UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ENGENHARIA - CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

# Diversidade genética, sistema de reprodução e fluxo de pólen e sementes em uma população fragmentada de *Myracrodruon urundeuva* (F.F. & M.F. Allemão) para fins de conservação genética

**ANA PAULA SILVA CAMPOS GAINO**

**Ilha Solteira, SP**
**2009**

# Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

**ANA PAULA SILVA CAMPOS GAINO**

# Diversidade genética, sistema de reprodução e fluxo de pólen e sementes em uma população fragmentada de *Myracrodruon urundeuva* (F.F. & M.F. Allemão) para fins de conservação genética

**ORIENTADOR: PROFESSOR DR. ALEXANDRE MAGNO SEBBENN**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia–Unesp, Campus de Ilha Solteira, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Sistemas de Produção.

**ILHA SOLTEIRA**
**São Paulo - Brasil**
**2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da UNESP - Ilha Solteira.

G142d

Gaino, Ana Paula Silva Campos.
Diversidade genética, sistema de reprodução e fluxo de pólen e sementes em uma população fragmentada de *Myracrodruon urundeuva* (F.F. & M.F. Allemão) para fins de conservação genética / Ana Paula Silva Campos Gaino. Ilha Solteira : [s.n.], 2009.
134 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção, 2009

Orientador: Alexandre Magno Sebbenn
Bibliografia: p. 110-134

1. Aroeira. 2. Essências florestais. 3. Microssatélites. 4. Diversidade genética. 5. Plantas – Genética molecular.

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** Diversidade genética, sistema de reprodução e fluxo de pólen e sementes em uma população fragmentada de Myracrodruon urundeuva (F.F. & M.F. Allemão) para fins de conservação genética

**AUTORA: ANA PAULA DA SILVA DE CAMPOS GAINO**
**ORIENTADOR: Prof. Dr. ALEXANDRE MAGNO SEBBENN**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em AGRONOMIA , Área: SISTEMAS DE PRODUÇÃO, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ALEXANDRE MAGNO SEBBENN
Instituto Florestal de São Paulo - Ifsp - Secret. do Meio Ambiente / Instituto de Botanica

Prof. Dr. MARIO LUIZ TEIXEIRA DE MORAES
Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. PEDRO CESAR DOS SANTOS
Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. RINALDO CESAR DE PAULA
Departamento de Producao Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. EDWIN CAMACHO PALOMINO
Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu

Data da realização: 30 de outubro de 2009.

# BIOGRAFIA

Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Estadual Paulista "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Ilha Solteira no ano de 2005. A obtenção do título de Mestre ocorreu em 2006, pela Universidade Estadual Paulista "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Ilha Solteira, na área de Fitopatologia. O curso de Pós-Graduação em nível de Doutorado foi realizado em Genética e Melhoramento de Espécies Florestais pela mesma instituição, com conclusão no ano de 2009.

*DEDICO....*

A Deus, nosso pai, minha força, eterna gratidão.

*AGRADEÇO....*

A família espiritual pela proteção, auxílio e a consciência de que a concretização de um sonho se faz com a união de um grupo de seres e não apenas pela vontade de um único indivíduo.

*OFEREÇO....*

Àqueles que amo, a quem tem minha admiração, meu céu, o meu chão, sorriso dos meus lábios, felicidade do meu coração, papai e mamãe (Ilton e Ivonete), vida (Ruberlei), minhas queridas irmãs (Fabiana e Alessandra).

# AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Sistema de Produção da Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Ilha Solteira, pela oportunidade da realização do curso de Doutorado.

A todos os docentes e funcionários desta unidade que contribuíram decisivamente para minha formação profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo, pelo apoio, financiamento ao projeto de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Doutorado.

Ao Prof. Dr. Alexandre Magno Sebbenn, pela orientação, confiança, amizade e pela sua dedicação em nos ensinar a genética das árvores.

Ao Prof. Dr. Mário Luiz Teixeira de Moraes pela oportunidade de trabalharmos juntos. Agradeço pelos ensinamentos, amizade e pela sua dedicação e preocupação com seus orientados.

Ao Prof. Dr. Miguel Luiz Menezes Freitas pela oportunidade, amizade e o apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha querida Selma Maria Bozzite de Moraes, técnica do laboratório de Genética de Populações e Silvicultura, pela amizade e carinho que me deu durante todo o período que trabalhamos juntas.

À Profa. Dra. Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva pela orientação, ensinamentos e auxílio nas análises utilizando marcadores microssatélites.

Aos pesquisadores do Laboratório de Genética Vegetal do Centro Nacional de Recursos Genéticos, CENARGEN/EMBRAPA, pela utilização de equipamentos e orientação durante o desenvolvimento das análises de microssatélites.

Aos técnicos Alexandre Marques da Silva, José Cambuim, Alonso A. da Silva e Manoel F. R. Bonfim da Fazenda de Ensino e Pesquisa da UNESP, Campus de Ilha Solteira, e aos técnicos Aparecido D. T. Maia, Adalto R. Souza, Dirceu A. Machado, Josimar D. Lima, Valdereci F. Meireles do Instituto Florestal, pelo apoio na coleta do material vegetal na Estação Ecológica de Paulo de Faria.

Aos funcionários da Biblioteca e Seção de Pós-graduação da FEIS - UNESP. Em especial ao João, Cristina, Adelaide e Onilda.

Aos colegas do Laboratório de Genética de Populações e Silvicultura, Janete, Patrícia, Ana Cristina, Juliana, Laila, Cecília, Ricardo, Marcela, Juliana Lourenção, Eriquinha e Taísa. Agradeço em especial a Juliana e a Laila pelos anos de convívio e pelas trocas de experiência pessoais e profissionais e a Janete e Patrícia pela amizade, companheirismo e apoio nos momentos difíceis.

Ao meu querido Vovô Carlinho (*in memorian*), pela luz que me protege e por acreditar que eu e a Bibi fôssemos capazes de chegar até aqui.

Aos meus sogros Darci e Jair Gaino pelo amor, compreensão e carinhos que tem para comigo. Agradeço ao Jair pelas preces feitas todos os dias e os ensinamentos da Darci.

À querida amiga D. Judite, exemplo de sabedoria, que por meio de seus valiosos conselhos e preces nos indica o caminho para nos tornamos indivíduos melhores.

À minha irmã de sangue e coração que sempre esteve ao meu lado e aceitou ser minha companheira de estrada durante todo o percurso deste caminho, desde a graduação até o doutorado. Agradeço a você minha irmã Fabiana.

Ao meu amor Ruberlei por transformar a minha vida e estar presente em todos os minutos e segundos me apoiando, ensinando e facilitando o meu caminho.

Aos meus queridos pais Ilton e Ivonete, à minha irmã Alessandra por todo o amor e carinho dedicado a mim, para que eu pudesse alcançar todos os meus objetivos pessoais e profissionais.

Enfim, agradeço a todos aqueles que contribuíram para a concretização deste sonho.

*"Existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".*

***Autor desconhecido.***

*"A ambição é o puro senso de dever, pois a si só não produz frutos realmente importantes para a pessoa humana, pelo contrário os frutos verdadeiros derivam do amor e da dedicação para com as pessoas e as coisas."*

***Albert Einstein***

# RESUMO

Os objetivos deste estudo foram investigar por locos microssatélites, a diversidade genética, o sistema de reprodução, a distribuição espacial de genótipos, a distância e os padrões de dispersão de pólen e sementes, e a dinâmica da endogamia entre gerações, em uma população fragmentada da espécie arbórea dióica *Myracrodruon urundeuva* (F.F. & M.F. Allemão). O estudo foi conduzido na Estação Ecológica de Paulo de Faria (435,73 ha), onde a população da espécie em estudo ocupa uma área aproximada de 142 ha. Todas as 467 árvores adultas encontradas foram amostradas, tiveram o diâmetro à altura do peito (DAP a 1,3 m) medido e foram mapeadas. Adicionalmente amostraram-se 149 regenerantes e 514 progênies de polinização aberta, coletadas de 30 árvores matrizes da população. Sobre a amostra total de cinco locos em 1130 genótipos (adultos + regeneração + progênies) foram observados 60 alelos, o que sugere um nível de polimorfismo relativamente alto. O número de alelos por loco variou de 7 a 25, com média de 12 alelos por loco. A heterozigosidade esperada média em equilíbrio de Hardy-Weinberg foi de 0,662, enquanto que a heterozigosidade observada foi de 0,713. O índice de fixação variou de -0,348 a 0,215 entre locos, com média de -0,076, sugerindo excesso de heterozigotos. A análise da distribuição espacial dos genótipos indicou a presença de estrutura genética espacial (EGE) na população adulta até aproximadamente 40 m e nos regenerantes até aproximadamente 30 m. Foram detectados cruzamentos entre parentes, pela diferença entre a unidade e a taxa de cruzamento uniloco ($1-t_s$=0,019, $P$<0,05). A estimativa da correlação de paternidade ($r_{p(m)}$) indicou que as progênies são compostas por misturas de meios-irmãos e irmãos-completos, embora estes últimos em menor proporção (média de 0,158). O coeficiente de coancestria ($\Theta_{xy}$) dentro das progênies foi maior do que o esperado em progênies de meios-irmãos ($\Theta_{xy}$=0,125), com média populacional de 0,150. O tamanho efetivo de variância ($N_e$) dentro das progênies variou de 2,74 a 3, com média populacional de 2,98. Os cálculos indicam, portanto, que para se obterem lotes de sementes com tamanho efetivo de 150, é necessário coletar sementes de pelo menos 50 árvores matrizes. A diferenciação no conjunto de pólen ($\Phi_{ft}$) recebido pelas diferentes árvores matrizes amostradas foi de 0,075. A árvore materna foi encontrada dentro do fragmento para todos 149 regenerantes amostrados, o que indica ausência de imigração de sementes. Já a árvore paterna foi encontrada para 145 (97,3%) dos 149 regenerantes e para 507 (99%) das 514 progênies de polinização aberta, indicando baixa taxa de imigração de pólen. O pólen foi

disperso dentro da população a distâncias relativamente grandes, variando para os regenerantes de 3,0 a 903 m (mediana de 62 m) e para as progênies de 3,1 a 890,5 m (mediana de 191,7 m). Aproximadamente 50% dos pólens das progênies e 70% dos pólens dos regenerantes foram transportados por menos de 200 m. A comparação da curva de frequência de dispersão de pólen medida nas progênies e a curva de frequência de distância entre as árvores masculinas e as 29 árvores matrizes, permitiu rejeitar a hipótese de cruzamentos aleatórios na população (teste de Kolmogorov-Smirnov´s: $D = 0{,}224$, $P = 0{,}00067$). Igualmente a diferença entre as distâncias da curva de dispersão de pólen medida nos regenerantes e a curva de distância entre todos os machos e todas as fêmeas foi significativa ($D = 0{,}713$, $P = 0{,}0000$). Estes resultados indicam que a distância das árvores masculinas em relação às árvores matrizes não explica o padrão de cruzamento observado. A análise dos regenerantes mostrou curta distância de dispersão de sementes, a qual variou de 0,8 a 739 m, com mediana de 62 m. Aproximadamente 68% das sementes desenvolviam dentro de um raio de 100 m da árvore maternal. O tamanho efetivo da população reprodutiva indicou que as 467 árvores adultas correspondem a apenas 335 indivíduos não parentes e endogâmicos ($N_e / N = 0{,}76$). Os resultados, em termos gerais, mostram alto grau de isolamento reprodutivo da população, ausência de imigração de sementes, estrutura genética espacial intrapopulacional, desvios de cruzamentos aleatórios, dispersão de pólen e sementes em alta frequência a curtas distâncias e que o tamanho efetivo da população é menor do que o número de indivíduos que a compõe. As implicações destes resultados são discutidas em termos de conservação genética.

**Palavras-chaves:** *Myracrodruon urundeuva.* Espécies arbóreas tropicais. Diversidade genética. Sistema de reprodução. Microssatélites. Dispersão de pólen. Dispersão de sementes.

# ABSTRACT

The aims of this study were to investigate for microsatellites loci the genetic diversity, mating system, the intrapopulational spatial genetic structure, the distance and patterns of pollen dispersal, and the dynamics of inbreeding among generations, in a fragmented population of the dioicious tropical tree *Myracrodruon urundeuva* (F.F. & M.F. Allemão). The study was carried out in the Paulo de Faria Ecological Station (435.73 ha), where the studied population occupies about 142 ha. All 467 adult trees found in the stand were sampled, have the diameter at breast height (D.B.H of 1.3 m) measured and were mapped. Additionally 149 juveniles and 514 open-pollinated offspring from 30 seed-trees were sampled in the population. On the total of five loci sampled in 1135 genotypes (adults + juveniles + offspring), 60 alelos were detected, suggesting a relative high level of polimorphis. The number of alleles per locus ranged from 7 to 25 alleles, with average of 12 alleles. The average expected heterozygositys in Hardy-Weinberg equilibrium was of 0.662, were the average observed heterozygosity was of 0.713. The fixation index ranged among locus from -0.348 to 0.215, with average of -0.076, suggesting excess of heterozygous. The analysis of the intra-population spatial genetic structure (SGS) detected the presence of SGS in adults until about 40 m and in juveniles until about 30 m. Mating among relatives were also detected by the difference between the unit and the single-locus outcrossing rate ($1-t_s$=0.019; $P$<0.5). The paternity correlation ($r_{p(m)}$) indicated that the offspring were composed by mixtures of half-sibs and full-sibs, where the last one occurred in low frequency (average of 0.158). The coancestry coefficient ($\Theta_{xy}$) within families was larger than expected in half-sibs ($\Theta_{xy}$=0.125), with population average of 0.150. The variance effective population size ($N_e$) within families ranged from 2.74 to 3.0, with average of 2.98. The calculations indicate, therefore, that for to obtain seed lots with the effective population size size of 150, is necessary to collect seeds from at least 50 seed-trees. The pollen gene pool differentiation among seed-trees ($\Phi_{ft}$) was 0.075. The mother-tree was found inside of the fragment for all 149 juveniles, indicating absence of seed immigration. The paternal trees was found for 145 (97.3%) of the 149 sampled juveniles and for 514 of the 507 offspring (99%), indicating a low pollen immigration rate in the stand. The pollen was dispersed inside of the population at distances relatively large, ranging for juveniles from 3.0 to 903 m (with median of 62 m) and

for offspring ranging from 3.1 to 890.5 m (with median of 191.7 m). About 50% of the pollen of the seeds and 70% of the pollen of the juvenile ones were transported for less than 200 m. The comparison of the frequency curve of pollen dispersal measured in offspring with the frequency curve of distance among all male trees and seed-trees rejected the hypothesis of random mating in the population (Kolmogorov-Smirnov´s test: $D = 0.224$, $P = 0.00067$). Similary, the frequency curve of pollen dispersal measured in juveniles and between all male trees and all female trees also reject the hypothesis of random mating in the population ($D = 0.713$, $P = 0.0000$). These results show that distance among the trees in the population not explain the observed patterns of pollen dispersal. In the juveniles, the distance of pollen dipesal ranged from 0.8 to 739 m, with median of 62 m. About 68% of the seed growth within 100 m of the radius of the mother-tree.The estimates of the effective population size indicated that the 467 trees correspond to only 335 individuals nor inbred and not relatives ($N_e / N = 0.76$). The results, in general terms, showed a very high level of reproductive isolation, absence of seed immigration, intra-population spatial genetic structure, deviation of random mating, short pollen and seed dispersal and that the effective population size is lower than the size of the population. The implications of the results are discussed in terms of conservation genetics.

**Key words:** *Myracrodruon urundeuva.* Tropical tree species. Genetic diversity. Mating system. Microsatellite. pollen dispersion. Dispersion of seeds.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES


**Figura 1** Fotos ilustrativas destacando características morfológicas da espécie dióica *M. urundeuva*. (A) árvore; (B) tronco; (C) folhas; (D) inflorescência; (E) frutos (Fotos: Lorenzi, 1992; Fernando Tatagiba)..... 39

**Figura 2** Vegetação da Estação Ecológica de Paulo de Faria (A); Árvore Matriz de Aroeira (B) (Fotos de Mário L. T. de Moraes); Imagem de satélite mostrando a área da Estação Ecológica (C)..... 43

**Figura 3** Distribuição espacial de árvores adultas, regenerantes e das matrizes de *M. urundeuva* na Estação Ecológica de Paulo de Faria..... 46

**Figura 4** Distribuição de frequências para o diâmetro a altura do peito (DAP=D.b.h.) de *M. urundeuva* na Estação Ecológica de Paulo de Faria, SP..... 46

**Figura 5** Teste de progênie de Aroeira (A) (Foto de Marcela A. de Moraes); Imagem de satélite mostrando a disposição do teste de progênie na Fazenda da UNESP campus de Ilha Solteira (B); Imagem de satélite da Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP (C)..... 47

**Figura 6** Comportamento do índice de fixação entre diferentes gerações de uma população de *M. urundeuva* na Estação Ecológica de Paulo de Faria, SP..... 57

**Figura 7** Distribuição espacial de genótipos adultos e regenerantes separadamente em população natural de *Myracrodruon urundeuva*. A linha contínua representa o valor médio do coeficiente de coancestria e as duas pontilhadas representam o intervalo de confiança a 95% de probabilidade..... 59

**Figura 8** Localização geográfica da área de coleta do material biológico de indivíduos adultos, regenerantes e germoplasma de árvores matrizes de *M. urundeuva*..... 71

**Figura 9** Imagem de satélite mostrando a distribuição de indivíduos machos, fêmeas e não identificados da população de *M. urundeuva* na Estação Ecológica de Paulo de Faria, SP..... 72

**Figura 10** Relação entre a matriz de diferenciação entre o pólen recebido pelas diferentes árvores maternas e pelo logaritmo da distância entre estas árvores matrizes..... 92

**Figura 11** Número de filhos gerados por cada genitor determinado como pai das sementes de *M. urundeuva*..... 95

**Figura 12** Distância de dispersão de pólen estimada nas progênies que tiveram o pai determinado dentro da área e curva de regressão exponencial, com respectiva função e coeficiente de determinação ($r^2$). a) Dispersão de pólen medida nas progênies; b) Dispersão de pólen medida nos regenerantes..... 97

**Figura 13** Frequência de distância na dispersão efetiva de pólen e frequência de distância entre as árvores masculinas e as árvores matrizes de *M. urundeuva*. a) Dispersão de pólen medida nas progênies; b) Dispersão de pólen medida nos regenerantes..... 98

**Figura 14** Dispersão e relação entre o diâmetro a altura do peito (DAP) das árvores masculinas determinadas como pai das sementes e número de descendentes gerados por cada parental paterno em população de *M. urundeuva*..... 99

**Figura 15** Distância de dispersão de sementes estimada na regeneração que tiveram a mãe determinado dentro da área e curva de regressão exponencial, com respectiva função e coeficiente de determinação ($r^2$). a) Frequência de dispersão de sementes até a distância de 900 m; b) Frequência de dispersão de sementes até a distância de 150 m..... 100

**Figura 16** Número de filhos gerados por cada árvore fêmea determinada como mãe dos regenerantes de *M. urundeuva*..... 100

**Figura 17** Distância de dispersão de sementes estimada na regeneração em relação ao pai determinado dentro da área e curva de regressão exponencial, com respectiva função e coeficiente de determinação ($r^2$)..... 101

# LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** Algumas espécies que ocorrem na Estação Ecológica de Paulo de Faria: classificação por Família botânica (Fonte: STRANGHETTI, 1996)..... 44

**Tabela 2** Sequências, temperatura de anelamento e marcação com fluoróforo dos Primers SSR desenvolvidos por Caetano et al. (2005), utilizados nos estudos genéticos da espécie *Myracrodruon urundeuva*..... 49

**Tabela 3** Desequilíbrio de ligação entre os locos. Os valores na tabela são as probabilidades após 1000 permutações. O valor limite de significância após correção de Bonferroni é 0,0017..... 53

**Tabela 4** Índices de diversidade genética para a amostra total de *Myracrodruon urundeuva*. *k* é o número total de alelos; $A_e$ é o número efetivo de alelos nos locos; $H_o$ é a heterozigosidade observada; $H_e$ é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; $F$ é o índice de fixação..... 55

**Tabela 5** Índices de diversidade genética e índice de fixação para árvores adultas, regenerantes e progênies de *Myracrodruon urundeuva*. *k* é o número total de alelos; $A_e$ é o número efetivo de alelos nos locos; $H_e$ é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; $H_o$ é a heterozigosidade observada; $F$ é o índice de fixação; $P_{1^o\ Parente}$ e $P_{2^o\ Parente}$ são respectivamente as probabilidades de excluir o primeiro parente (quando um dos parentes é conhecido) e o segundo parentes (quando nenhum dos parentes são conhecidos)..... 56

**Tabela 6** Diferenciação genética entre três gerações de *Myracrodruon urundeuva* com base na estatística $G_{ST}$`(Hedrick 2005)..... 58

**Tabela 7** Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução em uma população de *Myracrodruon urundeuva*. $t_m$ é a taxa de cruzamento multilocos; $t_s$ é a taxa de cruzamento unilocos; $t_m - t_s$ é a taxa de cruzamento entre parentes; $r_{p(m)}$ é correlação multilocos de paternidade; $r_{p(s)} - r_{p(m)}$ mede a ocorrência de parentesco entre as polinizadoras efetivas; $1/\hat{r}_p$ é o número efetivo de pais polizadores; $\Theta_{xy}$ é a coancestria dentro de progênies; $N_{e(v)}$ é o tamanho efetivo da progênie; média ± erro padrão da média 95% de probabilidade..... 75

**Tabela 8** Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução em uma população de *Myracrodruon urundeuva*..... 76

**Tabela 9** Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução em uma população de *Myracrodruon urundeuva*..... 91

**Tabela 10** Estimativa do fluxo de pólen dentro de uma população de *Myracrodruon urundeuva*. *m* é a taxa de imigração; $r_p$ é correlação de paternidade; $N_{ep}$ é o número efetivo de árvores polinizadoras; $\Theta_{xy}$ é a coancestria dentro de progênies; $N_e$ é o tamanho efetivo da progênie; $\delta$ é a distância de dispersão de pólen (média ± desvio padrão da média); $A_{ep}$ é a área de vizinhança de polinização; $t_{parentes}$ é a taxa de cruzamento entre parentes..... 94

# SUMÁRIO


**1 INTRODUÇÃO..... 21**

1.1 OBJETIVOS…….. 23

**1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 23**

1.2 HIPOTESES…….. 24

**2 REVISÃO DE LITERATURA……... 25**

2.1 A FRAGMENTAÇÃO DAS FLORESTAS DO ESTADO DE SÃO PAULO..... 25

2.2 EFEITOS GENÉTICOS DA FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS..... 26

2.3 FLUXO GÊNICO..... 29

2.4 ESTUDO DE FLUXO GÊNICO POR MARCADORES E ANÁLISE DE PATERNIDADE..... 33

2.5 EMPREGO DE MARCADORES MOLECULARES NO ESTUDO DE ESPÉCIES FLORESTAIS..... 34

2.6 A ESPÉCIE *MYRACRODRUON URUNDEUVA* (F.F. & M.F. Allemão)..... 37

**3 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL INTRAPOPULACIONAL EM POPULAÇÃO FRAGMENTADA DE *MYRACRODRUON URUNDEUVA* (F.F. & M.F. ALLEMÃO)..... 40**

3.1 INTRODUÇÃO..... 41

3.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 42

***3.2.1 Local de estudo..... 42***

***3.2.2 Estratégia de amostragem..... 45***

***3.2.3 Coleta e identificação de material biológico para extração do DNA genômico..... 47***

***3.2.4*** ***Extração e quantificação do DNA*** ..... ***48***

***3.2.5*** ***Marcadores Microssatélites*** ..... ***49***

*3.2.5.1* *Otimização das condições da reação em cadeia da polimerase (PCR)* ..... *49*

*3.2.5.2* *Amplificação dos locos SSR* ..... *50*

***3.2.6*** ***Análises estatísticas*** ..... ***51***

*3.2.6.1* *Análise da diversidade genética e índice de fixação* ..... *51*

*3.2.6.2* *Análise da diferenciação genética entre gerações* ..... *52*

*3.2.6.3* *Análise da distribuição espacial dos genótipos* ..... *52*

3.3 RESULTADOS ..... 53

***3.3.1*** ***Desequilíbrio de ligação entre locos*** ..... ***53***

***3.3.2*** ***Diversidade genética na amostra total*** ..... ***54***

***3.3.3*** ***Diversidade genética entre gerações*** ..... ***55***

***3.3.4*** ***Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg*** ..... ***57***

***3.3.5*** ***Divergência genética entre diferentes gerações*** ..... ***58***

***3.3.6*** ***Distribuição espacial de genótipos*** ..... ***58***

3.4 DISCUSSÃO ..... 59

***3.4.1*** ***Diversidade genética e índice de fixação na amostra total*** ..... ***59***

***3.4.2*** ***Diversidade genética entre as diferentes gerações*** ..... ***61***

***3.4.3*** ***Diferenciação genética entre gerações*** ..... ***64***

***3.4.4*** ***Distribuição espacial de genótipos*** ..... ***65***

3.5 CONCLUSÕES ..... 66

**4 SISTEMA DE REPRODUÇÃO DE *MYRACRODRUON URUNDEUVA* (F.F. & M.F. ALLEMÃO): SUBSÍDIO PARA A SELEÇÃO DE ÁRVORES MATRIZES PARA A RECUPERAÇÃO AMBIENTAL** ..... **67**

4.1 INTRODUÇÃO ..... 68

4.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 70

***4.2.1*** ***Coleta do material biológico e análise do DNA genômico..... 70***

***4.2.2*** ***Análise dos dados..... 72***

*4.2.2.1 Sistema de cruzamento..... 72*

4.3 RESULTADOS..... 74

***4.3.1*** ***Sistema de reprodução..... 74***

4.4 DISCUSSÃO..... 77

***4.4.1*** ***Taxa de cruzamento multiloco e uniloco..... 77***

***4.4.2*** ***Taxa de cruzamento entre parentes..... 77***

***4.4.3*** ***Taxa de cruzamentos correlacionados..... 78***

***4.4.4*** ***Número efetivo de doadores de pólen..... 80***

***4.4.5*** ***Coeficiente de coancestria e tamanho efetivo de variância..... 80***

4.5 CONCLUSÕES..... 81

**5 FLUXO DE PÓLEN E SEMENTES DE UMA POPULAÇÃO FRAGMENTADA DE *MYRACRODRUON URUNDEUVA* (F.F. & M.F. ALLEMÃO): IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO GENÉTICA E MARCAÇÃO DE ÁRVORES-MATRIZES PARA A COLETA DE SEMENTES..... 82**

5.1 INTRODUÇÃO..... 83

5.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 85

***5.2.1*** ***Local de estudo, coleta do material biológico e análise do DNA genômico 85***

***5.2.2*** ***Análise dos dados..... 87***

*5.2.2.1 Fluxo de pólen e semente..... 87*

*5.2.2.2 Número efetivo de doadores de pólen, coancestria, tamanho efetivo e área efetiva de polinização..... 88*

*5.2.2.3 Diferenciação no conjunto de pólen..... 88*

5.3 RESULTADOS..... 90

*5.3.1* ***Heterogeneidade no conjunto do pólen cruzado*** ..... ***90***

*5.3.2* ***Fluxo gênico crítico*** ..... ***93***

*5.3.3* ***Análise de paternidade nas progênies*** ..... ***93***

*5.3.4* ***Análise de paternidade nos regenerantes*** ..... ***95***

*5.3.5* ***Distância de dispersão do pólen medido nas progênies e regenerantes*** ..... ***96***

*5.3.6* ***Correlação entre DAP dos pais e número de filhos gerados*** ..... ***98***

*5.3.7* ***Distância do fluxo gênico realizado via sementes (regenerantes)*** ..... ***99***

*5.3.8* ***Área de vizinhança efetiva de polinização*** ..... ***101***

*5.3.9* ***Coancestria e tamanho efetivo da população reprodutiva*** ..... ***102***

**5.4** DISCUSSÃO ..... 102

5.4.1 ***Isolamento do Fragmento*** ..... ***102***

5.4.2 ***A dispersão de sementes e pólen*** ..... ***104***

5.4.3 ***Coeficiente de coancestria e tamanho efetivo da população*** ..... ***105***

5.4.4 ***Implicações para a conservação genética e coleta de sementes no reflorestamento ambiental da espécie*** ..... ***106***

**5.5** CONCLUSÕES ..... 108

**REFERÊNCIAS** ..... **110**

# 1 INTRODUÇÃO

A conservação da biodiversidade representa um dos maiores desafios da atualidade, em função do elevado nível de perturbações antrópicas que tem culminado na fragmentação dos sistemas naturais dos ecossistemas tropicais. Rico em diversidade de espécies e na complexidade ecológica (LAURANCE et al., 1997; WHITMORE, 1997), os ecossistemas tropicais retem metade do número de espécies mundiais em somente 7% da área do planeta e, apesar de sua importância biológica, sua vegetação vem sendo amplamente desmatada, fragmentada, queimada, suas madeiras exploradas e seus animais caçados em taxas alarmantes (FLEURY, 2003; WILSOM, 2001).

Presente em todas as etapas da ocupação territorial no país, desde as mais antigas, na Mata Atlântica nordestina, até as atuais nas áreas de cerrado do Centro-Oeste e nas florestas úmidas da Amazônia, a fragmentação florestal é um fenômeno grave, resultante do processo de expansão da fronteira agrícola no Brasil (VIANA et al., 1992). As implicações diretas da fragmentação sobre a biodiversidade são muitas. No entanto, algumas têm efeitos devastadores como a redução do tamanho dos ecossistemas e a extinção local de espécies. Como consequência, tem-se o comprometimento evolutivo das populações das espécies remanescentes, em função da perda de diversidade genética, que é a matéria prima responsável pela capacidade das populações se adaptarem às mudanças ambientais (SILVA, 2006).

A espécie arbórea tropical *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão, conhecida vulgarmente por aroeira, além de apresentar importante papel ecológico nos ecossistemas em que se encontra, possui relevante importância econômica devido à produção de madeira de alta qualidade, como, por exemplo, madeira de alta densidade e imputrescível. Entretanto, a ação do homem, ao longo dos anos, tem promovido a destruição de suas populações naturais, reduzindo-as a pequenas manchas espalhadas e isoladas pelo país. Como consequência, atualmente, essa espécie é pouco presente na região centro-sul do Brasil, especialmente no Estado de São Paulo onde não é mais possível encontrá-la em grandes proporções em seu estado silvestre, a não ser em reservas estaduais e pequenas reservas particulares (MORAES et al., 2005).

Dessa forma, é premente a implantação de medidas efetivas de conservação da espécie. Um aspecto fundamental para o delineamento de estratégias de conservação é que o

mesmo seja subsidiado por informações a respeito da diversidade genética, endogamia, estrutura genética espacial intrapopulacional, sistema de reprodução e fluxo gênico entre populações remanescentes. Tais informações também servem como ponto de partida para o melhoramento genético e para a exploração florestal sustentada da espécie.

O incentivo a programas de conservação genética de determinadas espécies com risco de extinção, como o caso do *M. urundeuva* é de vital importância. A exposição de espécies arbóreas, a condições extremas de exploração e manejo inadequados pode levá-las à perda da diversidade genética, aumento da endogamia e consequentemente a depressão endogâmica. A consequência da perda de diversidade genética para uma espécie significa a redução no número de locus heterozigotos e perda de alelos nas populações e consequente redução na capacidade adaptativa. A depressão endogâmica, em condições adversas, promove a redução da sobrevivência de indivíduos inaptos e a geração de indivíduos de baixa fecundidade (AMOS; BALMFORD, 2001). A conservação dos recursos genéticos, mesmo para aquelas populações que estão fora da lista de espécies ameaçadas de extinção, é fundamental para as futuras gerações, no que diz respeito ao melhoramento da espécie e aproveitamento de genes específicos de interesse econômico (FREITAS et al., 2006).

Programas de conservação genética para espécies arbóreas têm procurado dar ênfase à determinação dos níveis de diversidade genética mantidos dentro e entre populações, como forma de planejar o uso sustentável e a conservação *in situ*. Esse tipo de conservação é considerado ideal para as espécies arbóreas tropicais, visto que permite conservar não só a população alvo, mas também populações de outros organismos que vivem em mesmo ambiente (GIUDICE NETO et al., 2005). Outra forma de conservação é a *ex situ*, uma forma complementar da *in situ*, e que deve ser adotada quando a *in situ* é insuficiente para que uma espécie ou população de interesse não seja extinta. Não há hierarquia entre as formas de conservação *in situ* e *ex situ*. Em algumas situações a conservação *ex situ* é essencial e complementar à *in situ*, principalmente em espécies raras, em risco de extinção (KAGEYAMA, 1987). Porém, a utilização exclusiva da conservação *ex situ* tem contribuído decisivamente para a sobrevivência de populações de espécies florestais que estão sendo fragmentadas (VALOIS, et al., 2001). Dentro deste contexto, nos últimos anos, vários estudos de genética de populações de espécies arbóreas têm sido realizados, inclusive para *M. urundeuva* (FREITAS et al., 2005; FREITAS et al., 2006 ; MORAES, 1992; MORAES et al., 2005) com o objetivo de oferecer subsídios para programas de conservação *in situ*, *ex situ* e melhoramento genético.

## 1.1 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram investigar a diversidade genética, o sistema de cruzamento, a distribuição espacial intrapopulacional de genótipos, o fluxo contemporâneo de pólen e sementes e a dinâmica da endogamia entre gerações em uma população natural de *M. urundeuva*, na Estação Ecológica de Paulo de Farias, estado de São Paulo, usando cinco locos microssatélites.

### 1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar e comparar os níveis de diversidade genética entre diferentes gerações de uma população fragmentada da espécie;

2. Estudar a distribuição espacial intrapopulacional dos genótipos adultos e regenerantes da população;

3. Verificar os níveis de endogamia em diferentes fases ontogênicas (adultos, regenerantes e progênies);

4. Estimar parâmetros do sistema de reprodução, como taxas de autofecundação, taxas de cruzamento, cruzamento entre parentes, tamanho efetivo de vizinhança reprodutiva e cruzamentos correlacionados;

5. Determinar a distância e os padrões de dispersão de pólen e sementes dentro do fragmento da Estação Ecológica, usando análise de paternidade;

6. Quantificar o tamanho efetivo das árvores adultas, regenerantes e progênies e determinar o número de árvores matrizes para a coleta de sementes para fins de conservação genética *ex situ*.

## 1.2 HIPÓTESES

Em detrimento de algumas questões abordadas sobre a biologia da espécie arbórea *M. urundeuva* as seguintes hipóteses foram testadas:

1. Árvores adultas e regenerantes de *M. urundeuva* ocorrem agrupadas na área da Estação Ecológica de Paulo de Faria, provavelmente devido à dispersão de sementes próximas às árvores matrizes, levando ao aparecimento de estrutura genética espacial intrapopulacional. Isto por sua vez, provavelmente causa a ocorrência de cruzamentos entre indivíduos parentes, gerando endogamia biparental nas gerações descendentes;

2. Os cruzamentos provavelmente ocorrem predominantemente entre indivíduos próximos, causando estruturação genética no conjunto de pólen recebido por árvores localizadas espacialmente distantes dentro da população e, consequentemente, a área de vizinhança reprodutiva de polinização deve ser pequena;

3. Considerando que não existem populações da espécie próximas ao fragmento estudado, acredita-se que a presente população está isolada para a imigração de pólen e sementes;

4. Como a seleção natural é um fato em espécies arbóreas, acredita-se que os níveis de endogamia medidos em termos de índice de fixação sejam maiores na fase de sementes, seguido pela fase de plântulas e finalmente menores ou ausentes na fase adulta, devido a eliminação de genótipos endogâmicos.

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 A FRAGMENTAÇÃO DAS FLORESTAS DO ESTADO DE SÃO PAULO

O histórico da degradação das florestas do estado de São Paulo não foi diferente do que ocorreu com o restante do país, coberto por matas semidecíduas e cerrados. Atualmente o que se observa é uma rede de fragmentos descontínuos na vegetação de cerrado e Mata atlântica, circundados por diferentes culturas e pastagens (FERES, 2009). A ocupação sem planejamento, o cultivo de espécies agrícolas como o café, que no passado foi um dos principais produtos de exportação brasileiro, o desenvolvimento da pecuária e a expansão da área de cana-de-acúçar com o Pró-Álcool, foram alguns dos eventos que intensificaram a fragmentação do estado. Atualmente, com a crise mundial do petróleo e a procura por combustíveis alternativos incentivaram mais uma vez, o cultivo da cana-de-açúcar reduzindo ainda mais o tamanho e o número dos fragmentos paulistas. Dentre os fatores citados anteriormente, não se pode deixar de mencionar também as atividades de expansão das empresas de reflorestamento comercial, que hoje podem oferecer riscos para algumas regiões, principalmente aquelas com remanescentes do cerrado. O bioma do cerrado dentre as unidades de gerenciamento de recursos hídricos estudadas no estado foi o que sofreu redução mais drástica entre os períodos de 1962 a 2001, equivalente a 1,57 milhões de hectares. Além da perda em extensão, essas áreas encontram-se extremamente fragmentadas (KRONKA et al., 2005). Conforme um levantamento recente de Kronka et al. (2005), as áreas com vegetação natural no Estado de São Paulo vêm sofrendo reduções sucessivas ao longo dos anos. Na década de 60, o estado paulista possuía uma área de 7,26 milhões de hectares de cobertura vegetal (29,3%), nos anos 70 essa área havia sido reduzida para 4,39 milhões de hectares (17,7%), e em 90 a área total de vegetação natural era de 3,33 milhões de hectares (13,43%). No último levantamento realizado nos anos 2000 e 2001, observou-se que a área de cobertura vegetal foi superior ao verificado no levantamento anterior (década de 90). De acordo com esse estudo acredita-se área de cobertura vegetal remanescente do estado para a década de 2000, correspondem a 3,46 milhões de hectares, ou seja, restam apenas 13,9% da vegetação natural.

A fragmentação pode modificar a história evolutiva de populações naturais, alterar a dinâmica dos ecossistemas e comprometer a sobrevivência de diferentes espécies arbóreas no longo prazo. Portanto, a implantação de medidas efetivas de conservação deve ser premente para a recuperação e manutenção dos escassos fragmentos de vegetação natural do estado.

## 2.2 EFEITOS GENÉTICOS DA FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS

A fragmentação de habitats é definida como o processo pelo qual uma extensa área de cobertura vegetal natural sofre uma separação artificial, transformando-se em pequenas manchas isoladas e de tamanho reduzido, que são envolvidos por uma matriz altamente modificada ou degradada, que pode ser constituída por culturas agrícolas ou outro tipo de atividade (ISHIHATA, 1999). Nesse tipo de processo não estão inclusos apenas a divisão dos habitats e a redução significativa da área (FAHRIG, 2003). Geralmente, a fragmentação está associada a uma série de outras intervenções, tais como a extração de espécies madeireiras de interesse econômico, queimadas, implantação de vegetação exótica, exaustão do solo, assoreamento das bacias hídricas, caça, entre outros, contribuindo decisivamente para a perda da biodiversidade (LAURANCE et al., 2002; TABARELLI et al., 2004).

A fragmentação não é originária exclusivamente da ação antrópica, eventos naturais como montanhas, lagos e outras formações vegetativas são capazes de diminuir, significativamente, o fluxo de animais, pólen e/ou sementes (VIANA, 1990). No entanto, a fragmentação promovida pelo homem tem efeitos devastadores e ocorrem em um curto espaço de tempo, agindo de forma drástica sobre todo o ecossistema pré-existente. Muitas vezes, as alterações são tão profundas que algumas comunidades não conseguem se reorganizar e acabam por se extinguir.

A redução das florestas e a fragmentação florestal são duas das principais ameaças às populações naturais de espécies arbóreas tropicais (YOUNG; BOYLE, 2000b). Vários estudos detectaram que a redução do habitat natural e subsequente isolamento espacial das populações têm consequências negativas sobre o sucesso reprodutivo, fluxo gênico, tamanho efetivo populacional, endogamia e diversidade genética das espécies arbóreas tropicais (AGUILAR et al., 2008; BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; FREITAS et al., 2006; HAMRICK, 2004; JUMP; PENUELAS, 2006; KRAEMER et al., 2008; SEOANE et al.,

2000). A fragmentação contribui ainda para a erosão genética e aumento da divergência entre populações, através de eventos como aumento da deriva genética, aumento da endogamia, redução do fluxo gênico e aumento da probabilidade de extinção local (BALERONI, 2003; YOUNG; BOYLE, 2000b). Tais eventos têm implicações em relação à persistência das espécies. No curto prazo, a perda da heterozigose pode reduzir a aptidão individual da espécie, inviabilizando o remanescente populacional. No longo prazo, a redução da riqueza alélica deve limitar a habilidade das espécies a responderem às mudanças advindas da ação de forças seletivas (CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B., 1987; SEOANE et al., 2000).

Embora exista a dificuldade em se definir um padrão único e o sentido dos efeitos da fragmentação sobre as populações das espécies arbóreas, em virtude da ampla gama de estudos realizados com o tema (BERNACCI et al., 2006; FAHRIG, 2003; RIES et al., 2004) os efeitos genéticos mais óbvios observados na fragmentação de um contínuo florestal são as diminuições da diversidade genética nas populações e espécies, as mudanças na estrutura genética populacional, as modificações no sistema de cruzamento, e alterações na composição dos agentes polinizadores ou mesmo, seu comportamento individual (AGUILAR et al., 2008; BALERONI, 2003; BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; DICK et al., 2003; JUMP; PENUELAS, 2006; KRAEMER et al., 2008; PRIMACK; RODRIGUES, 2001; YOUNG; BOYLE, 2000b). A fragmentação de habitats pode reduzir a diversidade genética de uma população de plantas por duas vias: redução do tamanho populacional e posterior deriva genética. A redução do tamanho populacional cria gargalos genéticos (“bottlenecks”), pois os indivíduos remanescentes contêm apenas uma pequena amostra do conjunto (*pool*) gênico original. Consequentemente, a pequena população remanescente, caso permaneça isolada por muitas gerações, terá contínua perda de alelos, redução na heterozigosidade e aumento do parentesco e endogamia, devido à deriva genética aleatória (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; WARD et al., 2005). A diversidade genética é de importância fundamental, para o potencial evolutivo de uma espécie, e determina suas chances de sobrevivência em longo prazo (FLEISHMAN et al., 2001; JONES et al., 2001). Trata-se da "matéria-prima" que possibilita as mudanças evolutivas de uma espécie (PITHER et al., 2003; MAMURIS et al., 2001). Populações com pouca diversidade genética podem ser incapazes de responder às mudanças ambientais (JONES et al., 2001; MATOCQ; VILLABLANCA, 2001; SHARMA, 2001; SHARMA et al., 2000; TANSLEY; BROWN, 2000). Mais especificamente, a perda da diversidade genética resulta em baixo potencial evolutivo (HOLSINGER; GOTTLIEB, 1991) e provoca a redução da adaptação (*fitness*), tanto do indivíduo quanto da população

(BOUZAT, 2001; KOPPITZ, 1999; MATOCQ; VILLABLANCA, 2001). A redução da diversidade genética pode conduzir uma espécie à extinção (BOUZAT, 2001; SHARMA, 2001; SHARMA et al., 2000), sendo, portanto, uma das principais ameaças à existência de uma espécie (JAGGI et al., 2000; TANSLEY; BROWN, 2000).

A estrutura genética das populações de plantas é resultado da combinação do sistema de reprodução da espécie e da ação de diversos fatores evolutivos como a deriva genética, seleção natural, divergência mutacional e recombinação genética (OUBORG et al., 1999). A distribuição espacial e temporal da diversidade genética em populações naturais é determinada principalmente pelos mecanismos de dispersão de pólen e sementes, e também pela sua distribuição geográfica (HAMRICK; GODT, 1996). A fragmentação do habitat afeta a reprodução das plantas dos remanescentes florestais e a magnitude do seu efeito está diretamente relacionado com a biologia da reprodução da espécie, especialmente as espécies polinizadas e dispersas por animais, como é o caso da maioria das espécies arbóreas tropicais (FUCHS et al., 2003; NASON; HAMRICK, 1997; TEMPLETON et al., 1990; YOUNG et al., 1996). As drásticas mudanças na geometria da paisagem tendem a afetar as interações entre plantas e animais e, consequentemente, a demografia e recrutamento de plantas (HOWE, 1984; JANZEN, 1983). A fragmentação pode afetar a densidade populacional de animais, a amplitude de flutuação das suas populações, as atividades dos polinizadores e o arranjo de forrageamento dos mesmos (PULLIAM, 1988; SHAFFER, 1981), atingindo potencialmente a polinização e o nível de produção de sementes nas plantas (JENNERSTEN, 1988; MENGES, 1991).

A reprodução das plantas também é afetada pelas mudanças no microclima devido à fragmentação, em resposta às alterações do vento, da insolação e da dessecação (SAUNDERS et al., 1991). Assim, as consequências genéticas da fragmentação sobre o sistema de reprodução de populações são alterações na taxa de fluxo gênico, refletindo diretamente na taxa de cruzamento por alterar o tamanho das populações das espécies, ou indiretamente, por influenciar a abundância ou comportamento dos agentes polinizadores (KARRON et al. 1995). Portanto, estas consequências tendem aumentar a frequência de autofecundação e cruzamentos endogâmicos nas populações remanescentes (ALDRICH; HAMRICK, 1998; CASCANTE et al., 2002; DICK et al., 2003; FUCHS et al., 2003; LOBO et al., 2005). O aumento da endogamia ou homozigosidade pode resultar em depressão endogâmica, sendo esta mais severa em espécies predominantemente de cruzamento que mantêm altos níveis de carga genética em suas populações (NASON; HAMRICK, 1997).

A baixa densidade populacional, presença de sistemas de auto-incompatibilidade e as consequentes altas taxas de cruzamento de muitas espécies arbóreas dos trópicos tornam-nas vulneráveis à fragmentação (CASCANTE et al., 2002). A fragmentação florestal isola indivíduos e populações, reduz a densidade populacional e o tamanho da vizinhança reprodutiva, podendo diminuir o fluxo de genes entre populações e aumentar a endogamia dentro das populações e, consequentemente, aumentando a diferenciação entre as populações remanescentes (BITTENCOURT; SEBBENN, 2009; JUMP; PENUELAS, 2006; YOUNG et al., 1996).

A conservação e o manejo da diversidade biológica nos ecossistemas naturais em processos de fragmentação e a restauração de ecossistemas fragmentados são desafios complexos que requerem conhecimento fundamental sobre a fitossociologia, dinâmica, biologia reprodutiva e a estrutura genética de suas populações. Informações sobre os sistemas de cruzamento, fluxo gênico e os níveis da variabilidade genética entre e dentro de populações são fundamentais para o delineamento de estratégias apropriadas de conservação *in situ* e *ex situ* de espécies arbóreas tropicais (ASINS; CARBONELL, 1987).

## 2.3 FLUXO GÊNICO

O Fluxo gênico é a troca da informação genética entre indivíduos, populações ou espécies. Em plantas, o fluxo gênico pode-se estabelecer pelo movimento de pólen ou sementes (BORÉM, 2002). É definido como sendo um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam na movimentação de alelos entre as populações (SLATKIN, 1985). De acordo com Levin e Kerster (1974), é uma medida da fertilização (pólen), ou estabelecimento de indivíduos férteis (sementes), em razão da distância percorrida da origem até o local onde a dispersão ocorreu. É um fator evolutivo que tem o efeito de homogeneizar a composição genética, de modo que se ele for o único fator atuante, todas as populações irão convergir para uma mesma frequência alélica (FUTUYMA, 1992).

Em espécies arbóreas a importância do fluxo gênico (via pólen e sementes) reside na sua influência sobre a estrutura genética e no tamanho efetivo das populações, determinando a natureza e o nível de diversidade genética, fazendo-se necessário sua consideração para o estabelecimento e manejo de reservas genéticas (ADAMS, 1992; DOW; ASHLEY, 1998;

SOUSA; HATTEMER, 2003). O fluxo gênico é considerado o mecanismo evolutivo com maior capacidade de manter a coesão genética de uma espécie (DICK et al., 2003). Em populações naturais o fluxo gênico intenso pode efetivamente contrapor os efeitos detrimentais da deriva genética ou seleção direcional e pode ser a origem de novos alelos nas populações (BURCZYK et al., 2004). Fatores microevolutivos como o fluxo gênico, deriva genética e a seleção natural ao longo do tempo atuam e se contrapõem entre si, determinando a genética das populações em espécies arbóreas. Durante todo o processo de evolução das populações, o fluxo gênico opera no sentido de homogeneizar a diversidade genética espacial. Por outro lado, fatores como a deriva genética, mutação e seleção natural apresentam um efeito oposto contribuindo para a divergência entre populações (HAMRICK; NASON, 2000; SLATKIN, 1987). A seleção natural favorece a adaptação a condições ambientais locais, provocando a diferenciação genética entre populações e a deriva genética provoca a fixação aleatória de diferentes alelos nas diferentes populações (SLATKIN, 1987).

Os fatores que afetam a reprodução e o fluxo gênico são particularmente determinantes da estrutura genética de populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Polinizadores como morcegos e beija-flores, devido à sua capacidade de vôo, promovem o aumento da variabilidade dentro de populações, enquanto diminuem a divergência entre populações ao mantê- las ligadas por fluxo gênico. Da mesma forma, sementes dispersas pelo vento promovem o deslocamento de alelos dentro da população e eventualmente entre populações. O limitado fluxo gênico mesmo dentro de populações pode levar à formação de pequenos grupos de indivíduos geneticamente mais similares, de modo que uma população pode ser constituída de várias subpopulações geneticamente diferenciadas (FISCHER et al., 2000).

De acordo com Hamrick e Loveless (1989), populações de espécies arbóreas que têm sua polinização realizada por animais que percorrem longas distâncias apresentam maior diversidade genética comparadas com aquelas polinizadas pelo vento ou por animais que percorrem curtas distâncias. Já a dispersão das sementes pelo vento ou por animais apresenta maior diversidade genética dentro das populações do que a dispersão pela gravidade, em que a deposição das sementes é realizada próxima à árvore mãe.

A fragmentação do habitat possui uma ação devastadora e em alguns casos intensificadora sobre os fatores evolutivos atuantes em uma determinada população. O tamanho efetivo e a diversidade genética dentro de populações diminuem, a diferenciação genética entre populações aumenta, afetando a viabilidade da população a curto e médio prazo (CASCANTE et al., 2002; YOUNG et al., 1996). Os efeitos da fragmentação são devidos

principalmente ao aumento do nível de endogamia e deriva genética nos remanescentes populacionais em pequenas áreas e com fluxo gênico reduzido entre fragmentos, como relatado para algumas espécies arbóreas tropicais (DAYANANDAN et al., 1999; FUCHS et al., 2003; WHITE et al., 1999).

Quando populações de plantas se encontram geneticamente isoladas, tornam-se vulneráveis à perda da diversidade genética o que é crítico à sua sobrevivência no longo prazo (SORK; SMOUSE, 2006). A fragmentação de habitat promove uma perda imediata de alelos que está associado com a redução no tamanho da população (BITTENCOURT; SEBBENN, 2009; JUMP; PENUELAS, 2006; WHITE et al., 1999). Porém, a longevidade de árvores, combinadas com sementes viáveis e dispersão de pólen, pode aumentar a resistência aos efeitos negativos da fragmentação florestal (HAMRICK, 2004; JUMP; PENUELAS, 2006). Assim, o elemento fundamental para predizer os efeitos da fragmentação é o nível de fluxo de genes (via pólen e semente) entre populações (HAMILTON, 1999; HAMRICK, 2004) e a caracterização da distribuição genética espacial dentro de vizinhanças reprodutivas.

Estudos de fluxo gênico com abordagens ecológicas têm mostrado que a distância de migração de pólen e sementes é espacialmente restrita (SLATKIN, 1985) e com pequena proporção dispersa a longas distâncias. Em relação à maioria das espécies florestais, o pólen é raramente transportado a distâncias maiores que 1000 m (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Sementes tendem a ser distribuídas próximas às árvores matrizes e raramente são levadas a distâncias maiores de 200 m (HOWE; SMALLWOOD, 1982; LEVIN, 1981). No entanto, recentemente com estudos baseados na utilização de marcadores genéticos do tipo isoenzimas, de marcadores altamente polimórficos como os microssatélites e o uso de análises estatísticas como a análise de paternidade e TWOGENER, têm comprovado que tanto o pólen como a semente pode mover-se a distâncias consideráveis dentro de populações e que o fluxo de genes dentro de populações é muitas vezes alto (APSIT et al., 2001; BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; BITTENCOURT; SEBBENN, 2008; CARNEIRO et al., 2007; CARNEIRO et al., 2009; DICK et al., 2003; DUNPHY et al., 2004; NASON et al., 1998; WHITE et al., 2002). Nason et al. (1998), estudando a estrutura reprodutiva de sete espécies arbóreas tropicais monóicas do gênero *Ficus* no Panamá, detectaram que o fluxo de pólen ocorria rotineiramente em distâncias variando de 5,8 a 14,2 km entre coespecíficos e que a unidade reprodutiva de populações dessas espécies era constituídas de 150 a 750 indivíduos distribuídos sobre áreas de 106-632 $km^2$. De acordo com os autores o vetor espécie-específico, no caso vespas, favorecia o longo fluxo de pólen. Tais resultados levaram a conclusão de que o tamanho efetivo reprodutivo das populações das espécies de *Ficus* era

maior do que a área física ocupada pelas populações. Assim, mesmo com a fragmentação e o aumento do isolamento dos coespecíficos, as espécies de *Ficus* podiam trocar genes e não se tornaram isoladas reprodutivamente. Inclusive, nesse caso, é possível que a fragmentação tenha induzido a um aumento no tamanho da área de vizinhança reprodutiva. Esta hipótese também foi levantada em outras espécies. White et al. (2002) detectaram na espécie arbórea tropical *Swietenia humillis*, que alguns fragmentos recebiam grande contribuição de pólen vindo de mais de 4,5 km de distância, interpretando esse resultado como um fator positivo da fragmentação que teria favorecido a longa distância pela abertura de espaço, favorecendo o vôo dos polinizadores. Em concordância, Aldrich e Hamrick (1998) observaram que muitas das sementes produzidas dentro de fragmentos de *Symphonia globulifera* eram os resultados da contribuição de pólen de árvores isoladas localizadas em pastagens a centenas de metros dos fragmentos, embora também detectassem que muitas sementes produzidas nos fragmentos foram resultantes da contribuição polínica de poucas árvores polinizadoras, o que reflete a presença de deriva genética no processo de reprodução como um resultado da fragmentação da paisagem. Em outros termos, os resultados de Aldrich e Hamrick (1998) refletem uma grande área de vizinhança ocupada por uma pequena vizinhança genética. Por sua vez, Nason e Hamrick (1997) detectaram na espécie arbórea tropical *Spondias mombim* que, em pequenas populações fragmentadas, 90% a 100% das progênies produzidas, eram o produto do fluxo de pólen originado de fragmentos localizados de 80 a 1.000 m de distância. Igualmente, Dunphy et al. (2004), estudando *Hymenaea courbaril* em Porto Rico, detectaram que 42% a 62% do pólen vieram de fora das populações. Em termos gerais, estes resultados sugerem que existe a possibilidade das espécies responderem ao aumento da distância entre coespecíficos pela fragmentação. Contudo, estes estudos são preliminares, e como visto muito poucas espécies foram avaliadas em termos de isolamento reprodutivo, ainda mais considerando as grandes diferenças no sistema sexual, distribuição espacial, densidade, longevidade, mecanismos e vetores de polinização e dispersão de sementes, porte e características como auto-incompatibilidade, existentes entre as centenas de espécies arbóreas que vegetam nas florestas tropicais.

## 2.4 ESTUDO DE FLUXO GÊNICO POR MARCADORES E ANÁLISE DE PATERNIDADE

A taxa de imigração, a distância e os padrões de fluxo gênico em populações naturais podem ser estudados por meio de métodos diretos ou indiretos. Os métodos diretos permitem a obtenção da estimativa do fluxo gênico atual, já os métodos indiretos fazem uma referência aos níveis históricos do fluxo gênico (MARTINS, 2005). O método mais comum para se medir o fluxo gênico de forma direta em plantas é o baseado na observação do movimento dos agentes polinizadores e dispersores de sementes ou ainda por meio do acompanhamento da distância de dispersão dos grãos de pólen ou das sementes marcados com corantes (BORÉM, 2002; OUBORG et al., 1999; SLATKIN, 1985). Devido ao fluxo gênico por sementes ser o responsável por dois terços do tamanho da vizinhança genética, o conhecimento de sua extensão também é essencial para estimar o tamanho reprodutivo de populações de espécies arbóreas tropicais (HAMILTON, 1999).

Outros métodos diretos utilizam marcadores genéticos, e, nesse caso, pode-se estimar o fluxo gênico atual (contemporâneo). Um método simples é introduzir ou identificar uma planta em uma população com característica única, bem como analisar sua frequência na população da geração seguinte (LATTA et al., 1998). Os métodos indiretos utilizados para fazer a inferência dos padrões de fluxo gênico são baseados na estrutura genética das populações (ZUCCHI et al., 2002), sendo eles via $F_{ST}$, alelos privativos e análise de autocorrelação espacial. O uso do $F_{ST}$ vem sendo rotineiramente empregado para estimar o número de migrantes por geração (*Nm)* para um conjunto de populações ou de subpopulações. Este é chamado também de fluxo gênico histórico. O uso de alelos privativos para avaliação do fluxo gênico foi descrito inicialmente por Slatkin (1985), e é baseado na frequência média de alelos que são exclusivos de uma ou poucas populações (alelos raros). A frequência destes alelos é utilizada para estimar a média do número de migrantes permutados entre as populações (RAPOSO, 2007).

Um outro método mais sofisticado e efetivo para a estimação do fluxo gênico atual é o descrito por Dow e Ashley (1998), que requer o uso de marcadores moleculares para identificar o pai de progênies de polinização aberta. Se o marcador molecular é altamente polimórfico, como no caso dos microssatélites, e o número de pais potenciais é relativamente pequeno, o pai de cada semente pode ser identificado de forma precisa (BORÉM, 2002). De

acordo com Zucchi et al. (2002), a análise de paternidade é uma excelente ferramenta para a definição do fluxo de pólen e, consequentemente, o fluxo gênico nas populações.

Os primeiros estudos de análise de paternidade eram baseados na estimativa de exclusão de paternidade. Entretanto, este método pode identificar erroneamente o candidato a pai verdadeiro por apresentar alguns problemas causados por erros de genotipagem ou mutações (MARSHALL et al., 1998). A estatística Delta (Δ), definida por Marshall et al. (1998), auxilia na determinação da paternidade e é baseada no método da máxima probabilidade que tolera erros de genotipagem e define o indivíduo com mais chance de ser o pai de um descendente (semente, regenerante ou juvenil) com base nas frequências alélicas. A análise considera o número de candidatos a pai, a proporção de indivíduos amostrados e as falhas ou erros nos dados genéticos. Nesse caso, de acordo com Marshall et al. (1998), o programa Cervus 3.0 é indicado para as análises de paternidade, utilizando-se de marcadores codominantes.

## 2.5 EMPREGO DE MARCADORES MOLECULARES NO ESTUDO DE ESPÉCIES FLORESTAIS

A utilização de marcadores genéticos em estudos populacionais de espécies florestais tem demonstrado tratar-se de uma ferramenta de alto potencial (FREITAS et al., 2005). Nessas espécies, os marcadores moleculares têm sido utilizados, tanto nos programas de melhoramento, visando ao aumento de produtividade e qualidade dos produtos, como à geração de dados genéticos (diversidade genética, sistema de reprodução, estrutura genética populacional, fluxo gênico) que permitem a elaboração de estratégias de conservação e melhoramento de espécies vegetais (PAULA, 2006).

Embora a aplicação da biologia molecular em espécies florestais tenha sido relativamente mais lenta do que nas espécies agrícolas, na última década houve grande aumento de publicações de marcadores genéticos para espécies florestais. Avanços recentes, em genética molecular de árvores, contribuíram para um melhor entendimento da organização do genoma, estrutura, função, e evolução de espécies florestais (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al., 2006). Estudos utilizando marcadores genéticos contribuíram, expressivamente, para a compreensão de fluxo de genes, hibridação, estrutura de população, deriva genética e sistema

reprodutivo (HAMRICK; NASON, 2000; LINHART, 2000; NEWTON et al., 1999; OUBORG et al., 1999). Em espécies florestais, especificamente, a aplicação comum de marcadores moleculares foi utilizada para mensurar a diversidade genética (PETIT et al., 2005) testar hipóteses de glaciação relacionadas a padrões de migração (PETIT et al., 2003) caracterizar a expansão de genótipos particulares, mediada pela ação antrópica (GIL et al., 2004) e descrever a estrutura de reprodução e fluxo de gene (ADAMS; BURCZYK, 2000; NASON et al., 1998; SMOUSE; SORK, 2004). Dessa forma, os microssatélites (SSR) têm sido a classe de marcadores moleculares mais extensamente utilizados em estudos de genética de populações, com diversas aplicações incluindo a conservação genética, a genética de população, sistema de reprodução, teste de paternidade, e, também, para o estudo de populações de espécies florestais (COLLEVATTI et al., 1999; DAYANANDAN et al., 1997). Sua crescente utilização deve-se ao fato de que esses marcadores são co-dominantes, multialélicos, altamente reproduzíveis, polimórficos, têm grande resolução e estão baseados na reação da polimerase em cadeia (PCR) (OLIVEIRA et al., 2006). Marcadores moleculares, baseados em PCR, destacam-se por requererem um menor número de locos para fornecer uma estimativa satisfatória das relações entre indivíduos, no caso, de microssatélite de 30-40 locos (BLOUIN, 2003).

Embora a distribuição dos microssatélites no genoma eucarioto ocorra ao acaso (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), no caso específico do genoma de plantas, eles estão associados, preferencialmente, com o DNA não repetitivo, isto é, ocorrem, frequentemente, próximos ou mesmo dentro de genes (MORGANTE et al., 2002). A irregularidade dessa distribuição deve-se às diferenças em suas frequências dentro do códon e das sequências do anti-códon (ARCOT et al., 1995; WILDER; HOLLOCHER, 2001) e à possibilidade funcional das diferentes repetições. A frequência de microssatélites no genoma varia também por táxon, em termos de números absolutos de locos do microssatélite e de repetição preferencial (HANCOCK, 1999).

O número de repetições é fundamental para determinar a dinâmica evolutiva do microssatélite. Isso significa que a espécie com microssatélites curtos deve ter taxas mais baixas de mutação de microssatélite do que espécies com microssatélite mais longos (AMOS et al., 1996).

Até a alguns anos, pensava-se que os microssatélites fossem marcadores seletivamente neutros, não sendo afetados por pressões seletivas. Entretanto, agora é evidente que a expansão do número de repetições pode causar alterações fisiológicas, como por exemplo, doenças em humanos (MOXON; WILLS, 1999). Embora os microssatélites sejam usados

extensivamente em um número considerável dos estudos que cobrem as mais variadas áreas da genética, a dinâmica mutacional dessas regiões genômicas é pouco compreendida (SCHLÖTTERER, 2000), embora se saiba que a taxa mutacional desses locos é muito mais elevada do que a que ocorre em outras partes do genoma, variando de $10^{-2}$ a $10^{-6}$ nucleotídeos por loco a cada geração (SIA et al., 2000).

O progresso no uso dos microssatélites encontrou retrocesso devido ao custo elevado no desenvolvimento de primers específicos. Entretanto, muitos estudos mostram que *primers* projetados para uma determinada espécie podem ser usados para outra espécie do mesmo gênero (CIPRIANI et al., 1999; ISAGI; SUHANDONO, 1997;) ou até mesmo para gêneros diferentes da mesma família (ROA et al., 2000; WHITE; POWELL, 1997; ZUCCHI et al., 2002). Esse atributo do microssatélite é conhecido como transferabilidade ou amplificação cruzada de espécies. A transferabilidade é muito importante para facilitar o uso de microssatélites porque reduz custos ao trabalhar com taxas de frequências baixas de microssatélite ou microssatélites difíceis de isolar. A transferabilidade de microssatélite entre espécies relacionadas é permitida pela natureza homóloga da sequência do DNA em regiões flanqueadoras do microssatélite (PRIMMER; MERILÄ, 2002).

Apesar de alguns aspectos, com relação ao custo, marcadores microssatélites tem sido desenvolvidos para várias espécies arbóreas, como por exemplo, *Pinus sylvestris* (KOSTIA et al., 1995), *Pinus radiata* (SMITH; DEVEY, 1994), *Quercus macrocarpa* (DOW et al., 1995), e *Populus nigra* (RAHMAN; RAJORA, 2002; VAN DER SCHOOT et al., 2000). Coleções grandes de microssatélites estão disponíveis para *Pinus taeda* (245 SSRs) (WILLIAMS; AUCKLAND, 2002).

Contudo, uma das críticas ao emprego de marcadores SSR refere-se ao fato de alguns métodos de análise genética populacional apresentarem problemas de estimação, oriundos de erros de derivações dos estimadores, causado pelo alto polimorfismo dessa classe de marcadores, em termos de número de alelos. No entanto, novas derivações de parâmetros e métodos de estimação, solucionaram esses entraves, de maneira que o poder estatístico disponível para detectar a diferenciação entre grupos de espécies com risco de extinção é, atualmente, muito elevado (HEDRICK, 2001).

Na espécie arbórea *Myracrodruon urundeuva*, os primeiros estudos com marcadores genéticos envolviam a utilização de isoenzimas (MORAES, 1992), RAPD e sequência de cpDNA (REIS, 1999; REIS; GRATTAPAGLIA, 2004). Porém, outras técnicas moleculares foram sendo propostas, como o marcador dominante AFLP (FREITAS et al., 2005; VOS et al., 1995;) e os microssatélites (CAETANO et al., 2005; CAETANO et al., 2008). Os estudos

genéticos de *M. urundeuva*, utilizando-se *primers* SSR são recentes e restritos apenas ao conhecimento da diversidade existente dentro e entre populações do Paraguai e da Argentina (CAETANO et al., 2005) e da estrutura genética de 53 populações naturais da América do Sul (CAETANO et al., 2008). No Brasil, as primeiras publicações da utilização de *primers* de microssatélites específicos para a espécie no estudo da diversidade, estrutura genética e sistema de reprodução das populações do País, surgiram agora no ano de 2009 (GAINO et al., no prelo).

## 2.6 A ESPÉCIE *Myracrodruon urundeuva* (F.F. & M.F. Allemão)

A espécie *M. urundeuva*, conhecida vulgarmente como aroeira, aroeira-do-sertão ou urundeúva pertence à família Anarcadiaceae. É uma espécie arbórea tropical, secundária, tardia e de ampla distribuição geográfica que ocorre no Brasil, Argentina, Bolívia e no Paraguai (3°30'S, Brasil a 25°S, Argentina). No Brasil, distribui-se naturalmente desde o Ceará até o Mato Grosso do Sul, sendo mais frequente nos Estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo e com poucas aparições no Paraná (LORENZI, 1998; RIZZINI, 1995).

*Myracrodruon urundeuva* é uma árvore decídua, heliófila, seletiva xerófila, característica de terrenos secos e rochosos, ocorrendo em agrupamentos densos, tanto em formações abertas e muito secas (caatinga) como em formações muito úmidas e fechadas (floresta pluvial com 2000 mm de precipitação anual) (LORENZI, 1998). Porém, ocorre, preferencialmente, em ambientes secos, de solos pedregosos, sendo uma árvore encontrada nos mais variados tipos de vegetação, da caatinga à floresta pluvial tropical, passando através de formações de cerrado (SANTIN, 1989). A altura da árvore varia conforme a região de sua ocorrência (LORENZI, 1992), podendo atingir 30 m de altura (RIZZINI, 1971). *Myracrodruon urundeuva* é considerada uma espécie dióica (SANTIN; LEITÃO FILHO, 1991; Figura 1), mas há relato de monoicia (NOGUEIRA et al., 1982) e ocorrência de hermafroditismo juntamente com dioicia (CARVALHO, 1994). A floração é ampla e variada: em janeiro, em Pernambuco; de março a abril, no Ceará; de maio a julho, em Minas Gerais; de junho a agosto, no Estado de São Paulo; de julho a agosto, no Distrito Federal; de agosto a

setembro, Mato Grosso do Sul e em outubro, no Rio Grande do Norte. Os diásporos são dispersos por anemocoria (CARVALHO, 1994) e a polinização é feita por abelhas. Os frutos são do tipo drupa globosa ou ovóide, com cálice persistente, considerado um fruto-semente (FIGUEIRÔA et al., 2004). A semente é única (0,2 a 0,4 cm de diâmetro), globosa, desprovida de endosperma, com epicarpo castanho-escuro, mesocarpo castanho, carnoso, resinífero, com odor característico e tegumento membranáceo (ALMEIDA et al., 1998; MEDEIROS, 1996). Também apresenta dormência embrionária e um comportamento ortodoxo, podendo ser desidratadas e armazenadas por longo período de tempo em bancos de germoplasma de sementes a baixas temperaturas (MEDEIROS, 1996).

Considerada madeira de lei, é muito densa, dura, elástica, resistente a cupins, recebe excelente polimento e, quando seca, é de difícil trabalhabilidade (MORAES; FREITAS, 1997; RIZZINI, 1995; SANTOS, 1987). Quando recém cortada, apresenta coloração rosa-clara e torna-se vermelha-escura quando é exposta ao sol, sendo considerada a madeira mais resistente do Brasil. Enquanto um centímetro quadrado de concreto suporta uma carga de 250 Kgf, a *M. urundeuva* pode suportar até 696 Kgf. Nos registros do Institudo de Pesquisa Tecnológicas (IPT) de São Paulo, é classificada como ‘durável’ e se coloca no fechadíssimo grupo das madeiras com durabilidade secular, as chamadas ‘imputrescíveis’ (BRAGA, 1990; RIBEIRO, 1989;). Além das propriedades mecânicas que formam uma barreira física de proteção, existe também uma barreira química, formada por substâncias produzidas pela própria árvore, denominadas de extrativos, que possuem efeitos fungicida e inseticida (BRAGA, 1990).

A madeira de *M. urundeuva* é muito utilizada em cercados, construções rurais e civil e na indústria moveleira. A árvore também pode ser utilizada como planta ornamental, na atividade apícola, como forrageira e para reflorestamentos ambientais (CARVALHO, 1994; FREITAS et al., 2005). Na região nordeste do Brasil, a *M. urundeuva* é largamente empregada na medicina popular, com utilização em tratamentos ginecológicos, dermatológicos e gástricos, com propriedades analgésicas e antiinflamatórias. Porém, Vilar et al. (2004) em uma pesquisa no Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, verificaram que 2% dos 137 pacientes submetidos ao tratamento de dermatites, utilizando substâncias extraídas da *M. urundeuva*, desenvolveram lesões graves e até dermatites crônicas. Sua casca, devido ao alto conteúdo de tanino, é utilizada no curtume e suas folhas, quando maduras, na alimentação do gado nos sertões nordestinos (SANTIN, 1989). Suas excelentes qualidades fazem da *M. urundeuva* uma raridade em madeira, o que torna cada vez mais rápida sua devastação em todo o país (RIBEIRO, 1989).

Atualmente, *M. urundeuva* é pouco encontrada na região sudeste do Brasil, suas populações estão restritamente localizadas em unidades de conservação (MORAES et al., 2005). A ação do homem ao longo dos anos tem promovido a destruição de populações de *M. urundeuva*, reduzindo-as a pequenas manchas espalhadas pelo país.

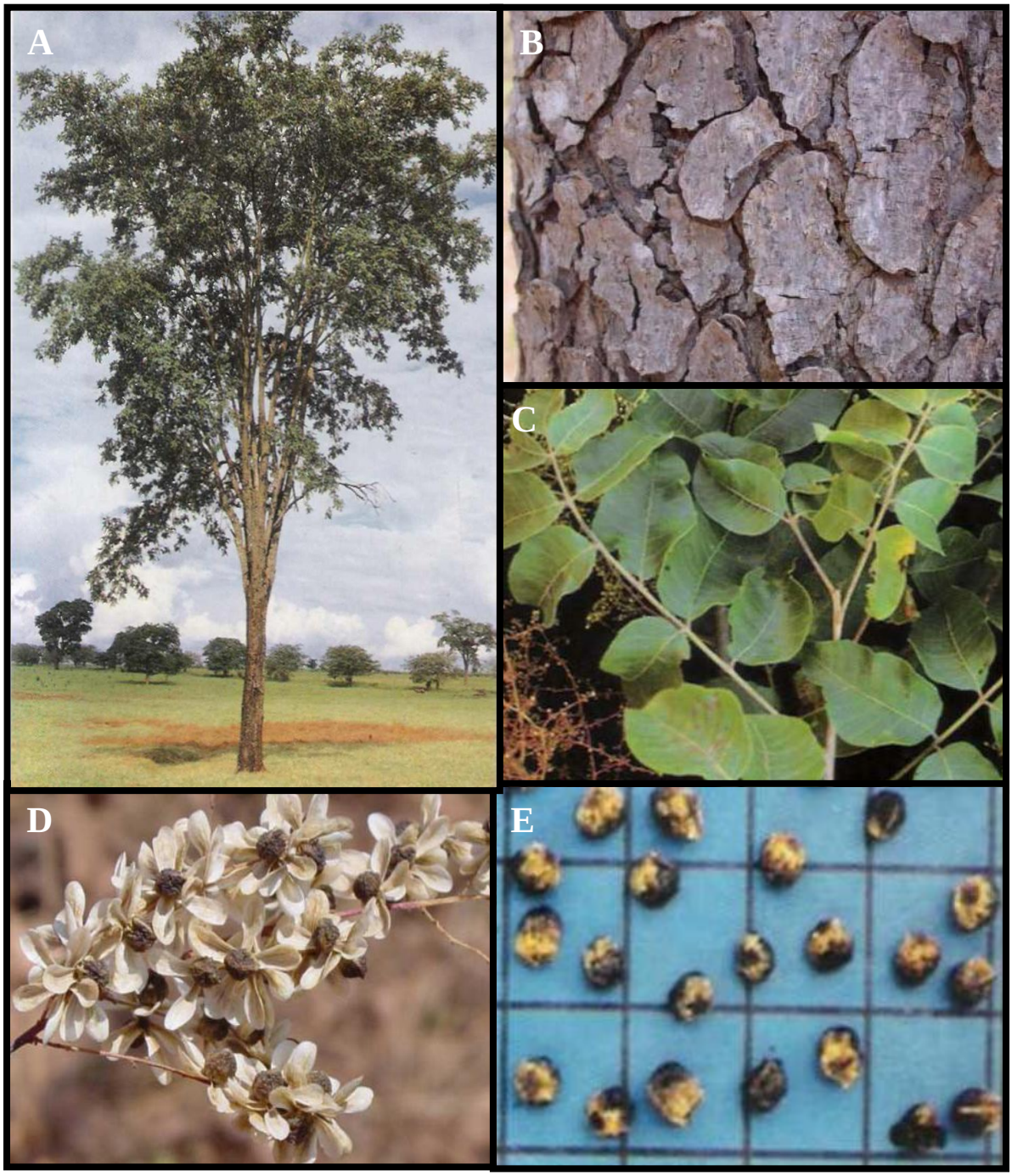


**Figura 1.** Fotos ilustrativas destacando características morfológicas da espécie dióica *M. urundeuva*. (A) árvore; (B) tronco; (C) folhas; (D) inflorescência; (E) frutos (Fotos: Lorenzi, 1992; Fernando Tatagiba).

# 3 CAPÍTULO I

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL INTRAPOPULACIONAL EM POPULAÇÃO FRAGMENTADA DE *Myracrodruon urundeuva* (F.F. & M.F. Allemão)**

## 3.1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas naturais vêm sofrendo drasticamente com a atividade humana e essa ação devastadora traz alterações irreversíveis às espécies predominantes nestes ambientes (PINTO et al., 2004). Assim, informações como diversidade genética e estrutura genética de populações remanescentes em fragmentos florestais são importantes para o delineamento de estratégias a serem utilizadas na conservação, melhoramento genético e exploração florestal sustentada das espécies arbóreas (RAJORA; PLUHAR, 2003).

A diversidade genética promove a matéria prima para adaptação, evolução e sobrevivência das espécies e indivíduos, especialmente sob mudanças ambientais e condições de doenças. Reduções na diversidade genética podem predispor as espécies à alterações patológicas, reduzir a produtividade e limitar o melhoramento genético (RAJORA; PLUHAR, 2003). Fatores intrínsecos a biologia das espécies arbóreas tropicais como o tamanho efetivo da população, a distribuição geográfica das populações, o modo de reprodução, o sistema de cruzamento, o mecanismo de dispersão de sementes e o tipo de comunidade em que a espécie habitualmente ocorre, podem influenciar a constituição genética dos indivíduos de uma população (HAMRICK, 1983).

O estudo da diversidade genética em populações naturais compreende a descrição dos níveis de variação genética mantida dentro das populações, bem como a forma em que a variação genética é dividida entre e dentro das populações (LOVELESS; HAMRICK, 1987). A diversidade genética intrapopulacional pode ser caracterizada pelos índices: porcentagem de locos polimórficos (*P*), número médio de alelos por loco (*A*), heterozigosidade esperada ou diversidade gênica ( $H_e$ ) em equilíbrio de Hardy-Weinberg, heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e índice de fixação ( $F$ ) (BERG; HAMRICK, 1997).

O padrão espacial ou a estrutura genética espacial intrapopulacional é um componente importante dos processos genético-ecológicos e evolutivos de populações naturais de plantas (GUSSON et al., 2005). A estrutura genética espacial intrapopulacional é o resultado, primeiramente, da dispersão de sementes a curtas distâncias, na vizinhança da árvore materna e, em segundo lugar, da dispersão de pólen também a curtas distâncias (HARDY et al., 2002). O conhecimento da estrutura genética espacial pode melhorar a eficiência da amostragem para maximizar a diversidade gênica ou minimizar os cruzamentos endogâmicos (EPPERSON, 1990). Cruzamentos endogâmicos e autofecundações geram endogamia a qual desencadeia a

depressão endogâmica (perda de vigor, fertilidade, mortalidade precoce, má formação, etc). A depressão endogâmica é uma realidade nas populações remanescentes em fragmentos florestais. Portanto, estudos em fina escala da distribuição espacial de genótipos, do sistema de reprodução, e de comparações dos níveis de endogamia existentes em diferentes estágios ontogênicos das plantas são necessários para compreender como se processa a dinâmica da endogamia entre gerações, bem como para determinar a distância mínima entre árvores matrizes para a coleta de sementes para a conservação *ex situ* e reflorestamentos ambientais.

Assim, os objetivos desta pesquisa foram verificar os níveis de diversidade genética, endogamia e a estrutura genética espacial intrapopulacional entre diferentes gerações de uma população fragmentada da espécie arbórea tropical dióica *Myracrodruon urundeuva* (F.F. & M.F. Allemão), na Estação Ecológica de Paulo de Faria, estado de São Paulo, usando locos microssatélites. As seguintes questões foram abordadas: a) Quais são os níveis de diversidade genética e endogamia nas gerações adulta, regenerante e progênies? b) Existe estrutura genética espacial na população adulta e na regeneração ou a distribuição dos genótipos é aleatória?

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### *3.2.1 Local de estudo*

O estudo foi conduzido na Estação Ecológica de Paulo de Faria do Instituto Florestal de São Paulo. A Estação Ecológica possui uma área de 435,73 ha, localizada entre as coordenadas 19º55' e 19º58' de latitude S e 49º31' e 49º32' de longitude W, com altitude variando de 400 a 495 m (Figura 2). O clima da região segundo a classificação de Koeppen é do tipo Aw, tropical quente e úmido, caracterizando-se por apresentar duas estações climáticas: uma seca, de abril a setembro, com média pluviométrica de 167 mm; e uma outra chuvosa, de outubro a março, com média de 978 mm. O solo encontrado na Estação Ecológica de acordo com Oliveira et al. (1999) é do tipo Latossolo Vermelho (LV6), eutroférrico e distroférrico, em relevo plano e suavemente ondulado, associado à Nitossolo Vermelho eutroférrico, em relevo suave ondulado e ondulado, ambos com horizonte A

moderado e chernozêmico e textura argilosa. Já nas planícies aluviais, observa-se um solo superficial pouco desenvolvido com predominância de argila orgânica e depósito aluvial com composição granulométrica arenosa, nos aluviões recentes.

A região onde está situada a Estação Ecológica é de transição entre a floresta semi-decídua e o cerrado e algumas espécies ocorrem também no cerrado. A área fica na região norte do estado de São Paulo, à margem esquerda do rio Grande (Represa de Água Vermelha), na divisa dos estados de São Paulo (mata semi-decídua) e Minas Gerais (triângulo mineiro–cerrado). Coberta por uma vegetação natural com pouca perturbação antrópica, a cobertura vegetal apresenta uma grande diversidade de espécies composta por exemplares de 51 famílias botânicas. Destas, 33 apresentam espécies arbóreas, ou seja, aproximadamente 64,7% (Tabela 1). Na Estação estão presentes espécies das famílias Leguminosae (14,7%), Bignomiaceae (6%), Euphorbiaceae (5,5%) e Apocynaceae (4,6%). As espécies arbóreas representaram 36,9% do total de espécies (STRANGHETTI, 1996). Na Estação Ecológica de Paulo de Faria, os indivíduos que compõem a população da espécie *M. urundeuva* ocorrem na porção norte, onde ocupam uma área de aproximadamente 142 ha.

**Figura 2.** Vegetação da Estação Ecológica de Paulo de Faria (A); Árvore Matriz de Aroeira (B) (Fotos de Mário L. T. de Moraes); Imagem de satélite mostrando a área da Estação Ecológica (C).

**Tabela 1.** Algumas espécies que ocorrem na Estação Ecológica de Paulo de Faria: classificação por Família botânica.

| **Família** | **Nome popular** | **Nome científico** |
|---|---|---|
| Anacardiaceae | Aroeira | *Myracrodruon urundeuva* |
| Apocynaceae | Guatambu-marfim | *Aspidosperma parvifolium* |
| Bignoniaceae | Ipê-rosa | *Tabebuia impetiginosa* |
| Bombacaceae | Barriguda-do-pantanal | *Chorisia publifora* |
| Boraginaceae | Guajuvira | *Patagonula americana* |
| Burseraceae | Almecegueira | *Protium heptaphyllum* |
| Caricaceae | Jaracatiá | *Jacaratia spinosa* |
| Cecropiaceae | Embaúba | *Cecropia pachystachya* |
| Clusiaceae | Bacupari | *Rheedia gardneriana* |
| Combretaceae | Capitão-do-campo | *Terminalia argentea* |
| Euphorbiaceae | Canudo-de-pito | *Mabea fistulifera* |
| Flacourtiaceae | Espeteiro | *Casearia gossypiosperma* |
| Lauraceae | Canela-de-folha-grande | *Nectandra rigida* |
| Lecythidaceae | Jequitibá-branco | *Cariniana estrellensis* |
| Lecythidaceae | Jequitibá-rosa | *Cariniana legalis* |
| Leguminosae-Caesalpinoideae | Amendoim-bravo | *Pterogyne nitens* |
| Leguminosae-Mimosoideae | Farinha-seca | *Albizia hasslerii* |
| Leguminosae-Papilionoideae | Cateretê (jacarandá-branco) | *Machaerium paraguariense* |
| Meliaceae | Cedro-do-brejo | *Cedrela odorata* |
| Moraceae | Figueira | *Ficus guaranitica* |
| Myrsinaceae | Capororoca | *Rapanea ferruginea* |
| Myrtaceae | Jaboticaba-do-mato | *Myrciaria trunciflora* |
| Nyctaginaceae | Maria-mole | *Guapira opposita* |
| Opiliaceae | Pau-marfim-do-cerrado | *Agonandra brasiliensis* |
| Polygonaceae | Pajeú | *Coccoloba latifolia* |
| Rhamnaceae | Cafezinho-do-mato | *Rhamnidium elaeocarpum* |
| Rubiaceae | Guatambu-preto | *Simira sampaioana* |
| Sapindaceae | Camboatá | *Cupania vernalis* |
| Sapotaceae | Guapeva | *Pouteria torta* |
| Solanaceae | Fruta-de sabiá | *Acnistrus arboresceens* |

**Tabela 1.** Continuação

| Família | Nome popular | Nome científico |
|---|---|---|
| Sterculiaceae | Xixá | *Sterculia striata* |
| Tiliaceae | Açoita-cavalo | *Luehea divaricata* |
| Ulmaceae | Candiúba | *Trema micrantha* |
| Verbenaceae | Lixa | *Aloysia virgata* |

**Fonte:** STRANGHETTI, 1996.

### *3.2.2 Estratégia de amostragem*

Para a amostragem foi realizado um censo em toda a área. A ocorrência da grande maioria das árvores adultas reprodutivas está restrita a uma área de 142 ha. Todas as árvores adultas encontradas e parte da regeneração foram georeferenciadas (GPS). O diâmetro a altura do peito (DAP) foi medido e materiais biológicos foram coletados para as análises genéticas (Figura 3). O crescimento de indivíduos de *M. urundeuva* é considerado lento, entre 0,45 a 0,62 cm por ano, até os 10 anos de idade (BALERONI et al., 2003). Então, foram consideradas árvores adultas, aquelas com DAP≥11 cm. Todas as 467 árvores adultas reprodutivas ocorrentes na área foram amostradas. O DAP destas árvores variou de 11,03 a 94,54 cm, sendo que aproximadamente 50% das árvores tinham DAP menor que 25 cm (Figura 4). Para o estudo de diversidade genética e estrutura genética temporal entre gerações também foram amostrados 149 plantas da regeneração, as quais tinham DAP variando de 0,64 a 10,98 cm (Figura 4). Eles foram amostrados próximos às 30 árvores matrizes, que deram origem às sementes utilizadas para a implantação de um teste de progênies, cujas informações também foram usadas neste estudo (Figura 3). O teste de progênies foi instalado na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da FEIS/UNESP, localizado no município de Selvíria - MS (FREITAS, 2003). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, no espaçamento 3 x 1,5 m, com 30 tratamentos (progênies), três repetições e parcelas lineares com 10 plantas. De cada árvore matriz, foram amostradas 20 plantas para análise de DNA. Entretanto, em virtude de alguns indivíduos apresentarem informações para um número de locos inferior a cinco, estes foram eliminados das análises totalizando apenas 514 progênies de 30 árvores matrizes. O DAP das 30 árvores matrizes variou de 19,74 a 94,54 cm.

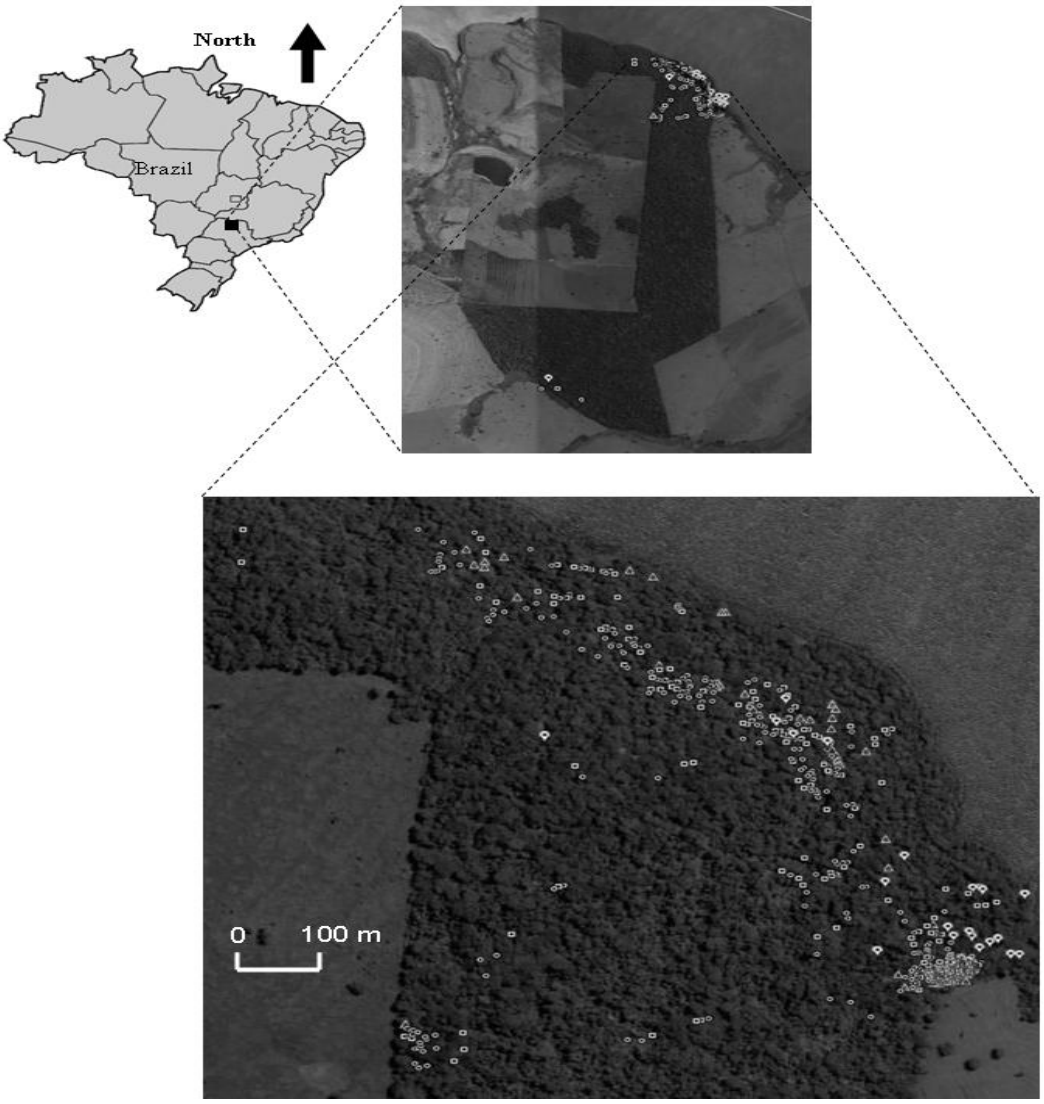


**Figura 3.** Distribuição espacial de árvores adultas, regenerantes e das matrizes de *M. urundeuva* na Estação Ecológica de Paulo de Faria.

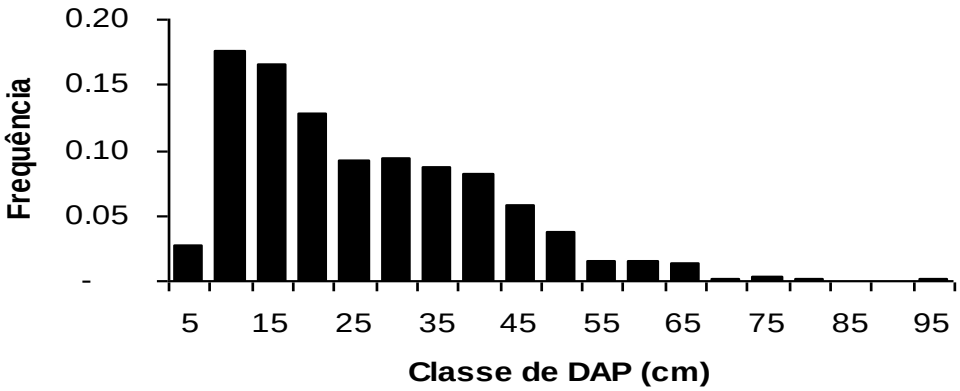


**Figura 4.** Distribuição de frequências para o diâmetro a altura do peito (DAP) de indivíduos de *M. urundeuva* na Estação Ecológica de Paulo de Faria, SP.

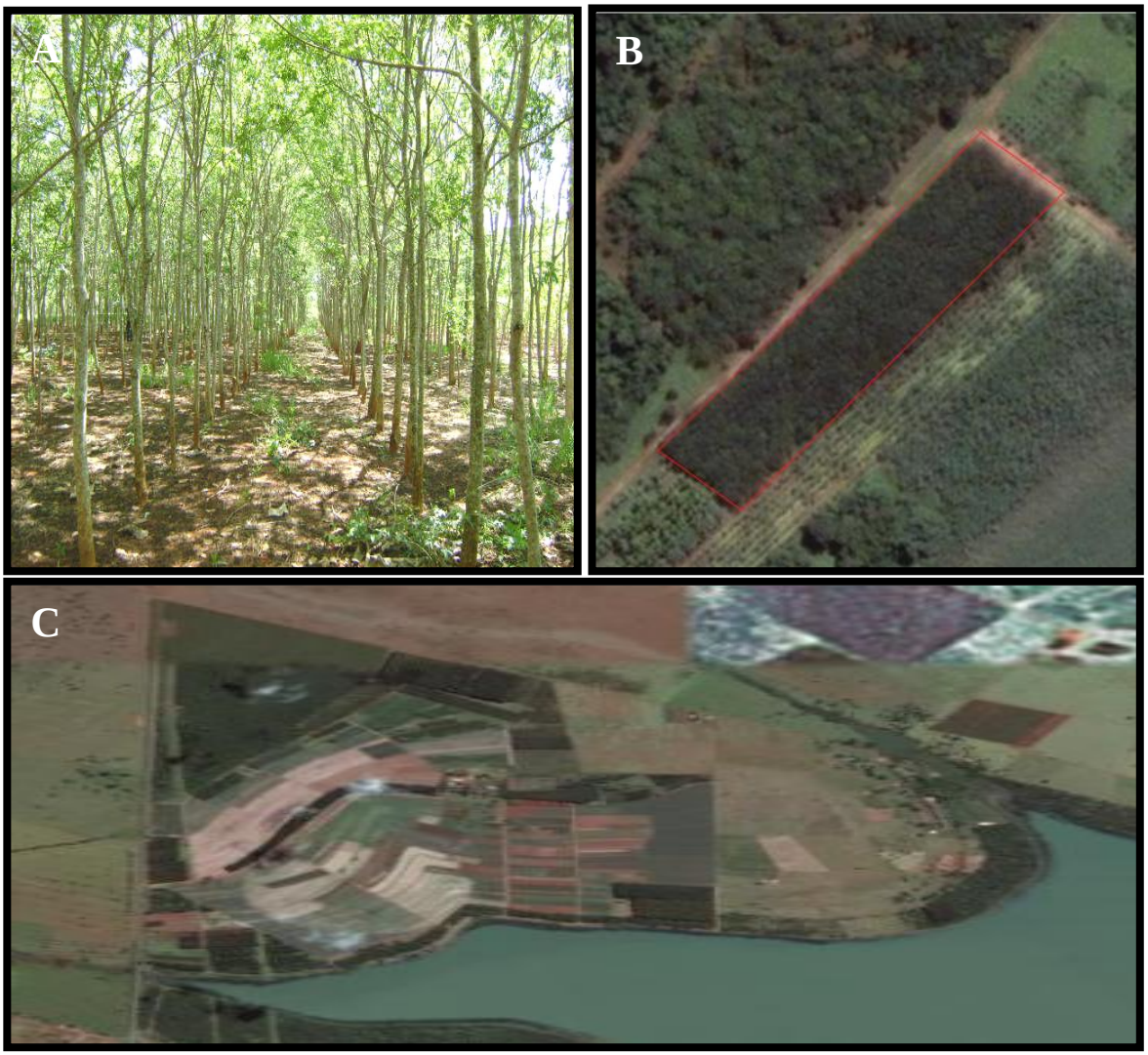


**Figura 5.** Teste de progênie de Aroeira (A) (Foto de Marcela A. de Moraes); Imagem de satélite mostrando a disposição do teste de progênie na Fazenda da UNESP campus de Ilha Solteira (B); Imagem de satélite da Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP (C).

### *3.2.3 Coleta e identificação de material biológico para extração do DNA genômico*

O material biológico utilizado para a extração do DNA genômico de indivíduos de três gerações (adulto, regenerante e progênie) da população de *M. urundeuva* foi constituído por amostras de tecidos foliares. O material foliar das árvores reprodutivas e das progênies foi retirado da copa com o auxílio de um podão. Em seguida, as folhas foram identificadas com uma numeração e acondicionadas em sacos de papel. Depois esses sacos foram armazenados para a viagem em caixa térmica contendo sílica gel. O material vegetal das plantas

regenerantes também foi coletado, identificado e armazenado da mesma forma que o material das plantas adultas e do teste de progênies. No laboratório, os sacos de papel contendo as amostras foram colocados em caixas de plástico contendo sílica gel e essas receberam uma identificação com a procedência, espécie e data da coleta. Durante este estudo, verificou-se que a viabilidade do material biológico para espécie arbórea *M. urundeuva* armazenado em sílica gel foi reduzida, apresentando boas condições para extração, até o limite de aproximadamente três meses.

### *3.2.4 Extração e quantificação do DNA*

Para a extração do DNA das amostras de *M. urundeuva*, empregou-se o protocolo CTAB (DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L., 1990), com modificações no tampão de extração pela adição de proteinase K (100 μg/mL), PVP-40 (4%), PVP-360 (1%) e β mercaptoetanol (2%). A extração do DNA e a quantificação foram realizadas no Laboratório de Genética de Populações e Silvicultura do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio-economia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Engenharia, campus de Ilha Solteira. A qualidade do DNA foi verificada por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose 0,8%, com TEB 1X (Tris 28mM, ácido bórico 88 mM, EDTA 7mM, pH 8,3), e posterior coloração com brometo de etídio (5 μg/ mL). Em seguida, as bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta. Para a quantificação do DNA das progênies de *M. urundeuva* utilizou-se o Biofotômetro modelo Eppendorf, medindo-se a absorbância em contraste com uma amostra de TE, no comprimento de onda de 260 nm. Na estimativa da quantidade de DNA considerou-se que uma unidade de densidade óptica (DO) no comprimento de 260 nm equivale a 50 μg DNA fita dupla por mL (SAMBROOK et al., 1989). A pureza foi avaliada pela relação de densidade óptica 260 nm/280 nm e 260 nm/230nm. A obtenção da estimativa da quantidade de DNA dos indivíduos adultos e dos regenerantes foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose a 0,8 %, mediante comparações visuais com concentrações conhecidas de DNA de fago λ, corado com gel red.

### *3.2.5 Marcadores Microssatélites*

#### *3.2.5.1 Otimização das condições da reação em cadeia da polimerase (PCR)*

Foram realizados ensaios de temperaturas de anelamento dos *primers* SSR desenvolvidos por Caetano et al. (2005), com objetivo de verificar a melhor temperatura para amplificação de cada um deles, nas condições de trabalho no Laboratório. Para a otimização foram usadas cinco amostras de DNA. A reação de amplificação foi realizada conforme Caetano et al. (2005), cujo volume da reação de amplificação foi de 12 µL utilizando-se tampão PCR (1X), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 mg/mL de BSA, 2,5 mM de $MgCl_2$ , 1uM de cada primer F e R (Tabela 2), 3 unidades de Taq DNA polimerase, 0,6 uL de DNA genômico. O equipamento utilizado para a PCR foi o termociclador Eppendorf MasterCycle, com as seguintes condições de amplificação: um ciclo de 94°C por 3 min., 35 ciclos de 94°C por 30 seg., temperatura de pareamento por 30 seg., 72°C por 30 seg., e um ciclo final de 72°C por 5 min. Para cada *primer*, foram testadas de 12 a 17 temperaturas de pareamento, descritas a seguir: 36°C, 36,2°C, 37,3°C, 39,1°C, 41,3°C, 43,9°C, 46,7°C, 49,4°C, 52°C, 54°C, 55,8°C, 56,7°C, 58,5°C, 61°C, 63,1°C, 64,7°C e 65,6°C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 3%, em TEB 1X.

**Tabela 2.** Sequências, temperatura de anelamento e marcação com fluoróforo dos *Primers* SSR desenvolvidos por Caetano et al. (2005), utilizados nos estudos genéticos da espécie *Myracrodruon urundeuva*.

| Loco SSR | Seqüência 5' – 3' | Tm (°C) | Tm' (°C) | Marcação com fluoróforo |
|---|---|---|---|---|
| Auru D200 – F | TTCACCACAGGTTTGCG | 56 | 55,8 | NED |
| Auru D200 - R | TAGTGAGCAACGACGAGAGC | | | -------- |
| Auru E062 – F | CAAAATTGCCGTCTGGGC | 56 | 49,4 | NED |
| Auru E062 - R | GGATCGGATTCAGCGGG | | | -------- |
| Auru A392– F | GCAAGAAATAAAAGAATCAGATG | 59 | 43,9 | NED |
| Auru A392- R | GTGTAACAGCCCACAGTATCAG | | | -------- |

**Tabela 2.** Continuação

| Loco SSR | Seqüência 5' – 3' | Tm (°C) | Tm' (°C) | Marcação com fluoróforo |
|---|---|---|---|---|
| Auru C072– F | ATGCATCTAGCTTGCTCTTTC | 58 | 61 | FAM |
| Auru C072- R | TTAACTGTCGGGGGTTCG | | | -------- |
| Auru D094– F | CACATTTGAAAAATGCTAGGG | 60 | 61 | HEX |
| Auru D094- R | ATGGTGATGGGGAAACTCTC | | | -------- |

**Tm –** Temperatura de anelamento em graus Celsius dos *primers* SSR de acordo com Caetano et al. (2005).
**Tm' –** Temperatura de anelamento dos locos SSR otimizados para condições de trabalho no Laboratório.

### *3.2.5.2 Amplificação dos locos SSR*

As reações de amplificação dos locos SSR foram realizadas no Laboratório de Genética Vegetal (CENARGEN/EMBRAPA), conduzidas de forma a avaliar cinco locos descritos para *M. urundeuva*, conforme Caetano et al. (2005). As amplificações foram efetuadas usando-se os conjuntos de iniciadores Auru (Tabela 2). A reação de amplificação de 6 µL foi realizada utilizando-se 1 ng de DNA genômico, 200uM de cada dNTPs, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,33 µM de cada iniciador, água ultrapura estéril e 1X Go Taq Master Mix PROMEGA. O componente Foward de cada par de *primers* foi marcado na sua extremidade 5' com um fluoróforo específico. As reações de amplificação foram realizadas em termocicladores 9600 e 9700 (Applied Biosystem) programado nas seguintes condições: um ciclo de 94°C por 3 min., 35 ciclos de 94°C por 30 seg., temperatura de pareamento do *primer* por 30 seg., 72°C por 30 seg., e um ciclo final de 72°C por 5 min. Os produtos de amplicações foram diluídos (1 µL de reação para 5 µL de água ultrapura), depois foram montados multiplex com 2 e 3 amplificados de locos distintos (1 µL de cada amplificado, 9 µL de formamida Hi Di, 0,65 µL de água ultrapura autoclavada e 0,35 µL do marcador interno fluorescente (ROX)) (BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001). Então, os multiplex foram desnaturados a 94ºC por 5 minutos e submetidos a eletroforese capilar em equipamento ABI Prism 3700 (Applied Biosystem). Utilizou-se o *software ABI Prism GeneScan* versão 3.7 (Applied Biosystems) para detectar e estimar o tamanho dos alelos em pares de bases. Para a

filtragem dos picos e interpretação do genótipo de cada indivíduo os dados da estimativa do tamanho de alelo obtidos foram importados para o *software ABI Prism Genotyper* versão 3.7 NT (Applied Biosystems). Obtidos os valores alélicos estes foram ajustados em categorias discretas, com base em quadrados mínimos pelo *software AlelloBin* (IDURY; CARDON, 1997).

### *3.2.6 Análises estatísticas*

#### *3.2.6.1 Análise da diversidade genética e índice de fixação*

Para verificar se os locos segregavam independentemente entre si, aplicou-se um teste de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos de cada amostra (adultos, regenerantes e progênies), utilizando um teste *G* de máxima verossimilhança. As probabilidades de significância do teste foram obtidas por 1000 permutações e aplicando uma correção de *Bonferroni* (95%, $\alpha$=0,05). A diversidade genética para amostra total e em cada geração da população (adultos, regenerantes e progênies) foi caracterizada para o número total de alelos (*k*), número médio de alelos por loco (*A*), heterozigosidade observada ($H_o$) e heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($H_e$). Os níveis de endogamia dentro das amostras foram quantificados pelo índice de fixação ($F$). A significância estatística dos valores de $F$ foi testada por permutação (1000), utilizando uma correção de *Bonferroni* (95%, $\alpha$=0,05), para evitar falsos positivos. Todas estas análises foram realizadas utilizando o programa FSTAT, versão 2.9.3.2. (GOUDET, 2002). O número de alelos exclusivos nas amostras (ocorrem em apenas uma geração) foi contado diretamente das estimativas das frequências alélicas, obtidas pelo programa FSTAT.

### *3.2.6.2 Análise da diferenciação genética entre gerações*

A diferenciação genética entre as gerações amostradas foi estimada utilizando a estatística $G'_{ST}$ de Hedrick (2005), que corrige para diferentes números de alelos entre as populações e é o método mais adequado para locos microssatélites devido ao alto grau de polimorfismo deste tipo de marcador, em termos de número de alelos por locos. A significância dos valores de $G'_{ST}$ entre populações foi testada utilizando permutação, usando o método de Monte-Carlo (10000). Estas estimativas foram calculadas usando o programa GDA_NT (DEGEN, 2006).

### *3.2.6.3 Análise da distribuição espacial dos genótipos*

As análises da distribuição espacial intrapopulacional de genótipos foram realizadas utilizando-se o estimador do coeficiente de coancestria ($\theta_{xy}$) proposto de Loiselle et al. (1995). Como estas estimativas dependem da frequência alélica da população parental, a análise dos regenerantes foi conduzida utilizando-se as frequências alélicas das árvores adultas como referência e de toda a população quando a análise foi realizada para adultos. O coeficiente $\theta_{xy}$ mede a extensão da similaridade entre os indivíduos X e Y, relativo à similaridade genética média entre dois indivíduos aleatórios da amostra (HARDY; VEKEMANS, 2002). O coeficiente $\theta_{xy}$ é definido para cada *k-ésimo* alelo do *l-ésimo* loco em cada par de indivíduos, *x* e *y*, como:

$$\hat{\theta}_{xy} = \left[ \frac{\sum_l \sum_k (p_{xlk} - \bar{p}_{lk})(p_{ylk} - \bar{p}_{lk})}{\sum_l \sum_k \bar{p}_{lk}(1 - \bar{p}_{lk})} \right] + \left[ \sum_l \frac{1}{(2n_l - 1)} \right],$$

em que $p_{xlk}$ e $p_{ylk}$ são as frequências do alelo $k$ no loco $l$ no indivíduo *x* e *y*, respectivamente (assumindo valores de zero, 0,5 e 1 em homozigotos para alelos alternativos, heterozigotos e indivíduos homozigotos para o alelo em consideração, respectivamente). $\bar{p}_{lk}$ é a frequência média do alelos $k$ no loco $l$ na população amostrada, em que $n_l$ é o número de alelos

existentes no loco *l* (número de indivíduos multiplicados pelo nível de ploidia, menos o número de alelos não amplificados). Para visualizar a estrutura genética espacial, os valores de $\theta_{xy}$ foram calculados para a média de pares de indivíduos dentro de classes de distância pré-determinadas. Foram usadas 10 classes de distância de 25 m para análise dos adultos e classes de diferentes distâncias para a análise dos regenerantes, procurando-se alocar um número similar de pares dentro de cada classe. Para testar se os valores médios eram significativamente diferentes de zero e existia estrutura genética espacial, o intervalo de confiança a 95% de probabilidade foi calculado para cada valor observado em cada classe de distância, usando permutação de indivíduos entre locais (1000 permutações). O intervalo de confiança foi usado para construir o correlograma. As análises foram conduzidas utilizando o programa SPAGEDI versão 1.2 (HARDY; VEKEMANS, 2002).

## 3.3 RESULTADOS

### *3.3.1 Desequilíbrio de ligação entre locos*

Dos 10 testes realizados entre os pares de locos avaliados em cada uma das três gerações (adultos, regenerantes e progênies), nenhum par evidenciou indícios de desequilíbrio gamético (Tabela 3), após a correção de Bonferroni ($\alpha$=0,05). Portanto, estes locos podem ser usados em estudos da estrutura genética espacial, estrutura e diversidade genética, sistema de reprodução e fluxo gênico visto que não vão gerar vícios nessas estimativas.

**Tabela 3**. Desequilíbrio de ligação entre os locos.Os valores na tabela são as probabilidades após 1000 permutações. O valor limite de significância após correção de Bonferroni é 0,0017.

| Pares de locos | Adultos | Regenerantes | Progênies |
|---|---|---|---|
| C072 X D094 | 0,0367 | 0,0783 | 0,0033 |
| C072 X A392 | 0,1050 | 0,3667 | 0,6083 |
| C072 X D200 | 0,3200 | 0,2083 | 0,0283 |
| C072 X E062 | 0,0400 | 0,9283 | 0,0317 |
| D094 X A392 | 0,0083 | 0,0483 | 0,2183 |

**Tabela 2.** Continuação

| Pares de locos | Adultos | Regenerantes | Progênies |
|---|---|---|---|
| D094 X D200 | 0,6817 | 0,2683 | 0,6733 |
| D094 X E062 | 0,4550 | 0,0700 | 0,2950 |
| A392 X D200 | 0,0033 | 0,1167 | 0,1950 |
| A392 X E062 | 0,0450 | 0,3800 | 0,1950 |
| D200 X E062 | 0,9450 | 0,8433 | 0,0033 |

### *3.3.2 Diversidade genética na amostra total*

Sobre a amostra total de cinco locos em 1130 genótipos (adultos + regeneração + progênies) foram observados 60 alelos (Tabela 4), o que sugere um nível de polimorfismo relativamente alto. O número de alelos por loco variou de 7 (E062) a 25 alelos (C072), com média de 12 alelos por locos. O número efetivo de alelos por locos foi menor do que o número médio de alelos por locos, variando de 2,39 a 7,46 alelos, com média 3,56 alelos, indicando que muitos alelos têm baixa frequência (0,05≤frequência≤0,25) ou são raros (frequência≤0,05). A presença de alelos raros pode contribuir para a adaptação em condições de estresse ambiental, ou alterações bruscas do ambiente (KRUSCHE; GEBUREK, 1991). A heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg variou de 0,581 (D094) a 0,866 (C072), com média de 0,662, enquanto que a heterozigosidade observada variou de 0,472 (D200) a 0,839 (C072), com média de 0,713. O índice de fixação variou de -0,348 (D094) a 0,215 (D200), com média de -0,076. O índice de fixação foi significativo nos locos D094, D200 e E062, sugerindo desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nos locos D094 e E062, estes desvios foram causados por excesso de heterozigotos e nos locos D200 por excesso de homozigotos.

**Tabela 4**. Índices de diversidade genética para a amostra total de *Myracrodruon urundeuva*. *k* é o número total de alelos; $A_e$ é o número efetivo de alelos nos locos; $H_o$ é a heterozigosidade observada; $H_e$ é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; $F$ é o índice de fixação.

| **Loco** | Tamanho dos Fragmentos (pb) | $k$ | $A_e$ | $H_o$ | $H_e$ | $F$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| C072 | 144-204 | 25 | 7,46 | 0,839 | 0,866 | 0,031 |
| D094 | 104-126 | 9 | 2,39 | 0,783 | 0,581 | -0,348 ** |
| A392 | 181-203 | 11 | 2,88 | 0,699 | 0,653 | -0,070 |
| D200 | 199-213 | 8 | 2,51 | 0,472 | 0,601 | 0,215 ** |
| E062 | 78-100 | 7 | 2,55 | 0,770 | 0,608 | -0,266 ** |
| **Média** | **--** | **12** | **3,56** | **0,713** | **0,662** | **-0,076** |

### *3.3.3 Diversidade genética entre gerações*

Um maior número de alelos foi encontrado na amostra da população adulta (60 alelos), seguida das progênies (50 alelos) e dos regenerantes (41 alelos; Tabela 5). Alelos exclusivos foram encontrados apenas na população adulta (10 alelos em relação às progênies e 19 alelos em relação aos regenerantes). Em todas as três gerações avaliadas (Tabela 5), o número efetivo de alelos foi menor que o número de alelos nos locos e média entre locos, indicando novamente que muitos alelos têm baixa frequência (0,05≤ frequência≤0,25) ou são raros (frequência ≤0,05). A heterozigosidade observada foi maior nos adultos do que nos regenerantes e nas progênies, o que sugere que algum processo possa estar reduzindo esta heterozigosidade em gerações recentes, como o cruzamento entre parentes. A heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg, por sua vez, foi menor do que a heterozigosidade observada nas três amostras. Consequentemente, o índice de fixação foi negativo em todas as amostras (Figura 6), sugerindo excesso de heterozigotos. Contudo, este excesso foi maior e significativamente diferente de zero nos adultos ($F$= -0,153; $P$<0,05) e nas progênies ($F$= -0,083; $P$<0,05). Nos regenerantes, o índice de fixação foi próximo à zero.

**Tabela 5**. Índices de diversidade genética e índice de fixação para árvores adultas, regenerantes e progênies de *Myracrodruon urundeuva*. *k* é o número total de alelos; $A_e$ é o número efetivo de alelos nos locos; $H_e$ é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; $H_o$ é a heterozigosidade observada; $F$ é o índice de fixação; $P_{1^o\,Parente}$ e $P_{2^o\,Parente}$ são respectivamente as probabilidades de excluir o primeiro parente (quando nenhum dos parentes são conhecidos) e o segundo parentes (quando um dos parentes é conhecido).

| Loco | Árvores adultas (*n*=467) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $k$ | $A_e$ | $H_o$ | $H_e$ | $F$ | $P_{1^o\,Parente}$ | $P_{2^o\,Parente}$ |
| **C072** | 25 | 7,75 | 0,849 | 0,871 | 0,025 | 0,411 | 0,258 |
| **D094** | 9 | 2,25 | 0,823 | 0,556 | -0,480** | 0,843 | 0,736 |
| **A392** | 11 | 2,65 | 0,682 | 0,622 | -0,096 | 0,785 | 0,638 |
| **D200** | 8 | 2,40 | 0,462 | 0,583 | 0,207** | 0,804 | 0,627 |
| **E062** | 7 | 2,32 | 0,810 | 0,569 | -0,423** | 0,834 | 0,723 |
| **Média** | **12** | **3,47** | **0,725** | **0,640** | **-0,153*** | **0,8174** | **0,9450** |
| **IC (85%)** | ±1,63 | ±0,52 | ±0,035 | ±0,029 | ±0,064 | | |
| **Total** | **60** | | | | | | |

| Loco | Regenerantes (*n*=149) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | $k$ | $A_e$ | $H_o$ | $H_e$ | $F$ |
| **C072** | 14 | 8,20 | 0,860 | 0,878 | 0,020 |
| **D094** | 7 | 2,97 | 0,819 | 0,663 | -0,235** |
| **A392** | 9 | 2,75 | 0,685 | 0,637 | -0,075 |
| **D200** | 6 | 3,01 | 0,333 | 0,668 | 0,501** |
| **E062** | 5 | 2,39 | 0,757 | 0,582 | -0,301** |
| **Média** | **8,2** | **3,86** | **0,691** | **0,686** | **-0,018** |
| **IC (85%)** | ±0,78 | ±0,53 | ±0,046 | ±0,025 | ±0,069 |
| **Total** | **41** | | | | |

| Loco | Progênies (*n*=514) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | $k$ | $A_e$ | $H_o$ | $H_e$ | $F$ |
| **C072** | 18 | 7,04 | 0,830 | 0,858 | 0,033 |
| **D094** | 7 | 2,35 | 0,735 | 0,575 | -0,278** |
| **A392** | 11 | 3,04 | 0,718 | 0,671 | -0,070** |
| **D200** | 8 | 2,44 | 0,508 | 0,591 | 0,140 ** |
| **E062** | 6 | 2,47 | 0,737 | 0,595 | -0,239** |
| **Média** | **10** | **3,47** | **0,706** | **0,658** | **-0,083 *** |
| **IC (85%)** | ±1,06 | ±0,44 | ±0,026 | ±0,026 | ±0,017 |
| **Total** | **50** | | | | |

* $P$<0,01.

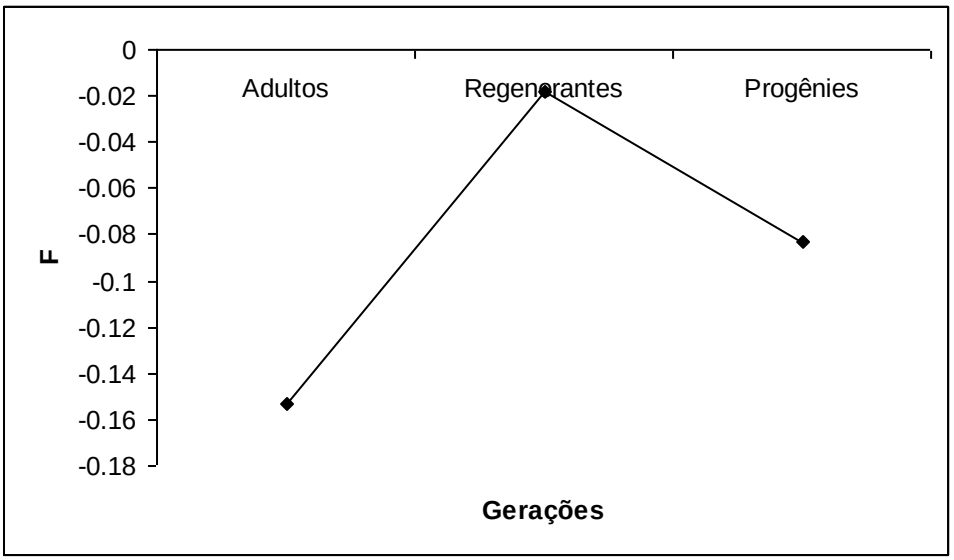


**Figura 6.** Comportamento do índice de fixação entre diferentes gerações de uma população de *M. urundeuva* na Estação Ecológica de Paulo de Faria, SP.

### *3.3.4 Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg*

O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg por loco em cada geração ($\alpha$=0,05, após correção de Bonferroni) foi analisado pelo índice de fixação em cada loco. Valores significativos negativos ou positivos do índice de fixação indicam desvios das proporções esperadas pelo modelo de EHW. Desvios das proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg foram observados em três locos nas árvores adultas, três nos regenerantes e em quatro nas progênies (Tabela 5). Os locos D094, D200 e E062 apresentaram desvios em todas as amostras, sendo os desvios nos locos D094 e E062 causados por excesso de heterozigotos, provavelmente, seleção para alelos de locos do mesmo grupo de ligação. Já o loco D200 apresentou desvios por excesso de homozigotos, sugerindo endogamia. A seleção provavelmente não ocorre para os alelos dos presentes locos, visto que marcadores SSR são teoricamente neutros, mas sim em algum loco ou locos do mesmo grupo de ligação em que se encontra o respectivo loco microssatélite. Por outro lado, o excesso de homozigotos no loco D200 poderia ser explicado pelo cruzamento entre parentes, causando endogamia biparental. Por sua vez, a grande variação no índice de fixação entre os locos pode ter origem no processo de fundação da população (efeito fundador) e na deriva genética que possa ter ocorrido em gerações subsequentes.

### *3.3.5 Divergência genética entre diferentes gerações*

A medida de diferenciação genética de Hedrick (2005) foi utilizada para medir as diferenças entre as diferentes gerações, visto que esta é a mais indicada para ser usada em locos microssatélites (Tabela 6). A diferenciação genética foi relativamente baixa em todos os casos, variando de 0,043 entre adultos e progênies a 0,100 entre regenerantes e progênies. A medida de divergência genética entre gerações demonstrou que ocorreu uma variação de 4,3% e 4,5% entre adultos-progênies e adultos-regenerantes, respectivamente, e que 95,7% e 95,5% da diversidade encontra-se dentro de cada geração. Como já comprovado pelos resultados da diversidade genética, a maior diferenciação ocorreu quando se comparou progênies e regenerantes. A diversidade genética entre as duas gerações foi de 10% e, portanto, a maior diversidade 90% encontra-se dentro de cada geração. Isto se deve ao fato de que os adultos possuíam todos os alelos presentes nos regenerantes e nas progênies, mas estas duas últimas gerações tinham alelos exclusivos entre si.

**Tabela 6**. Diferenciação genética entre três gerações de *Myracrodruon urundeuva* com base na estatística $G_{ST}$`(HEDRICK, 2005).

| Populações | Regenerantes | Progênies |
|---|---|---|
| Adultos | 0,045 | 0,043 |
| Regenerantes | --- | 0,100 ** |

### *3.3.6 Distribuição espacial de genótipos*

Em todas as análises realizadas foi possível verificar a presença de estrutura genética espacial (EGE) na população, com coeficiente de coancestria entre pares de árvores reduzindo da primeira classe de distância para as classes finais, o que representa um claro padrão de isolamento por distância (Figura 7). Quando a análise foi conduzida só com os genótipos dos adultos, observou-se EGE até aproximadamente 40 m. O coeficiente de coancestria na primeira classe foi de aproximadamente 0,06, ou próximo ao esperado entre primos de primeiro grau. Os regenerantes apresentaram um padrão um pouco diferente, com estrutura

genética espacial significativa até a distância de 30 m e coancestria na primeira classe (0 a 5 m) próxima à esperada entre meios-irmãos (0,125).

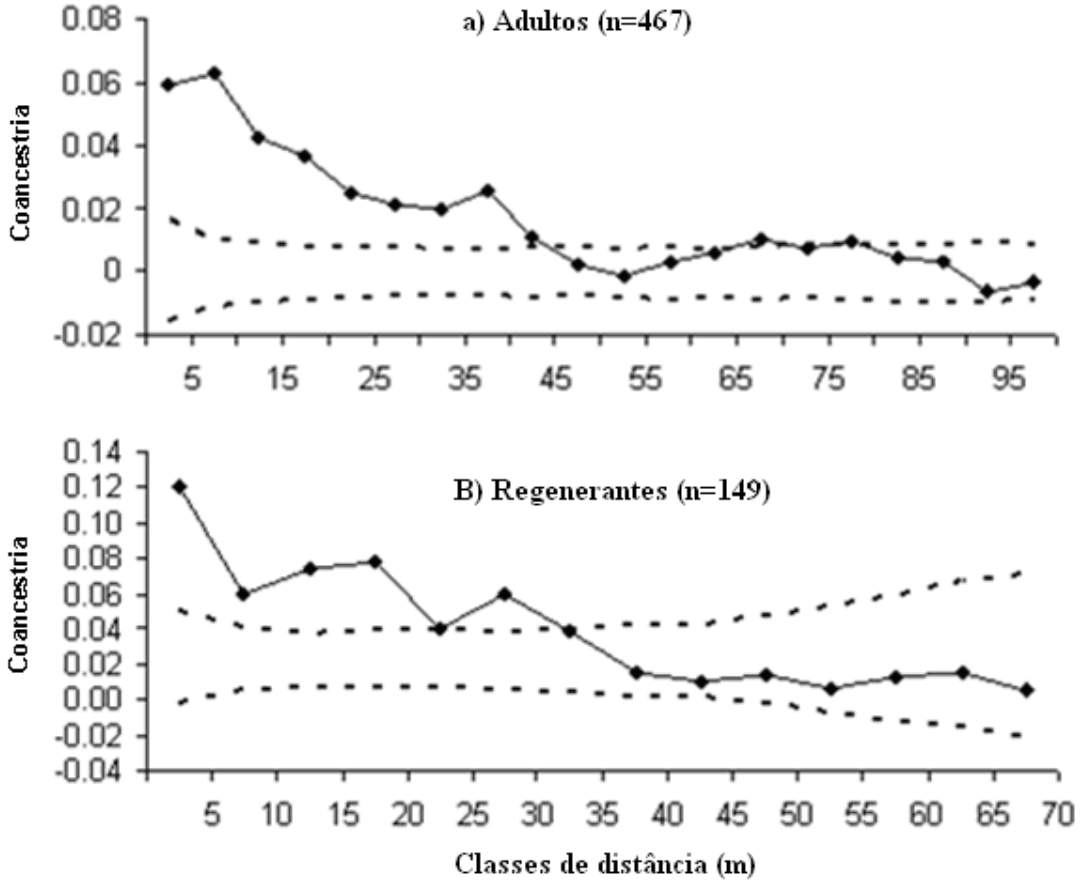


**Figura 7**. Distribuição espacial de genótipos adultos e regenerantes separadamente em população natural de *Myracrodruon urundeuva*. A linha contínua representa o valor médio do coeficiente de coancestria e as duas pontilhadas representam o intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

## 3.4 DISCUSSÃO

### *3.4.1 Diversidade genética e índice de fixação na amostra total*

A avaliação do conjunto amostral da população da Estação Ecológica apresentou um nível relativamente alto de diversidade genética (60 alelos). Ao comparar os resultados deste

estudo com outros trabalhos, onde foram utilizados mais de cinco locos microssatélites, torna-se evidente que o número de alelos aqui identificados pode ser superior ou próximo dos encontrados em algumas espécies arbóreas tropicais. Como é o caso do estudo de Caetano et al. (2005), com três populações naturais de *M. urundeuva* (duas provenientes do Paraguai e uma da Argentina), utilizando os mesmos cinco locos de microssatélites aqui usados foram observados 38 alelos. Raposo (2007), estudando a espécie *Carapa guianensis* com a utilização de sete locos microssatélite, obteve 56 alelos. No trabalho de Feres (2009), com populações de *Tabebuia rosea-alba* oriundas de duas regiões distintas e com indivíduos de gerações diferentes e utilizando oito *primers* SSR, o número de alelos observados variou de 6,5 a 12,88. Brandão (2008), com populações da espécie *Myrcia splendens* utilizando dez locos de ISSR, obteve 70 alelos. Portanto, o alto grau de diversidade genética dentro da população de *M. urundeuva*, confirma o elevado conteúdo de informação genética dos marcadores SSR utilizados.

A riqueza alélica da população (Â = 12) também apresentou resultados próximos ou superiores àqueles observados em algumas espécies florestais brasileiras estudadas por meio de marcadores SSR. Quando comparados com as espécies *Carapa guianensis* (Â = 8) (RAPOSO, 2007) e *Solanum lycocarpum* (Â = 3,9) (MARTINS, 2005), o número médio de alelos/loco da população de *M. urundeuva* foi superior. Em relação à espécie do cerrado *Caryocar brasiliensis* o número médio de alelos por locos foi relativamente próximo (Â = 16) (COLLEVATTI et al., 1999). A diversidade gênica ou heterozigosidade esperada em *M urundeuva* ($H_e$=0,662), também foi maior em relação a outras espécies árboreas tropicais utilizando marcadores microssatélites, como o que ocorreu com a *Myrcia splendens* ($H_e$=0,33) (BRANDÃO, 2008), *Theobroma grandiflorum* ($H_e$=0,428) (ALVES, 2002) e *Carapa guianensis* ($H_e$=0,609) (RAPOSO, 2007). Em contrapartida para espécies como *Caryocar brasiliensis* ($H_e$=0,840) (COLLEVATTI et al., 2001), *Hymenaea courbaril* ($H_e$=0,715) (LACERDA et al., 2008) e *Tabebuia rosea-alba* ($H_e$=0,746) (MARTINEZ, 2008), o índice de diversidade genética foi próximo ou superior ao encontrado em *M. urundeuva*. Apesar do índice de diversidade gênica se mostrar menor em relação a algumas espécies florestais estudadas, os locos de SSR utilizados não apresentaram indícios de desequilíbrio de ligação e apresentaram boa resolução, permitindo a verificação de que a população de *M. urundeuva* possui uma grande diversidade genética. Os relativos altos índices de diversidade genética detectados neste estudo podem estar associados à ampla distribuição geográfica da espécie, adaptação a diferentes condições ambientais de solo e clima, e a baixa perturbação antrópica em que a população tem sido exposta ao longo dos anos. Em espécies como *M. urundeuva*,

que se reproduzem obrigatoriamente por cruzamentos, ocupam grandes extensões geográficas e diferentes habitats, espera-se que apresentem altos níveis de diversidade genética (HAMRICK; LOVELESS, 1986).

O índice de fixação mede os desvios da frequência de heterozigotos em relação ao esperado em uma população panmítica. Assim, quando o valor do índice de fixação for igual a zero, a população está ajustada às proporções do Equilíbrio de Hardy–Weinberg e quando os valores são significativamente maiores ou menores que zero, indica que há um excesso de homozigotos ou de heterozigotos, respectivamente. Na população da espécie *M. urundeuva* este índice foi significativamente menor que zero nos locos D094 e E062, sugerindo que estes desvios foram causados por excesso de heterozigotos, provavelmente devido à ação da seleção natural em locos seletivos no mesmo grupo de ligação. Já nos locos D200 o índice foi significativamente maior que zero, sugerindo que o desvio no EHW foi ocasionado por excesso de homozigotos, possivelmente devido à endogamia gerada por cruzamentos entre parentes.

A dinâmica dos processos micro-evolutivos, como o caso da seleção natural é de suma importância, já que possui a capacidade de moldar e selecionar indivíduos mais aptos às transformações dos ecossistemas, o que é imprescindível diante das condições de ambientes extremamente fragmentados. Por outro lado, os efeitos dos processos de fragmentação são extremamente destrutivos, devido à redução no tamanho das populações, o que associada à baixa densidade populacional favorece a ocorrência de baixo número de indivíduos reprodutivos de muitas espécies arbóreas. Além disso, se o mecanismo de fluxo gênico for reduzido ou ineficiente, pode-se verificar um aumento na taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados, resultando no aumento da endogamia nas populações (NASON; HAMRICK, 1997).

### *3.4.2 Diversidade genética entre as diferentes gerações*

Na avaliação dos índices de diversidade genética entre os indivíduos das diferentes gerações da população da Estação Ecológica, observou-se que houve uma redução no número de alelos por locos, na riqueza alélica e na heterozigosidade observada dos adultos para as progênies, seguidos dos regenerantes. Não está claro se o pequeno número de alelos

detectados nos regenerantes é uma consequência da fragmentação florestal ou o resultado do tamanho da amostra (pequeno número de regenerantes amostrados). Em relação ao número efetivo de alelos por loco e a heterozigosidade esperada observou-se que foi ao contrário, ou seja, estes se mostraram maior nos regenerantes, seguidos das progênies e menor nos adultos. De acordo com Cournuet e Luikart (1996), populações que experimentaram uma recente redução de seu tamanho efetivo populacional exibem uma redução mais rápida do número de alelos do que da heterozigosidade esperada pelas proporções de EHW nos locos polimórficos. Assim, segundo Luikart et al. (1998), populações que passaram por um recente processo de gargalo genético (*bottleneck*) apresentam um excesso temporário de heterozigosidade. Nestes casos, a estimativa da riqueza alélica pode refletir com maior precisão os índices de diversidade genética de uma determinada população remanescente do que o número de alelos por locos e as heterozigosidades observadas e esperadas (COURNUET; LUIKART, 1996; VARVIO et al., 1986). Em concordância, poucos estudos que consideram os efeitos da fragmentação florestal sobre as espécies de árvores encontraram diminuições significativas na diversidade genética em populações fragmentadas, especialmente se a análise for conduzida apenas usando árvores adultas (AGUILAR et al., 2008; KRAEMER et al., 2008; LOWE et al., 2005).

A presença de alelos exclusivos apenas nos indivíduos adultos pode ser uma evidencia de que a população de *M. urundeuva* possa estar sofrendo os efeitos da fragmentação florestal, como deriva genética no processo de recombinação da diversidade genética. Entretanto, estes alelos exclusivos não foram completamente perdidos da população, uma vez que ainda existem em árvores adultas, e podem ser transferidas para as gerações futuras em futuros eventos reprodutivos. A ocorrência de alelos exclusivos sugere que a população possa estar isolada reprodutivamente e que apenas parte dos adultos está participando dos cruzamentos, caso contrário, estes alelos deveriam estar nas gerações descendentes. É o caso do estudo de Martinez (2008), com a espécie *Tabebuia roseo-alba* em que foram encontrados alelos exclusivos não apenas nos indivíduos adultos (4 alelos) como também nas progênies (15 alelos). No trabalho de Martins et al. (2008), com três populações de *Copaifera langsdorffii* no Pontal do Paranapanema também foram encontrados alelos exclusivos nas gerações descendentes, sendo que apenas em uma das populações (Fragmento Tucano), o número de alelos exclusivos observados foi maior nos indivíduos adultos (4 alelos) do que nos regenerantes que apresentaram apenas um alelo.

O índice de fixação foi outro indicador discutido neste estudo, que não mostra claramente os efeitos da fragmentação florestal. A relação entre a heterozigosidade observada

e a esperada gerou valores de fixação negativos, indicando o excesso de heterozigotos na população adulta seguido das progênies. Isto sugere que ocorreu redução de heterozigosidade entre a fase adulta até a fase de plântulas, eliminando plantas menos heterozigotas. O excesso de heterozigotos pode ser causado por seleção a favor de heterozigotos, embora isso não signifique que estes locos estão sofrendo seleção. A seleção pode estar atuando em outros locos localizados no mesmo grupo de ligação onde se encontram os respectivos locos microssatélites, de forma que a seleção neste, afete os locos microssatélites devido à ligação física entre eles. Indício de um excesso significativo de heterozigotos já tinha sido detectado por Moraes et al. (2005), na espécie de *M. urundeuva* em um estudo de estrutura de progênies com locos enzimáticos da mesma população. De acordo com Reis (1996), o excesso de heterozigotos tem sido descrito para várias espécies tropicais. Sua presença é de extrema importância, pois, altos níveis de diversidade genética possibilitam a ocorrência de um grande número de novas combinações genotípicas, aumentando o potencial evolutivo das espécies, pela maior capacidade de adaptação às possíveis mudanças ambientais (SEBBENN et al., 2000), sendo obrigatória, sua contemplação em atividades de coleta de sementes (REIS, 1996).

Embora a verificação de que esta população apresenta altos índices de variabilidade genética, a avaliação da diversidade entre as diferentes gerações da espécie de *M. urundeuva*, sugere que a população possa estar sendo afetada pelas transformações (fragmentação) que ocorrem em seu entorno, mesmo sob condições de baixa influência antrópica dentro da unidade de conservação. Entretanto, os resultados deste estudo indicam que a detecção dos efeitos da fragmentação florestal sobre a diversidade genética e endogamia na população estudada, só será possível mediante a inclusão de muitas gerações futuras. As análises genéticas realizadas neste estudo não foram capazes de mostrar os possíveis efeitos da fragmentação da floresta em virtude de razões como: a espécie é de vida longa e dióica, e a endogamia só pode ser produzida por meio de cruzamentos entre parentes; essa população é relativamente grande (470 árvores adultas reprodutivas); a fragmentação da população é recente, pois ocorreu há menos de 100 anos, e; finalmente, como a população está restrita apenas a uma parcela da área total, ela pode se beneficiar da existência de áreas potencialmente adequadas e crescer.

### *3.4.3 Diferenciação genética entre gerações*

Estudos em espécies arbóreas têm mostrado que o grau de diferenciação entre grupos de indivíduos de um determinado nível hierárquico da subdivisão de espécies é relativamente baixo e que a maior parte da diversidade genética se encontra dentro desses grupos (KAGEYAMA et al., 2004; LOVELESS; HAMRICK, 1984). Moraes et al. (2005), estudando a estrutura genética de duas populações de *M. urundeuva* sob diferentes condições de antropização por meio de locos isoenzimáticos, encontraram uma divergência genética semelhante ao observado no presente estudo (0,043). De acordo com Moraes (1992), em populações de *M. urundeuva* a maior parte da diversidade genética encontra-se dentro de populações (97,26%) e apenas 2,74%, entre populações. A distribuição da diversidade genética entre e dentro de grupos de indivíduos de um nível hierárquico, em locos neutros, como os marcadores microssatélite, é determinada pelo sistema de reprodução, deriva genética e fluxo gênico. Espécies alógamas, polinizadas por animais e dispersas pelo vento, como *M. urundeuva*, geralmente apresentam baixos níveis de divergência genética entre grupos de indivíduos (HAMRICK; LOVELESS, 1986). A divergência intermediária (10%), observada entre as gerações de indivíduos regenerantes e das progênies pode ser explicada pela presença de alelos exclusivos na geração adulta. Seone et al. (2000) relatam que a presença de alelos exclusivos em algumas populações de espécies arbóreas é um indicativo de fluxo gênico restrito, o que culminaria no aumento da diferenciação genética entre grupos de indivíduos. Em suma, os resultados da diferenciação genética indicam que algumas alterações estão ocorrendo entre as gerações desta população de *M. urundeuva*. Uma possível explicação é que nem todos os adultos estão participando do processo de reprodução, devido a variações na fenologia de florescimento e/ou isolamentos por distância, o que leva a uma deriva genética amostral durante o processo de reprodução, além da ocorrência de cruzamentos entre parentes.

### *3.4.4 Distribuição espacial de genótipos*

A estrutura genética espacial é determinada principalmente pela dispersão de sementes próxima às árvores matrizes, embora ela possa ser amplificada pela dispersão de pólen a curtas distâncias. Diversos estudos realizados com espécies arbóreas tropicais têm observado estruturação genética espacial intrapopulacional e este padrão tem sido atribuído à dispersão de sementes a curtas distâncias (AZEVEDO et al., 2007; BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; BITTENCOURT; SEBBENN, 2008; CARNEIRO et al., 2007; CLOUTIER et al., 2007; LACERDA et al., 2008; SILVA et al., 2008). O padrão observado no presente estudo foi também originado provavelmente pela dispersão de sementes a curtas distâncias da árvore materna. De acordo com Moraes et al. (2005), os poucos remanescentes de *M. urundeuva* localizados no estado de São Paulo apresentam uma distribuição agrupada em forma de manchas, sendo essas formadas pela dispersão das sementes próximas às árvores matrizes, o que favorece a estrutura genética intrapopulacional. Em espécies arbóreas polinizadas por animais, indivíduos próximos tendem a se cruzar mais do que indivíduos localizados espacialmente distantes e se estes são relacionados pela dispersão de sementes próxima a árvore materna (são parentes), a endogamia vai aumentar na população com o passar das gerações (COLES; FOWER, 1976), caso a pressão de seleção contra indivíduos endogâmicos não seja efetiva. Caso a dispersão de pólen ocorra a curtas distâncias, também podem ocorrer cruzamentos entre parentes, dando origem a endogamia biparental, embora não foi observada endogamia em ambas gerações (progênies e regenerantes). Estes resultados, aparentemente incongruentes, devido à ausência de endogamia nos adultos, regenerantes e progênies, na realidade podem estar refletindo outro aspecto: a presença de seleção natural contra homozigotos. Isso se deve ao fato de que as progênies analisadas têm mais de dez anos de idade e encontram-se estabelecidas no campo, em um teste de progênies, de forma que a seleção natural possa ter eliminado indivíduos endogâmicos entre o período da fertilização e o momento da análise das progênies. A depressão endogâmica em espécies arbóreas é fato e, em espécies tropicais, tem sido relatada entre a fase de fertilização e a fase de plântulas em *Platypodium elegans* (HUFFORD; HAMRICK, 2003), *Neobalanocarpus heimii* (NAITO et al., 2005) e *Pinus chiapensis* (DEL CASTILLO; TRUJILLO, 2007). Possivelmente isso também venha acontecendo em *M. urundeuva*. Uma consequência prática da observada estrutura genética espacial *em M. urundeuva* é de que a seleção de árvores matrizes para a

coleta de sementes para fins de melhoramento florestal, conservação genética e recuperação ambiental devem ser preferencialmente marcadas em distâncias maiores do que 40 m, para evitar coletar sementes de árvores parentes. Quando sementes de árvores parentes são envolvidas em um mesmo teste, ocorre um aumento adicional na identidade por descendência dos alelos, na população descendente, o que reduz o tamanho efetivo da população. Contudo, é importante ter em mente que isso não evita que algumas árvores masculinas tenham fertilizado várias árvores matrizes localizadas a distâncias maiores do que 40 m, o que adiciona a amostra meios-irmãos paternos e também reduz o tamanho efetivo da amostra. Assim, adicionalmente à importância de se conhecer a extensão da estrutura genética espacial, é fundamental conhecer a distância e os padrões de dispersão de pólen para selecionar árvores matrizes que não sobreponham o conjunto de pólen recebido por cada uma ou que esta sobreposição seja pequena, para evitar a inclusão de meios-irmãos paternos.

## 3.5 CONCLUSÕES

1. Não existem indícios de desequilíbrio de ligação entre os cinco locos nas três gerações (adultos, regenerantes e progênies) e, portanto, estes cinco locos podem ser usados para estudos da diversidade e estrutura genética, sistema de reprodução e fluxo gênico contemporâneo;
2. A população adulta apresenta maior diversidade genética em termos de número de alelos do que os regenerantes e as progênies;
3. A população não se encontra nas proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg;
4. Existem indícios de seleção para heterozigotos entre a fase de plântulas e a fase adulta da população;
5. Existe estrutura genética espacial intrapopulacional nas gerações, adultas e regenerantes e, devido a isso, árvores matrizes para a coleta de sementes para fins melhoramento florestal, conservação genética e recuperação ambiental devem ser preferencialmente marcadas em distâncias maiores do que 40 m, para evitar coletar sementes de árvores matrizes aparentadas.

# 4 CAPÍTULO II

**SISTEMA DE REPRODUÇÃO DE *Myracrodruon urundeuva* (F.F. & M.F. Allemão): SUBSÍDIO PARA A SELEÇÃO DE ÁRVORES MATRIZES PARA A RECUPERAÇÃO AMBIENTAL**

## 4.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento do sistema de reprodução das espécies arbóreas é de extrema importância para a compreensão dos padrões de fluxo gênico e da diversidade genética entre e dentro populações (BAWA, 1974; CLEGG, 1980; HAMRICK, 1989). O estudo do sistema de reprodução pode fornecer informações importantes sobre os padrões de cruzamentos, a dinâmica dos processos micro-evolutivos e as melhores formas para a conservação e manejo dessas espécies (OLIVEIRA et al., 2002).

O sistema de reprodução das espécies arbóreas tropicais geralmente é caracterizado como misto associado às complexas interações com agentes polinizadores e dispersores de sementes, com predomínio de cruzamentos. Tais espécies apresentam geralmente baixa densidade populacional e dependem de animais para a dispersão de pólen e/ou sementes. Suas reproduções são geralmente por fecundação cruzada (BAWA, 1974). A reprodução por cruzamentos favorece a alta heterozigosidade dentro das populações e reduz os níveis de diferenciação genética entre as populações, devido ao intenso fluxo gênico entre populações e aos grandes tamanhos de vizinhança reprodutiva, com reduzida subdivisão dentro de populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Espécies arbóreas tropicais apresentam altas taxas de cruzamentos (0,880). No entanto, uma grande parte dos cruzamentos não ocorre de forma aleatória, mas sim entre árvores aparentadas (cruzamentos endogâmicos) e de forma sistemática entre mesmas árvores (cruzamentos correlacionados), gerando progênies compostas por misturas de irmãos de autofecundação, irmãos-completos, meios-irmãos e irmãos de cruzamento e autofecundação (SEBBENN, 2001). Embora, essas espécies apresentem elevadas taxas de cruzamentos, seus sistemas de reprodução podem variar entre espécies, populações de uma espécie, eventos reprodutivos de uma população e entre flores de uma árvore, devido ao seu controle estar sob a influência genética e ambiental (SEBBENN, 2006).

Fatores genéticos e ecológicos como: o sistema sexual e a presença de auto-incompatibilidade (FINKELDEY, 1998; LEE, 2000; MURAWSKI; HAMRICK, 1991); o tamanho e a densidade populacional, que corresponde ao número de árvores florescendo por hectare (FRANCESCHINELLI; BAWA, 2000; ROUTLEY et al., 1999); a estrutura genética espacial, relativa ao modo de distribuição das árvores florescendo (FINKELDEY, 1998); a fenologia do florescimento, relacionada a variações entre os períodos de floração das plantas

(BOSHIER et al., 1995); o modo de polinização e o comportamento dos polinizadores (FRANCESCHINELLI; BAWA, 2000), podem promover uma grande interferência no sistema de reprodução de uma espécie arbórea, alterando as taxas de cruzamentos entre os indivíduos de uma população e entre as espécies (SEBBENN, 2006). A amplitude de variação na taxa de cruzamento das espécies arbóreas tropicais tem fortes implicações para a coleta de sementes para reflorestamentos ambientais, uma vez que o seu conhecimento pode ser utilizado na determinação do número de árvores matrizes necessário para a coleta do germoplasma (SEBBENN, 2006).

Fatores antropogênicos como fragmentação florestal e corte seletivo de árvores também podem afetar o sistema de reprodução das espécies arbóreas tropicais (ALDRICH; HAMRICK, 1998; DEGEN et al., 2006; DICK et al., 2003; LOWE et al., 2005; NASON; HAMRICK, 1997). A fragmentação pode afetar a densidade populacional de animais, a amplitude de flutuação das suas populações, as atividades dos polinizadores e o arranjo de forrageamento dos mesmos (PULLIAM, 1988; SHAFFER, 1981;), atingindo potencialmente a polinização e o nível de produção de sementes nas plantas (JENNERSTEN, 1988; MENGES, 1991).

As consequências genéticas da fragmentação estão relacionadas com alterações no fluxo gênico original, refletindo diretamente na taxa de cruzamento por alterar o tamanho das populações das espécies, ou indiretamente, por influenciar a abundância ou comportamento dos agentes polinizadores (KARRON et al., 1995). De acordo com Moraes et al. (2007), vários estudos recentes relatam que populações de espécies arbóreas tropicais fragmentadas apresentam uma redução nas taxas de cruzamentos e no tamanho da vizinhança reprodutiva comparada às populações com baixa antropização. As consequências da fragmentação tendem a aumentar a frequência de cruzamentos endogâmicos nas populações remanescentes. O aumento da endogamia ou homozigosidade para alelos idênticos por descendência pode resultar em depressão endogâmica, sendo esta mais severa em espécies predominantemente alógamas que mantêm altos níveis de carga genética (NASON; HAMRICK, 1997).

A baixa densidade populacional, presença de sistemas de auto-incompatibilidade e as consequentes altas taxas de cruzamento de muitas espécies arbóreas dos trópicos tornam-nas vulneráveis à fragmentação (CASCANTE et al., 2002). Portanto, o conhecimento do sistema reprodutivo é de grande importância para os programas de melhoramento e conservação dos recursos genéticos das espécies, pois permite delinear estratégias que otimizem a amostragem da variabilidade genética e também indica os modelos genético-estatísticos apropriados para a estimativa dos parâmetros genéticos (FREITAS et al., 2004; SOUZA et al., 2003). Permiti,

ainda, a aplicação de métodos amostrais mais efetivos e o uso de modelos matemáticos mais realistas no estudo da herança quantitativa de caracteres de interesse econômico (SEBBENN, 2001).

O objetivo deste estudo foi investigar o sistema de cruzamento de uma população natural de *Myracrodruon urundeuva*, da Estação Ecológica de Paulo de Faria, por meio de marcadores microssatélites. Nesta etapa as seguintes questões foram abordadas: *i*) Qual é a taxa de cruzamentos endogâmicos e correlacionados na população? *ii*) Qual o número efetivo de árvores doadoras de pólen? *iii*) Qual o coeficiente médio de coancestria dentro de progênies e qual o tamanho efetivo populacional médio dentro de progênies de polinização aberta? *iv*) Qual o número de árvores matrizes necessário para a coleta de sementes?

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### *4.2.1 Coleta do material biológico e análise do DNA genômico*

Para o presente estudo, foi realizada uma amostragem semelhante à descrita no capítulo 1, no subitem 3.2.2. Neste caso, além do georeferenciamento e medidas do diâmetro a altura do peito (DAP) das árvores adultas, também foi determinado o sexo das mesmas (Figura 8). Da amostra total de 467 plantas, 175 eram plantas femininas, 268 eram masculinas e 24 não puderam ter seu sexo determinado, devido à ausência de flores durante o evento reprodutivo avaliado (Figura 9). Em testes de progênies tem se verificado que *M. urundeuva* inicia a reprodução com menos de cinco anos de idade (MORAES, informação pessoal). Assim, aqui considerou-se árvores com DAP≥11 cm como adultas. Contudo, a floração e frutificação são baixas nos primeiros anos (BALERONI et al., 2003). Para o estudo do sistema de cruzamento, também foram amostradas 514 progênies de 30 árvores matrizes.

O material amostral foi constituído por tecido foliar armazenado em sílica gel. O DNA genômico foi extraído pelo emprego do protocolo CTAB (DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L., 1990), com algumas modificações no tampão de extração. Assim, o DNA genômico dos indivíduos de *M. urundeuva* foram estudados por meio de cinco locos de SSR (CAETANO et al., 2005). As reações e condições de amplificação foram conduzidas conforme proposto por

Caetano et al. (2005), e descritas no capítulo 1 subitem 3.2.5.2. Desta forma, as PCRs foram constituídas de 1 ng de DNA genômico em um volume final de 6 µL contendo: 200uM de cada dNTPs, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,33 µM de cada iniciador, água ultrapura estéril e 1X Go Taq Master Mix PROMEGA. O componente Foward de cada par de primers foi marcado na sua extremidade 5' com um fluoróforo específico. O programa de PCR utilizado para a amplificação das regiões microssatélites foi constituído de um ciclo de 94°C por 3 min., 35 ciclos de 94°C por 30 seg., temperatura de pareamento do primer por 30 seg., 72°C por 30 seg., e um ciclo final de 72°C por 5 min. As reações de amplificação foram realizadas em termocicladores 9600 e 9700 (Applied Biosystem). Os produtos de amplicações foram diluídos e depois foram montados multiplex com 2 e 3 amplificados de locos distintos (BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001). Então, os multiplex foram desnaturados a 94ºC por 5 minutos e submetidos à eletroforese capilar em equipamento ABI Prism 3700 (Applied Biosystem).

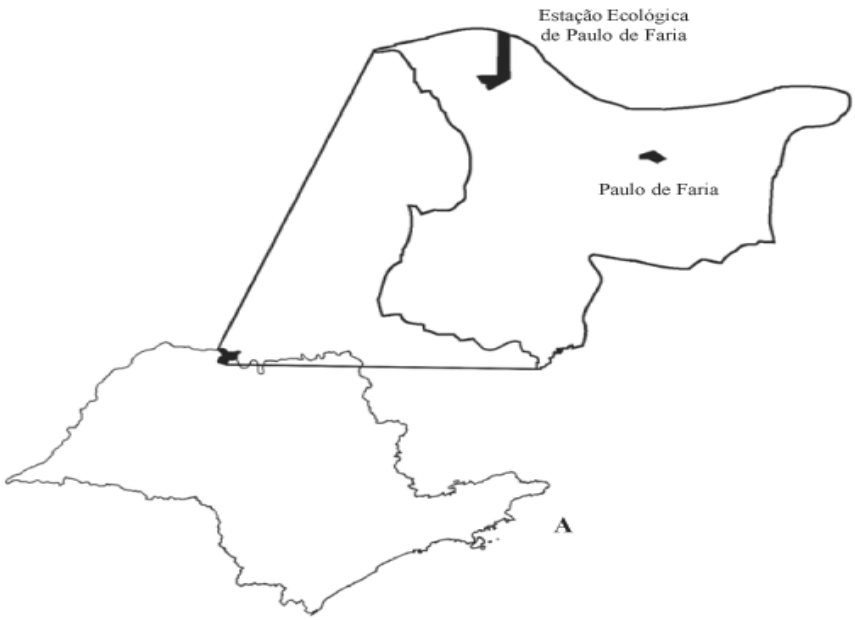


**Figura 8.** Localização geográfica da área de coleta do material biológico de indivíduos adultos e de germoplasma de árvores matrizes de *M. urundeuva*.

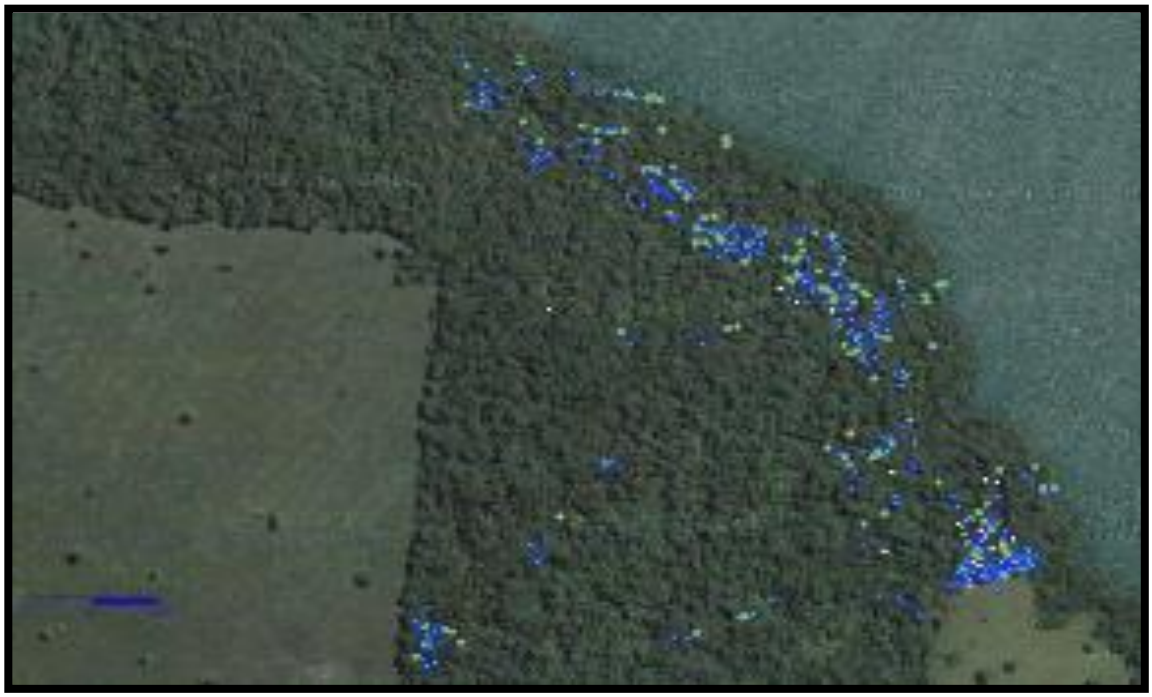

**Figura 9.** Imagem de satélite mostrando a distribuição de indivíduos machos ( ● ), fêmeas ( ● ) e não identificados ( □ ) da população de *M. urundeuva* na Estação Ecológica de Paulo de Faria, SP.

### *4.2.2 Análise dos dados*

#### *4.2.2.1 Sistema de cruzamento*

As análises do sistema de cruzamento foram baseadas nos modelos mistos de reprodução (RITLAND; JAIN, 1981) e de cruzamentos correlacionados (RITLAND, 1989). As estimativas foram realizadas utilizando o programa "Multilocos MLTR" (RITLAND, 2004) e o método de máxima verossimilhança (Algoritmo Newton-Rapson). Os parâmetros estimados foram a taxa populacional de cruzamento multiloco ($t_m$), taxa populacional de cruzamento uniloco ($t_s$), taxa de cruzamento entre aparentados ($t_m - t_s$), taxa efetiva de cruzamento entre parentes em caso de espécies dióicas ($1-t_s$ ou $1-t_m$, dependendo de qual das estimativas for a menor, $t_s$ ou $t_m$) e, correlação multiloco de paternidade ($r_{p(m)}$). Estes parâmetros foram também estimados em nível de progênies. O intervalo de confiança das estimativas foi obtido por 1000 reamostragens *bootstraps*. A unidade de reamostragem foi as

progênies na análise populacional e plantas dentro de progênies nas análises individuais para progênie. Estes parâmetros foram utilizados para estimar outros parâmetros demográficos e genéticos, como: número efetivo de pais polinizadores ou tamanho da vizinhança reprodutiva ($\hat{N}_{ep} = 1/\hat{r}_p$) e coeficiente médio de coancestria ($\Theta_{xy}$) entre plantas dentro de progênies, calculado usando a expressão para espécies dióicas com cruzamentos entre parentes:

$$\hat{\Theta}_{xy} = 0{,}125\hat{t}_s(1+\hat{F}_p)(1+\hat{r}_p) + 0{,}25(1-\hat{t}_s)[2\hat{t}_s(1+\hat{F}_p+2\hat{\theta}_p)+\hat{t}_s(1+\hat{F}_p+6\hat{\theta}_p)(1-\hat{r}_p)]+$$

$$+0{,}125(1-\hat{t}_s)^2[(1+\hat{F}_p+6\hat{\theta}_p)(1-\hat{r}_p)+(1+\hat{F}_p+2\hat{\theta}_p)2\hat{r}_p] \qquad \text{(SEBBENN, 2006).}$$

sendo que $\hat{F}_p$ é o coeficiente de endogamia na população reprodutiva, $\hat{r}_p$ é a correlação de paternidade, $\hat{\theta}_p$ é o coeficiente de coancestria na geração parental e $\hat{t}_s$ é a taxa de cruzamento uniloco.

O índice de fixação das progênies ($F_o$) foi usado para estimar o coeficiente de coancestria entre os parentais que efetivamente se cruzaram. Como a espécie é dióica, toda endogamia nas progênies é produzida pelo cruzamento entre parentes ($F_{t_m - t_s}$) e como a coancestria entre os parentais cruzados é igual, á endogamia nas progênies, o coeficiente de coancestria entre parentes é simplesmente o valor da endogamia nas progênies ($\hat{F}_{t_m - t_s} = \hat{\theta}_p$). Adicionalmente, para conhecer a representatividade genética dentro das progênies foi estimado o tamanho efetivo populacional ($N_{e(v)}$):

$$\hat{N}_{e(v)} = \frac{0{,}5}{\left[\hat{\Theta}_{xy}\left(\frac{n-1}{n}\right)+\frac{1+\hat{F}_o}{2n}\right]} \qquad \text{(COCKERHAM, 1969).}$$

em que *n* é o tamanho amostral. O número de árvores matrizes ($m$) para a coleta de sementes foi calculado assumindo que o objetivo é reter na amostra total o tamanho efetivo de referência de 150:

$$\hat{m} = N_{e(referência)} / \hat{N}_{e(v)} \quad \text{(SEBBENN, 2003).}$$

Esta última expressão é baseada em três suposições: *i*) que as árvores matrizes onde foram coletadas as sementes não são parentes entre si; *ii*) que estas árvores matrizes não se cruzaram entre si; *iii*) que as árvores matrizes amostram conjuntos gênicos polínicos não sobrepostos.

## 4.3 RESULTADOS

### *4.3.1 Sistema de reprodução*

A taxa de cruzamento multilocos ($t_m$) variou entre progênies de 0,816 a 0,982 (Tabela 7), com média populacional de 1,002 (Tabela 8). Estes valores menores do que a unidade nas estimativas individuais na taxa de cruzamento indicam a presença de cruzamentos entre indivíduos parentes ou estão associados a erros de estimação, advindos do pequeno tamanho amostral de cada progênie (aproximadamente 20 plantas). Como a espécie em questão tem sistema sexual dióico, era esperado se observar uma taxa de cruzamento igual à unidade (1,0). Estes resultados confirmam a dioicia na espécie. A taxa de cruzamento unilocos ($t_s$) foi menor do que a taxa de cruzamento multilocos em 28 das 30 progênies, reforçando a hipótese de ter ocorrido cruzamento entre parentes. A média populacional da taxa de cruzamento unilocos foi igualmente menor que a multilocos ($t_s$ =1,001; Tabela 8). A diferença entre a taxa de cruzamento multilocos e unilocos ($t_m - t_s$) mede a taxa de cruzamento entre parentes. Esta variou entre as 28 progênies que apresentaram diferenças positivas de 0,006 a 0,089, o que indica a ocorrência de cruzamento entre parentes. Contudo, em espécies dióicas a taxa de cruzamento entre parentes corresponde à diferença entre a unidade e a menor das taxas de cruzamento calculadas, ou seja, pode ser medida por $1 - t_s$ ou $1 - t_m$. Assim, a taxa efetiva de cruzamento entre indivíduos parentes foi estimada estar entre 0,051 a 0,125, com média populacional de 0,019. O cruzamento entre parentes era esperado, considerando que a análise da estrutura genética espacial detectou a presença da distribuição não aleatória de genótipos dentro da população. Portanto, certos níveis de endogamia podem ser esperados ocorrer em sementes coletadas de polinização aberta da presente população.

A estimativa da correlação multilocos de paternidade ($r_{p(m)}$) indicou que as progênies são compostas de uma mistura de meios-irmãos e irmãos-completos, estes últimos em menor proporção. A correlação multilocos de paternidade variou entre progênies de 0,057 a 0,152, com média populacional estimada em 0,158. Portanto, entre 5,7 a 15,2% das progênies eram irmãos-completos, com média populacional estimada em 15,8%. A diferença entre a correlação unilocos e multilocos de paternidade ($r_{p(s)} - r_{p(m)}$) mede a ocorrência de

parentesco entre as árvores masculinas que atuaram como polinizadores. Esta diferença foi positiva em 22 das 30 progênies e significativamente diferente de zero em pelo menos três casos, o que mostra que árvores masculinas que fertilizaram algumas progênies também eram parentes entre si. O parentesco entre os machos não causa endogamia nas progênies, mas aumenta a identidade por descendência dos alelos dentro das progênies e reduz o tamanho efetivo.

O número efetivo de árvores masculinas fertilizando as árvores matrizes foi estimado variar de 6,6 a 14,5 (Tabela 7), com média populacional de 8,33 (Tabela 8). O coeficiente de coancestria ($\Theta_{xy}$) dentro das progênies foi maior do que o esperado em progênies de meios irmãos ($\Theta_{xy}$=0,125), variando de 0,146 a 0,168, com média populacional de 0,150. O tamanho efetivo de variância ($N_{e(v)}$) dentro das progênies foi, portanto, também menor do que o esperado em progênies de meios-irmãos ($N_{e(v)}$=4), variando de 2,74 a 3, com média populacional de 2,98. O tamanho efetivo total das 30 progênies foi estimado em apenas 86,45. Este último valor é 28% menor que seria esperado caso as progênies fossem perfeitamente parentes no grau de meios-irmãos ($N_{e(v)}$=120). Os cálculos indicam, portanto, que para obterem-se lotes de sementes com tamanho efetivo de 150, é necessário coletar sementes de pelo menos 50 árvores matrizes.

**Tabela 7**. Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução em uma população de *Myracrodruon urundeuva*. $t_m$ é a taxa de cruzamento multilocos; $t_s$ é a taxa de cruzamento unilocos; $t_m - t_s$ é a taxa de cruzamento entre parentes; $r_{p(m)}$ é correlação multilocos de paternidade; $r_{p(s)} - r_{p(m)}$ mede a ocorrência de parentesco entre as polinizadoras efetivas; $1/\hat{r}_p$ é o número efetivo de pais polizadores; $\Theta_{xy}$ é a coancestria dentro de progênies; $N_{e(v)}$ é o tamanho efetivo da progênie; média ± erro padrão da média 95% de probabilidade.

| Progênie | $t_m$ | $t_s$ | $t_m - t_s$ | $r_{p(m)}$ | $r_{p(s)} - r_{p(m)}$ | $1/\hat{r}_p$ | $\Theta_{xy}$ | $N_{e(v)}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,976±0,008 | 0,942±0,010 | 0,034±0,010 | 0,145±0,088 | -0,014±0,055 | 6,9 | 0,163 | 2,74 |
| 2 | 0,965±0,008 | 0,922±0,012 | 0,043±0,010 | 0,057±0,012 | 0,028±0,008 | 17,5 | 0,146 | 3,00 |
| 3 | 0,965±0,020 | 0,943±0,010 | 0,022±0,016 | 0,095±0,059 | 0,011±0,037 | 10,5 | 0,147 | 2,98 |
| 4 | 0,957±0,033 | 0,914±0,016 | 0,042±0,027 | 0,097±0,055 | 0,005±0,037 | 10,3 | 0,152 | 2,90 |
| 5 | 0,971±0,008 | 0,910±0,012 | 0,061±0,012 | 0,070±0,024 | 0,022±0,014 | 14,3 | 0,149 | 2,94 |
| 6 | 0,982±0,010 | 0,936±0,010 | 0,046±0,010 | 0,107±0,061 | 0,002±0,047 | 9,3 | 0,150 | 2,94 |
| 7 | 0,982±0,010 | 0,937±0,008 | 0,045±0,008 | 0,109±0,086 | 0,008±0,057 | 9,2 | 0,150 | 2,94 |
| 8 | 0,816±0,153 | 0,883±0,025 | -0,067±0,016 | 0,081±0,025 | 0,014±0,129 | 12,3 | 0,155 | 2,85 |
| 9 | 0,982±0,010 | 0,929±0,008 | 0,053±0,008 | 0,120±0,082 | -0,009±0,057 | 8,3 | 0,152 | 2,89 |
| 10 | 0,957±0,037 | 0,919±0,022 | 0,038±0,035 | 0,082±0,039 | 0,016±0,025 | 12,2 | 0,149 | 2,94 |
| 11 | 0,971±0,016 | 0,934±0,012 | 0,037±0,010 | 0,085±0,045 | 0,016±0,027 | 11,8 | 0,147 | 2,98 |
| 12 | 0,925±0,088 | 0,910±0,025 | 0,016±0,073 | 0,122±0,069 | -0,014±0,051 | 8,2 | 0,156 | 2,84 |
| 13 | 0,982±0,010 | 0,934±0,008 | 0,048±0,008 | 0,107±0,045 | 0,004±0,029 | 9,3 | 0,150 | 2,93 |

**Tabela 7.** Continuação

| Progênie | $t_m$ | $t_s$ | $t_m - t_s$ | $r_{p(m)}$ | $r_{p(s)} - r_{p(m)}$ | $1/\hat{r}_p$ | $\Theta_{xy}$ | $N_{e(v)}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 14 | 0,979±0,006 | 0,922±0,012 | 0,058±0,014 | 0,101±0,039 | 0,000±0,029 | 9,9 | 0,151 | 2,91 |
| 15 | 0,965±0,024 | 0,903±0,027 | 0,062±0,029 | 0,084±0,035 | 0,019±0,022 | 11,9 | 0,152 | 2,89 |
| 16 | 0,964±0,016 | 0,910±0,018 | 0,054±0,018 | 0,075±0,029 | 0,017±0,022 | 13,3 | 0,150 | 2,93 |
| 17 | 0,977±0,002 | 0,906±0,022 | 0,070±0,022 | 0,069±0,027 | 0,025±0,018 | 14,5 | 0,168 | 2,66 |
| 18 | 0,975±0,004 | 0,907±0,018 | 0,068±0,016 | 0,093±0,049 | 0,004±0,033 | 10,8 | 0,153 | 2,89 |
| 19 | 0,903±0,108 | 0,896±0,031 | 0,006±0,086 | 0,110±0,057 | -0,005±0,043 | 9,1 | 0,157 | 2,83 |
| 20 | 0,893±0,112 | 0,883±0,035 | 0,013±0,020 | 0,082±0,027 | 0,013±0,094 | 12,2 | 0,155 | 2,85 |
| 21 | 0,966±0,031 | 0,877±0,041 | 0,089±0,043 | 0,139±0,094 | -0,031±0,067 | 7,2 | 0,163 | 2,73 |
| 22 | 0,979±0,006 | 0,898±0,029 | 0,080±0,029 | 0,081±0,035 | 0,015±0,025 | 12,3 | 0,153 | 2,89 |
| 23 | 0,909±0,096 | 0,886±0,027 | 0,022±0,078 | 0,102±0,045 | 0,000±0,035 | 9,8 | 0,157 | 2,82 |
| 24 | 0,875±0,104 | 0,893±0,020 | -0,018±0,035 | 0,112±0,049 | -0,009±0,090 | 8,9 | 0,160 | 2,77 |
| 25 | 0,965±0,031 | 0,909±0,022 | 0,056±0,029 | 0,078±0,041 | 0,013±0,027 | 12,8 | 0,151 | 2,92 |
| 26 | 0,975±0,006 | 0,933±0,010 | 0,041±0,008 | 0,101±0,057 | 0,002±0,037 | 9,9 | 0,149 | 2,94 |
| 27 | 0,941±0,037 | 0,899±0,014 | 0,042±0,029 | 0,114±0,043 | -0,007±0,033 | 8,8 | 0,157 | 2,83 |
| 28 | 0,957±0,055 | 0,922±0,018 | 0,035±0,045 | 0,099±0,041 | 0,010±0,027 | 10,1 | 0,151 | 2,91 |
| 29 | 0,946±0,039 | 0,918±0,016 | 0,028±0,029 | 0,078±0,031 | 0,016±0,018 | 12,8 | 0,149 | 2,94 |
| 30 | 0,982±0,010 | 0,949±0,006 | 0,033±0,006 | 0,152±0,096 | -0,021±0,055 | 6,6 | 0,153 | 2,88 |
| Média | -- | -- | -- | -- | -- | 10,7 | -- | 2,88 |
| Total | | | | | | | | 86,45 |

**Tabela 8**. Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução em uma população de *Myracrodruon urundeuva*.

| Parâmetro | Paulo Farias-SP (IC95%) |
|---|---|
| Número de árvores matrizes | 30 |
| Número total de descendentes: *n* | 514 |
| Taxa de cruzamento multiloco: $t_m$ | 1,002 (1,002-1,168) |
| Taxa de cruzamento uniloco: $t_s$ | 1,001 (0,971-1,072) |
| Taxa de cruzamento entre parentes: $t_m - t_s$ | 0,018 (0,033-0,096) |
| Correlação multiloco de paternidade: $r_{p(m)}$ | 0,158 (0,100-0,178) |
| Número médio de árvores polinizadoras: $1/\hat{r}_p$ | 8,33 (9,35-17,24) |
| Coancestria média dentro de progênies: $\Theta_{xy}$ | 0,150 (0,146-0,167) |
| Parentesco dentro das progênies: $r_{xy}$ | 0,300 (0,291-0,334) |
| Tamanho efetivo de variância: $N_{e(v)}$ | 2,98 (2,70-3,06) |
| Número de matrizes: *m* | 50 (49-56) |

Sendo: $m$ é o número de árvores matrizes necessárias para a coleta de sementes visando reter o tamanho efetivo de 150.

## 4.4 DISCUSSÃO

### *4.4.1 Taxa de cruzamento multiloco e uniloco*

A estimativa da taxa populacional de cruzamento multilocos, reafirmou a condição do sistema sexual dióico da espécie *M. urundeuva*, com a garantia de taxas de fecundação cruzada máximas. O estudo do sistema de reprodução da espécie, realizado por Moraes et al. (2004a), apresentou resultados sobre a taxa de cruzamento multiloco ($t_m$) congruente ao do valor observado neste estudo. Taxas de fecundação cruzada máximas também já tinham sido relatadas em outras espécies arbóreas brasileiras dióicas, como: *Araucaria angustifolia* (SOUSA et al., 2005), e bissexuais como *Caryocar brasiliensis* (COLLEVATTI et al., 2001), *Teobroma grandiflorium* (ALVES, 2002) e *Hymenaea courbaril* (LACERDA et al., 2008). As estimativas da taxa de cruzamento multilocos individuais para as progênies foram inferiores às esperadas para uma espécie dióica. Para essas espécies, em virtude da ausência de autofecundação, todas as diferenças da taxa de cruzamento multiloco ou uniloco da unidade, são atribuídas aos cruzamentos entre indivíduos aparentados ou a erros de estimação. Estudos realizados nas espécies dióicas *Ilex paraguariensis* (WENDT, 2005) e *Cecropia pachystachya* (RIBAS, 2003), também observaram taxas de fecundação cruzada inferiores aos da unidade, reforçando a influência do tamanho amostral em termos de locos e número de plantas por progênies nas respectivas estimativas.

### *4.4.2 Taxa de cruzamento entre parentes*

Confirmando as expectativas do baixo valor da taxa de cruzamento uniloco em relação à multiloco, a análise da taxa de cruzamento entre aparentados, evidenciou a ocorrência de um padrão de cruzamentos entre indivíduos com grau de parentesco na população de *M. urundeuva*. No entanto, a proporção desses cruzamentos em nível de população quando comparados com os de outras espécies arbóreas estudadas são relativamente inferiores e semelhantes aos observados em *Hevea brasiliensis* (FURLANI et al., 2005) e *Hymenaea*

*courbaril* (SANTOS, 2002). Em nível de análise por indivíduo, a taxa de cruzamento entre parentes apresentou variação e mostrando-se consideravelmente alta, denotando que uma parte das progênies utilizadas nesta análise é proveniente de cruzamentos entre parentes e, portanto apresentam endogamia. Fatores genéticos e ecológicos intrínsecos a espécie como a estruturação genética espacial e o fluxo gênico, podem contribuir decisivamente para a ocorrência de cruzamentos entre indivíduos parentes. Consequentemente o que se observa é uma amplitude significativa dessa taxa entre as espécies arbóreas brasileiras. Nessas espécies a taxa de cruzamento entre aparentados ($t_m - t_s$) tem variado de 0,01 em *Hevea brasiliensis* (FURLANI et al., 2005) a 0,30 em *Hymenaea stignocarpa* (MORAES et al., 2007). Autofecundações, associadas a altas taxas de cruzamentos biparentais e cruzamentos endogâmicos, aumentam a endogamia nas sementes, desencadeando a depressão endogâmica (SEBBENN, 2002). A endogamia é originada pela diminuição da frequência dos heterozigotos, nos vários locos e pela carga genética da população (BARRET; KOHN, 1991; FALCONER, 1989; MURAWSKI; HAMRICK, 1991). Para pequenas populações de espécies arbóreas tropicais, o rápido crescimento da endogamia é um problema, pois essa produz um aumento da homozigosidade de alelos recessivos deletérios, que por sua vez, em grandes populações são mantidos como raros em heterozigose pela seleção natural, além da possibilidade da fixação desses alelos por deriva genética (ALLARD, 1971; FALCONER; MACKAY, 1996). Portanto, a coleta de sementes para reflorestamentos ambientais de acordo com Sebbenn (2002), deve visar a eliminação da endogamia nas futuras gerações e conservar o potencial evolutivo das espécies. Para isso a amostragem deve ser realizada de tal forma, que as amostras representem a variabilidade da população. Para garantir um mínimo de variabilidade genética nos plantios, é necessária a coleta de sementes em um número adequado de árvores matrizes.

### *4.4.3 Taxa de cruzamentos correlacionados*

A ocorrência de cruzamentos não aleatórios foi também observada na estimativa da correlação multiloco de paternidade ($r_{p(m)}$) dentro de progênies e na análise em nível populacional, revelando uma quantidade significativa de irmãos-completos provenientes de cruzamentos correlacionados. Contudo, a proporção de progênies de meios-irmãos observadas

na população de *M. urundeuva* é notavelmente superior, mostrando que apesar da identificação de estrutura genética espacial e de indícios de isolamento físico do fragmento pela presença da cultura da cana-de açúcar em seu entorno, cerca de aproximadamente 85% da fecundação cruzada que ocorre na população é de cruzamento aleatório. Estimativas de correlação de paternidade semelhantes foram encontradas em algumas espécies tropicais, como: *Bagassa guianensis* ( $r_{p(m)}$ = 0,14) (SILVA, 2005), *Caryocar brasiliensis* ( $r_{p(m)}$ = 0,16) (COLLEVATTI et al., 2001), *Cedrela odorata* ( $r_{p(m)}$ = 0,16) (JAMES et al., 1998) e *Hymenaea courbaril* ( $r_{p(m)}$ = 0,15) (SANTOS, 2002).

De acordo com Sebbenn (2006), os cruzamentos correlacionados em populações de espécies arbóreas tropicais, podem ser explicados pelo assincronismo das plantas, pelo pequeno tamanho da população reprodutiva e pelo comportamento de forrageio dos polinizadores com visitas sistemáticas a árvores próximas. Nunes et al. (2008), estudando os aspectos ecológicos relacionados à fenologia de *M. urundeuva*, observaram que a sua reprodução é diretamente influenciada pela temperatura e precipitação. Citam ainda, que a fase reprodutiva da espécie é reduzida (dois meses) e restrita ao período de déficit hídrico. De acordo com Mantovani e Martins (1988), fatores ambientais, principalmente a precipitação, podem afetar a atividade de agentes polinizadores e das espécies vegetais, as quais por sua vez, podem desenvolver mecanismos de resposta aos estímulos ambientais. Aspectos da fenologia, aliados às características da biologia da espécie podem favorecer a ocorrência de cruzamentos não aleátorios entre os indivíduos, conforme já relatado em outras espécies arbóreas tropicais.

A diferença entre a correlação uniloco e multiloco de paternidade ( $r_{p(s)} - r_{p(m)}$ ) detectou que alguns genitores possuem grau de parentesco. Esse parentesco aumenta a identidade por descendência dos alelos dentro das progênies, consequentemente pode-se observar uma elevação no índice do coeficiente de coancestria, que por sua vez, reflete na redução do tamanho efetivo da população.

A detecção do sistema reprodutivo (misto ou mistura de cruzamentos aleatórios e correlacionados) de uma espécie arbórea é de extrema impotância para a conservação genética, melhoramento florestal e nas atividades de coleta de sementes para reflorestamentos ambientais. Essa detecção está relacionada com a determinação do tamanho amostral para a retenção de tamanhos efetivos de referência. Espécies de sistema misto de reprodução requerem maiores tamanhos amostrais para reter tamanhos efetivos de referência, do que as de cruzamentos perfeitamente aleatórios (SEBBENN, 2002, 2003).

### *4.4.4 Número efetivo de doadores de pólen*

A partir da correlação de paternidade, é possível estimar o número de indivíduos que efetivamente polinizaram as árvores maternas. Ou seja, essa estimativa indica a média do número provável de indivíduos que contribuíram com pólen no evento de reprodução de uma árvore-mãe. Para a população de *M. urundeuva*, o número de árvores polinizadoras de uma árvore matriz foi relativamente alto, comparado com o número médio de indivíduos polinizadores encontrados em outras espécies arbóreas tropicais. Os resultados observados neste estudo, corroboram com os encontrados para as espécies de *Bagassa guianensis* (SILVA et al., 2008) e *Hymenaea courbaril* (SANTOS, 2002).

### *4.4.5 Coeficiente de coancestria e tamanho efetivo de variância*

Em virtude, da constatação de parentesco entre os indivíduos polinizadores de uma árvore-matriz e do cruzamento entre aparentados na população de *M. urundeuva*, o coeficiente de coancestria dentro das progênies foi superior ao valor esperado em progênies de meios irmãos ($\Theta_{xy}$=0,125). Como mencionado anteriormente, o parentesco entre árvores masculinas pode promover uma elevação no número de alelos idênticos por descendência. Consequentemente aumenta-se o coeficiente de coancestria entre os indivíduos e reduz o tamanho efetivo de variância das populações. Cruzamentos entre aparentados, também podem aumentar o número de alelos idênticos por descendência promovendo a endogamia e reduzindo o tamanho efetivo.

A determinação do coeficiente de coancestria é interessante para se conhecer o tamanho efetivo de variância, já que esse mede a representatividade genética de uma população a partir de suas progênies (WENDT, 2005). Em uma população idealizada (tamanho infinito, cruzamentos aleatórios, ausência de seleção, mutação e migração) o tamanho efetivo de variância dentro de progênies (>1000 sementes) corresponde a quatro indivíduos não parentes e não endogâmicos ($N_{e(v)}$=4). Entretanto, desvios das pressuposições que caracterizam a população idealizada causam reduções no tamanho efetivo de variância. Foi o que se observou neste estudo, longe de ser uma população idealizada, o conjunto de

indivíduos da espécie *M. urundeuva*, apresentou um tamanho efetivo menor em relação ao estabelecido para uma população panmítica, porém foi moderado e compatível com a maioria das espécies tropicais estudadas. O resultado do tamanho efetivo de variância encontrado para a espécie *M. urundeuva*, corrobora com os observados nas espécies tropicais *Cariniana legalis* (SEBBENN et al., 2000) e *Parapiptadenia rigida* (RIBAS, 1999).

Os poucos exemplares de populações de espécies arbóreas no Brasil, não atendem o modelo panmítico de população, devido principalmente aos ambientes extremamente fragmentados pela ação antrópica. De acordo com Sebbenn (2002), os efeitos da fragmentação de habitas promovem o aumento da coancestria e a redução do tamanho efetivo nas progênies das populações remanescentes. Portanto, para um programa de coleta de germoplasma se faz necessário a coleta em um maior número de árvores do que seriam necessários caso os cruzamentos fossem perfeitamente aleatórios e as populações tendessem a um tamanho infinito (SEBBENN, 2002).

A coleta de sementes para programas de recuperação ambiental, utilizando germoplasma da população de *M. urundeuva* da Estação Ecológica de Paulo de Faria, deve visar para um tamanho efetivo de referência de 150, a coleta de propágulos de 50 árvores matrizes. Este valor está dentro da média de 67 árvores matrizes (m=150) recomendadas por Sebbenn (2006), para a implantação de pomares de sementes utilizando as espécies tropicais já estudadas. Apesar de a população apresentar desvios nas pressuposições de um modelo panmítico, seu conjunto de indivíduos estão aptos a serem utilizados em programas de melhoramento e conservação genética.

## 4.5 CONCLUSÕES

1. Existem cruzamentos entre parentes e cruzamentos correlacionados na população e progênies de polinização aberta são compostas por misturas de meios-irmãos e irmãos completos;
2. Coletas de sementes para conservação genética, melhoramento e recuperação ambiental visando reter o tamanho efetivo de 150, requerem que as sementes sejam coletadas de pelo menos 50 árvores matrizes.

# 5 CAPÍTULO III

**FLUXO DE PÓLEN E SEMENTES EM UMA POPULAÇÃO FRAGMENTADA DE *Myracrodruon urundeuva* (F.F. & M.F. Allemão): IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO GENÉTICA E MARCAÇÃO DE ÁRVORES-MATRIZES PARA A COLETA DE SEMENTES**

## 5.1 INTRODUÇÃO

A redução de florestas contínuas a fragmentos florestais é um dos principais problemas ambientais nos países tropicais e no mundo. Os fragmentos tornam-se as populações de origem das futuras gerações das espécies arbóreas que ali vivem. Se o tamanho efetivo das populações remanescentes for muito baixo (<20) pode-se esperar um rápido declínio nas populações com sua consequente extinção. Contudo, embora a fragmentação seja um distúrbio comum nas florestas tropicais, o entendimento dos seus efeitos sobre o fluxo gênico, sistema de reprodução e a diversidade genética ainda é restrito (NASON et al., 1998; WHITE et al., 2002). A resposta das espécies arbóreas à fragmentação depende de um número de fatores espécie-específicos que podem influenciar padrões de conectividade genética e reprodutiva entre populações fragmentadas (ALDRICH; HAMRICK, 1998; NASON; HAMRICK, 1997). A redução no tamanho das populações, associada à baixa densidade populacional faz com que o número de indivíduos reprodutivos remanecente nos fragmentos seja baixo para muitas espécies arbóreas. Se o movimento dos vetores de polinização e dispersão de sementes também é reduzido pela fragmentação, então os fragmentos se tornam unidades geneticamente e demograficamente isoladas em pequenos tamanhos efetivos, tornando as espécies arbóreas vulneráveis à extinção local. (NASON; HAMRICK, 1997).

Em termos gerais, a fragmentação tem três principais efeitos sobre as populações de espécies arbóreas: i) redução no número total de indivíduos; ii) redução no tamanho médio das populações, quando indivíduos são restritos a pequenos fragmentos florestais e; iii) isolamento espacial das populações remanescentes, em uma paisagem intercalando fragmentos e usos de terras para diferentes fins (YOUNG; BOYLE, 2000b). Esses efeitos demográficos podem levar as populações a perderem alelos, reduzir a heterozigosidade (YOUNG; BOYLE, 2000a; SOUZA et al., 2004), aumentar a divergência genética entre populações por deriva genética (DAYANANDAN et al., 1999; HAMILTON, 1999; SOUZA et al., 2004; YOUNG; BOYLE, 2000) e, principalmente, romper o fluxo de genes via pólen e sementes entre populações (HAMILTON, 1999), alterando o tamanho genético da vizinhança reprodutiva, o sistema de reprodução (ALDRICH; HAMRICK, 1998; SEOANE et al., 2001) e, consequentemente, a endogamia, a coancestria e o tamanho efetivo das populações descendentes. Esses efeitos da fragmentação têm implicações diretas sobre a conservação *in*

*situ*, coleta de germoplasma para conservação *ex situ*, marcação de árvores matrizes e coleta de sementes para a recuperação ambiental.

Com a drástica redução e a consequente fragmentação da vegetação natural do estado de São Paulo, tem-se observado na última década um aumento na demanda por sementes de espécies florestais nativas para a recuperação ambiental, embora ainda não exista nenhum pomar de sementes de tais espécies em franca produção. Esforços estão sendo feitos no sentido de marcar árvores matrizes em fragmentos florestais remanescentes do estado, para a realização da coleta de sementes a serem utilizadas em reflorestamentos ambientais (Projeto Matrizes – BIOTA/FAPESP). Entretanto, se conhece muito pouco sobre as consequências genéticas da fragmentação sobre os níveis de diversidade genética, endogamia, coancestria e tamanho efetivo nas gerações descendentes (sementes), de árvores matrizes localizadas em fragmentos florestais ou em árvores isoladas em campos e pastagens. Tais informações são fundamentais no delineamento de estratégias para a marcação de matrizes e coleta de germoplasma.

Dois aspectos fundamentais quando se pensa na coleta de sementes de árvores matrizes em populações naturais são o tamanho e a área de vizinhança reprodutiva. O fluxo de pólen pode viajar longas distâncias sem que isto represente um grande tamanho de vizinhança. A distância do fluxo pode ser longa devido à baixa densidade populacional, sem que isto represente um grande número de parentais contribuindo para descendência de uma árvore matriz. Em contraste, quando o pólen é recebido de árvores de fora da população o tamanho efetivo da população reprodutiva pode ser maior do que a área ocupada pela população recipiente (NASON et al., 1998). Identificando as árvores doadoras de pólen de uma determinada progênie de uma árvore matriz, é possível determinar o tamanho e a área reprodutiva que esta árvore matriz ocupa, ou seja, a sua vizinhança genética. Estimativas do tamanho da vizinhança reprodutiva de populações são essenciais para a predição dos efeitos da deriva genética e endogamia em pequenas populações, além de promoverem uma perspectiva ecológica sobre a extensão espacial da unidade reprodutiva de plantas e, indiretamente, do comportamento dos polinizadores a partir de padrões geneticamente determinantes de depósito de pólen (APSIT et al., 2001).

O fluxo de pólen é um dos fatores mais importantes influenciando a estrutura genética de espécies arbóreas. Extensivo fluxo gênico via pólen promove altos níveis de diversidade genética dentro de populações e baixa diferenciação entre populações e é o principal mecanismo mantendo a coesão genética de uma espécie (DICK et al., 2003). A determinação da influência contemporânea do movimento do pólen sobre o tamanho efetivo da população

reprodutiva ou tamanho da vizinhança requer detalhada análise da estrutura reprodutiva das populações. Tais análises incluem a identidade do doador de pólen e sua distância da planta materna (NASON et al., 1996). Esses estudos têm sido eficientemente conduzidos com base em marcadores genéticos altamente polimórficos, como microssatélites. Estudos preliminares baseados na observação do comportamento do vôo dos polinizadores indicavam que o movimento desses agentes ocorria predominantemente entre árvores vizinhas. Entretanto, estudos recentes baseados em dados de marcadores isoenzimáticos e de microssatélites, utilizando análises estatísticas refinadas como análise de paternidade e análise TWOGENER, têm comprovado que o pólen move-se à distâncias consideráveis e que o fluxo de genes dentro de populações é muitas vezes alto (APSIT et al., 2001; BITTECOURT; SEBBENN, 2007; CARNEIRO et al., 2009; DICK et al., 2003; DUNPHY et al., 2004; NASON et al., 1998; WHITE et al., 2002 ).

Dentro deste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da fragmentação florestal sobre o processo de dispersão de sementes e pólen de uma população de *Myracrodruon urundeuva,* utilizando cinco locos microssatélites e análise de paternidade. Assim, as seguintes questões foram abordadas: *i*) Qual é a taxa de imigração de pólen e sementes na população? *ii*) Qual é a distância e os padrões de dispersão de pólen e sementes dentro da população e qual é a área efetiva de polinização? *iii*) Existe relação entre o tamanho das árvores masculinas polinizadoras e a taxa de sucesso de fertilização? *iv*) O pólen recebido por diversas árvores maternas da população é homogêneo ou existe estrutura genética espacial? *v*) Qual a coancestria e o tamanho efetivo dentro de progênies de polinização aberta e qual o número de árvores nescessário para a coleta de sementes?

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### *5.2.1 Local de estudo, coleta do material biológico e análise do DNA genômico*

O estudo foi conduzido na Estação Ecológica de Paulo de Faria do Instituto Florestal de São Paulo. Para este fim, foi realizada uma amostragem semelhante à descrita no capítulo 1, no subitem 3.2.2. Nesta amostragem todas as árvores reprodutivas e parte da regeneração

da população foram georeferenciadas (GPS), o diâmetro a altura do peito (DAP) foi medido, o sexo determinado e tecidos foliares coletados. Da amostra total de 467 plantas, 175 eram plantas femininas, 268 eram masculinas e 24 não puderam ter seu sexo determinado, devido à ausência de flores durante o evento reprodutivo avaliado. Em testes de progênies tem-se verificado que *M. urundeuva* inicia a reprodução com menos de cinco anos de idade (MORAES, informação pessoal). Assim, aqui foram consideradas árvores com DAP≥11 cm como adultas. Para o estudo da dispersão de sementes e pólen, também foram amostrados 149 plantas de regeneração. A coleta do material biológico dos regenerantes foi realizada em indivíduos localizados próximos as 30 árvores matrizes reprodutivas utilizadas nesta pesquisa. Adicionalmente, para a avaliação do fluxo de pólen também foram amostradas 514 progênies das 30 árvores matrizes mencionadas anteriormente.

O DNA genômico foi extraído pelo emprego do protocolo CTAB (DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L., 1990), com algumas modificações no tampão de extração. Assim, o DNA dos indivíduos de *M. urundeuva* foi estudado por meio de cinco locos de SSR (CAETANO et al., 2005). As reações e condições de amplificação foram conduzidas conforme proposto por Caetano et al. (2005), e descritas no capítulo 1 subitem 3.2.5.2. Desta forma, as PCRs foram constituídas de 1 ng de DNA genômico em um volume final de 6 µL contendo: 200uM de cada dNTPs, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,33 µM de cada iniciador, água ultrapura estéril e 1X Go Taq Master Mix PROMEGA. O componente Foward de cada par de *primers* foi marcado na sua extremidade 5' com um fluoróforo específico. O programa de PCR utilizado para a amplificação das regiões microssatélites foi constituído de um ciclo de 94°C por 3 min., 35 ciclos de 94°C por 30 seg., temperatura de pareamento do primer por 30 seg., 72°C por 30 seg., e um ciclo final de 72°C por 5 min. As reações de amplificação foram realizadas em termocicladores 9600 e 9700 (Applied Biosystem). Os produtos de amplicações foram diluídos e depois foram montados multiplex com 2 e 3 amplificados de locos distintos (BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001). Então, os multiplex foram desnaturados a 94ºC por 5 minutos e submetidos à eletroforese capilar em equipamento ABI Prism 3700 (Applied Biosystem).

### *5.2.2 Análise dos dados*

#### *5.2.2.1 Fluxo de pólen e semente*

A estimativa do fluxo gênico contemporâneo a partir do pólen (progênies e regenerantes) e de sementes (regenerantes) foi realizada utilizando análise de parentesco e o programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI et al. 2007; MARSHALL et al. 1998). As análises do fluxo de pólen (análise de paternidade) foram conduzidas a partir dos genótipos de 30 árvores maternas e suas respectivas 514 progênies e das demais 268 árvores masculinas, usadas como candidatos a pai. Esta análise também foi realizada para os 149 regenerantes, utilizando como candidatos a pai, as árvores masculinas (268) e como mãe as árvores femininas (175). O fluxo gênico crítico ou, em outros termos, a probabilidade de encontrar um candidato compatível como pai ou mãe de uma semente ou plântula dentro da população, quando o verdadeiro pai ou mãe encontra-se fora da população (fluxo gênico crítico), foi calculado segundo método de Dow e Ashley (1998). Como todas as árvores da população tinham o seu genótipo determinado e sua posição espacial conhecida, em termos de coordenadas *X* e *Y*, as sementes que tiverem o pai determinado dentro da população foram utilizadas para determinar com precisão as distâncias mínima, máxima e média de dispersão de pólen na população. A partir destas estimativas, uma média ponderada pela frequência de dispersão de pólen foi calculada. O fluxo de sementes realizado foi calculado utilizando os regenerantes amostrados e todas as árvores femininas adultas (175 árvores) como candidatos a mãe. Á distância entre a posição da candidata à mãe e o regenerante foi usada para inferir a distância de dispersão de sementes. A distância de dispersão de pólen correspondeu à distância entre o candidato a pai e o candidato à mãe. Tais informações foram também usadas para a construção de curvas de dispersão de pólen e sementes, utilizando funções de densidade. A taxa de imigração de pólen e sementes ($m$) foi calculada como a proporção de sementes que não tiverem um candidato a pai ou mãe determinada dentro das populações ($n_{imigrante}$) em relação ao total de sementes genotipadas ($n_{total}$) dentro das populações, $\hat{m} = \hat{n}_{imigrante} / n_{total}$ (BURCZYK et al. 1996; BURCZYK et al. 2004; SMOUSE; SORK, 2004).

### *5.2.2.2 Número efetivo de doadores de pólen, coancestria, tamanho efetivo e área efetiva de polinização*

O número efetivo de doadores de pólen ($N_{ep}$) de cada árvore matriz foi estimado de acordo com Burczyk et al. (1996) do número de doadores de pólen ($n_p$) detectados dos resultados da análise de paternidade como: $\hat{N}_{ep} = 1/\sum_{i=1}^{n_p} p_i^2$, em que $n_p$ é o número de embriões analisados, $p_i$ é a proporção de sementes filhas do pai *i*. Da média entre todas as progênies foi estimado a correlação de paternidade como: $\hat{r}_p = 1/\hat{N}_{ep}$. Da correlação de paternidade, o coeficiente médio de coancestria dentro de progênies ($\Theta_{xy}$) foi estimado como: $\hat{\Theta}_{xy} = 0{,}125(1+\hat{F}_p)(1+\hat{r}_p)$, em que $F_p$ é o coeficiente de endogamia na população reprodutiva (SOUSA et al., 2005). O índice de fixação foi estimado como anteriormente apresentado. O tamanho efetivo de variância ($N_{e(v)}$) para as progênies foi estimado como:

$$\hat{N}_{e(v)} = \frac{0{,}5}{\left[\hat{\Theta}_{xy}\left(\frac{n-1}{n}\right) + \frac{1+\hat{F}_o}{2n}\right]} \qquad \text{(COCKERHAM, 1969).}$$

O erro padrão foi usado para determinar o intervalo de confiança a 95% de probabilidade. A área efetiva de polinização ($A_{ep}$) foi calculada para cada árvore matriz da variância de dispersão de pólen ($\sigma^2$), assumindo uma área circular ao redor de cada árvore matriz, $\hat{A}_{ep} = 2\pi\hat{\sigma}^2$ (LEVIN, 1988).

### *5.2.2.3 Diferenciação no conjunto de pólen*

A diferenciação no conjunto de pólen recebido por diferentes árvores maternas foi estimada por análise TWOGENER (AUSTERLITZ; SMOUSE, 2001; SMOUSE et al., 2001). O princípio do método TWOGENER é estimar a diferenciação nas frequências alélicas entre o conjunto de pólen cruzado ($\Phi_{ft}$) entre diferentes árvores maternas de uma população, de

forma a poder se verificar a extensão da dispersão de pólen. Baixa diferenciação no fluxo de pólen indica uma alta taxa de dispersão efetiva de pólen e que o pólen é disperso a longas distâncias e que grande número de árvores está polinizando as árvores maternas, enquanto uma alta diferenciação no fluxo de pólen entre as árvores indica restrita dispersão de pólen e que poucas árvores polinizadoras estão contribuindo para os cruzamentos. A análise TWOGENER foi realizada utilizando-se o genótipo multilocos de árvores maternas e suas respectivas sementes de polinização aberta. Como o genótipo materno é conhecido, e sabe-se que cada semente recebe metade de seus alelos da árvore mãe, o genótipo paterno foi deduzido pela subtração dos alelos maternos do genótipo das sementes. A diferenciação nas frequências alélicas do pólen recebido pelas árvores maternas ($\Phi_{ft}$) foi estimada por ANAVA (EXCOFFIER et al., 1992). O parâmetro $\Phi_{ft}$ foi calculado como uma correlação intra-classe de gametas masculinos (pólen) dentro de árvores femininas:

$$\hat{\Phi}_{ft} = \frac{\hat{\sigma}_A^2}{\hat{\sigma}_d^2 + \hat{\sigma}_A^2},$$

em que, $\sigma_A^2$ é a estimativa da variação genética entre os gametas maternos recebidos por diferentes árvores matrizes e $\sigma_d^2$ é a estimativa da variação genética entre os gametas dentro das progênies (SMOUSE et al., 2001). O parâmetro $\Phi_{ft}$ foi convertido em outros parâmetros. De $\Phi_{ft}$ foi possível calcular uma medida do número médio de árvores efetivamente doadoras de pólen, $\hat{N}_{ep} = 1/2\Phi_{ft}$, igualmente como é feito pela estimativa da correlação de paternidade (SMOUSE et al., 2001; SMOUSE; SORK, 2004). A estimativa do $N_{ep}$, juntamente com informações de campo da densidade de árvores reprodutivas (*d*) nas populações foi usada para calcular o coeficiente de coancestria dentro de progênies, o tamanho efetivo de variância e o número de árvores matrizes necessário para a coleta de sementes. Estas análises foram calculadas pelas mesmas expressões apresentadas no tópico "*sistema de cruzamento*" (Capítulo 2; subitem 4.2.2.1).

## 5.3 RESULTADOS

### *5.3.1 Heterogeneidade no conjunto do pólen cruzado*

Da amostra de progênies foi estimada a diferenciação no conjunto de pólen recebido pelas diferentes árvores matrizes (Tabela 9). A diferenciação no conjunto de pólen ($\Phi_{ft}$) foi de 0,075. Este valor é menor do que o que tem sido estimado para outras espécies arbóreas tropicais. Por exemplo, Moraes et al. (2007) estimaram uma diferenciação no conjunto de pólen de árvores isoladas de *H. stigonocarpa* em 0,308. O valor aqui calculado é também geralmente menor do que o reportado em outras espécies polinizadas por animais [Ex: *Dizinia excelsa*: $\hat{\Phi}_{ft} = 0{,}002 - 0{,}104$ (DICK et al., 2003); *Albizia julibrissin*: $\hat{\Phi}_{ft} = 0{,}244$ (IRWIN et al., 2003); *Symphonia globulifera*: $\hat{\Phi}_{ft} = 0{,}205$ (DEGEN et al., 2004); e *Cornus florida*: $\hat{\Phi}_{ft} = 0{,}090 - 0{,}174$ (SORK et al., 2005)]. A causa da menor diferenciação no conjunto de pólen está provavelmente associada à amostragem. As sementes para este estudo foram coletadas, em muitos casos de árvores matrizes localizadas espacialmente próximas (Figura 3; Capítulo 1), de forma que estas compartilham o mesmo conjunto gênico polínico. Uma explicação alternativa ou complementar é que o pólen é disperso a longas distâncias, de forma que árvores matrizes localizadas espacialmente distantes compartilhem o mesmo conjunto gênico de pólen. Isto explica esta menor diferenciação na presente população de *M. urundeuva* em relação às outras espécies arbóreas tropicais estudadas.

A diferenciação no conjunto de pólen é associada à correlação de paternidade. De fato, a diferenciação $\Phi_{ft}$ é uma medida de coancestria entre as árvores masculinas polinizadoras e a correlação de paternidade é uma medida de parentesco entre os machos polinizadores, de forma que ambos estimadores são relacionados por: $\Phi_{ft} = r_{p(m)}/2$, na ausência de endogamia na geração parental. Estimando a correlação de paternidade da diferenciação no conjunto de pólen cruzado ($r_{p(m)} = 2\hat{\Phi}_{ft} = 2x0{,}075 = 0{,}150$), chega-se a um valor muito próximo ao valor estimado diretamente pelo modelo de cruzamentos correlacionados ($r_{p(m)} = 0{,}158$) de Ritland (1989). Esta alta coerência na estimativa da correlação de paternidade por análise TWOGENER e pelo modelo de cruzamentos

correlacionados não tem sido confirmada em outros estudos (CARNEIRO et al., 2007). A causa tem sido a presença de autofecundação, que vicia a estimativa via análise TWOGENER. Análise TWOGENER não acomoda autofecundações no modelo e autofecundações tendem a inflar a estimativa de $\Phi_{ft}$. Por outro lado, o modelo de cruzamentos correlacionados estima a correlação de paternidade apenas para a proporção das sementes produzidas por cruzamentos, livre da autofecundação. Assim, a alta coerência obtida se deve ao fato de *M. urundeuva* ser uma espécie dióica, logo não se autofecunda, e as estimativas foram obtidas apenas para indivíduos advindos de cruzamentos.

**Tabela 9**. Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução em uma população de *Myracrodruon urundeuva*.

| Parâmetro | Estimativas |
|---|---|
| Diferenciação no pólen entre matrizes: $\Phi_{ft}$ | 0,075 |
| Correlação multiloco de paternidade: $r_{p(m)}$ | 0,150 |
| Número médio de árvores polinizadoras: $N_{ep}$ | 6,67 |
| Coancestria média dentro de progênies: $\Theta_{xy}$ | 0,144 |
| Parentesco dentro das progênies: $r_{xy}$ | 0,288 |
| Tamanho efetivo de variância: $N_{e(v)}$ | 3,48 |
| Número de matrizes: $m$ | 43 |

Sendo: $m$ é o número de árvores matrizes necessárias para a coleta de sementes visando reter o tamanho efetivo de 150.

A correlação de paternidade estimada pelo método TwoGener confirma que muitas das progênies são parentes no grau de irmãos-completos, como já discutido. O número de árvores efetivamente polinizando as árvores matrizes foi calculado de $N_{ep} = 1/2\Phi_{ft}$, em 6,67. Igualmente a coancestria dentro de progênies (0,144), estimada de $\Phi_{ft}$ foi um pouco menor do que a previamente estimada via $r_{p(m)}$. Por sua vez, o tamanho efetivo de variância médio das progênies (3,48) foi maior do que o previamente calculado, levando a indicação de que para a conservação, implantação de testes de progênies e coleta de sementes para a recuperação ambiental, é necessário coletar sementes de pelo menos 43 árvores matrizes. A diferença entre os valores observados entre os dois métodos está associado ao processo de estimação. O modelo de cruzamentos correlacionados estima a correlação de paternidade com base nas informações multilocos enquanto o método TWOGENER faz este cálculo em nível de médias de locos. Adicionalmente, o método TWOGENER é viciado pela presença de estrutura

genética espacial, como observado na população em questão. Assim, os resultados obtidos via modelo de cruzamentos correlacionados são aparentemente mais confiáveis, por não serem afetados pela estruturação genética espacial.

A análise da relação entre a diferenciação entre o conjunto de pólen recebido por diferentes árvores matrizes e o logaritmo da distância espacial entre as árvores mostrou uma baixa correlação, indicando ausência de isolamento por distância (Figura 10). Além do fato de que muitas árvores matrizes terem sido amostradas próximas entre si, a espécie é dióica, de forma que aproximadamente apenas a metade da população é masculina e fertiliza as árvores femininas. Isso associado a variação na fenologia de florescimento, limita o número de parentais efetivamente fertilizando as matrizes e, possivelmente, afeta o conjunto de pólen recebido pela árvores femininas, no sentido de homogeneizar o pólen na população. Este resultado revela um aspecto importante: o de que em árvores o conjunto gênico do pólen é diversificado e apresenta um alto grau de homogeneidade entre diferentes matrizes, o que é favorável a recombinação da diversidade genética da população.

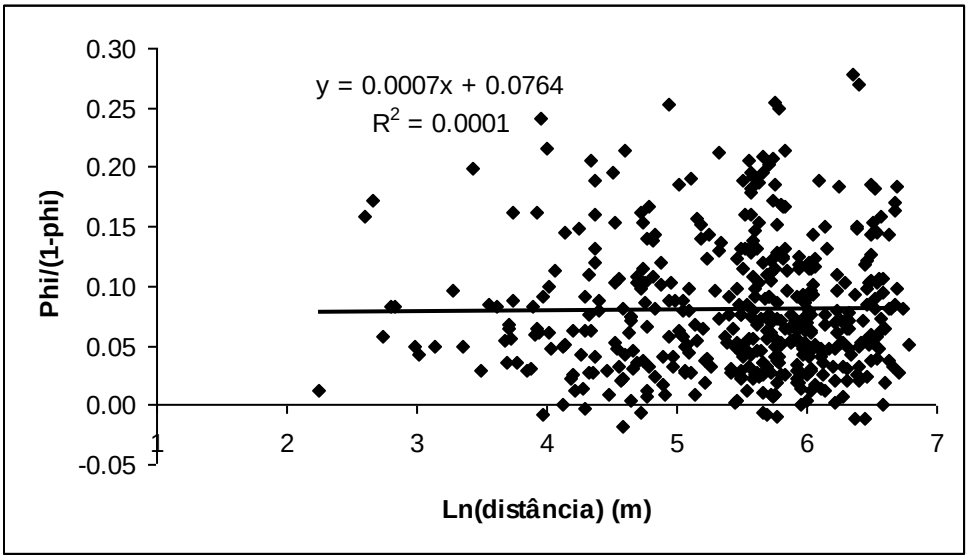


**Figura 10.** Relação entre a matriz de diferenciação do pólen recebido pelas diferentes árvores maternas e o logaritmo da distância entre estas árvores matrizes.

### *5.3.2 Fluxo gênico crítico*

A possibilidade da estimativa de imigração de pólen estar subestimada, devido à algum gameta de origem externa poder ter um genótipo multiloco que também poderia ter sido gerado por um macho local (fluxo gênico crítico) foi baixa. O poder de exclusão do par de parentes foi 0,9998 e a probabilidade de fluxo gênico crítico por pólen medido nas progênies foi de 0,027 ($1-0.9998^{137}$) (DOW; ASHLEY, 1996) e nos regenerantes de 0,015 ($1-0.9998^{78}$). Isso sugere que o número de progênies e regenerantes que poderiam ter sido geradas por um falso pai de dentro da população foi baixo, ou seja, de cada 100 sementes e 100 regenerantes, três sementes e dois regenerantes poderiam ter sido geradas por pais localizados fora da população, mas que tinham uma árvore masculina dentro da área que poderia ter gerado o seu gameta paterno.

### *5.3.3 Análise de paternidade nas progênies*

Das 514 progênies genotipadas, a árvore paterna foi encontrada dentro do fragmento para 507 (99%: Tabela 10). As outras sete plântulas representam provavelmente pólen originado de fora do fragmento (pólen imigrante) ou de alguma possível árvore que ficou por acaso fora da amostra, mas encontra-se no fragmento. Das 507 progênies, 49 tinham mais de um candidato masculino, sendo que 33 podiam ter dois possíveis pais; sete, três pais; seis, quatro pais; dois, cinco e uma seis pais na população masculina. Dos 268 potenciais machos doadores de pólen, 137 (51%) geraram pelo menos uma semente. Entre estes 137 machos, um foi o pai de 23 sementes; 10 deixaram mais de 10 descendentes e 47 apenas um descendente (Figura 11). Estes resultados sugerem alto grau de isolamento reprodutivo do fragmento, que os cruzamentos não ocorrem aleatoriamente e apenas parte dos possíveis polinizadores participam do processo de reprodução a cada geração e que parte das progênies são parentes no grau de irmãos-completos.

**Tabela 10**. Estimativa do fluxo de pólen dentro de uma população de *Myracrodruon urundeuva*. *m* é a taxa de imigração; $r_p$ é correlação de paternidade; $N_{ep}$ é o número efetivo de árvores polinizadoras; $\Theta_{xy}$ é a coancestria dentro de progênies; $N_e$ é o tamanho efetivo da progênie; $\delta$ é a distância de dispersão de pólen (média ± desvio padrão da média); $A_{ep}$ é a área de vizinhança de polinização; $t_{parentes}$ é a taxa de cruzamento entre parentes.

| | | Fluxo de pólen | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Matriz | *n* | Dentro | fora | *m* | $r_p$ | $N_{ep}$ | $\Theta$ | $N_e$ | $\delta$ (m) | $A_{ep}$ | $t_{parentes}$ |
| Mat_1 | 20 | 20 | 0 | 0 | 0,113 | 8,89 | 0,139 | 3,18 | 107±240 | 36 | 0,200 |
| Mat_2 | 18 | 18 | 0 | 0 | 0,086 | 11,57 | 0,136 | 3,20 | 177±189 | 23 | 0,444 |
| Mat_3 | 16 | 16 | 0 | 0 | 0,078 | 12,80 | 0,135 | 3,17 | 202±199 | 25 | 0,438 |
| Mat_4 | 20 | 20 | 0 | 0 | 0,105 | 9,52 | 0,138 | 3,20 | 182±192 | 23 | 0,150 |
| Mat_5 | 18 | 17 | 1 | 0,06 | 0,156 | 6,42 | 0,144 | 3,02 | 119±152 | 15 | 0,000 |
| Mat_6 | 20 | 19 | 1 | 0,05 | 0,080 | 12,45 | 0,135 | 3,24 | 229±122 | 9 | 0,211 |
| Mat_7 | 20 | 20 | 0 | 0 | 0,080 | 12,50 | 0,135 | 3,26 | 260±144 | 13 | 0,300 |
| Mat_8 | 18 | 18 | 0 | 0 | 0,105 | 9,53 | 0,138 | 3,16 | 233±168 | 18 | 0,389 |
| Mat_9 | 20 | 20 | 0 | 0 | 0,100 | 10,00 | 0,138 | 3,21 | 216±115 | 8 | 0,050 |
| Mat_10 | 14 | 14 | 0 | 0 | 0,092 | 10,89 | 0,136 | 3,08 | 279±169 | 18 | 0,286 |
| Mat_11 | 20 | 19 | 1 | 0,05 | 0,069 | 14,44 | 0,134 | 3,27 | 217±148 | 14 | 0,053 |
| Mat_12 | 16 | 16 | 0 | 0 | 0,078 | 12,80 | 0,135 | 3,17 | 266±136 | 12 | 0,188 |
| Mat_13 | 18 | 18 | 0 | 0 | 0,074 | 13,50 | 0,134 | 3,23 | 177±147 | 13 | 0,222 |
| Mat_14 | 18 | 18 | 0 | 0 | 0,080 | 12,46 | 0,135 | 3,22 | 253±139 | 12 | 0,278 |
| Mat_15 | 15 | 15 | 0 | 0 | 0,138 | 7,26 | 0,142 | 3,01 | 144±147 | 14 | 0,133 |
| Mat_16 | 16 | 16 | 0 | 0 | 0,070 | 14,22 | 0,134 | 3,19 | 162±92 | 5 | 0,250 |
| Mat_17 | 20 | 19 | 1 | 0,05 | 0,119 | 8,40 | 0,140 | 3,15 | 137±140 | 12 | 0,368 |
| Mat_18 | 16 | 13 | 3 | 0,19 | 0,112 | 8,89 | 0,139 | 3,00 | 212±168 | 18 | 0,077 |
| Mat_19 | 12 | 12 | 0 | 0 | 0,167 | 6,00 | 0,146 | 2,85 | 257±299 | 56 | 0,231 |
| Mat_20 | 14 | 14 | 0 | 0 | 0,112 | 8,89 | 0,139 | 3,00 | 418±222 | 31 | 0,154 |
| Mat_21 | 19 | 19 | 0 | 0 | 0,061 | 16,41 | 0,133 | 3,29 | 361±261 | 43 | 0,263 |
| Mat_22 | 18 | 18 | 0 | 0 | 0,167 | 6,00 | 0,146 | 3,02 | 657±263 | 43 | 0,056 |
| Mat_23 | 19 | 19 | 0 | 0 | 0,064 | 15,70 | 0,133 | 3,28 | 328±259 | 42 | 0,105 |
| Mat_24 | 16 | 16 | 0 | 0 | 0,109 | 9,14 | 0,139 | 3,10 | 280±183 | 21 | 0,125 |
| Mat_25 | 19 | 19 | 0 | 0 | 0,069 | 14,44 | 0,134 | 3,27 | 190±254 | 41 | 0,105 |
| Mat_26 | 14 | 14 | 0 | 0 | 0,143 | 7,00 | 0,143 | 2,97 | 80±78 | 4 | 0,071 |
| Mat_27 | 17 | 17 | 0 | 0 | 0,114 | 8,76 | 0,139 | 3,12 | 134±98 | 6 | 0,000 |
| Mat_28 | 13 | 13 | 0 | 0 | 0,089 | 11,27 | 0,136 | 3,05 | 206±143 | 13 | 0,077 |
| Mat_29 | 14 | 14 | 0 | 0 | 0,071 | 14,00 | 0,134 | 3,12 | 267±293 | 54 | 0,000 |
| Mat_30 | 16 | 16 | 0 | 0 | 0,078 | 12,80 | 0,135 | 3,17 | 360±203 | 26 | 0,000 |
| Média | 514 | 507 | 7 | 0,01 | 0,099 ±0,03 | 10,90 ±2,95 | 0,137 ±0,004 | 3,14 ±0,11 | 237±112 | 22±15 | 0,174±0,131 |

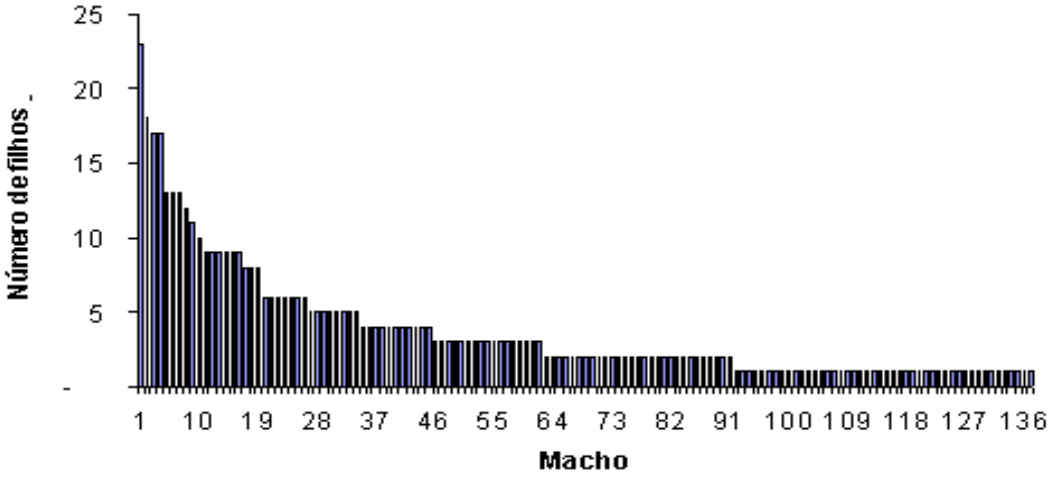


**Figura 11.** Número de filhos gerados por cada genitor determinado como pai das sementes de *M. urundeuva.*

### *5.3.4 Análise de paternidade nos regenerantes*

A árvore mãe foi encontrada dentro do fragmento para todos 149 regenerantes amostrados, os quais foram gerados por 74 (42%) das 175 árvores femininas. A árvore paterna foi encontrada para 145 (97,3%) dos 149 regenerantes, os quais foram gerados por 78 (29%) dos 268 candidatos a pai. Para confirmar estes parentescos entre pais e filhos, estimou-se o coeficiente de coancestria entre os regenerantes que tiveram o pai e a mãe determinado dentro da área, o qual tem um valor esperado de 0,25. O coeficiente de coancestria médio entre todos os pares de regenerantes e as putativas árvores maternas foi de $0{,}288 \pm 0{,}046$, e entre os regenerantes e os putativos pais foi de $0{,}327 \pm 0{,}031$. O intervalo de confiança do erro padrão a 95% de probabilidade mostra que estas estimativas são significativamente diferentes de zero. Tais resultados reforçam a hipótese de que os verdadeiros pais foram encontrados dentro da área de estudo. Em termos gerais, estes resultados sugerem ausência de imigração de sementes e baixa taxa de imigração de pólen (<3%). Portanto, o fragmento apresenta alto grau de isolamento genético de outras populações da espécie.

### *5.3.5 Distância de dispersão do pólen medido nas progênies e regenerantes*

O pólen foi disperso dentro da população a distâncias relativamente grandes (Tabela 10, Figuras 12 e 13). A distância de movimento do pólen medida nas progênies variou de 3,1 a 890,5 m, com mediana de 191,7 m (média aritmética de 252±204 m). Em nível de média de árvores matrizes, a dispersão variou de 80 m a 657 m, com média geral de 237 m (Tabela 10). A distância média de dispersão de pólen nos regenerantes, medida pela distância entre as árvores determinadas como mãe e as determinadas com pai das sementes variou de 3 a 903 m, com mediana de 62 m (138±169 m). Estas distâncias são muito menores do que a distância média entre todos os machos e as árvores matrizes (366±233 m) e entre todos os machos e as fêmeas (374±235 m) na população. Aproximadamente 50% dos pólens das progênies e 70% dos pólens dos regenerantes viajaram menos de 200 m e mais de 90% menos de 600 m (Figuras 12 e 13). Nenhuma semente originou-se da fertilização de árvores amostradas no grupo distante a 4 km da população. Foi detectada uma correlação negativa e significativa entre o número de progênies fertilizadas ($R^2 = 0{,}84, P < 0{,}01$) e regenerantes ($R^2 = 0{,}93, P < 0{,}01$) com a distância entre os parentais maternos e paternos. A comparação da distribuição de frequência de distância entre os potenciais machos e os machos efetivos das 30 árvores matrizes, possibilitou rejeitar a hipótese de cruzamentos aleatórios na população (Figura 13a, b). A diferença entre as distâncias entre a curva de dispersão de pólen e a curva de distância entre todos os machos em relação as 30 árvores matrizes (Figura 13a), avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov´s foi significativa nas sementes ($D = 0{,}224$, $P = 0{,}00067$). Igualmente a diferença entre as distâncias entre a curva de dispersão de pólen medida nos regenerantes e a curva de distância entre todos os machos e todas as fêmeas (Figura 13b) foi significativa ($D = 0{,}713$, $P = 0{,}0000$). Estes resultados indicam que a distância entre os potenciais polinizadores das árvores matrizes não explica o padrão de cruzamento observado. Existe uma forte tendência para os cruzamentos ocorrem entre árvores, localizadas próximas.

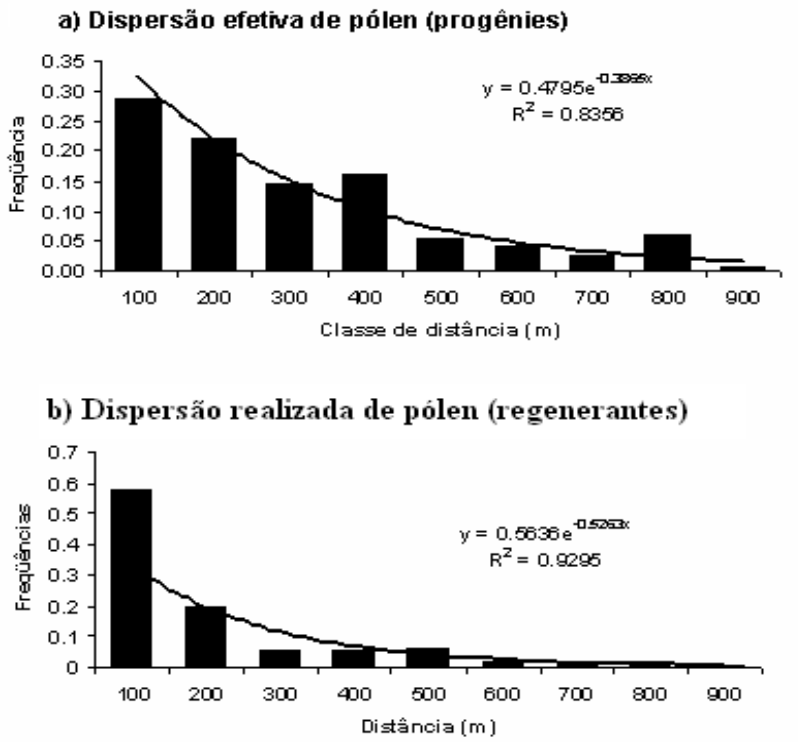


**Figura 12**. Distância de dispersão de pólen estimada nas progênies que tiveram o pai determinado dentro da área e curva de regressão exponencial, com respectiva função e coeficiente de determinação ($r^2$). a) Dispersão de pólen medida nas progênies; b) Dispersão de pólen medida nos regenerantes.

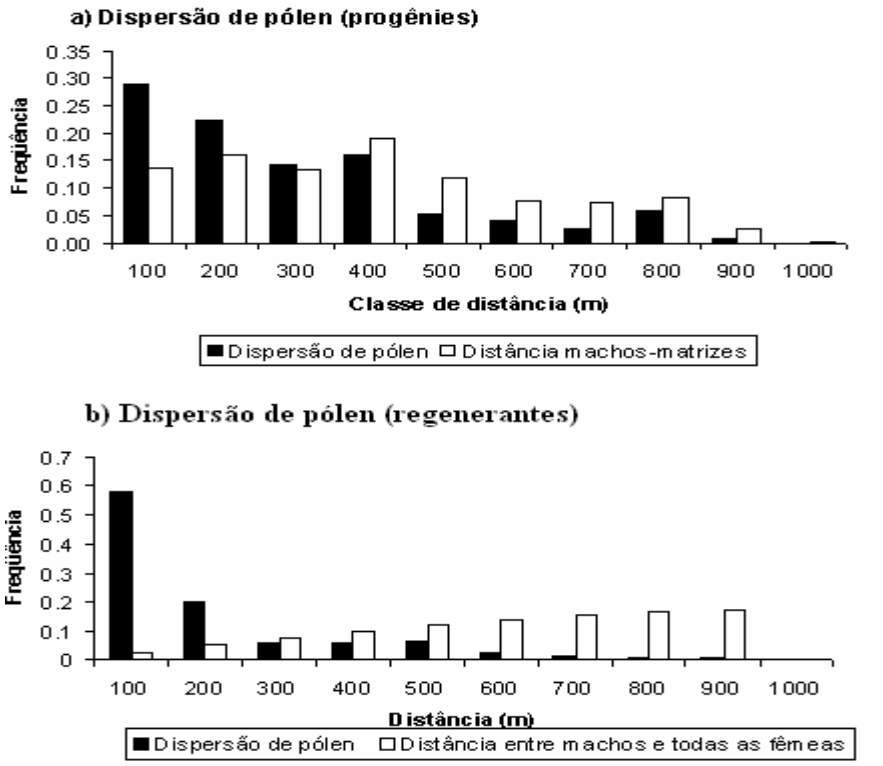


**Figura 13.** Frequência de distância na dispersão efetiva de pólen e frequência de distância entre as árvores masculinas e as árvores matrizes de *M. urundeuva*. a) Dispersão de pólen medida nas progênies; b) Dispersão de pólen medida nos regenerantes.

### *5.3.6 Correlação entre DAP dos pais e número de filhos gerados*

Para verificar se o tamanho das árvores, em termos de DAP, determinava a paternidade das sementes, correlacionou-se o DAP das árvores consideradas como putativos pais das sementes com o número de sementes originadas da fertilização destas árvores masculinas (Figura 14). Os resultados mostraram ausência de associação entre DAP e número de sementes originadas da fertilização destas árvores (r= -0,065). Portanto, o tamanho da árvore não influenciou o número de filhos gerados.

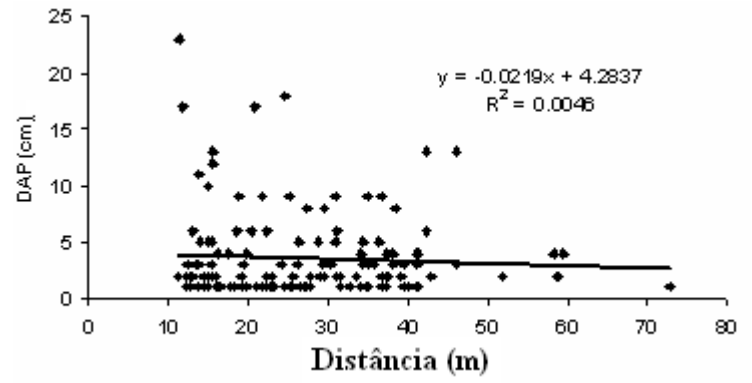


**Figura 14.** Dispersão e relação entre o diâmetro a altura do peito (DAP) das árvores masculinas determinadas como pai das sementes e número de descendentes gerados por cada parental paterno em população de *M. urundeuva*.

### *5.3.7 Distância do fluxo gênico realizado via sementes (regenerantes)*

A análise dos regenerantes mostrou uma curta distância de dispersão de sementes (Figura 15a, b). Todas as plantas analisadas da regeneração tinham a mãe determinada dentro da população, sugerindo ausência de imigração de sementes. A distância de dispersão de sementes medida pela distância entre os regenerantes e a mãe variou de 0,8 a 739 m, com mediana de 62 m (média aritmética de 124±150 m). Aproximadamente 68% das sementes desenvolviam dentro de um raio de 100 m da árvore maternal e 90% dentro de um raio de 400 m (Figura 15a, b). A correlação entre o número de regenerantes e a distância da mãe foi negativa, alta e significativa (até 900 m: $R^2 = 0,69, P < 0,01$ e até 150 m: $R^2 = 0,75, P < 0,01$). O coeficiente médio de coancestria entre as mães e os regenerantes foi de 0,326±0,037 (±erro padrão a 95% de probabilidade), reforçando a hipótese de correta determinação das putativas mães por análise de paternidade. O número de filhos gerados por estas mães variou de 1 a 11 (Figura 16).

A distância de dispersão de sementes medida em relação aos regenerantes e aos pais determinados dentro da área (Figura 17) variou de 3 a 904 m, com mediana de 63 m (média aritmética de 169±204 m). Estes resultados demonstram que muitos dos cruzamentos têm ocorrido em curtas distâncias e as sementes são dispersas em grande parte na vizinhança da árvore matriz.

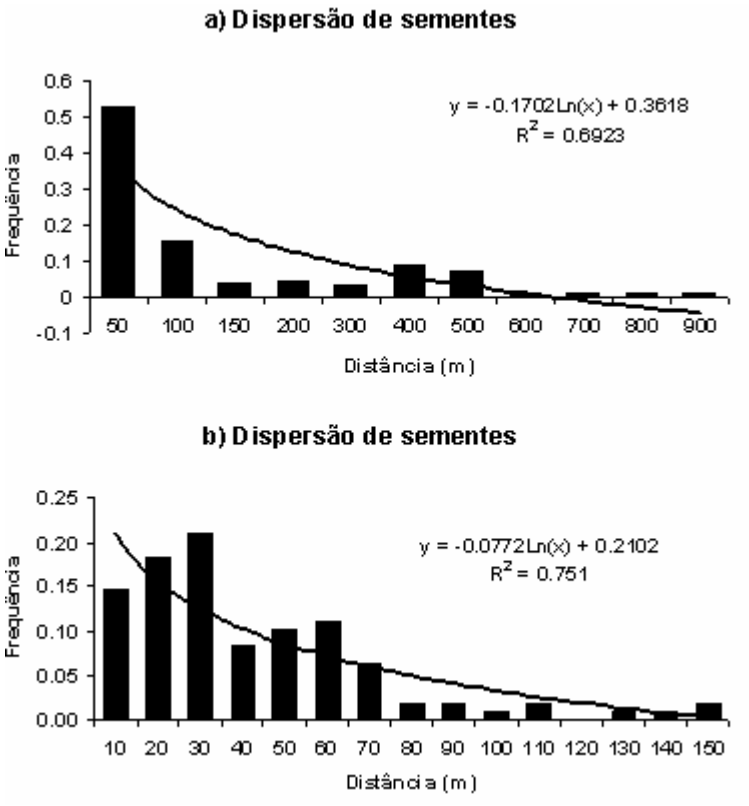


**Figura 15**. Distância de dispersão de sementes estimada na regeneração que tiveram a mãe determinada dentro da área e curva de regressão exponencial, com respectiva função e coeficiente de determinação ($r^2$). a) Frequência de dispersão de sementes até a distância de 900 m; b) Frequência de dispersão de sementes até a distância de 150 m.

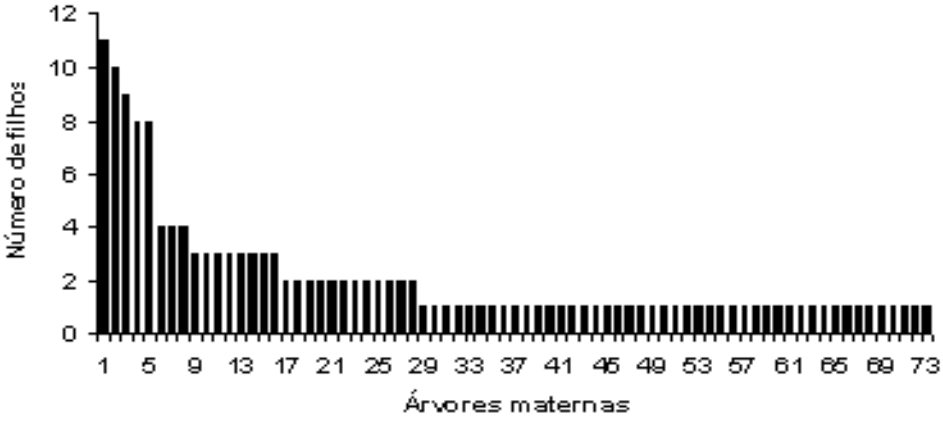


**Figura 16.** Número de filhos gerados por cada árvore fêmea determinada como mãe dos regenerantes de *M. urundeuva*.

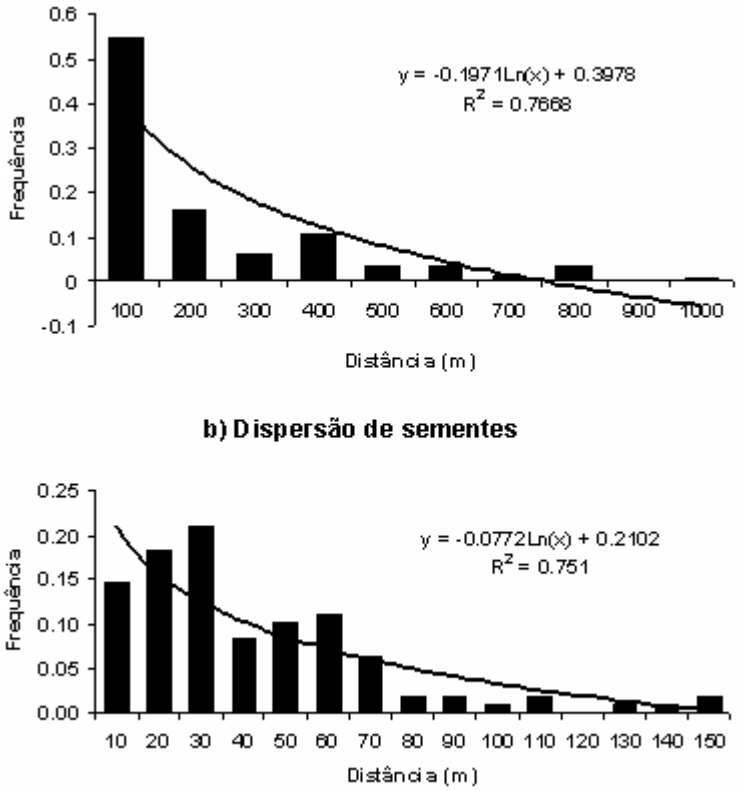


**Figura 17.** Distância de dispersão de sementes estimada na regeneração em relação ao pai determinado dentro da área e curva de regressão exponencial, com respectiva função e coeficiente de determinação ($r^2$).

## *5.3.8 Área de vizinhança efetiva de polinização*

Com base nas progênies, a estimativa da área efetiva de polinização ( $A_{ep}$ ) variou entre árvores matrizes de 4 a 56 ha, com média de 22 ha (Tabela 10). Quando $A_{ep}$ foi estimada para os regenerantes, este foi quantificado em 26,25 ha. Resultados semelhantes para a área de vizinhança reprodutiva foram encontrados em outras espécies arbóreas como: *Cordia alliodora* (BOSHIER et al., 1995) e *Gliricidia sepium* (LATOUCHE-HALLÉ et al., 2004). Estas áreas correspondem a um circulo de raio ( $r_{ep} = \sqrt{A_{ep} / \pi}$ ) variando de 112 a 422 m, com média 289 m para progênies e de 264 m para os regenerantes.

### *5.3.9 Coancestria e tamanho efetivo da população reprodutiva*

O coeficiente de coancestria entre fêmeas, machos e entre machos e fêmeas foi respectivamente, 0,000359, 0,0, e 0,000000409 (total 0,000325). Isto demonstra que sob cruzamentos aleatórios, a endogamia biparental esperada é baixa (0,00032). O tamanho efetivo da população reprodutiva indicou que as 467 árvores adultas correspondem a 335 indivíduos não parentes e endogâmicos ( $N_e / N = 0{,}76$ ).

O número efetivo de doadores de pólen estimados da analise de paternidade ( $N_{ep}$ ) variou de 6 a 14,44, com média de 10,9 por árvore matriz (Tabela 10). A correlação de paternidade ( $r_p$ ) variou entre matrizes de 0,061 a 0,167, com média de 0,099, indicando que alguns cruzamentos correlacionados estão ocorrendo. O coeficiente médio de coancestria dentro de progênies ($\Theta_{xy}$) e o tamanho efetivo de variância ( $N_e$ ) dentro de progênies foram maiores e menores, respectivamente, do que o esperado em progênies de meios-irmãos (0,125 e 4).

## 5.4 DISCUSSÃO

### *5.4.1 Isolamento do Fragmento*

Conhecer os níveis de isolamento genético das populações de espécies arbóreas é fundamental para a compreensão da dinâmica genética dessas populações. O fluxo de genes é responsável pela homogeneização da diversidade genética entre as populações (SMOUSE; SORK, 2004). No entanto, a ausência de fluxo gênico, no longo prazo, pode resultar em aumento da diferenciação genética entre as populações. Se uma população é isolada, o tamanho efetivo da população será reduzido nas gerações futuras, devido à falta de fluxo gênico e, portanto, um aumento na frequência de alelos idênticos por descendência será observado. Os resultados das análises de maternidade e da paternidade deste estudo mostraram ausência total de imigração de sementes na análise dos regenerantes estabelecidos

e baixos níveis de imigração de pólen nos regenerantes (2,7%) e progênies (1,6%). A estimativa do fluxo gênico indica que as taxas de imigração de sementes e pólens são consistentes. Como não existem outras populações próximas à estudada, alguns machos não puderam ser genotipados no presente estudo. Outras árvores masculinas podem não ter sido encontradas durante o trabalho de amostragem no campo, e devido a possíveis erros que possam ter ocorrido durante as genotipagens, é possível que não exista imigração de pólen na população.

Sementes de *M. urundeuva* são dispersas por gravidade e anemocoria e as árvores são polinizadas por abelhas (NUNES et al., 2008). Teoricamente, a dispersão de sementes por anemocoria e a polinização por abelhas têm o potencial para dispersar sementes e pólen a longas distâncias, porém, alguns fatores como a densidade vegetal elevada e a ausência de outras sementes e fontes de pólen em torno do fragmento podem limitar a distância de dispersão. Alta densidade arbórea pode limitar tanto a distância de dispersão de sementes quanto a de pólen, devido à baixa permeabilidade no interior do fragmento, podendo produzir a EGE nas populações. O fragmento estudado apresenta elevada densidade vegetal (observação pessoal) e diversidade de espécies (STRANGHETTI; RANGA, 1998). Com relação ao pólen, alguns estudos têm mostrado que a densidade de espécies arbóreas pode limitar a distância de dispersão do pólen realizada pelo vento (DYER; SORK, 2001; ROBLEDO-ARNUNCIO et al., 2004) e pelos insetos polinizadores (SORK et al., 2005). Assim, a alta densidade do povoamento vegetal provavelmente contribuiu para a ausência de imigração de sementes e a baixa imigração de pólen no fragmento. No entanto, acredita-se que a causa mais provável dos baixos níveis de imigração é a ausência de outras fontes de pólen e sementes próximos ao fragmento. O povoamento florestal estudado é fisicamente isolado por um rio largo e por plantações de cana-de-açúcar. Observaram-se alguns pequenos fragmentos de floresta isolados na região, porém não há ocorrência da espécie *M. urundeuva* nestes. É importante salientar que a presente análise da imigração de pólen e sementes utilizando locos microssatélites verificou que está ocorrendo diminuição nos níveis de fluxo gênico, confirmando os padrões observados e os elevados níveis de isolamento da população. Assim, os níveis elevados de isolamento genético detectados sugerem para o futuro um aumento na diferenciação genética desta população isolada em relação a outras populações da espécie que irá resultar em uma redução do tamanho efetivo da população nas gerações futuras.

### *5.4.2 A dispersão de sementes e pólens*

Os resultados deste estudo mostraram que uma alta frequência de sementes foi dispersa a uma curta distância da árvore-mãe. Aproximadamente 53% das sementes produzidas foram dispersas dentro de um raio de 50 m da árvore-mãe (Figura 13a). Os resultados também mostraram uma forte associação entre o número de regenerantes por árvore-mãe e a sua respectiva distância da árvore materna ( $\hat{r} = -0{,}83, P < 0.01$ ), sugerindo um padrão de isolamento por distância. Esta dispersão de sementes de curta distância pode explicar a EGE observada em ambas as gerações (adultas e regenerantes) (Figura 7; Capítulo 1). Curta distância de dispersão de sementes tem sido encontrada em muitas outras espécies de árvores tropicais, como *Jacaranda copaia* (JONES et al., 2005), *Fraxinus excelsior* (BACLES et al., 2006), *Araucaria angustifolia* (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007) e *Copaifera langsdorffii* (SEBBENN et al., 2009). A alta frequência de dispersão de sementes a curta distância e EGE parece ser um padrão comum em muitas populações de espécies arbóreas. Como mencionado acima, sementes de *M. urundeuva* são dispersas por gravidade e anemocoria (NUNES et al., 2008). A dispersão de sementes por gravidade tem alto potencial de produzir EGE, já que o recrutamento ocorre perto da árvore-mãe. Por outro lado, a dispersão de sementes por anemocoria tem o potencial para dispersar sementes a longas distâncias. No entanto, como discutido anteriormente, a dispersão de sementes pelo vento pode ser afetada pela densidade de espécies vegetais. Como o fragmento possui alta densidade vegetal, a dispersão de sementes pelo vento é provavelmente restrita. Assim, tanto a dispersão de sementes por gravidade e a alta densidade vegetal limitam a dispersão de sementes por anemocoria, e provavelmente são responsáveis pela alta frequência de dispersão de sementes a curtas-distâncias e a baixa frequência de dispersão de sementes a longas-distâncias. Se esta estrutura de famílias permanece até as árvores atingirem a idade reprodutiva e a dispersão do pólen também ocorrer a distâncias curtas, o cruzamento entre parentes é inevitável. Cruzamento entre parentes produz endogamia biparental, que é a única forma de endogamia entre espécies dióicas.

O resultado deste estudo também mostrou que o pólen tem alta frequência de dispersão a curtas-distâncias, embora essa distância seja maior que a observada para as sementes. Em *M. urundeuva*, ocorre a polinização pelas abelhas que são capazes de percorrer longas distâncias durante o forrageamento. No entanto, muitas espécies de abelhas mostram

fidelidade ao local ou território que geralmente frequentam (GHAZOUL, 2005). Por exemplo, as abelhas melíferas de floresta forrageiam em manchas muito pequenas (algumas dezenas de metros de largura) e outras abelhas tendem para o transporte de pólen entre apenas um ou alguns indivíduos adjacentes (WILMER et al., 1994). Este padrão de forrageamento pode explicar a curta distância de dispersão do pólen observado. Outro fator poderia ser a alta densidade do povoamento vegetal que pode restringir o movimento das abelhas entre coespecíficos mais distantes. Assim, como ambas as sementes e dispersão do pólen ocorrem predominantemente em distâncias curtas, pode-se esperar o acasalamento entre parentes e cruzamentos correlacionados nesta população nas gerações futuras e, consequentemente, alguns níveis de endogamia e baixo tamanho efetivo da população.

### *5.4.3 Coeficiente de coancestria e tamanho efetivo da população*

O coeficiente de coancestria entre as árvores do sexo masculino e feminino indica que sob cruzamentos aleatórios, baixos níveis de endogamia biparental são esperados nesta população (F <1%). No entanto, neste estudo, foram observados fatores que podem produzir a endogamia biparental. Dentre esses citam-se a estrutura genética espacial significativa entre os indivíduos adultos, a frequente dispersão de sementes e pólens a distâncias curtas, e padrões de dispersão de pólen, que indicam a presença de cruzamentos correlacionados na população. Entretanto, nenhuma endogamia foi observada em árvores adultas, jovens ou progênies (Tabela 5). Esta discrepância pode ser explicada pela depressão endogâmica, que pode ter eliminado indivíduos menos heterozigotos entre o evento de fertilização e o momento da análise do genótipo por meio de marcadores microssatélites. Outra explicação é o fato de que nem todos os regenerantes ou progênies devem ser endogâmicos, mas o índice de fixação foi estimado utilizando-se todas as plantas, endogâmicas e não edogâmicas. Logo, esta mistura pode estar mascarando a endogamia na população.

A estimativa do tamanho efetivo da população reprodutiva e das progênies pela análise de parentesco foi inferior ao número de indivíduos na população e esta diferença foi maior entre as progênies do que nos adultos. A diferença entre o número de indivíduos na população e no tamanho efetivo da população reflete o relacionamento entre as árvores (presença de alelos idênticos por descendência entre os indivíduos) no interior do fragmento.

Como a coancestria média pareada foi maior nas progênies, o seu tamanho efetivo da população foi menor. Em geral, estes resultados sugerem que a frequência de indivíduos relacionados está aumentando nas novas gerações da população. Este resultado é esperado, pois em populações isoladas são esperadas que apresentem aumento de parentesco e endogamia em gerações subseqüentes. A presença da estrutura genética espacial, dispersão de sementes e pólens a curta distância, e a ausência de endogamia indicam que, embora a coancestria esteja aumentando com as novas gerações, alguns fatores evolutivos estão atuando para reduzir a endogamia, como a depressão endogâmica, como já comentado. Espécies dióicas e auto-incompatíveis são provavelmente mais suscetíveis aos efeitos negativos da endogamia biparental, já que sua carga genética não é acessada por autofecundação e não faz parte de sua história evolutiva (LATOUCHE-HALLÉ et al., 2004). Assim, grande parte da endogamia pode ter sido eliminada entre a fase de semente para a fase adulta.

### *5.4.4 Implicações para a conservação genética e coleta de sementes para reflorestamentos ambientais com a espécie*

O estudo da estrutura genética espacial, sistema de reprodução e dispersão contemporânea de pólen e sementes de espécies arbóreas apresenta implicações práticas na realização da amostragem para marcação de árvores matrizes, conservação genética e coleta de sementes para recuperação ambiental (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007). O tamanho efetivo da população de progênies oriundas de sementes de polinização aberta é determinado por quatro fatores: *i*) o sistema de reprodução (autofecundação, cruzamentos correlacionados, cruzamentos endogâmicos e apomixia), *ii*) o parentesco entre as árvores matrizes; *iii*) se as sementes são coletadas de árvores auto-compatíveis (porcentagem de autofecundação), e *iv*) o conjunto genético efetivo de pólen amostrado para cada progênie. Como autofecundação não ocorre na espécie dióica, o parentesco dentro da família é determinado por meio de cruzamentos entre parentes machos e fêmeas e cruzamentos correlacionados. Em sementes de polinização aberta coletadas de espécies dióicas em populações que apresentem estrutura genética espacial, pode-se encontrar uma mistura de meio-irmãos e irmãos-completos não endogâmicos e meios-irmãos e irmãos-completos endogâmicos. Consequentemente, o coeficiente de coancestria dentro de cada família será maior que o esperado em progênies de

meios-irmãos ($\Theta_{xy}$=0,125) e o tamanho efetivo da população será menor do que quatro (valor esperado para progênies de meios-irmãos em uma população panmítica). Isso afeta diretamente no número de árvores necessário para a coleta de sementes (SEBBENN, 2002, 2003, 2006). Se as sementes forem coletadas de árvores matrizes que ocorrem dentro da área de estrutura familiar, tais matrizes podem ser parentes entre si e isso vai reduzir o tamanho efetivo da amostra total (conjunto das progênies de diferentes matrizes), pois indivíduos de diferentes progênies serão parentes entre sí, como primos, além do parentesco existente dentro das progênies. Assim, de acordo com os resultados observados na análise da estrutura genética espacial (~ 42 m), a coleta de sementes na população de *M. urundeuva* deve ser realizada com uma distância de pelo menos 50 m entre amostras. Isto irá reduzir a probabilidade de coleta de sementes a partir de sementes de árvores parentes.

Ainda, como a espécie é dióica, as sementes não serão produzidas por autofecundação e não vão ocorrer cruzamentos entre as matrizes. Sendo assim, a pressuposição *iii* mencionada anteriormente não influenciará o tamanho efetivo das sementes amostradas na população e não vai ocorrer aumento no parentesco entre progênies de diferentes árvores matrizes, pois estas não se cruzarão. Contudo, o conjunto de pólen pode afetar o tamanho efetivo da população da amostra total devido ao fato que algumas árvores masculinas poderão ser pai de mais de uma semente selecionada de uma árvore matriz. Portanto, na amostragem realizada poderá incluir alguns indivíduos meios-irmãos paternos. A alta frequência observada de dispersão do pólen a curta distância, sugere que o conjunto gênico está localizado, embora alguns eventos de baixa frequência de dispersão de pólen a longa distância possa ocorrer. Observou-se que cerca de 70% do pólen foi disperso até uma distância de 200 m, e 90% até 500 m. Assim, teoricamente, deveria haver uma distância de pelo menos 1000 m entre as árvores matrizes para a coleta de sementes para garantir que as mesmas possam representar diferentes conjunto gênico de pólen. Entretanto, exigir uma distância tão grande entre as árvores dentro do fragmento vai reduzir significativamente o número potencial de sementes a serem utilizadas para a coleta. Alternativamente, essa distância pode ser reduzida para cerca de 200 m. Embora, o número de árvores a partir da qual as sementes serão coletas deverá aumentar. Este método compensa a redução no tamanho efetivo total da população sobre todas as famílias, pois é provável que ocorra alta frequência de meios-irmãos paternos entre as famílias.

Na conservação genética, o número de árvores matrizes para a coleta de sementes pode ser determinado dividindo-se o tamanho efetivo de referência pelo tamanho efetivo

médio da população, $\hat{m} = N_{e(referência)} / \hat{N}_{e(v)}$ (SEBBENN, 2002). Mas, para fazer isso, como já mencionado, é necessário assumir que (i) em média, cada família tem um tamanho efetivo da população de 3,14 (Tabela 10), (ii) as sementes serão coletadas a partir de árvores que não são parentes entre si e, (iii), sementes de árvores que amostram conjunto de pólen diferente (distância mínima de 200 m). Assim, por exemplo, para conservar um tamanho efetivo de referência de 150 (3x50) (NUNNEY; CAMPBELL, 1993), a partir dos resultados de análise de paternidade, o número de árvores necessário para a coleta de sementes nessa população será 48.

Em conclusão, não foram observados efeitos claros da fragmentação florestal sobre a diversidade genética da presente população. Isto se deve ao fato de que a espécie é dióica e de longa vida; a população é relativamente grande; o evento de fragmentação ocorreu apenas recentemente. Devido às grandes distâncias entre o fragmento e outros coespecíficos ou populações da espécie, nenhuma imigração de sementes foi detectada no fragmento e níveis baixos de imigração de pólen foram observados. Dentro do fragmento, alta frequência de sementes e pólen foram dispersos em curta distância, o que explica os padrões de estrutura genética espaciais observados. Consequentemente, a população foi organizada em estruturas familiares, resultando em uma redução no tamanho efetivo da população de ambas as gerações (adultos e regenerantes) em relação ao número total de indivíduos na população. Os resultados deste estudo têm um impacto importante sobre o plano de amostragem para a coleta de sementes para a conservação genética, melhoramento e projetos de restauração ambiental. Este estudo demonstrou que é necessária a coleta de semente de um grande número de árvores, distantes em pelo menos 200 m para compensar o aumento do parentesco entre e dentro das famílias incluídas na amostra.

## 5.5 CONCLUSÕES

1. O conjunto de pólen recebido por diversas árvores matrizes é pouco diferenciado;
2. Não existe imigração de sementes na população;
3. A presente população apresenta alto grau de isolamento reprodutivo;
4. Um número bem menor de potenciais árvores polinizadoras participa do processo de reprodução;

5. Embora o pólen e as sementes sejam dispersos dentro da população a distâncias relativamente grandes, a maior intensidade de dispersão ocorre a curtas distâncias;
6. As sementes foram dispersas em grande quantidade na vizinhança das árvores matrizes.
7. Não existe correlação entre diâmetro das árvores polinizadoras e o número de filhos gerados;
8. Amostras de sementes da presente população devem ser coletadas de indivíduos distantes para evitar coletar de indivíduos parentes e de árvores matrizes que receberam conjunto polínicos sobrepostos.

# REFERÊNCIAS


ADAMS, W. T. Gene dispersal within forest tree populations. **Forest Science**, Bethesda, v. 6, p. 217–240, 1992.

ADAMS, W. T.; BURCZYK, J. Magnitude and implications of gene flow in gene conservation reserves. In: YOUNG, A.; BOSHIER D.; BOYLE, T. (Ed.). **Forest conservation genetics:** principles and practice. Wallingford: CABI, 2000. p. 215–224.

AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOCO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, p. 5177-5188, 2008.

ALDRICH, P. R.; HAMRICK, J. L. Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical forest mosaic. **Science**, Whashington, v. 281, p. 103-105, 1998.

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

ALMEIDA, S. P. **Cerrado**: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. 188 p.

ALVES, R. M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex. Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores Botânico-Agronômicos**. 2002. 146 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

AMOS, W.; SAWCER, S. J.; FEAKES, R. W.; RUBINSZTEIN, D. C. Microsatellites show mutational bias and heterozygote instability. **Nature Genetics**, New York, v. 13, p. 390-391, 1996.

AMOS, W.; BALMFORD, A. When does conservation genetics matter. **Heredity**, London, v. 87, p. 257-265, 2001.

APSIT, V. J.; HAMRICK. J. L.; NASON, J. D. Breeding population size of a fragmented population of a Costa Rican Dry Forest Tree Species. **Journal of Heredity**, Washington, v. 92, n. 5, p. 415-420, 2001.

ARCOT, S. S.; WANG, Z.; WEBER, J. L.; DEININGER, L.; BATZER, M. A. Alu repeats: a source for the genesis of primate microsatellites. **Genomics**, Londres, v. 29, p. 136-144, 1995.

ASINS, M. J.; CARBONELL, E. A. Concepts involved in measuring genetic variability ans its importance in conservation of plant genetic resources. **Evolution Trends Plants**, Svalof, v. 1, p. 51-61, 1987.

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

AZEVEDO, V. C. R.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A. Y.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic structure and mating system of Manilkara huberi (Ducke) A. Chev., a heavily logged Amazonian timber species. **Journal of Heredity**, Washington, v. 98, p. 646-654, 2007.

BACLES, C. F. E.; LOWE, A.; ENNOS, R. Effective seed dispersal across a fragmented landscape. **Science**, Whashington, v. 311, n. 5761, p. 628, 2006.

BALERONI, C. R. S. **Comportamento de populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All. procedentes de áreas com pertubação antrópica**. 2003. 123 f. Dissertação (Mestrado em Sistema de Produção) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2003.

BALERONI, C. R. S.; ALVES, P. F.; SANTOS, E. B. R.; CAMBUIM, J.; ANDRADE, J. A. C.; MORAES, M. L. T. Variação genética em populações naturais de aroeira em dois sistemas de plantio. **Revista Instituto Florestal**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 125-136, 2003.

BARRET, S. C. H.; KOHN, J. R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for consevation. In: FALK, D. A.; HOLSINGER, K. E. (Ed.). **Genetics and conservation of rare plants**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 1-30.

BAWA, K. S. Breeding systems of tree species for a lowland tropical community. **Evolution**, Lancaster, v. 28, p. 85-92, 1974.

BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal Forest Research**, Ottawa, v. 27, n. 3, p. 415-424, 1997.

BERNACCI, L. C.; FRANCO, G. A. D. C.; ÀRBOCZ, G. F.; CATHARINO, E. L. M.; DURIGAN, G.; METZGERO, J. P. Efeito da fragmentação florestal na composição e riqueza

de árvores na região da Reserva Morro Grande (Planalto de Ibiúna, sp). **Revista Instituto Florestal**, São Paulo, v. 18, p. 121-166, 2006.

BITTENCOURT, J. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, London, v. 99, p. 580-591, 2007.

BITTENCOURT, J. M.; SEBBENN, A. M. Pollen movement within a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. **Conservation Genetics**, v. 9, p. 855-868, 2008.

BITTENCOURT; J. M., SEBBENN, A. M. Genetic effects of forest fragmentation and *in situ* conservation of high-density *Araucaria angustifolia* populations in Southern Brazil. **Tree Genetics and Genomes**, v. 5, p. 573-582, 2009.

BLOUIN, M. S. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 18, p. 503-511, 2003.

BORÉM, A. Dispersão Gênica. **Escape gênico & transgênicos**. Viçosa, 2002. Disponível em: <http://www.cib.org.br/pdf/09DispeGenica.pdf> . Acesso em: 20 abr. 2009.

BOSHIER, D. H.; CHASE, M. R.; BAWA, K. S. Populations genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 2. Mating system. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 82, n. 4, p. 476-483, 1995.

BOUZAT, J. L. The population genetic structure of the Greater Rhea (*Rhea americana*) in an agricultural landscape. **Biological Conservation**, Liverpool, v. 99, p. 277-284, 2001.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste**: especialmente do Ceará. 4. ed. Natal: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1990. 315 p.

BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia splendes* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor – fragmento semideciduais no sul de Minas Gerais**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Manejo Ambiental) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. A simple and cost effective method to synthesize a fluorescent labeled internal DNA standard for fragment sizing in an automatic sequencer. **Biotechniques**, Natick, v. 31, p. 793-800, 2001.

BURCZYK, J.; ADAMS, W. T.; SHIMIZU, J. Y. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata Lemmon*) stand. **Heredity**, London, v. 77, p. 251-260, 1996.

BURCZYK, J.; LEWANDOWSKI, A.; CHALUPKA, W. Local pollen dispersal and distant gene flow in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 197, n. 1, p. 39-48, 2004.

CAETANO, S.; SILVEIRA, P.; SPICHIGER, R.; NACIRI-GRAVEN, Y. Identification of microsatellite markers in a neotropical seasonally dry forest tree, *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, p. 21-23. 2005.

CAETANO, S.; PRADO, D.; PENNINGTON, R. T.; BECK, S.; OLIVEIRA-FILHO, A.; SPICHIGER, R.; NACIRI, Y. The history of Seasonally Dry Tropical Forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 17, p. 3147–3159, 2008.

CARNEIRO, F. A. S.; SEBBENN, A. M.; KANASHIRO, M.; DEGEN, B. Low inter-annual variation of mating system and gene flow of *Symphonia globulifera* in the Brazilian Amazon. **Biotropica**, Whashington, v. 39, p. 628-636, 2007.

CARNEIRO, F. A. S.; DEGEN, B.; KANASHIRO, M.; LACERDA, A. E. B.; SEBBENN, A. M. High levels of pollen dispersal in *Symphonia globulifera* in a dense Brazilian Amazon forest revealed by paternity analysis. **Forest Ecology and Management**, Amsterdan, v. 258, p. 1260-1266, 2009.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras:** recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira. Colombo: Embrapa–CNPF, 1994. 640 p.

CASCANTE, A.; QUESADA, M.; LOBO, J. J.; FUCHS, E. A. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. **Conservation Biology**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 137-147, 2002.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Davis, v. 18, p. 237-268, 1987.

CIPRIANI, G.; LOT, G.; HUANG, W. G.; MATARAZZO, M. T.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: Isolation, characterization and cross species amplification in *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, p. 65-72, 1999.

CLEGG, M. T. Measuring plant mating systems. **Bioscience**, Washington, v. 30, n. 12, p. 814-818, 1980.

CLOUTIER, D.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A. Y.; SCHOEN, D. J. Impacts of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 797-809, 2007.

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

COLES, J. F.; FOWLER, D. P. Inbreeding in neighboring trees in two White Spruce populations. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 25, n. 1, p. 29-34, 1976.

COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, London, v. 83, p. 748-756, 1999.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, Lawrence, v. 10, n. 2, p. 349-356, 2001.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Baltimore, v. 144, n. 4, p. 2001-2014, 1996.

DAYANANDAN, S.; BAWA, K. S.; KESSELI, R. Conservation of microsatellites among tropical tree (Leguminosae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 84, p. 1658-1663, 1997.

DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELI, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 10, p. 1585-1592, 1999.

DEGEN B. **Genetic data analysis and numerical test**. GDA-NT. Beta version 1.0, 2006.

DEGEN, B.; BANDOU, E.; CARON, V. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guyana. **Heredity**, London, v. 93, p. 585-591, 2004.

DEL CASTILLO R. F.; TRUJILLO, S. Effect of inbreeding depression on outcrossing rates among populations of a tropical pine. **New Phytologist**, Cambridge, v. 177, p. 517-524, 2007.

DICK, C. W.; ETCHELECU, G.; AUSTERLITZ, F. Pollen dispersal of Neotropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and Africa honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 753-764, 2003.

DOW, B. D.; ASHLEY, M. V.; HOWE, H. F. Characterization of highly variable (GA/CT)n microsate-llites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 91, p. 137–141, 1995.

DOW, B. D.; ASHLEY, M. V. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of sampling in bur oak, *Quercus macrocarpa*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, p. 615-627, 1996.

DOW, B. D.; ASHLEY, M. V. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. **Journal of Heredity**, Washington, v. 89, p. 62-70, 1998.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUNPHY, B. K.; HAMRICK, J. L.; SCHWAGERL, J. A comparison of direct and indirect measures of gene flow in the bat-pollinated tree *Hymenaea courbaril* in the dry forest life zone of southwestern Puerto Rico. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 165, n. 3, p. 427-436, 2004.

DYER, R. J.; SORK, L. J. Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus schinata* Mill. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 859-866, 2001.

EPPERSON, B. K. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, 1990. p. 229-253.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. W. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Reviews of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 34, p. 487-515, 2003.

FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. 3. ed. New York: Longman Scientific & Technical, 1989. 438 p.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. London: Longman Scientific & Technical, 1996. 464 p.

FERES, J. M. **Diversidade genética, sistema reprodutivo e fluxo de pólen em duas populações de *Tabebuia rosea-alba* (Ridl.) sand.:** implicações para conservação. 2009. 142 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220 p.

FISCHER, M.; HUSI, R.; PRATI, D.; PEINTINGER, M.; VAN KLEUNEN, M.; SCHMID, B. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clon al plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 87, p. 1128-1137, 2000.

FIGUEIRÔA, J. M.; BARBOSA, D. C. A.; SIMABUKURO, E. A. Crescimento de plantas jovens de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) sob diferentes regimes hídricos. **Acta Botanica Brasilica**, São Carlos, v. 18, n. 3, p. 573-580, 2004.

FINKELDEY, R. **An introduction to tropical forest genetics**. Georg-August University Göttingen, Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, 1998. 241 p. (Lecture Notes).

FLEISHMAN, E.; LAUNER, A. E.; SWITKY, K. R.; YANDELL, U.; HEYWOOD, J.; MURPHY, D. D. Rules and exceptions in conservation genetics: genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications for management planning. **Biological Conservation**, Liverpool, v. 98, p. 45-53, 2001.

FLEURY, M. **Efeito da fragmentação florestal na predação de sementes da palmeira jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) em florestas semidecíduas do estado de São Paulo**. 2003. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

FRANCESCHINELLI, E. V.; BAWA, K. S. The effect of ecological factors on the mating system of a South America shrub species (*Helicteres brevispira*). **Heredity**, London, v. 84, p. 116-123, 2000.

FREITAS, M. L. M. **Caracterização genética por marcador AFLP e caracteres quantitativos em uma população de *Myracrodruon urundeuva* F.F.& M.F. Allemão.** 2003. 88 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M.; MORAES, M. L. T.; LEMOS, E. G. M. Mating system of a population of *Myracrodruon urundeuva* F. F. & M. F. Allemão using the fAFLP molecular marker. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 3, p. 425-431, 2004.

FREITAS, M. L. M.; AUKAR, A. P. A.; SEBBENN, A. M.; MORAES, M. L. T.; LEMOS, E. G. M. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. por marcador AFLP. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 68, p. 21-28, 2005.

FREITAS, M. L. M.; AUKAR, A. P. A.; SEBBENN, A. M.; MORAES, M. L. T.; LEMOS, E. G. M. Variação genética em progênies de *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão em três sistemas de cultivo. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 319-329, 2006.

FUCHS, E. J.; LOBO, J. A.; QUESADA, M. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. **Conservation Biology**, Cambridge, v. 17, n. 1, p. 149-157, 2003.

FURLANI, R. C. M.; MORAES, S. B.; MORAES, M. L. T.; PAIVA, J. R.; SEBBENN, A. M. Mating system in natural population of *Hevea brasiliensis* by allozimes. **Crop Beeding and Appplied Biothecnology**, Londrina, v. 5, p. 402-409, 2005.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992. 646 p.

GAINO, A. P. S. C.; SILVA, A. M.; MORAES, M. A.; ALVES, P. F.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M. Mediated seed and pollen gene flow, spatial genetic structure and effective population size in a large, isolated and fragmented population of the dioecious tropical tree species *Myracrodruon urundeuva*. **Conservation Genetics**, 2009. No prelo.

GHAZOUL J. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 80, p. 413-443, 2005.

GIL, L.; FUENTES-UTRILLA, P.; SOTO, A.; CERVERA, M. T.; COLLADA, C. English elm is a 2000-year-old Roman clone. **Nature**, London, v. 431, p. 1053, 2004.

GIUDICE NETO, J. D.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade genética de uma população "*ex situ*" de *Caesalpinia echinata* Lam. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 69, p. 125-133, 2005.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C.; ERSOZ, E.; BROWN, G. R.; WHEELER, N. C.; NEALE, D. B. DNA sequence variation and selection of tag SNPs at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. **Genetics**, Austin, v. 172, n. 3, p. 1915-1926, 2006.

GOUDET, J. FSTAT. (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate /F/-statistics. **Journal Heredity**, London, v. 86, p. 485-486, 2002.

GUSSON, E.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 67, p. 123-135, 2005.

HAMILTON, M. B. Tropical tree gene flow and seed dispersal. **Nature**, London, v. 401, n. 6749, p. 129-130, 1999.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, C. M.; MACBRIDE, B.; THOMAS, L. (Ed.). **Genetics and conservation**. Menlo Parck: The Benjamin/Cummings, 1983. p. 335-348.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. Isozyme variation in tropical trees: Procedures and preliminary results. **Biotropica**, Whashington, v. 18, n. 3, p. 201-207, 1986.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The genetic structure of tropical tree populations: Associations with reproductive biology. In: BOCK, J. H.; LINHART, Y. B. (Ed.). **Plant evolutionary ecology**. Boulder: Westview Press, 1989. Cap. 2, p. 131-146.

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**. New York: Champman and Hall, 1989. p. 87-105.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Conservation genetics of endemic plant species. In: AVISE, J. C.; HAMRICK, J. C. (Ed.). **Conservation genetics: case histories from nature**. New York: Chapman & Hall, 1996. Cap. 9, p. 281-304.

HAMRICK, J. L.; NASON, J. D. Gene flow in forest trees. In: YOUNG A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Wallingford: CABI, 2000. p. 81–90.

HAMRICK, J. L. Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management**, Amsderdam, v. 197, p. 323-335, 2004.

HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. (Ed.) **Microsatellites:** evolution and applications. New York: Oxford University Press, 1999. p. 1-9.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, p. 618-620, 2002.

HEDRICK, W. Conservation genetics: Where are we now? **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 16, p. 629-636, 2001.

HEDRICK, F. A. Standardized genetic differentiation measured. **Evolution**, Lawrence, v. 59, p. 1633-1638, 2005.

HOLSINGER, K. E.; GOTTLIEB, L. D. Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In: FALK, D. A.; HOLSINGER, K. E. (Ed.). **Genetics and conservation of rare plants**. Oxford: Oxford University Press, p. 195-223, 1991.

HOWE, H. F.; SMALLWOOD, J. Ecology of seed dispersal. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 13, p. 201-208, 1982.

HOWE, H. F. Implications of seed dispersal by animals for tropical reserve management. **Biological Conservation**, Barking, v. 30, p. 261-281, 1984.

HUFFORD, K. M.; HAMRICK, J. L. Variability selection at three early life stages of the tropical tree *Platypodium elegans* (Fabaceae, Papilonoidae). **Evolution**, Lawrence, v. 57, p. 518-526, 2003.

IDURY, R. M.; CARDON, L. R. A Simple Method for Automated Allele Binning in Microsatellite Markers. **Genome Research**, Califórnia, v. 11, p. 1104-1109, 1997.

IRWIN, A. L.; HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; SMOUSE, P. E. A multiyear estimate of the effective pollen donor pool for *Albizia julibrissin*. **Heredity**, London, v. 90, p. 187-194, 2003.

ISAGI, Y.; SUHANDONO, S. PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, p. 897-899, 1997.

ISHIHATA, L. **Bases para seleção de áreas prioritárias para a implantação de unidades de conservação em regiões fragmentadas.** 1999. 200 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

JAGGI, C.; WIRTH, T.; BAUR, B. Genetic variability in subpopulations of the asp viper (*Vipera aspis*) in the Swiss Jura Mountains: implications for a conservation strategy. **Biological Conservation**, Liverpool, v. 94, p. 69-77, 2000.

JAMES, T.; VEGE, S.; ALDRICH, P.; HAMRICK, J. L. Mating systems of three tropical dry forest tree species. **Biotropica**, Washington, v. 30, p. 587-594, 1998.

JANZEN, D. H. No park is na island: increase in interference from ouside as park size decreases. **Oikos**, Copenhagem, v. 41, p. 402-410, 1983.

JENNERSTEN, O. Pollination in *Dianthus deltoides* (Caryophyllaceae): effects of habitat fragmentation on visitation and seed set. **Conservation Biology**, Malden, v. 2, p. 359- 366, 1988.

JONES, B.; GLIDDON, C.; GOOD, J. E. G. The conservation of variation in geographically peripheral populations: *Lloydia serotina* (Liliaceae) in Britain. **Biological Conservation**, Liverpool, v. 101, p. 147-156, 2001.

JONES, F. A.; CHEN, J.; WENG, G.-J.; HUBBELL, S. P. A genetic evaluation of seed dispersal in the Neotropical tree, *Jacaranda copaia* (Bignonianaceae). **American Nature**, Washington, v. 166, p. 543-555, 2005.

JUMP, A. S.; PENUELAS, J. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, p. 8096-8100, 2006.

KAGEYAMA, P. Y. Conservação "*in situ*" de recursos genéticos de plantas. **IPEF**, Piracicaba, n. 35, p. 7-37, 1987.

KAGEYAMA, P. Y.; CARON, D.; GANDARA, F. B.; MARTINS, K.; WADT, L. H. O.; LACERDA, C. M. B.; BOUFLEUER, N. T.; RIBAS, L. A.; MORENO, M. A.; FERRAZ, E. M. Genetic and ecological aspects of nonwood forest product exploitation in two western

Amazonian settlements. In: VINCETI, B.; AMARAL, W.; MEILLEUR, B. (Org.). **Challenges in managing forest genetic resource for livelihoods:** examples from Argentina and Brazil. Roma: IPGRI, 2004. p. 149-217.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 1099-1106, 2007.

KARRON, J. D.; THUMSER, N. N.; TUCKER, R.; HESSENAUER, A. J. The influence of population density on outcrossing rates in *Mimulus ringens*. **Heredity**, London, v. 75, p. 175-180, 1995.

KOPPITZ, H. Analisys of genetic diversity among selected populations of /Phragmites australis /world-wide. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 64, p. 209-221, 1999.

KOSTIA, S.; VARVIO, S. L.; VAKKARI, P.; PULKKINEN, P. Microsatellite sequences in a conifer, *Pinus sylvestris*. **Genome**, Ottawa, v. 38, p. 1244–1248, 1995.

KRAEMER, A. T.; ISON, J. L.; ASHLEY, M. V.; HOWE, H. F. The paradox of forest fragmentation genetics. **Conservation Biology**, Oxford, v. 22, p. 878-885, 2008.

KRONKA, F. J. N.; NALON, M. A.; MATSUKUMA, C. K.; KANASHIRO, M. M.; YWAKE, M. S. S.; PAVÃO, M.; DURIGAN; G.; LIMA, L. M. P. R.; GUILLAUMON, J. R.; BAITELLO, J. B.; BORGO, S. C.; MANETTI, L. A.; BARRADAS, A. M. F.; FUKUDA, J. C.; SHIDA, C. N.; MONTEIRO, C. H. B.; PONTINHA, A. A. S.; ANDRADE, G. G.; BARBOSA, O.; SOARES, A. P. **Inventário florestal da vegetação natural do estado de São Paulo**. São Paulo: Imprensa Oficial, 2005. 200 p.

KRUSHE, D.; GEBUREK, T. H. Conservation of forest gene resources as related to sample size. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 40, p. 145-150, 1991.

LACERDA, A. B.; SEBBENN, A. M.; KANASHIRO, M. Long-pollen movement and deviation of random mating in a low-density continuous population of *Hymenaea courbaril* in the Brazilian Amazon. **Biotropica**, Washington, v. 40, p. 462-470, 2008.

LATTA, R. G.; LINHART, Y. B.; FLECK, D.; ELLIOT, M. Direct and indired estimates of seed versus pollen moviment within a population of ponderosa pine. **Evolution**, Lawrence, v. 52, p. 61-67, 1998.

LATOUCHE-HALLÉ, C.; RAMBOER, A.; BANDOU, E.; CARON, H.; KREMER, A. Long-distance pollen flow and tolerance to selfing in a neotropical tree species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 1055-1064, 2004.

LAURANCE, W. F.; BIERREGAARD JUNIOR., R. O.; GASCON, C.; DIDHAM, R. K.; SMITH, A. P.; LYNAM, A. J.; VIANA, V. M.; LOVEJOY, T. E.; SIEVING, K. E.; SITES, J. W.; ANDERSEN, M.; TOCHER, M. D.; KRAEMER, E. A.; RESTREPO, C.; MORITZ, C. Tropical forest fragmentation: synthesis of a diverse and dynamic discipline. In: LAURANCE, W. F.; BIERREGAARD JUNIOR., R. O. (Ed.). **Tropical forest remnants:** ecology, management, and conservation of fragmented communities. Chicago: The University of Chicago Press, 1997. p. 502-514.

LAURENCE, W. F.; LOVEJOY, T. E.; VASCONCELOS, H. L.; BRUNA, E. M.; DIDHAM, R. K.; STOUFFER, P. C.; GASCON, C.; BIERREGAARD, R. O.; LAURANCE, S. G.; SAMPAIO, E. Ecosystem decay of amazonian forest fragments: a 22-year investigation. **Conservation Biology**, Malden, v. 16, p. 605-618, 2002.

LEE, S. L. Mating system parameters of *Dryobalanops aromatica* Gaertn. F. (Dipterocarpaceae) in three different forest types and a seed orchard. **Heredity**, London, v. 85, p. 338-345, 2000.

LEVIN, D. A.; KERTER, H. W. Gene flow in seed plants. **Evolutionary Biology**, New York, v. 7, p. 139-220, 1974.

LEVIN, D. A. Dispersal versus gene flow in plants. **Annals of the Minouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 68, n. 2, p. 233-253, 1981.

LEVIN D. A. The paternity pool plants. **American Nature**, Washington, v. 132, p. 309-317, 1988.

LINHART, Y. B. Variation in woody plants: molecular markers, evolutionary processes and conservation biology. In: JAIN, S. M.; MINOCHA, S. C. (Ed.). **Molecular biology of woody plants forestry sciences**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 341–374.

LOBO, J. A.; QUESADA, M.; STONER, K. E. Effects of pollination by bats on the mating system of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) populations in two tropical life zones in Costa Rica. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 92, p. 370-376, 2005.

LOISELLE, B. A.; SORK, V. L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 82, p. 1420-1425, 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Plantarum, 1992. v. 1. 368 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v. 2. 368 p.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, p. 65-95, 1984.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Distribution de la variation gentica en espécies arbreas tropicales. **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v. 35, n. 1, p. 165-176, 1987.

LOWE, A. J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C. F. E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for Neotropical trees. **Heredity**, London, v. 95, p. 255-273, 2005.

LUIKART, G.; ALLENDORF, F. W.; CORNUET, J. M.; SHERWIN, W. B. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of Heredity**, Cary, v. 89, n. 3, p. 238-247, 1998.

MAMURIS, Z.; SFOUGARIS, A. I.; STAMATIS, C. Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDBNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. **Biological Conservation**, Liverpool, v. 101, p. 187-196, 2001.

MANTOVANI, W.; MARTINS, F. R. Variáveis fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji Guaçu, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 11, n. 1/2, p. 101-112, 1988.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUUK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 639-655, 1998.

MARTINEZ, M. L. L. **Aplicação de marcadores microssatélites na caracterização de recursos genéticos de *Tabebuia roseo-alba* conservados *ex situ* no banco de germoplasma da floresta da USP de Ribeirão Preto**. 2008. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e Conservação "*in situ*". **IPEF**, Piracicaba, n .35, p. 71-78, 1987.

MARTINS, K. **Diversidade genética e fluxo gênico via pólen e semente em populações de *Solanum lycocarpum* ST. HIL. (Solanaceae) no Sudeste de Goiás**. 2005. 128 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MARTINS, K.; SANTOS, J. D.; GAIOTTO, F. A.; MORENO, M. A.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinioideae) em fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 61-69, 2008.

MATOCQ, M. D.; VILLABLANCA, F. X. Low genetic diversity in endangered species: recent or historic pattern? **Biological Conservation**, Liverpool, v. 98, p. 61-68, 2001.

MEDEIROS, A. C. S. **Comportamento fisiológico, conservação de germoplasma a longo prazo e previsão de longevidade de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl.)**. 1996. 127 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.

MENGES, E. S. Seed germination percentage increases with population size in a fragmented prairie species. **Conservation Biology**, Malden, v. 5, p. 158-164, 1991.

MORAES, M. L. T. **Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão - Anacardiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Engler).** 1992. 139 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M. **Resumos Embrapa - CPAO/Flora Sul**. Dourados, MS: Embrapa, 1997. p. 9. (Boletins Informativos).

MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Correlated mating in dioecious tropical tree species, *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 11, p. 53-59, 2004a.

MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Diversidade e estrutura espacial em duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sob diferentes condições antrópicas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 281-289, 2005.

MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R.; VENCOVSKY, R. Estrutura genética intrapopulacional em *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 2, n. 3, p. 475-487, 2004b.

MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em pequenas populações fragmentadas e em árvores isoladas de *Hymenaea stigonocarpa*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 74, p. 75-86, 2007.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, New York, v. 30, p. 194-200, 2002.

MOXON, R.; WILLIS, C. DNA microsatellites: Agents of evolution? **Scientific American,** New York, v. 280, p. 94-99, 1999.

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.

NAITO, Y.; KONUMA, A.; IWATA, H.; SUYAMA, Y.; SEIWA, K.; OKUDO, T.; LEE, S. L.; MUHAMMAD, N.; TSUMURA, Y. Selfing and inbreeding depression in seeds and seedlings of *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae). **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 118, p. 423-430, 2005.

NASON, J. D.; HERRE, E. A.; HAMIRICK, J. L. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. **Nature**, London, v. 391, n. 6668, p. 685-697, 1998.

NASON, J. D.; HAMRICK, J. L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 88, p. 264-276, 1997.

NASON, J. D.; HERRE, E. A.; HAMIRICK, J. L. Paternity analysis of the breeding structure of strangler fig populations: evidence for substantial long-distance wasp dispersal. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 501-512, 1996.

NEWTON, A. C.; ALLNUTT, T. R.; GILLIES, A. C. M.; LOWE, A. J.; ENNOS, R. A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 14, p. 140–145, 1999.

NOGUEIRA, J. C. B.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; MORAES, E.; COELHO, L. C. C.; MARIANO, G.; KAGEYAMA, P. Y.; ZANATTA, A. C.; FIGLIOLIA, M. B. Conservação genética de essências nativas através de ensaios de progênie/ procedências. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v. 16A, p. 957-969, 1982.

NUNES, Y. R. F.; FAGUNDES, M.; ALMEIDA, H. S.; VELOSO, M. D. M. Aspectos ecológicos da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão - Anacardiaceae): fenologia e germinação de sementes. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 233-243, 2008.

NUNNEY, L.; CAMPBELL, K. A. Assessing minimum viable population size: Demography meets population genetics. **Trends in Ecology, & Evolution**, Victoria, v. 8, p. 234-239, 1993.

OLIVEIRA, J. B.; CAMARGO, M. N.; ROSSI, M.; CALDERANO FILHO, B. **Mapa pedológico do Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agronômico; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. Escala 1:500.000.

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, D.; ROSADO, S. C. S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 331-338, 2002.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Piracicaba, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OUBORG, N. J.; PIQUOT, Y.; VAN GROENENDAEL, J. M. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 87, p. 551–568, 1999.

PAULA, R. N. **Ferramentas utilizadas no melhoramento genético do *Eucalyptus***. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/MELHOR/MHR019.htm>. Acesso em: 10 set. 2006.

PETIT, R. J.; AGUINAGALDE, I.; BEAULIEU, J. L.; BITTKAU, C.; BREWER, S.; CHEDDADI, R.; ENNOS, R.; FINESCHI, S.; GRIVE,T. D.; LASCOUX, M.; MOHANTY, A.; MÜLLER-STARCK, G.; DEMESURE-MUSCH, B.; PALME, A.; MARTIN, J. P.; RENDELL, S.; VENDRAMIN, G. G. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic divesity. **Science**, Whashington, v. 300, p. 1563–1565, 2003.

PETIT, R. J.; DUMINIL, J.; FINESCHI, S.; HAMPE, A.; SALVINI, D.; VENDRAMIN, G. G.; Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 689–701, 2005.

PINTO, S. I.; SOUZA, A. M. ; CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorfii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia forestalis**, Piracicaba, n. 65, p. 40-48, 2004.

PITHER, R.; SHORE, J. S.; KELLMAN, M. Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazônia* (Combretaceae) in naturally fragmented populations. **Heredity**, London, v. 91, p. 307-313, 2003.

PULLIAM, H. R. Sources, sinks and population regulation. **The American Naturalistic**, Chicago, v. 132, p. 652-661, 1988.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: E. Rodrigues, 2001. 328 p.

PRIMMER, C. R.; MERILÄ, J. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. **Conservation Genetics**, v. 3, p. 445-449, 2002.

RAHMAN, M. H.; RAJORA, O. P. Microsatellite DNA fingerprinting, differentiation, and genetic relationships of clones, cultivars, and varieties of six poplar species from three sections of the genus Populus. **Genome**, Ottawa, v. 45, p. 1083–1094, 2002.

RAJORA, O. P.; PLUHAR, S. A. Genetic diversity impacts of forest fire, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, p. 1203-1212, 2003.

RAPOSO, A. **Estrutura genética e fluxo gênico de populações naturais de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) visando o manejo e a conservação da espécie**. 2007. 150 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

REIS, M. S. Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais em plantas. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 4, p. 37-47, 1996.

REIS, A. M. M. **Distribuição da variabilidade genética em aroeira (*Myracrodruon urundeuva* – Anacardiaceae) por marcadores RAPD e polimorfismo de seqüência de dpDNA.** 1999. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

REIS, A. M. M.; GRATTAPAGLIA, D. RAPD variation in a germplasm collection of tree: Recommendations for conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 51, p. 529-538, 2004.

RIBAS, L. A. **Variabilidade isoenzimática e sistema de cruzamento de *Parapiptadenia rigida* em um pomar de sementes**. 1999. 90 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

RIBAS, L. A. **Diversidade genética e sistema de cruzamento em populações naturais de duas espécies pioneiras arbóreas**. 2003. 102 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

RIBEIRO, J. H. Aroeira: durável além de uma vida. **Globo Rural**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 85-90, 1989.

RIES, L.; FLETCHER, R. J.; BATTIN, J.; SISK, T. D. Ecological responses to habitat edges: mechanisms, models, and variability explained. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 35, p. 491-522, 2004.

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, Lawrence, v. 43, n. 4, p. 848-859, 1989.

RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR**. Version 3.1. University of British Columbia, Canada. 2004. Free program distributed by the authors from. Disponível em: <http//kritland@.interchange.ubc.ca>. Acesso em: 12 dez. 2008.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, London, v. 47, n. 1, p. 35-52, 1981.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. Manual de dendrologia brasileira. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 296 p.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil:** manual de dendrologia brasileira. 2. ed. São Paulo: Edgard Blcher, 1995. 296 p.

ROA, A. C.; CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; DUQUE, M. C.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; IGLESIAS, C.; TOHME, J. Cross species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 87, p. 1647-1655, 2000.

ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; SMOUSE, P. E.; GIL, L.; ALÍA, R. Pollen movement under alternative silvicultural practices in native population of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in central Spain. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 197, p. 245-255, 2004.

ROUTLEY, M. B.; MAVRAGANIS, K.; ECKERT, C. G. Effect of population size on the mating system in a self-compatible, autogamous plant, *Aquilegia Canadensis* (Ranunculaceae). **Heredity**, London, v. 82, p. 518-528, 1999.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSH, E. F. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2. ed. New York: Cold Sprig Harbor Laboratory, 1989.

SANTIN, D. A. **Revisão taxonômica do gênero *Astronium* Jacq. e reavaliação do gênero *Myracrodruon* Fr. Allem. (Anacardiaceae).** 1989. 178 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

SANTIN, D. A.; LEITÃO FILHO, H. F. Restabelecimento e revisa taxonômica do gênero *Myracrodruon* Freire Alemão (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 14, p. 133-145, 1991.

SANTOS, E. **Nossas madeiras**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1987. 316 p.

SANTOS, J. D**. Estudo ecológico e genético numa paisagem fragmentada visando sua conectividade, no Pontal do Paranapanema-SP.** 2002. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SAUNDERS JUNIOR, D. A.; HOBBS, R. J.; MARGULES, C. R. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. **Conservation Biology**, Malden, v. 5, p. 18-32, 1991.

SCHLOTTERER, C.; HARR, B. *Drosophila virilis* has long and highly polymorphic microsatellites. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 17, p. 1641-1646, 2000.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; ZANATTO, A. C. E. Taxa de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze. : implicações para a conservação e melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 58, p. 25-40, 2000.

SEBBENN, A. M. **Estrutura genética de populações de jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze.) por caracteres quantitativos e isoenzimáticos**. 2001. 210 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

SEBBENN, A. M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 115-132, 2002.

SEBBENN, A. M. Tamanho amostral para conservação *ex situ* de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 15, p. 109-124, 2003.

SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. **Pomares de sementes de espécies nativas**. Curitiba: FUPEF, 2006. p. 193-138.

SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low level of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, London, 2009. No prelo.

SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Efeitos da fragmentação florestal em populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 57, p. 123-139, 2000.

SEOANE, C. E. C; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema reprodutivo em populações de *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 13, p. 19-26, 2001.

SHAFFER, M. L. Minimum population sizes for species conservation. **Bioscience**, Washington, v. 31, p. 131-134, 1981.

SHARMA, I. K.; CLEMENTS, M. A.; JONES, D. L. Observations of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa* R. Br. (Orchidaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 28, p. 651-663, 2000.

SHARMA, I. K. Understanding clonal diversity patterns through allozyme polymorphism in an endangered and geographically restricted Australian shrub, *Zieria baeuerlenii*, and its implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 29, p. 681-695, 2001.

SIA, E. A.; BUTLER, C. A.; DOMINSKA, M.; GREENWELL, P.; FOX, T. D.; PETES, T. D. Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, Washington, v. 97, p. 250-255, 2000.

SILVA, M. B. **Aspectos ecológicos e genéticos de *Bagassa guianensis* Aunl. (Moraceae):** um enfoque para o manejo florestal sustentado da espécie. 2005. 120 f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2005.

SILVA, M. S. **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de *Geonoma Schottiana* Mart. no Parque Florestal Quedas o Rio Bonito**. 2006. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

SILVA, M. B.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A. Y.; TOMPSON, I.; SEBBENN, A. M. Genetic effects of selective logging and pollen gene flow in a low-density population of the dioecious tropical tree *Bagassa guianensis* in the Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, p. 1548-1558, 2008.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 16, p. 393-430, 1985.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **American Association for the Advancement of Science**, Philadelphia, v. 236, n. 4803, p. 787-792, 1987.

SMITH, D. N.; DEVEY, M. E. Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. **Genome**, Ottawa, v. 37, p. 977–983, 1994.

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

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

SORK, V. L.; SMOUSE, P. E.; APSIT, V. J.; DYER, R. J.; WESTFALL, R. D. A TWO-GENERATION analysis structure in flowering dogwood, *Cornus florida* (Cornaceae), in the Missouri Ozarks. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 92, p. 262-271, 2005.

SORK, V. L.; SMOUSE, P. E. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. **Landscape Ecology**, Dordrecht, v. 21, p. 821–836, 2006.

SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H. Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 51, p. 309–317, 2003.

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

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* A. St. Hil. (Bombaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 113-121, 2003.

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. (Bombacaceae). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 65, p. 70-79, 2004.

STRANGHETTI, V. **Levantamento florístico das espécies vasculares de uma floresta estacional no norte do Estado de São Paulo, Estação Ecológica de Paulo de Faria.** 1996. 163 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

STRANGHETTI, V.; RANGA, N. T. Levantamento florístico das espécies vasculares da floresta estacional mesófila semidecídua da Estação Ecológica de Paulo de Faria–SP. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, p. 295-304, 1998.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C.; GASCON, C. Forest fragmentation, synergisms and the impoverishment of neotropical forests. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 13, n. 7, p. 1419-1425, 2004.

TANSLEY, S. A.; BROWN, C. R. RAPD variation in the rare and endangered *Leucadendron elimense* (Proteaceae): implications for their conservation. **Biological Conservation**, Liverpool, v. 95, p. 39-48, 2000.

TEMPLETON, A. R.; SHAW, K.; ROUTMAN, E.; DAVIS, S. K. The genetic consequences of habitat fragmentation. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 77, n. 1, p. 13-27, 1990.

VALOIS, A. C.; NASS, L. L.; GOES, M. Conservação "*ex situ*" de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C.; MELP, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos Genéticos e Melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 29-55.

VAN DER SCHOOT, J.; POSPISKOVA, M.; VOSMAN, B.; SMULDERS, M. J. M. Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, p. 317–322, 2000.

VARVIO, S. L.; CHAKRABORTY, R.; NEI, M. Genetic variation in subdivided populations and conservation genetics. **Heredity**, London, v. 57, p. 189-198, 1986.

VIANA, V. M. Biologia de manejo de fragmentos de florestas naturais. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. **Anais...** Campos do Jordão: Sociedade Brasileira de Silvicultura/Sociedade Brasileira de Engenheiros Florestais, 1990. p. 155.

VIANA, V. M.; TABANEZ, A. A. J.; MARTINEZ, J. L. A. Restauração e manejo de fragmentos florestais. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., 1992, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal de São Paulo, 1992. p. 400-407.

VILAR, M. L. L. do; DIÓGENES, M. J. N.; VILAR, J. L.; BEZERRA, J. G. F.; DANTAS, J. D. P.; SOUZA, J. A. L. de; MORAIS, S. M. de. Contact dermatitis associated with *Astronium urundeuva* (allemão) Engl., a traditional medicinal plant from Brazil. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 51, p. 311–322, 2004.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new techique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Resources**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WARD, M.; DICK, C. W.; GRIBEL, R.; LOWE, A. J. To self, or not to self: a review of outcrosssing and pollen-mediated gene flow in Neotropical trees. **Heredity**, London, v. 95, p. 246-254, 2005.

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

WHITE, G.; POWELL, W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): An endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, p. 851-860, 1997.

WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 11, p. 1899-1909, 1999.

WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H.; POWELL, W. Increased pollen flow counteracts fragmentation in tropical dry Forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, Stanford, v. 99, n. 4, p. 2038-2042, 2002.

WHITMORE, T. C. Tropical forest disturbance, disappearance, and species loss. In: LAURANCE, W. F., BIERREGAARD JUNIOR., R. O. (Ed.). **Tropical forest remnants:** ecology, management, and conservation of fragmented communities. Chicago: The Chicago University Press, 1997. p. 3-12.

WILDER, J.; HOLLOCHER, H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 18, p. 384-392, 2001.

WILLIAMS, C. G.; AUCKLAND, L. **Conifer microsatellite handbook College Station.** Texas: Texas A & M University, 2002.

WILMER, P.; GILBERT, F.; GHAZOUL, J.; ZALAT, S.; SEMIDA, F. A novel form to territoriality – daily paternal investment in an anthophorid bee. **Animal Behaviour**, London, v. 48, p. 535-549, 1994.

WILSOM, E. O. (Ed.). **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001. 660 p.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends Ecology Evolutionary**, Oxford, v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.

YOUNG, A. G.; BOYLE, T. J. Effects of logging and other forms of harvesting on genetic diversity in humid tropical forest. In: YOUNG, A. G.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. J. **Forest conservation genetics**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000a. p. 115-123.

YOUNG, A. G.; BOYLE, T. J. Forest fragmentation. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. **Forest conservation genetics**. Canbera: CSIRO Publishing, 2000b. p. 123-134.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. V.; PINHEIRO, J. B.; BRONDANI, C.; VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology**, London, v. 2, p. 512-514, 2002.

# Livros Grátis

( http://www.livrosgratis.com.br )

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo