

Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii*¹

ANA CRISTINA MAGALHÃES DE CARVALHO², MIGUEL LUIZ MENEZES FREITAS³, SELMA MARIA BOZITE DE MORAES², MÁRIO LUIZ TEIXEIRA DE MORAES², VALÉRIA STRANGHETTI⁴, ANA LILIA ALZATE-MARIN⁵ e ALEXANDRE MAGNO SEBBENN^{5,6}

(recebido: 08 de abril de 2009; aceito: 07 de outubro de 2010)

ABSTRACT – (Genetic diversity, inbreeding and gene flow in a small fragmented population of *Copaifera langsdorffii*). The aim of this work was to study the seed and pollen immigration rate and dispersal distance in a *Copaifera langsdorffii* Desf. small population fragment, based on the polymorphism at eight microsatellite loci. All 47 adult trees and 65 subadults found in the fragment were mapped and genotyped. Adults had a lower total number of alleles per locus (142) than subadults (164). A total of 20 alleles were exclusive to adults and 41 to subadults. Adults had significantly lower genetic diversity and higher inbreeding ($\hat{A} = 17.75 \pm 0.51$; $\hat{A}_e = 8.97 \pm 0.27$; $\hat{F} = 0.191 \pm 0.017$) than subadults ($\hat{A} = 20.5 \pm 0.65$; $\hat{A}_e = 10.86 \pm 0.29$; $\hat{F} = 0.119 \pm 0.013$). The probability of exclusion of the first parent overall loci was high ($P_{1^\circ \text{ Parente}} = 0.9994$), showing that the eight microsatellite loci have high power to resolve paternity tests. From the 65 subadults, the maternal parent could be identified for 12 and both maternal and paternal parents for only two individuals, indicating a pollen and seed immigration of 81% (m_{sementes}) and 97% ($m_{\text{pólen}}$), respectively. These results evidenced a high rate of gene flow in the past. The mean distance of seed dispersal was 38.4 m, and nearly 58% of seeds were dispersed up to 30 m. The results evidence that the population present high levels of genetic diversity, due to high seed and pollen immigration that occurred in the past.

Key words - effective population size, paternity analysis, tropical tree species

RESUMO – (Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii*). O objetivo deste trabalho foi investigar a taxa de imigração e a distância de dispersão de pólen e sementes em uma pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii* Desf., com base no polimorfismo de oito locos microssatélites. Foram mapeadas e genotipadas todas as 47 árvores adultas e 65 subadultas existentes no fragmento. Adultos tinham um total número menor de alelos (142) do que subadultos (164), sendo 20 alelos exclusivos aos adultos e 41 aos subadultos. Adultos tinham significativamente menor diversidade genética e maior endogamia ($\hat{A} = 17,75 \pm 0,51$; $\hat{A}_e = 8,97 \pm 0,27$; $\hat{F} = 0,191 \pm 0,017$) do que subadultos ($\hat{A} = 20,5 \pm 0,65$; $\hat{A}_e = 10,86 \pm 0,29$; $\hat{F} = 0,119 \pm 0,013$). O poder de exclusão do primeiro parente foi alto para o conjunto de locos nos adultos ($P_{1^\circ \text{ Parente}} = 0,9994$), mostrando que estes oito locos microssatélites têm alto poder de resolver testes de parentescos. Dos 65 subadultos, foi encontrado o parental materno para 12 e o materno e paterno para apenas dois indivíduos, o que indica uma taxa de imigração de sementes e pólen na população de 81% (m_{sementes}) e 97% ($m_{\text{pólen}}$), respectivamente. Estes resultados sugerem uma alta taxa de fluxo gênico no passado. A distância média de dispersão de sementes foi de 38,4 m. Os resultados evidenciam que a população apresenta altos níveis de diversidade genética, devido a uma intensa taxa de imigração de sementes e pólen.

Palavras chave - análise de parentesco, espécies arbóreas tropicais, tamanho efetivo

Introdução

As árvores, por seu grande porte e longevidade são os organismos chaves dos ecossistemas florestais

(Rajora *et al.* 2000). O isolamento de populações de espécies arbóreas em pequenos fragmentos reduz o número de indivíduos reprodutivos, a densidade populacional, e pode afetar processos genéticos como deriva genética, fluxo de genes, seleção e sistema de reprodução (Young & Boyle 2000), além de poder isolar reprodutivamente populações e aumentar a estrutura genética espacial dentro das populações. Imediatamente após a fragmentação, com a redução do tamanho das populações, tem-se um efeito de gargalo na diversidade genética das espécies, causado pela redução no número de indivíduos nas populações. Esta redução pode causar a perda de alelos e redução na heterozigosidade (Young *et al.* 1996). O estudo genético por marcadores moleculares das gerações pós-fragmentação como sementes e

1. Parte da dissertação de mestrado da primeira autora, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira/UNESP, Ilha Solteira, São Paulo, Brasil.
2. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira/UNESP, Caixa Postal 31, 15385-000 Ilha Solteira, SP, Brasil.
3. Instituto Florestal de São Paulo, Caixa Postal 1322, 01059-970 São Paulo, SP, Brasil.
4. Centro Universitário de Rio Preto/UNIRP, R. Ivete Gabriel Atique, 45, 15025-400 São José do Rio Preto, SP, Brasil.
5. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil.
6. Autor correspondente: alexandresebbenn@yahoo.com.br

regeneração natural podem ajudar a evidenciar estes processos. Por exemplo, White *et al.* (2002), usando locos microssatélites observaram em sementes coletadas de polinização aberta em fragmentos de *Swietenia humilis* um aumento de fluxo de pólen entre os fragmentos, indicando que a fragmentação não isolou as populações. Em contraste, Jump & Penuelas (2006) observaram na regeneração de fragmentos de *Fraxinus excelsa* um aumento nos níveis de endogamia em comparação a geração adulta, em populações de florestas contínuas, demonstrando claramente os efeitos da fragmentação afetando as gerações subseqüentes pelo processo de deriva genética.

O fluxo gênico via pólen e sementes é um dos fatores mais importantes influenciando a estrutura genética de espécies arbóreas (Smouse & Sork 2004, Robledo-Arnuncio & Gil 2005, Sork & Smouse 2006). A determinação da influência do movimento do pólen sobre o tamanho efetivo da população reprodutiva, ou tamanho da vizinhança requer detalhada análise do sistema de reprodução das populações. Estudos têm sido eficientemente conduzidos com base em marcadores genéticos altamente polimórficos, como microssatélites. Alguns desses estudos têm mostrado que o pólen pode mover-se a distâncias consideráveis entre plantas dentro de populações e que o fluxo de genes dentro de populações é muitas vezes alto (White *et al.* 2002, Hardesty *et al.* 2006, Carneiro *et al.* 2007, Bittencourt & Sebbenn 2007, Isagi *et al.* 2007, Bacles & Ennos 2008, Lacerda *et al.* 2008, Silva *et al.* 2008), embora outros tenham mostrado justamente o oposto (Sork & Smouse 2006, Naito *et al.* 2008, Pakkad *et al.* 2008).

O gênero *Copaifera* é composto por 72 espécies, das quais 16 são endêmicas do Brasil, ocorrentes principalmente na Amazônia e no Cerrado (Alencar 1982, Veiga Júnior & Pinto 2002). As copaibas são nativas da região tropical da América Latina. São encontradas na região que se estende do México ao norte da Argentina e também na África Ocidental (Carvalho 2003). *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae), conhecida popularmente por copaíba, pau-d'óleo, podói, cupaúba e cupiúva é uma árvore tropical, hermafrodita, polinizada por insetos (abelhas *Apis mellifera*, *Trigona* sp e outros insetos), que apresenta um sistema misto de reprodução, mas com predomínio de polinização cruzada (Carvalho 2003, Oliveira *et al.* 2002). São árvores de crescimento lento que alcançam 40 metros de altura, até 100 cm de diâmetro a altura do peito e podem viver até 400 anos (Carvalho 2003). A madeira é própria para fabricação de peças torneadas e de marcenaria em geral (Carvalho 2003). A árvore também

é utilizada na fabricação de carvão e pelas indústrias de construção civil e naval (Carvalho 2003).

Atualmente, a ocorrência de *Copaifera langsdorffii* no Estado de São Paulo restringe-se a pequenos fragmentos isolados por culturas agrícolas e pecuária intensiva. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o fluxo gênico por pólen e sementes em uma pequena população de *Copaifera langsdorffii* localizada no Bosque Municipal de São José do Rio Preto, utilizando locos microssatélites e análise de parentesco. O estudo foi conduzido com base em um censo da população, amostrando-se árvores adultas e subadultas. Aqui, as seguintes questões foram acessadas: i) existem clones na população? ii) existem diferenças nos níveis de diversidade genética entre árvores adultas e subadultas? iii) qual foi a taxa de imigração de sementes e pólen nos subadultos? iv) quais os padrões e a distância de dispersão de sementes e pólen dentro do fragmento?

Material e métodos

O estudo foi conduzido no Bosque Municipal de São José do Rio Preto (20°46'44.14" S, 49°21'17.70" W), o qual é um pequeno remanescente de 4,8 ha de floresta estacional semi-decídua, localizado nas imediações periféricas do município. O clima da região é tropical, com inverno seco e verão úmido. A altitude é de 489 m e a precipitação média anual varia de 16 a 241 mm. A temperatura média anual é de 25,3 °C, com média mínima de 18,9 °C e a máxima é de 27,8 °C. A fragmentação da região ocorreu entre 60 e 80 anos atrás e atualmente a população encontra-se geograficamente isolada. Observando-se o entorno do bosque verifica o intenso estado de devastação das florestas naturais para o cultivo de cana de açúcar. O fragmento é fisicamente isolado pela cidade no seu lado leste e sul e por plantios de cana de açúcar no lado norte e oeste. Praticamente não existem mais florestas na região. Um simples exemplar isolado da espécie foi encontrado na beira de uma rodovia a 1,2 km do bosque. A população do bosque foi também explorada pelo corte seletivo de árvores. As árvores de *Copaifera langsdorffii* se encontram distribuídas por toda a área do parque. No bosque podem ser observados desde indivíduos regenerantes até indivíduos com grandes dimensões, atingindo próximo a 1 m de diâmetro a altura do peito (DAP).

Para estes estudos foram amostradas, mapeadas (georeferenciadas com um GPS) e medidas para o diâmetro a altura do peito (DAP) todas as árvores existentes no fragmento. Foram encontradas 112 árvores, com DAP variando de 15 a 93 cm. Tecidos foliares e cambio do tronco das maiores árvores foram amostradas para as análises genéticas.

A extração de DNA foi efetuada com base na metodologia de Doyle & Doyle (1990) modificada por Ciampi *et al.* (2000), para *Copaifera langsdorffii*. Procedeu-se amplificação dos oito locos microssatélites através de reações da polimerase em

cadeia (PCR) utilizando condições semelhantes às descritas por Ciampi *et al.* (2000). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador marca Eppendorf (AG). Os locos amplificados foram separados sob condições desnaturantes em gel desnaturante de poli(acrilamida 5%, corado com nitrato de prata (20%). Segundo protocolo de Sanguinetti *et al.* (1994). A visualização dos produtos de amplificação foi feita com nitrato de prata (20%) segundo protocolo de Sanguinetti *et al.* (1994). Fragmentos de diferentes mobilidades foram considerados alelos diferentes.

A diversidade genética para amostra dos adultos e subadultos da população foi caracterizada para o número total de alelos nos locos e sobre todos os locos (k), número médio de alelos por locos (A), número efetivo de alelos nos locos e média por locos (A_e), heterozigosidade observada (H_o) e esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e). O erro padrão da média, calculado por reamostragem jackknife entre locos para estes parâmetros foi utilizado para verificar diferenças entre as médias de adultos e subadultos. Os níveis de endogamia dentro das amostras foram quantificados pelo índice de fixação (F) de acordo com o método de Weir & Cockerham (1984). A significância estatística dos valores de F foi testada por permutação (10000). Aplicou-se também neste caso uma correção seqüencial de Bonferroni para múltiplas comparações para evitar falsos positivos. Todas estas análises foram rodadas utilizando o programa Fstat 2.9.3.2. (Goudet 1995). A presença de clones foi avaliada utilizando uma análise de identidade e o programa CERVUS 3.0 (Marshall *et al.* 1998, Kalinowski *et al.* 2007).

As estimativas do fluxo gênico histórico a partir do pólen e de sementes (subadultos) foram realizadas utilizando análise de parentesco e o programa CERVUS 3.0. As análises de maternidade e parentesco foram conduzidas a partir dos genótipos de 65 subadultos (DAP < 40 cm) e dos 47 genótipos dos adultos (DAP ≥ 40 cm). O fluxo gênico crítico ou a probabilidade de encontrar um candidato compatível como pai ou mãe de um indivíduo dentro da população quando o verdadeiro pai ou mãe encontra-se fora da população, foi calculado segundo método de Dow & Ashley (1998). Como todas as árvores da população tinham o seu genótipo determinado e sua posição espacial conhecida, as plantas que tiveram o pai determinado dentro das populações foram utilizadas para determinar as distâncias mínima, máxima, média e mediana de dispersão de pólen e sementes na população. Quando um subadulto tinha apenas um candidato determinado dentro da população, este foi considerado como o candidato materno e a distância entre a posição do candidato à mãe e o subadulto foi usado para inferir a distância de dispersão de sementes. Quando um genótipo subadulto tinha dois candidatos determinados dentro da população, o candidato localizado mais próximo ao subadulto foi considerado como o parental materno e o mais distante como o parental paterno. Estas suposições foram baseadas no fato de que a dispersão primária das sementes ocorre por gravidade e o pólen é disperso primariamente por abelhas.

Assim, subadultos devem provavelmente estar mais próximo da árvore mãe do que da árvore paterna e as estimativas obtidas vão representarem uma mínima distância de dispersão de sementes. Este método é o que tem sido o mais utilizado na literatura corrente quando não é possível distinguir com precisão o parental materno do paterno, como no caso de espécies bissexuais (Dow & Ashley 1998, Schueler *et al.* 2006, Nakanishi *et al.* 2008). Neste caso, foram extraídas as informações referentes à distância de dispersão de sementes e distância de dispersão de pólen, a qual correspondeu à distância entre o candidato a pai e o candidato à mãe. 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 da população, ($\hat{m} = n_{imigrante} / n_{total}$) (Burczyk *et al.* 1996, Burczyk *et al.* 2004, Smouse & Sork 2004). Também foi estimado o coeficiente de coancestria (Loiselle *et al.* 1995) entre os subadultos e os putativos parentes maternos e paternos determinados por análise de parentesco, utilizando-se o programa Spagedi (Hardy & Vekemans 2002). O valor esperado para o coeficiente de coancestria entre um pai e um filho é de 0,25.

Resultados e discussão

Existem indícios de que *Copaifera langsdorffii* possa se regenerar vegetativamente a partir das raízes. Contudo, a inspeção dos genótipos microssatélites não indicou a presença de clones na população, visto que nenhum dos genótipos era idêntico.

A população de *Copaifera langsdorffii* apresentou um alto nível de diversidade genética para os locos analisados. Os adultos tinham um menor número total de alelos (142) do que o observado nos subadultos (164), sendo 20 alelos exclusivos nos adultos e 41 nos subadultos (tabela 1). Esse grande número de alelos exclusivos nos adultos sugere a ocorrência de deriva genética entre o processo de reprodução e regeneração e que nem todos os indivíduos aptos a deixarem descendentes estão se reproduzindo. Já o maior número de alelos exclusivos nos subadultos, sugere fluxo gênico ou que os parentais não se encontram mais na população.

O número efetivo de alelos por loco (A_e) foi menor do que o número médio de alelos por locos (k) em ambos adultos e subadultos (tabela 1), indicando que muitos alelos são raros (frequência ≤ 0,05). Todos os índices de diversidade genética, juntamente com o índice de fixação foram significativamente diferentes entre adultos e subadultos, de acordo com o erro padrão da média a 95% de probabilidade (tabela 1). A estimativa do número médio de alelos por locos (k), o número efetivo de alelos por loco (A_e), a heterozigosidade observada (H_o)

Tabela 1. Diversidade genética e endogamia em locos microssatélites de árvores adultas e subadultas de *Copaifera langsdorffii*. k é o número total de alelos em cada loco e para todos os locos; 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; $P_{1^\circ \text{ Parente}}$ é o probabilidades de excluir o primeiro parente (quando nenhum dos parentes é conhecido).

Table 1. Genetic diversity and inbreeding in microsatellite loci of *Copaifera langsdorffii* adult and subadult trees. k is the total number of alleles in each locus and for all loci; A_e is the effective number of alleles per locus; H_e is the expected heterozigosity in Hardy-Weinberg equilibrium; H_o is the observed heterozigosity; F is the fixation index; $P_{1^\circ \text{ Parente}}$ is the power to exclude the first parent (when no one of the relatives is known).

Loco	k	A_e	H_o	H_e	F	$P_{1^\circ \text{ Parente}}$
Adultos (N = 47)						
CL01	20	9,52	0,933	0,895	-0,042	0,369
CL02	23	9,43	0,702	0,894	0,215*	0,364
CL06	10	5,03	0,383	0,801	0,522**	0,559
CL20	11	7,58	0,800	0,868	0,078	0,445
CL27	18	9,26	0,761	0,892	0,147*	0,369
CL32	24	14,49	0,810	0,931	0,130*	0,271
CL34	20	6,99	0,702	0,857	0,181**	0,449
CL37	16	9,43	0,596	0,894	0,333**	0,374
Média	17,75 [£]	8,97	0,711	0,879	0,191**	—
EP _(95%)	± 0,51	± 0,27	± 0,026	± 0,004	± 0,017	—
Total	142	—	—	—	—	0,9994
Subdultos (N = 65)						
CL01	28	12,66	0,892	0,921	0,031	—
CL02	26	12,66	0,738	0,921	0,199**	—
CL06	12	6,33	0,547	0,842	0,350**	—
CL20	13	6,58	0,833	0,848	0,018	—
CL27	17	11,63	0,754	0,914	0,175*	—
CL32	29	14,29	0,897	0,930	0,035	—
CL34	20	10,99	0,933	0,909	-0,026	—
CL37	19	11,76	0,746	0,915	0,185*	—
Média	20,5 [£]	10,86	0,792	0,900	0,119*	—
EP _(95%)	± 0,65	± 0,29	± 0,012	± 0,003	± 0,013	—
Total	164	—	—	—	—	—

EP_(95%) = calculado por reamostragem jackknife entre locos / calculated by jackknife resampling among loci. * $P < 0,05$. ** $P < 0,01$. £ = Número médio de alelos nos locos (A) / Average number of alleles per locus (A).

e a heterozigosidade esperada (H_e) foram maiores nos subadultos do que nos adultos, enquanto que a estimativa do índice de fixação (F) foi menor nos subadultos que nos adultos. Isso mostra que os subadultos têm maior diversidade genética e menor endogamia do que os adultos. Este resultado foi inesperado, visto que a hipótese inicial era de que existia algum tipo de seleção contra homozigotos entre a fase juvenil e adulta e, portanto, existiam menores níveis de diversidade genética e maior endogamia nos subadultos do que nos adultos. Uma explicação para este resultado é de que os subadultos representam a recombinação entre muitos genótipos de uma população muito maior do que a constituída pelos atuais adultos e que foi dizimada durante o processo de fragmentação e corte seletivo de árvores.

O índice de fixação foi positivo e significativamente diferente de zero em seis locos nos adultos, quatro locos nos subadultos e para média dos locos em ambos adultos e subadultos (tabela 1), sugerindo desvios das proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido a excesso de homozigotos, provavelmente endogamia. *Copaifera langsdorffii* é espécie predominantemente de cruzamento, embora uma certa taxa de autofecundação (8%) e de cruzamentos entre parentes (4%) tem sido detectados em populações naturais (Oliveira *et al.* 2002). Ambas autofecundação e cruzamento entre parentes geram endogamia, embora o cruzamento entre parentes gere uma taxa muito menor do que a autofecundação. A autofecundação pode gerar no mínimo 50% de endogamia a cada geração [$F_{o(s)} = 0,5s(1 + F_p)$],

em que, $F_{o(s)}$ e F_p são a endogamia nas progênes e na população parental e s é taxa de autofecundação], enquanto que o cruzamento entre parentes gera sob cruzamentos aleatórios uma endogamia a uma taxa de igual ao coeficiente de coancestria na geração parental (Sebbenn 2006). Assim, a endogamia observada nos adultos poderia ter sido originada do cruzamento entre irmãos-completos ($\theta_{xy} = 0,25$) e nos subadultos do cruzamento entre meios-irmãos ($\theta_{xy} = 0,125$).

Outra explicação para os altos níveis de endogamia observados em ambos adultos e subadultos pode ser a presença de alelos nulos segregando nos locos microsátélites. Alelos nulos aumentam o número de indivíduos supostamente homocigotos, visto que apenas um dos alelos amplifica em caso de plantas heterocigotas para o alelo nulo. Existem fortes indícios da segregação de alelos nulos nesses locos. No entanto, para detectar a presença de tais alelos é necessário estruturas de progênes de árvores matrizes de genótipo conhecido, o que não foi possível obter até o momento. Outra explicação alternativa para estes altos níveis de endogamia é a presença do efeito Wahlund, devido à presença de estrutura genética espacial.

A probabilidade de fluxo gênico crítico (pólen externo a população que tem o genótipo multilocus que também poderia ter sido gerado por uma árvore local da população) foi baixo para o primeiro parente [$0,028 = (1-0,9994^{47})$]. Assim, o número de subadultos que poderiam ter um adulto não parente dentro da área, mas com genótipo compatível, quando o verdadeiro parente estava fora da área foi calculado em 1,8 ($65 \times 0,028$). Este resultado indica que o fluxo gênico crítico não afeta substancialmente a estimativa de dispersão de pólen e sementes por análise de parentesco. Ainda, inspecionando os genótipos dos adultos, verificou-se que não existem dois genótipos iguais na população, ou seja, todos os 47 adultos tinham um genótipo único, o que favorece o estudo de fluxo gênico por análise de parentesco e maternidade, visto que mostra que em geral poucos candidatos parentes poderão ser confundidos nas análises e, portanto, espera-se que apenas o verdadeiro parente seja determinado dos candidatos.

Dos 65 subadultos amostrados foi encontrado o parental materno para 12 e o materno e paterno para apenas dois, o que sugere uma taxa de imigração de sementes e pólen na população de 81% ($m_{sementes}$) de 97% ($m_{pólen}$), respectivamente (tabela 2). Essas sementes que não tiverem nenhum dos parentes determinados dentro da população, provavelmente representam pólen e sementes de árvores que viviam ou vivem fora da população, ou de árvores que viviam na presente população e foram

cortadas, considerando que este Parque sofreu corte seletivo de árvores.

A alta taxa histórica observada de imigração de sementes e pólen era esperada, visto que a referida população no passado, quando estes subadultos se estabeleceram, encontrava-se inserida dentro de uma floresta contínua. Contudo, como a população foi também explorada pelo corte seletivo de árvores é possível que alguns parentes que ocorriam na população tenham sido cortados. A dispersão de sementes em *Copaifera langsdorffii* é feita por gravidade, ao redor das árvores matrizes e por animais, principalmente aves, como o tucanuçu (*Ramphastos toco*), a gralha-do-campo (*Cyanocorax cristatellus*) e o sabiá-larangeira (*Turdus rufiventris*). Estas aves engolem o arilo e regurgitam as sementes. Entretanto, é bem possível que estas aves façam isso, ainda nas copas das árvores ou abaixo das árvores, de onde coletam as sementes, de forma a dispersar as sementes não tão distantes da matriz. O macaco muriqui (*Brachyteles arachnoides*) e o macaco-prego (*Cebus apella nigrinus*) também atuam provavelmente como dispersores (Mendonça Filho 1996), mas devido à fragmentação intensa da região, é possível que estes não ocorram mais na região. Assim, a alta taxa histórica de imigração de semente e pólen pode ser explicada pela fragmentação e pelo corte seletivo de árvores, ou seja, os parentais paternos e maternos de muitos dos subadultos, provavelmente, no passado ocorriam no entorno do fragmento ou dentro desse, mas foram cortados.

Para os subadultos que tiveram pelo menos um putativo parente determinado dentro da população, a distância de dispersão de sementes variou de 0,8 a 110 m, com média de 38,4 m (tabela 2). Aproximadamente 58% das sementes foram dispersas até 30 m (figura 1), embora uma alta taxa também (33%) tenha sido dispersas na distância de 70 m da putativa árvore materna.

O coeficiente de coancestria esperado entre pais e filhos é de 0,25, o que significa que em média, existem 25% de genes idênticos por descendência entre estes indivíduos. A estimativa do coeficiente de coancestria entre subadultos e as putativas mães determinadas por análise de parentesco variaram de 0,219 a 0,538, com média de 0,349 (tabela 2), reforçando a hipótese destes indivíduos serem realmente parentes. Já o coeficiente de parentesco entre os dois subadultos e os putativos pais determinados foi de 0,257 e 0,213, com média de 0,235 (tabela 2), também confirmando este parentesco. Em todos os casos o intervalo de confiança a 95% do erro das estimativas, indica que estas são significativamente diferentes de zero. Essas diferenças dos valores estimados

Tabela 2. Dispersão realizada de sementes e pólen em uma população de *Copaifera langsdorffii*.Table 2. Accomplished seeds and pollen dispersal in a *Copaifera langsdorffii* population.

Subadultos	n	Fluxo gênico		Distância (m)		Coancestria (θ_{xy})	
		Dentro	Imigração	Média	Mín-Max	Media	Mín-Max
Sementes	65	12 (18,5%)	53 (81,5%)	38,4	0,8-110	0,349	0,219-538
Pólen	65	2 (3,1%)	63 (96,9%)	118	93-143	0,235	0,213-257

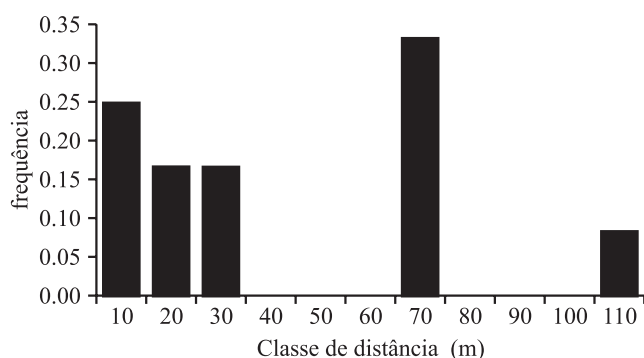


Figura 1. Distância de dispersão de sementes determinada por análise de parentesco nos subadultos.

Figure 1. Seed dispersal distance determined by parentage analysis in subadults.

para o esperado (0,25) se devem as dificuldades em estimar parentesco usando marcadores genéticos. Por exemplo, o cruzamento entre duas plantas heterozigotas para alelos diferentes em determinado loco, uma com genótipo A_1A_2 e outra com o genótipo A_3A_4 pode gerar filhos com genótipo A_1A_3 e A_2A_4 . Atente para o fato de que estes dois filhos são filhos do mesmo pai e mesma mãe, isto é, são parentes no grau de irmãos completos, mas possuem alelos totalmente diferentes, e a estimativa de coancestria entre estes dois filhos daria um valor zero, enquanto que o valor esperado seria também de 0,25. Contudo, quando vários locos são usados simultaneamente, o valor médio sobre os locos tende ao valor esperado. Assim, pode ser considerar que as estimativas obtidas refletem o parentesco esperado entre pais e filhos.

Agradecimentos – Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 06/61143-0). Os autores agradecem a José Cambuim, Alexandre M. da Silva, e Cezar H.A. Seleguin pela ajuda no trabalho de coleta de campo e Laila T. Cardin, Juliana P. Moreira e Patrícia F. Alves pelo trabalho de laboratório. A.C.M. Carvalho agradece ao Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado na Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira/UNESP (Brasil). Os autores A.M. Sebbenn e M.L.T. Moraes agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade em pesquisa.

Referências bibliográficas

- ALENCAR, J. DA C. 1982. Estudos Silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne – Leguminosae, na Amazônia Central. *Acta Amazônica* 12:75-89.
- BACLES, C.F.E. & ENNOS, R.A. 2008. Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior*. *Heredity* 101:368-380.
- BITTENCOURT, J.M. & SEBBENN, A.M. 2007. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. *Heredity* 99:580-591.
- BURCZYK, J., ADAMS, W.T. & SHIMIZU, J.Y. 1996. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon) stand. *Heredity* 77:251-260.
- BURCZYK, J., DIFAZIO, S.P. & ADAMS, W.T. 2004. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel. *Forest Genetic* 11:1-14.
- CARNEIRO, F., SEBBENN, A.M., KANASHIRO, M. & DEGEN, B. 2007. Low inter-annual variation of mating system and gene flow of *Symphonia globulifera* in the Brazilian Amazon. *Biotropica* 39:628-636.
- CARVALHO, P.E.R. 2003. Espécies arbóreas brasileiras. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília.
- CIAMPI, A.Y., BRONDANI, R. & GRATTAPAGLIA, D. 2000. Desenvolvimento de Marcadores Microsatélites para *Copaifera/langsdorffii* Desf. (Copaíba) – Leguminosae-Caesalpinioideae e Otimização de Sistemas Fluorescentes de Genotipagem Multiloco. *Boletim de Pesquisa da Embrapa* 16:1-40.
- DOW, B.D. & ASHLEY, M.V. 1998. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *Journal Heredity* 89:62-70.

- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- GOUDET, J. 1995. Fstat. (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate *F*-statistics. *Journal Heredity* 86:485-486.
- HARDESTY, B.D., HUBBELL, S. & BERMINGHAM, E. 2006. Genetic evidence of frequent long-distance recruitment in a vertebrate-dispersed tree. *Ecological Letters* 9:516-525.
- HARDY, O. & VEKEMANS, X. 2002. SPAGeDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2:618-620.
- ISAGI, Y., SAITO, D., KAWAGUCHI, H., TATENO, R. & WATANABE, S. 2007. Effective pollen dispersal is enhanced by the genetic structure of an *Aesculus turbinata* populations. *Journal of Ecology* 95: 983-990.
- JUMP, A.S. & PENUELAS, J. 2006. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. *Proceedings of National Academy of Science USA* 103:8096-8100.
- KALINOWSKI, S.T., TAPER, M.L. & MARSHALL, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.
- LACERDA, A.B., SEBBENN, A.M. & KANASHIRO, M. 2008. Long-pollen movement and deviation of random mating in a low-density continuous population of *Hymenaea courbaril* in the Brazilian Amazon. *Biotropica* 40:462-470.
- LOISELLE, B.A., SORK, V.L., NASON, J. & GRAHAM, C. 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82:1420-1425.
- MARSHALL, T.C., SLATE, J., KRUIK, L.E.B. & PEMBERTON, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7:639-655.
- MENDONÇA FILHO, C.V. 1996. Braúna, angico, jacarandá e outras leguminosas de mata atlântica: Estação Biológica de Caratinga, Minas Gerais. Fundação Botânica Margaret Mee/Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
- NAITO, Y., KANZAKI, M., IWATA, H., OBAYASHI, K., LEE, S.L., MUHAMMAD, N., OKUDO, T. & TSUMURA, Y. 2008. Density-dependent selfing and its effects on seed performance in a tropical canopy tree species, *Shorea acuminata* (Dipterocarpaceae). *Forest Ecology and Management*. 256:375-383.
- NAKANISHI, A., TOMARU, N., YOSHIMARU, H., MANABE, T. & YAMAMOTO, S. 2008. Effects of seeds- and pollen-mediated gene dispersal on genetic structure among *Quercus salicina* samplings. *Heredity* 102:182-189.
- OLIVEIRA, A.F., CARVALHO, D. & ROSADO, S.C.S. 2002. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaiba langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. *Revista Brasileira de Botânica* 25:331-338.
- PAKKAD, G., UENO, S. & YOSHIMARU, H. 2008. Gene flow and mating system in a small population of *Quercus semiserrata* Roxb. (Fagaceae). *Forest Ecology and Management* 255:3819-3826.
- RAJORA, O.P., RAHMAN, M.H., BUCHERT, G.P. & DANCİK, B.P. 2000. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobes*) in Ontario, Canada. *Molecular Ecology* 9:339-348.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J. & GIL, L. 2005. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity* 94:13-22.
- SANGUINETTI, C., DIAS-NETO, E. & SIMPSON, A.J.G. 1994. RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. *Biotechniques* 17:914-921.
- SCHUELER, S., TUSCH, A. & SCHOLZ, F. 2006. Comparative analysis of the within-population genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.) at the self-incompatibility locus and nuclear microsatellites. *Molecular Ecology* 15:3231-3243.
- SEBBENN, A.M. 2006. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In Pomares de sementes de espécies nativas (A.R. Higa & L.D. Silva, eds.). Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná – FUFEP, Curitiba, p.93-138.
- SILVA, M.B., KANASHIRO, M., CIAMPI, A.Y., TOMPSON, I. & SEBBENN, A.M. 2008. 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* 255:1548-1558.
- SMOUSE, P.E. & SORK, V.L. 2004. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *Forest Ecology and Management* 197:21-38.
- SORK, V.L. & SMOUSE, P.E. 2006. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landscape Ecology* 21:821-836.
- VEIGA JÚNIOR, V.F. & PINTO, A.C.O. 2002. Gênero *Copaifera* L. *Química Nova* 25:273-286.
- WEIR, B.S. & COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- WHITE, G.M., BOSCHER, D.H. & POWELL, W. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in tropical dry Forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proceedings of National Academy of Science USA* 99:2038-2042.

- YOUNG, A. & BOYLE, T. 2000. Forest Fragmentation. *In* Forest conservation genetics: principles and practice. (A. Young, D. Boshier & T. Boyle, eds.) CSIRO Publishing, Collingwood, p.123-132.
- YOUNG, A., BOYLE, T. & BROWN, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* 11:413-418.