

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

“Fluxo de pólen e sementes em população isolada de
Copaifera langsdorfii Desf. (LEGUMINOSAE –
CAESALPINIOIDEAE) em um fragmento florestal localizado
em área urbana”

ANA CRISTINA MAGALHÃES CARVALHO

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Magno Sebbenn

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia - UNESP – Campus de Ilha Solteira,
para obtenção do título de Mestre em
Agronomia.

Especialidade: Sistemas de Produção

Ilha Solteira – SP
abril/2009

FICHA CATALOGRÁFICA

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

- C331f Carvalho, Ana Cristina Magalhães.
Fluxo de pólen e sementes em população isolada de *Copaifera langsdorfii* Desf. (LEGUMINOSAE – CAESALPINIOIDEAE) em um fragmento florestal localizado em área urbana / Ana Cristina Magalhães Carvalho. -- Ilha Solteira : [s.n.], 2009. 72f. il., fots. color.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção, 2009
- Orientador: Alexandre Magno Sebbenn
Bibliografia: p. 63-72
1. Análise de paternidade. 2. Copaíba. 3. Marcador molecular. 4. Estrutura genética espacial. 5. Espécies arbóreas.

DEDICO

Aos meus pais,

*Benedito dos Santos Carvalho e Maria de Nazaré Magalhães Carvalho,
por minha vida, ensinamentos, dedicação, força, coragem, carinho e amor,
por dedicarem a mim e aos os meus irmãos parte de suas vidas,
por tudo o que sou e pelo apoio constante.*

OFEREÇO

*Ao meu filho muito amado Otávio Lucas pelo apoio, paciência, companheirismo,
compreensão, carinho e amor;*

Aos meus irmãos Alan, Adriana, Alesandra, enfim, por existirem em minha vida.

AGRADECIMENTOS

- À DEUS, pela minha vida, por sempre estar comigo me mostrando o caminho, dando-me sempre forças e fé;
- À Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Ilha Solteira, pela oportunidade concedida no curso de pós-graduação;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante o Mestrado;
- Ao Prof. Dr. Alexandre Magno Sebbenn pela orientação;
- Ao Prof. Dr. Mário Luiz Teixeira de Moraes, pelas palavras de incentivo;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro;
- Aos professores do curso de Pós Graduação que contribuíram para minha formação.
- À Selma Maria Bozzite de Moraes, pelas importantes lições de trabalho e por sempre ter uma palavra amiga;
- Aos colegas de Laboratório: Patrícia, Deise, Hélio, Juliana, Láila, Janete em especial Ana Paula e demais agregados;
- Aos Funcionários da Fazenda de Ensino e Pesquisa da FEIS/UNESP, José Cambuim, Manoel F. R. Bonfim, pelo apoio na coleta de dados e Alexandre M. da Silva pela confecção dos mapas;
- Às minhas amigas Rosane B. Fontelle e Simonne S. da Silva pelo apoio e amizade sincera;
- Aos colegas de curso de Pós-graduação pelo companheirismo e amizade: Adriana, Célia; Cidnei, Flávio, Francimary, Michelli, Márcia, Kelly Cristine;
- E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, ajudaram-me a concluir esta importante etapa de minha vida.

Muito Obrigada!!!!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Detalhes da árvore de <i>C. langsdorffii</i>	24
Figura 2.	Detalhes do fruto e semente de <i>C. langsdorffii</i>	25
Figura 3.	Foto aérea digitalizada do Bosque Município de São José do Rio Preto, onde estão localizadas as árvores <i>C. langsdorffii</i> amostradas do fragmento florestal	29
Figura 4.	Indivíduos de <i>C. langsdorffii</i> amostrados no Bosque Municipal de São José do Rio Preto	30
Figura 5.	Distância de dispersão de sementes de <i>C. langsdorffii</i> determinada por análise de paternidade nos sub-adultos	37
Figura 6.	Indivíduos de <i>C. langsdorffii</i> dispersos na área do Bosque Municipal de São José do Rio Preto	43
Figura 7.	Distribuição de frequências do diâmetro a altura do peito (DAP) de todos os genótipos adultos e da regeneração de <i>C. langsdorffii</i> amostrados no Bosque Municipal de São José do Rio Preto	48
Figura 8.	Distribuição de frequências da altura das plantas da regeneração de <i>C. langsdorffii</i> amostrados no Bosque Municipal de São José do Rio Preto	48
Figura 9.	Estrutura genética espacial na população adulta e na regeneração de <i>C. langsdorffii</i> no Bosque Municipal de São José do Rio Preto e na região	55
Figura 10.	Correlação entre número de filhos gerados por árvores maternas e paternas de <i>C. langsdorffii</i> com seus respectivos diâmetros a altura do peito (DAP)	57
Figura 11.	Distância de dispersão de pólen, sementes e distância entre os regenerantes e a árvore polinizadora, determinada por análise de paternidade nos regenerantes e distância entre todas as árvores adultas da população de <i>C. langsdorffii</i>	59
Figura 12.	Distância de dispersão de pólen determinada por análise de paternidade nos regenerantes e distância entre todas as árvores adultas da população <i>C. langsdorffii</i>	60
Figura 13.	Estrutura genética espacial para gametas femininos (óvulos) e masculinos (pólen) em regenerantes de <i>C. langsdorffii</i> no Bosque Municipal de São José do Rio Preto e na região	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Diversidade genética e endogamia em locos microssatélites de árvores adultas e sub-adultas de <i>C. langsdorffii</i>	33
Tabela 2.	Dispersão efetiva de sementes e pólen em população de <i>C. langsdorffii</i>	36
Tabela 3.	Diversidade genética e endogamia na amostra agrupada de árvores adultas e regenerantes de <i>C. langsdorffii</i>	49
Tabela 4.	Desequilíbrio de ligação entre os locos de árvores adultas e regenerantes de <i>C. langsdorffii</i>	51
Tabela 5.	Diversidade genética e endogamia em locos microssatélites de árvores adultas e regenerantes de <i>C. langsdorffii</i>	52
Tabela 6.	Parentesco, tamanho efetivo e número censo em população adulta de <i>C. langsdorffii</i>	53
Tabela 7.	Dispersão de pólen e sementes medida nos regenerantes de <i>C. langsdorffii</i>	56

RESUMO

A fragmentação florestal reduz o tamanho da população reprodutiva, a densidade populacional e aumenta a distância entre coespecíficos. Também pode isolar populações e indivíduos em campos e pastagens. Em curto prazo, isso pode afetar processos como sistema de reprodução e dispersão de pólen e sementes e resultar no aumento da taxa de autofecundação e cruzamentos correlacionados, redução na taxa de imigração de pólen e sementes (isolamento reprodutivo do fragmento), redução na distância de dispersão de pólen e sementes e no aparecimento de estrutura genética espacial dentro das populações. Dentro desse contexto, os objetivos desta dissertação foram estudar por marcadores microssatélites a estrutura genética espacial, a taxa de imigração e a distância de fluxo de pólen e sementes em uma pequena população em fragmento de 4,8 ha de *Copaifera langsdorffii* Desf., localizada no município de São José do Rio Preto, no estado de São Paulo. Para tanto, foram mapeadas e genotipadas para oito locos microssatélites todas as 112 árvores adultas reprodutivas e 128 plântulas da regeneração existentes no referido fragmento. O teste de desequilíbrio de ligação não detectou indício de ligação física entre os locos avaliados, o que indica que estes podem ser usados em estudos genéticos de diversidade e fluxo gênico. Na amostra total das 240 plantas foram encontrados 186 alelos. Altos níveis de diversidade genética foram encontrados para a média dos locos na população ($\hat{A}=23,25$; $\hat{A}_e=8,67$; $\hat{H}_o=0,774$; $\hat{H}_e=0,878$). Comparando árvores adultas com regenerantes, 54 alelos foram exclusivos aos adultos e nenhum nos regenerantes. Adultos apresentaram maior número médio de alelos por loco e número médio efetivo de alelos ($\hat{A}=23,25$; $\hat{A}_e=10,07$, respectivamente) do que os regenerantes ($\hat{A}=16,5$; $\hat{A}_e=6,70$). As heterozigosidades observada e esperada foram similares entre adultos ($\hat{H}_o=0,757$; $\hat{H}_e=0,893$;) e regenerantes ($\hat{H}_o=0,788$; $\hat{H}_e=0,838$). O índice de fixação foi significativamente diferente de zero nos adultos ($\hat{F}=0,152$; $P<0,05$) e não significativo nos regenerantes ($\hat{F}=0,124$; $P>0,05$), o que sugere endogamia nos adultos, provavelmente, advinda de autofecundações e cruzamentos entre parentes. Outra explicação pode ser a segregação de alelos nulos nos locos ou o efeito Wahlund, devido à presença de estrutura genética espacial intrapopulacional. A estimativa do tamanho efetivo da população revelou que este foi baixo e as 112 árvores adultas e os 128 regenerantes correspondem, respectivamente, apenas a 65 e 68 indivíduos não endogâmicos e não parentes entre si. Significativa estrutura genética espacial foi observada para os adultos até a distância de aproximadamente 50 m e para os regenerantes até 20 m. A causa é a dispersão de sementes nas vizinhanças da árvore materna. A propagação vegetativa foi rejeitada como causa de tal estrutura, visto que não havia genótipos idênticos. O poder de exclusão do primeiro e segundo parente foi alto para o conjunto de locos ($P_{1^\circ \text{ Parente}}=0,9998$; $P_{2^\circ \text{ Parente}}=0,9999$), mostrando que este tem alto poder de resolver testes de paternidade. A análise de dispersão de pólen e sementes por análise de paternidade e maternidade foi avaliada nos regenerantes e em uma amostra de 65 genótipos da população adulta (DAP<40 cm), classificadas como sub-adultos. Dos 65 sub-adultos, 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% ($m_{pólen}$), respectivamente. Dos 128 regenerantes, o parental materno foi encontrado para todos ($m_{sementes}=0\%$), indicando ausência de imigração de sementes. Já o parental paterno foi encontrado para 122 ($m_{pólen}=4,7\%$). Estes resultados evidenciam uma alta taxa de fluxo gênico no passado, mas uma aparente baixa taxa atual, provavelmente devido ao isolamento da população pelo aumento da fragmentação na região. A distância média de

dispersão de sementes medida nos sub-adultos e nos regenerantes foi de 38,4 m e 61 m, respectivamente, sendo que aproximadamente 58% das sementes foram dispersas até 30 m nos sub-adultos e 50% até 52 m nos regenerantes. A distância de dispersão de pólen medida nos sub-adultos (118 m) e regenerantes (105 m) foi maior que medida nas sementes. Os resultados, de modo geral evidenciam que a população apresenta altos níveis de diversidade genética, mas que devido ao alto grau de isolamento está sofrendo um processo de aumento no parentesco e redução no tamanho efetivo.

Palavras-chave: Espécies arbóreas tropicais; análise de paternidade; fluxo gênico; marcadores microssatélites.

ABSTRACT

Forest fragmentation to decrease the size of the reproductive population, the population density, increase the distance among conspecifics and can isolate populations and individuals in pastures. This in short term, can affect process as mating system and pollen and seed dispersal and result in increase in selfing rate and correlated matings, decrease in the pollen and seed immigration rate (reproductive isolation of the fragment) and distance of pollen and seed dispersal and, result in intra-population spatial genetic structure. Thus, the aims of this master these were to study by microsatellite markers the spatial genetic structure, the seed and pollen immigration rate and dispersal in a small fragmented population of 4.8 ha of *Copaifera langsdorffii* Desf., located inside of the São José do Rio Preto municipality, in State of São Paulo. Thus, it were mapped and genotyped for eight microsatellite loci all 112 adult reproductive trees in the fragment and in a sampled of 128 individuals of the regeneration. The test of linkage disequilibrium not detected anyone indicative of physic linkage between the evaluated loci, indicating that these can be used for studies of genetic diversity and gene flow. In the total sample of 240 plants it was found 186 alleles. Consequently, high levels of genetic diversity were found for the average of loci in the population ($\hat{A}=23.25$; $\hat{A}_e=8.67$; $\hat{H}_o=0.774$; $\hat{H}_e=0.878$). Comparing adult trees with regeneration, 54 alleles were exclusives in the adults and no one in the regeneration. Adult trees have higher average number of alleles per loci and effective number of alleles per loci ($\hat{A}=23.25$; $\hat{A}_e=10.07$, respectively) than regeneration ($\hat{A}=16.5$; $\hat{A}_e=6.70$). The observed and expected heterozygosities were similar among the adults ($\hat{H}_o=0.757$; $\hat{H}_e=0.893$) and regeneration ($\hat{H}_o=0.788$; $\hat{H}_e=0.838$). The fixation index was significantly different from zero in the adults ($\hat{F}=0,152$; $P<0.05$) and not significant in the regeneration ($\hat{F}=0,124$; $P>0.05$), whit suggest inbreeding in the adults, probably originated from selfing and mating among relatives. Other explanation can be the segregation of null alleles in the loci or the Wahlund effect, due the presence of intra-population spatial genetic structure. The estimative of effective population size of the population reveled that it is low and the 112 adult trees and 128 individuals of regeneration correspond, respectively, to only 65 and 68 individuals not inbreed and not relatives. Significantly spatial genetic structure was observed for adult trees until the distance of about 50 m and for the regeneration until 20 m. The cause is the seed and pollen dispersal in the neighbor of the seed-tree. The vegetative propagation was rejected as the cause of spatial genetic structure, considering that all genotypes were different. The power of exclusion of the first and second parent was high for the loci ($P_{1^\circ Parent}=0.9998$; $P_{2^\circ Parent}=0.9999$), showing that

these have high power to resolve parentage test. The paternity analysis of seed and pollen dispersal was evaluated in the regeneration and a sample of 65 genotypes of adult population (Dbh<40 cm), classified as sub-adults. From 65 sub-adults, it was found the maternal parent for 12 and both maternal and paternal parents for only two individuals, what indicates a pollen and seed immigration of 81% (m_{seeds}) and 97% (m_{pollen}), respectively. From 128 individual of regeneration, the maternal parent was found for all ($m_{seeds}=0\%$), indicating absence of seed immigration. Paternal parent was found for 122 individuals ($m_{pollen}=4.7\%$). These results evidence a high rate of gene flow in the past, but an apparent low actual rate, probably due the isolation of the population due the increase in the fragmentation of the region. The average distance of seed dispersal measured in the sub-adults and in the regeneration was 38.4 m and 61 m, respectively, and about 58% of seeds were dispersed until 30 m in the sub-adults and 50% until 52 m in the regeneration. The distance of pollen dispersal measured in the sub-adults (118 m) and regeneration (105 m) was higher than measured in the seeds. The results, in general terms evidence that the population present high levels of genetic diversity, but that due the high levels of isolation it suffering a process of increase in the relatedness and reduction in the effective population size.

Key-words: Tropical tree species; paternity analysis; gene flow; microsatellite markers.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1. Objetivos	12
1.2. Hipóteses	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Floresta Latifoliada Semidecídua e efeitos da fragmentação	13
2.2 Fluxo gênico	15
2.3 Dinâmica da endogamia entre gerações	17
2.4 Conservação ex situ e coleta de sementes	18
2.5 Marcadores microssatélites (SSR)	19
2.6 Considerações sobre a espécie	21
3 Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequeno fragmento florestal de <i>Copaifera langsdorfii</i> Desf	26
RESUMO	26
ABSTRACT	26
3.1 INTRODUÇÃO	27
3.2 Material e Métodos	29
3.2.1 Local de estudo	29
3.2.2 Amostragem	30
3.2.3 Análise de microssatélite	31
3.2.4 Análises dos dados	31
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.4 CONCLUSÕES	38

4 Fluxo gênico via pólen e semente de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. em pequeno fragmento florestal	39
RESUMO	39
ABSTRACT	39
4.1 INTRODUÇÃO	40
4.2. Material e Métodos	42
4.2.1. Área de estudo e amostragem	42
4.2.2 Análise de microssatélite	43
4.2.3 Análises estatísticas	43
4.2.3.1 Análises da diversidade genética e endogamia	44
4.2.3.2 Análises da coancestria e do tamanho efetivo da população	44
4.2.3.3 Análises da distribuição espacial dos genótipos	45
4.2.3.4 Análise de Fluxo Gênico Contemporâneo	46
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.3.1 Estrutura populacional	47
4.3.2 Diversidade genética, endogamia e desequilíbrio de ligação nos locos da amostra total	49
4.3.3 Diversidade genética e endogamia nas gerações	51
4.3.4 Tamanho efetivo	53
4.3.5 Estrutura genética espacial intrapopulacional	53
4.3.6 Fluxo gênico via pólen e sementes	55
5 CONSIDERAÇÕES GERAIS	62
6 CONCLUSÕES	62
7 REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

O grande aumento da população humana no planeta nos últimos dois séculos e o incremento na qualidade de vida de seus habitantes gerou um aumento na demanda de produtos agrícolas e silviculturais entre outros recursos naturais, aumentando a pressão sobre as florestas naturais e causando graves problemas ao meio ambiente. As pressões exercidas ao meio ambiente resultaram na intensa fragmentação das paisagens, na extinção de espécies, e no isolamento reprodutivo de populações e indivíduos. Os fragmentos são geralmente isolados uns dos outros por paisagens degradadas ou modificadas (PRIMACK; RODRIGUES, 2006). Os fragmentos florestais de diferentes tamanhos e formas reduzem o tamanho efetivo das populações ocasionando o isolamento dos indivíduos e conseqüentemente, provocando alterações no sistema de cruzamento das espécies, como o aumento do grau de parentesco entre indivíduos (COSTA, 2003).

As alterações a que as florestas tropicais vêm sofrendo podem causar redução na adaptação das gerações futuras, devido à erosão genética, colocando em risco a conservação e manutenção das espécies, como também dos ecossistemas existentes. Os ecossistemas florestais abrigam diversas espécies vegetais e animais, muitas das quais vivem em simbiose. São responsáveis pela manutenção dos mananciais hídricos e do equilíbrio da temperatura no planeta. Muitas das espécies que ocorrem nestes ecossistemas têm grande valor econômico atual e muito mais espécies terão valor futuro, com o desenvolvimento da ciência e tecnologia. Quando as florestas são cortadas para vários propósitos, como a expansão para área agrícola, construção de estradas, barragens hidrelétricas, entre outros, ocorre a fragmentação de habitats em pequenas ou médias áreas que apenas suportam um pequeno número de espécies e indivíduos (COSTA, 2003). A continuação do processo de fragmentação pode resultar em diminuição no tamanho médio dos fragmentos, aumento da distância entre eles, aumento do efeito de borda (TOWNSEND et al., 2006), e perda de espécies do interior da floresta que não podem sobreviver em habitats limitados (DAJOZ, 2006).

As modificações na paisagem ameaçam a existência de espécies vegetais de várias maneiras, reduz a alimentação dos animais aumentando mortalidade, pode levar a extinção e o declínio de uma população ou dividir uma população em duas ou mais subpopulações onde as menores tornam-se mais vulneráveis a depressão endogâmica, também pode limitar o potencial de uma espécie para dispersão e colonização, pois pássaros, mamíferos e insetos provenientes do interior da floresta não conseguiriam alcançar uma faixa mesmo que estreita

de ambiente aberto, podendo ser eliminados por outros predadores. Com isto, muitas espécies não recolonizariam os fragmentos após a população ter desaparecido, plantas com frutos carnosos ou sementes aderentes seriam afetadas, pois necessitam dos animais para fazerem a dispersão, diminuindo o número de espécies no fragmento com o passar do tempo (PRIMACK; RODRIGUES, 2006). Com a fragmentação e a diminuição do tamanho da população ocorrerá uma maior propensão de ocorrência de deriva genética e aumento da endogamia, favorecendo a perda de variabilidade genética. Por isso, é fundamental conservar estes ecossistemas para que futuras gerações possam usufruir dos mesmos benefícios que eles fornecem hoje para humanidade. Nesse contexto, a conservação genética *in situ* é a mais indicada, porque preserva não só o organismo alvo, mas também outros que vivem associados, como os animais.

A extinção de populações de espécies arbóreas é ainda mais pronunciada nos trópicos, onde em alguns locais a diversidade de espécies pode chegar a mais de 280 espécies por hectare (PHILLIPS et al., 1994), sendo que grande parte dessas ocorrem em baixa densidade populacional, tipicamente menos do que um indivíduo por hectare (CARNEIRO et al., 2007, LACERDA et al., 2008; SILVA et al., 2008). Assim, pequenos fragmentos (<10 ha) podem conter populações formadas por poucos indivíduos reprodutivos. Contudo, para efetivamente conservar tais espécies, é necessário entender os processos que afetam a diversidade genética e demografia das espécies que compõem estes ecossistemas.

1.1 Objetivos

O objetivo deste estudo foi investigar a estrutura genética espacial e o fluxo de pólen e sementes em uma pequena população de 4,8 ha de *C. langsdorffii* do Bosque Municipal de São José do Rio Preto, em um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual, usando locos microssatélites. Objetivos específicos foram:

1. Quantificar os níveis de diversidade genética para oito locos microssatélites e o tamanho efetivo da população adulta e da regeneração;
2. Estudar a distribuição espacial de genótipos de *C. langsdorffii* em um pequeno fragmento isolado;
3. Determinar as taxas de autofecundação e taxa de fluxo gênico via pólen e sementes externos à população, usando análise de paternidade;

4. Determinar a distância e os padrões de dispersão de pólen e sementes dentro do fragmento *C. langsdorffii*, usando análise de paternidade;
5. Comparar os níveis de endogamia em adultos e regenerantes.

1.2 Hipóteses

As principais hipóteses testadas foram as seguintes:

1. Como a espécie ocorre isolada por área urbana e pelo fato de tratar-se de pequena área, acredita-se que a regeneração tenha sido originada do cruzamento entre indivíduos do próprio fragmento e não existe fluxo gênico via sementes. Por isso, acredita-se que exista estrutura genética espacial na população regenerante;
2. Acredita-se que grande parte, se não todos os cruzamentos, ocorrem apenas entre os indivíduos da própria população, ou seja, a população está isolada reprodutivamente;
3. Em relação à dinâmica da endogamia entre gerações, acredita-se que os níveis de endogamia medidos em termos de índice de fixação sejam maiores na fase de plântulas e menor, nulo ou até negativo na fase adulta, devido à ocorrência de depressão por endogamia;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Floresta Latifoliada Semidecídua e efeitos da fragmentação

Entre as diversas formações florestais brasileiras, a Floresta Latifoliada Semidecídua constitui uma das mais importantes pela grande biodiversidade que abriga. Seus recursos naturais tiveram papel fundamental no processo de ocupação e colonização do país, principalmente com a extração da madeira. Contudo, devido à expansão de fronteiras agrícolas no estado de São Paulo, restam poucos remanescentes dessa vegetação, em geral são

encontrados em pequenos fragmentos isolados na paisagem por culturas anuais, pecuária ou silvicultura intensiva de espécies exóticas.

Segundo VALERI; SENÓ, (2004), a fragmentação de uma área de vegetação natural ou reflorestada cria barreiras para a dispersão dos organismos entre os fragmentos, já que o movimento de algumas espécies depende da habilidade de dispersão e do comportamento migratório das mesmas e os fragmentos encontram-se isolados por barreiras naturais ou por intervenção antrópica. As barreiras naturais podem ser constituídas de rochas, mares, rios, lagoas, várzeas, desertos. As barreiras de ação antrópica são: atividades agropecuárias, grandes cidades, hidrelétricas, rodovias e pontes sobre aterros em áreas de preservação permanente. Algumas espécies cruzam estas barreiras com pequena ou nenhuma dificuldade, dependendo da dimensão do terreno desfavorável, outras espécies relutam em se aventurar em habitat não familiar, muitos pássaros tropicais e borboletas não cruzam rios ou áreas desflorestadas, por inibições intrínsecas à dispersão.

Oliveira (2000) menciona que cada espécie tem um tamanho mínimo viável de população que é necessário para possibilitar cruzamentos e produzir descendências geneticamente variáveis (para espécies de reprodução cruzada), para sobreviver a flutuações aleatórias no tamanho, e para produzir propágulos que poderão colonizar novas áreas em longo prazo. O isolamento de populações em pequenos fragmentos reduz o número de indivíduos reprodutivos e a densidade populacional, podendo afetar os principais processos genéticos como deriva genética, fluxo de genes, seleção e sistema de reprodução (YOUNG; BOYLE, 2000), também pode isolar populações reprodutivas e aumentar a estrutura genética espacial dentro das populações.

A resposta das espécies a estes efeitos vai depender das suas características ecológicas, como sistema de reprodução, síndrome de dispersão, longevidade, nível de ploidia e demografia (YOUNG; BOYLE, 2000). Os três mais óbvios efeitos genéticos da fragmentação são: a) perda de diversidade genética no nível de população e espécie; b) aumento da estrutura genética entre as populações e; c) aumenta a endogamia (YOUNG; BOYLE, 2000). Imediatamente após a fragmentação, com a redução do tamanho das populações, tem-se um efeito de gargalo na diversidade genética das espécies, pela redução no número de indivíduos nas populações. Esta redução pode causar a perda de alelos e redução na heterozigosidade (YOUNG et al., 1996). Isto afeta diretamente as futuras gerações das populações, porque reduz o número de indivíduos reprodutivos, desencadeando a deriva genética no processo de recombinação dos gametas a cada geração. Se as populações mantiverem-se isoladas e pequenas por longas gerações, pode-se esperar um aumento da estrutura genética espacial e,

portanto, da endogamia por cruzamento entre parentes e, conseqüentemente, uma perda rápida de diversidade genética. Por outro lado, se as populações mantiverem certos níveis de fluxo gênico (um simples imigrante por geração é teoricamente suficiente para manter as populações coesas; $N_e m > 1$, Wright, 1931) e ocorrer um crescimento da população, estes efeitos podem ser minimizados e a variabilidade genética das populações pode voltar os níveis pré-fragmentação (JUMP; PENUELAS, 2006).

O estudo genético por marcadores moleculares de gerações pós-fragmentação como sementes e 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 e Penuelas (2006) observaram na regeneração de fragmentos de *Fraxinus excelsior* 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 subsequentes pelo processo de deriva genética.

2.2 Fluxo gênico

Em populações de plantas o fluxo gênico ocorre durante as gerações gametofíticas e esporofíticas, portanto através da dispersão do pólen e de semente (MARTINS, 1997). O fluxo gênico via pólen e sementes é um dos fatores mais importantes influenciando a estrutura genética de populações de espécies arbóreas (SMOUSE et al., 2001, SMOUSE; SORK, 2004, ROBLEDO-ARNUNCIO; GIL, 2005, SORK; SMOUSE, 2006) apresenta uma gama de estratégias de reprodução que vai desde mecanismos que garantem a totalidade de cruzamentos entre indivíduos distintos até a autofecundação (NASS, 2007).

Futuyma (1992) menciona quatro modelos básicos de fluxo gênico que correspondem a diferenças na estrutura de populações: a) o modelo continente-ilha, em que o movimento dos genes é unidirecional, partindo de uma população maior para outra menor e isolada ou, para colonização; b) o modelo de ilhas, onde a migração ocorre ao acaso entre um grupo de pequenas populações bem definidas; c) o modelo de alpondras ou “stepping-stone”, onde as populações trocam migrantes entre populações vizinhas e d) o modelo de isolamento por distância, no qual o fluxo ocorre entre grupos vizinhos, em uma população contínua.

O grau em que uma população pode ser delimitada de outras depende da intensidade o fluxo gênico entre elas (FUTUYMA, 1992), assim, a distribuição esperada da informação genética dentro e entre populações está intimamente relacionada com a organização física e a capacidade de dispersão da espécie (NASS, 2007). O padrão de dispersão de pólen está diretamente ligado com o comportamento dos agentes polinizadores, que podem sofrer influência de certos fatores como: territorialidade, especificidade ao recurso, disponibilidade de recursos e sociabilidade dos animais, sendo estes fatores determinantes para os padrões de distância no transporte de pólen (HIGA; SILVA, 2006).

A taxa média de fluxo gênico entre populações estabelecidas de uma espécie é, com frequência, mais baixa e tem probabilidade de ser menor se os indivíduos imigrantes necessitarem competir com os residentes para sobreviver e reproduzir (FUTUYMA, 1992), porém a taxa de média se fluxo gênico pode ser maior do que sugere a sua taxa média, se populações locais se extinguiem com frequência e os sítios forem recolonizados por indivíduos retirados de diversas populações, quanto mais elevada à taxa de extinção e recolonização, maior será a taxa de fluxo gênico e menor a variância nas frequências alélicas entre populações (FUTUYMA, 1992).

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; SORK; SMOUSE, 2006). Em populações naturais o fluxo gênico intenso pode efetivamente contrapor os efeitos detrimenais da deriva genética ou seleção direcional e pode ser a origem de novos alelos nas populações (BURCZYK et al., 2004). No entanto, 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). Em suma, para prever as mudanças genéticas causadas pela fragmentação em populações de espécies arbóreas tropicais, é necessário estudar o fluxo gênico contemporâneo (atual) via sementes e via pólen (HAMILTON, 1999, HAMRICK, 2004) e caracterizar a distribuição genética espacial e a vizinhanças reprodutivas.

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. Tais análises incluem a determinação da paternidade de sementes de polinização aberta e da distância entre a planta materna e o doador de pólen (NASON et al., 1996), bem como da distância de dispersão das sementes (BURCZYK et al., 2004). Estes 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 (NASON et al., 1998, APSIT et al., 2001, WHITE et al., 2002, DICK et al., 2003, DUNPHY et al., 2004, HARDESTY et al., 2006, CARNEIRO et al., 2007, DUNPHY; HAMICK, 2007, BITTENCOURT; SEBBENN, 2007, CLOUTIER et al., 2007, FUKUE et al., 2007, ISAGI et al., 2007, MILLAR et al., 2007, WANG et al., 2008, BACLES; ENNOS, 2008, BITTENCOURT; SEBBENN, 2008, LACERDA et al., 2008, SILVA et al., 2008), embora outros tenham mostrado justamente o oposto (DEGEN et al., 2004, VERON et al., 2005, SORK; SMOUSE, 2006, NAITO et al., 2008; PAKKAD et al., 2008).

2.3 Dinâmica da endogamia entre gerações

Segundo Costa (2003), Wright definiu como sendo endogamia a correlação entre gametas que se unem, sendo assim refere-se ao processo de cruzamento entre indivíduos mais aparentados entre si do que são membros aleatórios da população, tendo por consequência um aumento na homozigose para alelos idênticos por descendência na população.

Para Pires (2006), a endogamia é definida como todo sistema de cruzamento que promove o aumento de homozigose nas descendências, ou seja, refere-se ao cruzamento de materiais genéticos aparentados ou a autofecundação, levando ao acúmulo de genes comuns em homozigose, o que pode ser prejudicial nas espécies de polinização cruzada, uma vez que as populações naturais destas espécies são portadoras de alelos recessivos deletérios, que podem provocar a perda de vigor na descendência pelo aparecimento de genes deletérios e letais em condição homozigota, refletido pela redução na média da população, denominada depressão endogâmica.

Em populações naturais a endogamia pode ocorrer por meio de cruzamentos entre indivíduos aparentados em espécies dióicas, cruzamentos entre indivíduos aparentados e autofecundações em espécies monóicas ou com sistema reprodutivo misto (RESENDE, 2002). Em espécies arbóreas, a distribuição espacial, o parentesco intrapopulacional e o sistema de reprodução podem estar associados, especialmente em espécies arbóreas polinizadas por animais. Indivíduos próximos tendem a se cruzar mais do que indivíduos localizados espacialmente distantes (HARDESTY et al., 2006, DUNPHY; HAMICK, 2007,

BITTENCOURT; SEBBENN, 2007, FUKUE et al., 2007; ISAGI et al., 2007, WANG et al., 2008, BACLES; ENNOS, 2008, BITTENCOURT; SEBBENN, 2008, LACERDA et al., 2008, SILVA et al., 2008), sendo relacionados pela dispersão de sementes próxima a árvore materna, a endogamia biparental pode aumentar na população com o passar das gerações (COLES; FOWER, 1976, YOUNG et al., 1996; YOUNG; BOYLE, 2000), caso a pressão de seleção contra indivíduos endogâmicos não seja efetiva. Para compreender como se processa a dinâmica da endogamia entre gerações, são necessários estudos em fina escala do sistema de reprodução, distribuição espacial de genótipos e comparações dos níveis de endogamia, existentes em diferentes estágios ontogênicos das plantas.

2.4 Conservação ex situ e coleta de sementes

O conhecimento do sistema de reprodução das espécies é de fundamental importância para coleta de sementes de polinização aberta, é responsável pela transferência das informações genéticas de uma geração para outra. O sistema de reprodução refere-se à forma como as populações de uma espécie recombina seus genes a cada geração para formar a população descendente. Pode apresentar grande variação entre e dentro de populações de uma espécie, devido o seu controle estar sob influência genética (genes controlando a auto-incompatibilidade, determinado sistema sexual, a maturidade reprodutiva e a depressão endogâmica) e ambiental (fatores ambientais influenciando a fenologia de florescimento e o comportamento dos polinizadores) (SEBBENN, 2002).

Devido a intensa fragmentação das paisagens florestais da região sudeste do Brasil e a crescente demanda de sementes para reflorestamentos visando à recuperação ambiental, atualmente tem-se discutido muito as implicações de se coletar sementes em fragmentos e árvores isoladas em pastagens. Os poucos estudos existentes realizados com espécies arbóreas tropicais foram desenvolvidos na América central (ALDRICH; HAMRICK, 1998, CASCANTE et al., 2002, FUCHS et al., 2003), têm detectado que árvores isoladas em campos e pastagens não estão reprodutivas, mas uma maior taxa de autofecundação e cruzamentos correlacionados têm sido detectados nas árvores isoladas do que as ocorrentes em fragmentos ou florestas contínuas (ALDRICH; HAMRICK, 1998, CASCANTE et al., 2002, FUCHS et al., 2003). Por exemplo, em um estudo conduzido com a espécie arbórea tropical *Paqira quinata* na Costa Rica, foram detectadas taxa de autofecundação de 8,5% e

correlação de paternidade de 47% em florestas contínuas e 22,3% e 74%, respectivamente em árvores isoladas em pastagens (FUCHS et al., 2003). Resultado semelhante foi observado em na espécie arbórea *Samanea saman*, também na Costa Rica (CASCANTE et al., 2002). Isto implica que um maior número de árvores matrizes deveriam ser utilizadas para a coleta de sementes em árvores isoladas, em comparação a coleta de sementes em florestas contínuas e que seria necessária a seleção das sementes e plântulas, a fim de evitar o aumento dos custos de replantio, devido a alta taxa de mortalidade nos referidos plantios. Finalmente, com estas informações é possível determinar o tamanho efetivo de variância e o número de árvores matrizes necessárias para coleta de sementes para reter o tamanho efetivo desejado na amostra de sementes (SEBBENN, 2006).

2.5 Marcadores microssatélites (SSR)

Estudos genéticos em populações naturais de espécies arbóreas tropicais por marcadores moleculares tiveram início na Malásia, porém tiveram um grande avanço nas florestas neotropicais no Panamá, Costa Rica e no Brasil (KAGEYAMA et al., 2003). Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de gene expresso, é uma característica capaz de detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos ou organismos. Assim, pode-se considerar como marcador genético, toda característica fenotípica ou qualquer segmento de DNA que sejam transmitidas pelos pais para as progênes e que permitam a análise de similaridade e diversidade genética entre indivíduos. As diferenças na sequência gênica podem ser diretamente observadas e descritas com alto grau de precisão. Os marcadores moleculares são utilizados no estudo da extensão e distribuição da variação entre espécies como também para investigar questões taxonômicas e evolutivas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Um fragmento de DNA pode ser considerado, de fato, um marcador quando é confirmada a associação entre ele e uma característica de interesse, como por exemplo, no melhoramento genético de animais, de plantas ou de microorganismos, a identificação de marcadores moleculares e o seu uso podem acelerar e otimizar o processo como um todo (VIANA et al., 2003).

Os marcadores moleculares foram usados pela primeira vez na década de 70 em um experimento destinado à detecção de mutações em DNA em vírus, com o desenvolvimento da

técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição, que são fragmentos de DNA obtidos por clivagem do DNA de enzimas de restrição seguida de hibridizações com sondas de sequências homólogas marcadas com radioatividade ou fluorescência. As principais vantagens deste marcador são a codominância e a alta reprodutibilidade, como desvantagens exige uma grande quantidade e qualidade de DNA, necessita de sondas específicas para a hibridização e o fato de a técnica ser mais trabalhosa, demorada e cara em comparação a outras técnicas mais recentes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; VIANA, 2003, BORÉM; CAIXETA, 2006, FALEIRO, 2007). Os RFLPs podem ser utilizados para a identificação de germoplasma, identificação de variedades, controle de qualidade na produção de sementes híbridas, caracterização genética de populações, monitoramento nos retrocruzamentos e auxílio na identificação e clonagem de genes, entre outras (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Com o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da DNA polimerase) na década de 80, novos tipos marcadores foram desenvolvidos, por meio da PCR, amplificam-se porções específicas do genoma desde que as sequências adjacentes sejam conhecidas. Com base na técnica de PCR, foi possível desenvolver várias metodologias para detectar marcadores moleculares de DNA entre os quais os marcadores microssatélites (*SSR - Simple Sequence Repeats* - Sequências simples repetidas) (VIANA et al., 2003).

Os microssatélites constituem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis atualmente, apresentam uma taxa de mutação mais alta, sendo o mais indicados para estudos de genética de populações, diversidade genética, sistemas de cruzamentos e mapas de ligação (NASS, 2007). Por sua natureza altamente informativa, combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia do PCR, faz desses marcadores uma eficiente ferramenta para estudos de genes eucarióticos, (BORÉM; CAIXETA, 2006), constituem um loco genético altamente, multialélicos, consistem de pequenas sequências 1-5pb repetidas em tandem, ou seja, uma após a outra, encontradas nos genomas de eucariotos sendo bastante frequentes e distribuídas ao acaso (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998, FALEIRO, 2007).

A obtenção dos marcadores envolve a amplificação dos microssatélites via PCR, utilizando-se de primers específicos (geralmente de 20 a 25 pb), para as regiões do DNA que flanqueiam os microssatélites, ou seja desenvolvimento de primers específicos para uma espécie em estudo. A técnica de SSR revela polimorfismo em um loco devido às diferenças no número de vezes em que uma repetição ou motivo se repete naquele loco, estas repetições

constituem variações no comprimento dos segmentos amplificados pela reação de polimerase em cadeia e separados em gel de eletroforese (NASS, 2007). A visualização das bandas no gel é realizada por meio de coloração com brometo de etídio, Gel RedTM ou nitrato de prata, como também tem sido usados primers fluorescentes em combinação com sequenciador semi-automático de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998, BORÉM; CAIXETA, 2006).

Possuem como vantagens sobre os métodos clássicos de genética quantitativa na análise da estrutura genética de populações como: elevado conteúdo de informação de polimorfismo, qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento genético, a herança das características detectadas pode ser facilmente observada; a maioria dos locos são co-dominantes facilmente reproduzíveis e as frequências alélicas podem ser calculadas diretamente sem a necessidade de cruzamentos genéticos; as estimativas da variabilidade genética podem ser comparadas diretamente entre populações ou espécies e um conjunto de locos pode ser acessado usando-se pequena quantidade de material (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998, BORÉM; CAIXETA, 2006).

A restrição para aplicação desta tecnologia na análise genética esta na grande quantidade de trabalho desenvolvido, necessitando de equipamento sofisticado e o alto custo para o desenvolvimento de primers específicos, quando não estão disponíveis para espécies a serem estudadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998, FALEIRO, 2007). Embora para esses marcadores o desenvolvimento de primers específicos para o loco microssatélites entre espécies relacionadas seja necessário um grande demanda de trabalho, atualmente com o desenvolvimento das pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de primers denominados heterólogos, é possível utilizar primers que foram desenvolvidos para uma espécie e empregá-los em outras espécies do gênero (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

2.6 Considerações sobre a espécie

O gênero *Copaifera* L., descrito por Linnaeus em 1762, apresenta quatro espécies distribuídas na África e 28 na América (DWYER, 1951), é composto por árvores e arbustos com a casca do tronco aromática, caracterizado pela combinação da folha paripinada com dois ou mais folíolos; inflorescência em espigas paniculiformes com flores, apétalas, legume coriáceo, elipsóide ou ovato-falcado, achatado, deiscente, com uma semente envolta por um arilo abundante, colorido apresentando ou não pontuações nos folíolos bem como o número e

a forma dos folíolos (DWYER, 1951, VAN DEN BERG, 1982). Segundo Veiga Junior; Pinto (2002), o gênero possui 72 espécies, das quais 16 são endêmicas do Brasil, ocorrentes principalmente na Amazônia e no cerrado (ALENCAR, 1982). As copaíbas são nativas da região tropical da América Latina são encontradas espécies na região que se estende do México ao norte da Argentina e também da África Ocidental (CARVALHO, 2003).

O primeiro relato que se tem sobre a denominação do óleo extraído das espécies do gênero foi *Copei*, através de relatório enviado ao Papa Leão X por Petrus Martyr publicado em Strasburgo em 1534 e mencionado sob o nome cupayba em 1625, por um monge Português que escreveu sobre o Brasil e suas riquezas naturais (DWYER, 1951).

O óleo da copaíba pode ser usado puro (in natura ou destilado), ou como componente na preparação de uma variedade de produtos, na indústria de perfumes e cosméticos, na manufatura de sabonetes, cremes e espumas de banho, xampus, cremes condicionadores, loções hidratantes e capilares. Como medicinal é usado contra sinusite, nas inflamações de garganta, bronquites, cistites, doenças venéreas como cicatrizantes. É também utilizado na indústria de vernizes, fotografia e confecção de borracha sintética, como inibidor de corrosão de aço em solução salina, como fonte rica e renovável de hidrocarbonetos, na síntese de biomarcadores de sedimentos e resíduos de petróleo e seu uso como combustível ecologicamente limpo tem sido extensamente avaliado (ALMEIDA et al., 1998, RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2006.)

Copaifera langsdorffii Desf. é uma espécie arbórea da família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae, conhecida popularmente por copaíba, pau-d'óleo, podói, cupaúba e cupiúva (CORRÊA, 1984, BARROSO et al., 1999). Segundo Leite e LLeras (1993), a espécie *C. langsdorffii* apresenta grande importância no Brasil, por estar distribuída por todo o território (da Amazônia a Santa Catarina, no nordeste e centro-oeste) e por possuir quatro diferentes variedades: *C. langsdorffii* var. *grandifolia*, *grandiflora*, *laxa* e *glabra*. É uma árvore tropical, hermafrodita, polinizada por abelhas *Apis mellifera* e *Trigona sp* e outros insetos (CARVALHO, 2003). Apresenta um sistema misto de reprodução, mas com predomínio de cruzamentos (OLIVEIRA et al., 2002). São árvores de crescimento lento que alcançam de 25 a 40 m de altura, até 100 cm de diâmetro a altura do peito e podem viver até 400 anos (PEDRONI et al., 2002). As folhas são alternadas, compostas paripinadas, pecioladas e penduladas, folíolos dois a seis pares, alternos ou subopostos, peciolulados, com pontos translúcidos freqüentemente presentes (Figura 1). Os frutos são legumes deiscantes com 3,5 a 4,0 cm, contêm uma semente exalbuminosa, sendo a maioria elipsóide, podendo-se encontrar algumas com formato irregular. A testa é lisa, de coloração negra e brilhante ovóide

envolvida por um arilo abundante e colorido (Figura 2) (ALMEIDA et al., 1998, CARVALHO, 2003, GUERRA, 2006).

As flores produzem odor intenso, suave, e doce desde a abertura, são branco-esverdeadas, opacas com cerca de 0,5 cm de diâmetro e reunidas em inflorescências paniculadas, terminais, multifloras, com uma média de 125 flores, androceu composto por dez estames, de dois tamanhos diferentes, maiores e menores, intercalados, em um disco nectarífero de cor verde-escura, na base do ovário. As anteras têm deiscência lateral e longitudinal e são dorsifixas. O ovário é súpero, unilocular, com dois a três óvulos de placentação sutural e o estilete é inclinado, o estigma é pequeno, papiloso e seco (FREITAS; OLIVEIRA, 2002).

A floração pode iniciar a partir do cinco anos de idade. A dispersão das sementes envolve zoocoria e hidrocoria, devido a sua ocorrência freqüente junto aos cursos dos rios (CARVALHO, 2003). A madeira tem a superfície lisa, lustrosa, durável, de alta resistência a ataque de xilófagos e baixa permeabilidade, própria para fabricação de peças torneadas e de marcenaria em geral. A árvore também é utilizada na fabricação de carvão e pelas indústrias de construção civil e naval (LORENZI, 2002).

No estado de São Paulo floresce de outubro a abril e frutifica de agosto a outubro, embora a frutificação não seja anual. Anos com alta frutificação são seguidos por anos com baixa frutificação (PEDRONI et al., 2002).

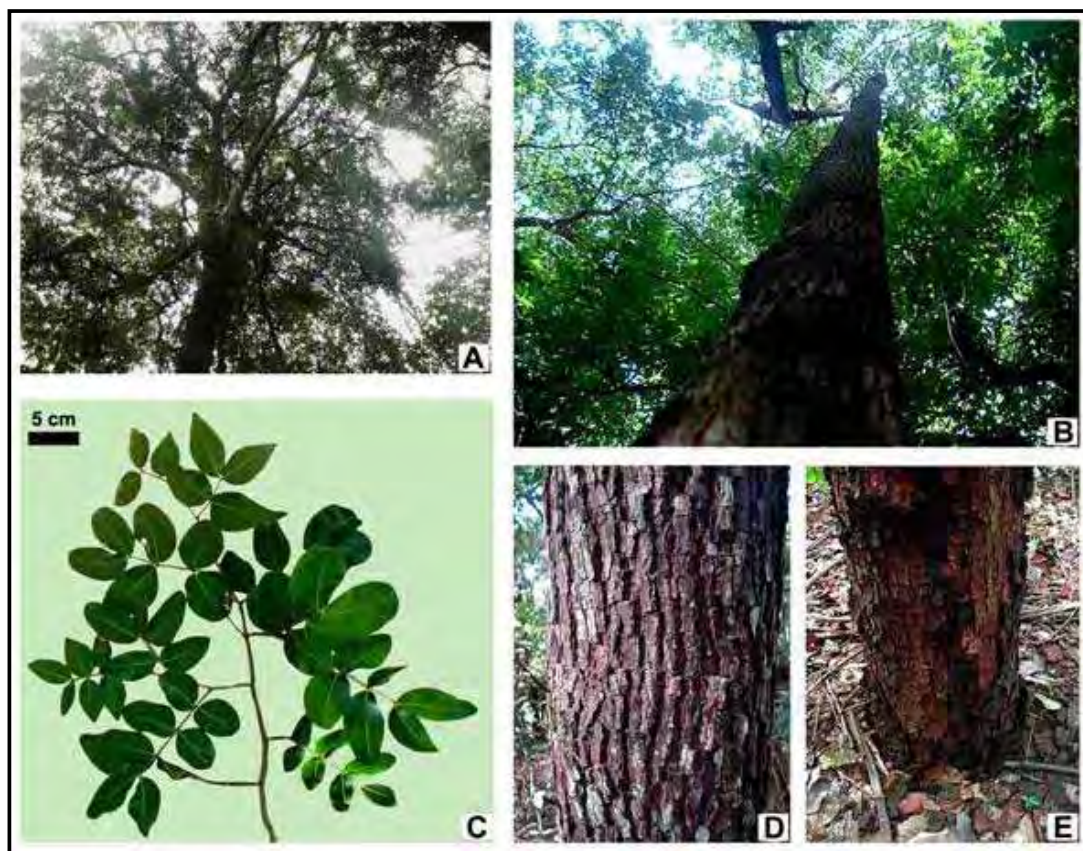


Figura 1. Detalhes da árvore de *Copaifera langsdorffii*. A- Copa; B- Fuste; C- Folhas; alternadas, compostas paripinadas, folíolos com dois a seis pares, alternos ou subopostos; D- Retidoma; E-Base. Fotos: *Ana Cristina M. Carvalho*.

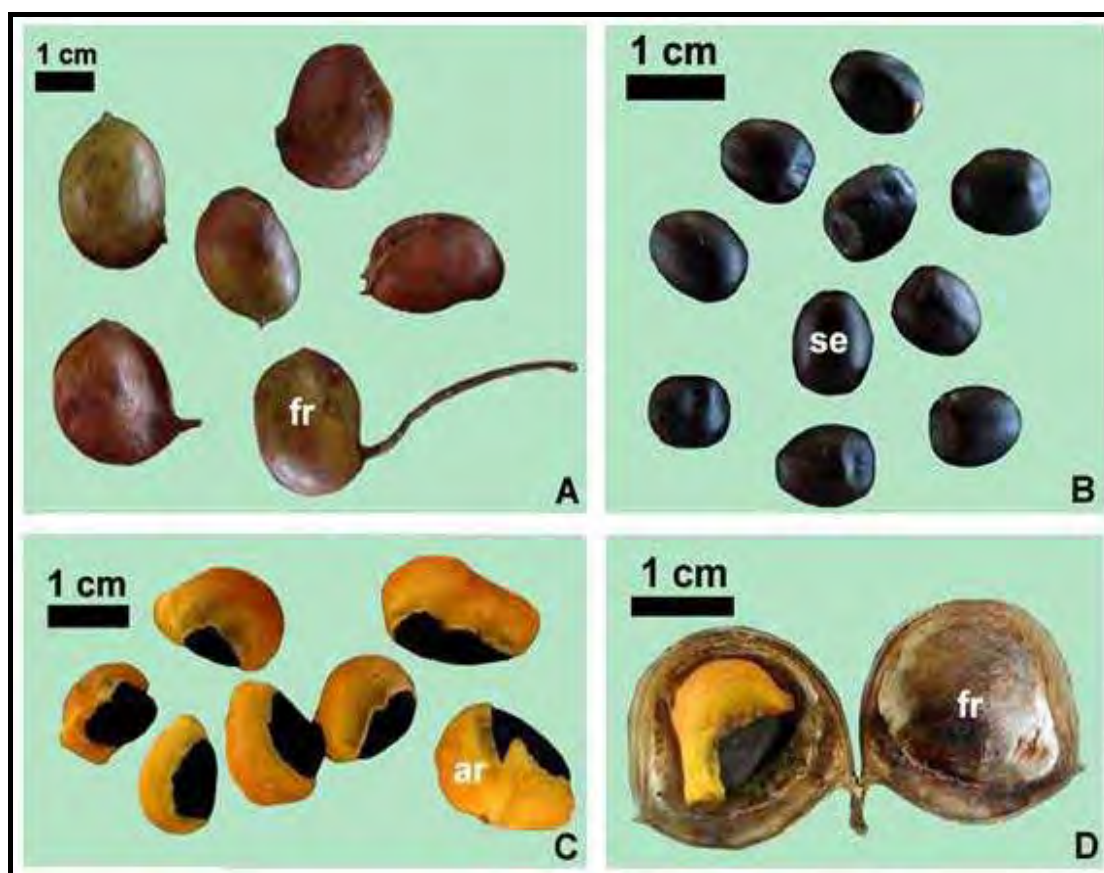


Figura 2. Detalhes do fruto e semente de *Copaifera langsdorffii*. A- Fruto fechado maduro; B- sementes; C-arilo recobrimdo a semente; D- Fruto aberto.ar- arilo; se-semente; fr-fruto. Fotos: Ana Cristina M. Carvalho.

A ocorrência de *C. langsdorffii* no estado de São Paulo restringe-se a pequenos fragmentos isolados por culturas agrícolas e pecuária onde restam poucos exemplares. Por exemplo, no Bosque Municipal de São José do Rio Preto (4,8 ha), existem 112 indivíduos adultos dispersos por toda a área. Essas populações remanescentes tornar-se-ão as populações de origem das futuras gerações da espécie e, se o tamanho efetivo dessas for muito baixo (<50), pode-se esperar um rápido declínio nas populações com sua consequente extinção.

3. Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequeno fragmento florestal de *Copaifera langsdorffii* Desf.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar por marcadores microssatélites à taxa de imigração e a distância de fluxo de pólen e sementes em adultos e sub-adultos em uma pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii* Desf., localizada no município de São José do Rio Preto, no estado de São Paulo. Foram mapeadas e genotipadas para oito locos microssatélites todas as 47 árvores adultas (DAP \geq 40 cm) e 65 sub-adultas (DAP<40 cm) existentes no fragmento. Adultos tinham um número menor de alelos (142) do que sub-adultos (164), sendo 20 alelos exclusivos aos adultos e 41 aos sub-adultos. Adultos tinham significativamente menor diversidade genética e maior endogamia ($\hat{A}=17,75\pm 0,51$; $\hat{A}_e=8,97\pm 0,27$; $\hat{H}_o=0,711\pm 0,026$; $\hat{H}_e=0,879\pm 0,004$; $\hat{F}=0,191\pm 0,017$) do que sub-adultos ($\hat{A}=20,5\pm 0,65$; $\hat{A}_e=10,86\pm 0,29$; $\hat{H}_o=0,792\pm 0,012$; $\hat{H}_e=0,900\pm 0,003$; $\hat{F}=0,119\pm 0,013$). 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 este tem alto poder de resolver testes de paternidades. Dos 65 sub-adultos, 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. A distância média de dispersão de sementes foi de 38,4 m. A distância de dispersão de pólen (118 m) foi maior que a medida nas sementes. Os resultados, de modo geral evidenciam que a população apresenta altos níveis de diversidade genética, devido a uma intensa taxa de imigração de sementes e pólen, que ocorreu no passado.

Palavras-chave: Espécies arbóreas tropicais; análise de paternidade; tamanho efetivo.

ABSTRACT

The aim of this work was to study by microsatellite markers the seed and pollen immigration rate and the distance of seed and pollen dispersal in a small fragmented population of *Copaifera langsdorffii* Desf., located inside of the São José do Rio Preto municipality, in State of São Paulo. Thus, it was mapped and genotyped for eight microsatellite loci all 47 adult trees and 65 sub-adults in the fragment. Adults had a lower number of alleles per locus (142) than sub-adults (164), where 20 alleles were exclusives to adults and 41 to sub-adults. Adults had significantly lower genetic diversity and higher inbreeding ($\hat{A}=17.75\pm 0.51$; $\hat{A}_e=8.97\pm 0.27$; $\hat{H}_o=0.711\pm 0.026$; $\hat{H}_e=0.879\pm 0.004$; $\hat{F}=0.191\pm 0.017$) than sub-adults ($\hat{A}=20.5\pm 0.65$; $\hat{A}_e=10.86\pm 0.29$; $\hat{H}_o=0.792\pm 0.012$; $\hat{H}_e=0.900\pm 0.003$; $\hat{F}=0.119\pm 0.013$). The power of exclusion of the first parent was high over loci in adult-trees ($P_{1^\circ\text{ Parente}}=0.9994$), showing that these have high power to resolve paternity tests. From 65 sub-adults, maternal parent for 12 and both maternal and paternal parents for only two individuals was found, that indicates a pollen and seed immigration of 81% (m_{seed}) and 97% (m_{pollen}), respectively. These results evidence a high rate of gene flow in the past. The average distance of seed

dispersal was 38.4 m, and about 58% of seeds were dispersed until 30 m. The distance of pollen dispersal (118 m) was higher than measured in the seeds. The results, in general terms evidence that the population present high levels of genetic diversity, due high seed and pollen immigration occurred in the past.

Key-words: Tropical tree species; paternity analysis; effective population size.

3.1 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, pela redução no número de indivíduos nas populações. Esta redução pode causar a perda de alelos em decorrência dos cruzamentos entre parentes (YOUNG et al., 1996). O estudo genético por marcadores moleculares de gerações pós-fragmentação por sementes e regeneração natural podem ajudar a evidenciar estes efeitos. 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 e Penuelas (2006) observaram na regeneração de fragmentos de *Fraxinus excelsior* 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 subsequentes 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, DUNPHY et al., 2004, HARDESTY et al., 2006, CARNEIRO et al., 2007, DUNPHY; HAMICK, 2007, BITTENCOURT; SEBBENN, 2007, 2008, 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* pertence a família Leguminosae é composto por 72 espécies, das quais 16 são endêmicas do Brasil, ocorrentes principalmente na Amazônia e no cerrado (ALENCAR, 1982, VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). As copaíbas são nativas da região tropical da América Latina são encontradas espécies na região que se estende do México ao norte da Argentina e também da África Ocidental (CARVALHO, 2003). *Copaifera langsdorffii* Desf. é uma espécie arbórea da subfamília Caesalpinioideae, conhecida vulgarmente por óleo-vermelho, copaíba da várzea, oleiro, copaúba (ALMEIDA et al., 1998). É uma árvore tropical, hermafrodita, polinizada por abelhas *Apis mellifera* e *Trigona sp.* Apresenta um sistema misto de reprodução, mas com predomínio de cruzamentos (OLIVEIRA et al., 2002, CARVALHO, 2003). São árvores de crescimento lento que alcançam de 25 a 40 metros de altura, até 100 cm de diâmetro a altura do peito e podem viver até 400 anos (PEDRONI et al., 2002). Árvore melífera, recomendada para paisagismo, a madeira é usada na construção civil, vigas, batentes, cabos de ferramentas e marcenaria em geral (ALMEIDA et al., 1998).

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

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Local de estudo

O estudo foi conduzido no Bosque Municipal de São José do Rio Preto, o qual compreende 4,8 ha de floresta semidecídua, localizado nas imediações periféricas do município. A área é isolada por uma cerca alta (>3 m), visto trata-ser de um parque de recreação urbano e hospeda o zoológico municipal. A área sofreu corte seletivo no passado e é rodeada por área urbana em sua maior extensão e cultura de cana-de-açúcar em outra (Figura 3). A população de *C. langsdorffii* encontra-se distribuída por toda a área. Podem ser observados desde indivíduos regenerantes até indivíduos com grandes dimensões, atingindo próximo a 1 m de diâmetro a altura do peito (DAP) (Figura 4 A e E). Não foram encontradas outras árvores reprodutivas de *C. langsdorffii* nas redondezas da população.



Figura 3. Foto aérea digitalizada do Município de São José do Rio Preto, onde estão localizadas as árvores de *C. langsdorffii* amostradas do fragmento florestal SP. Fonte: Google 01, fevereiro 2009.

3.2.2 Amostragem

Foram amostradas, mapeadas (com um GPS) e medidos para o diâmetro a altura do peito (DAP) todas as árvores acima de 15 cm de DAP. Foram encontradas 112 árvores, como DAP variando de 15 a 93 cm. Tecidos foliares e o cambio do tronco das maiores árvores foram amostrados para as análises genéticas (Figura 4). Para estudar os efeitos da fragmentação nas árvores adultas a população foi dividida em duas classes, árvores com DAP ≤ 40 cm e árvores com ≥ 40 cm. O DAP de *C. langsdorffii* pode atingir até 100 cm, mas o crescimento é lento (CARVALHO, 2003). Nogueira (1977) reporta um DAP de 14,75 cm aos 20 anos de idade, em plantio em Cosmópolis-SP. Isto sugere um incremento médio anual (IMA) de $0,735 \text{ cm ano}^{-1}$ (CARVALHO, 2003), este IMA foi utilizado para determinar a idade das árvores, visto tratar-se da medida que se dispõe em idade mais avançada para espécie. A idade das árvores na população foi estimada entre 21 e 123 anos.

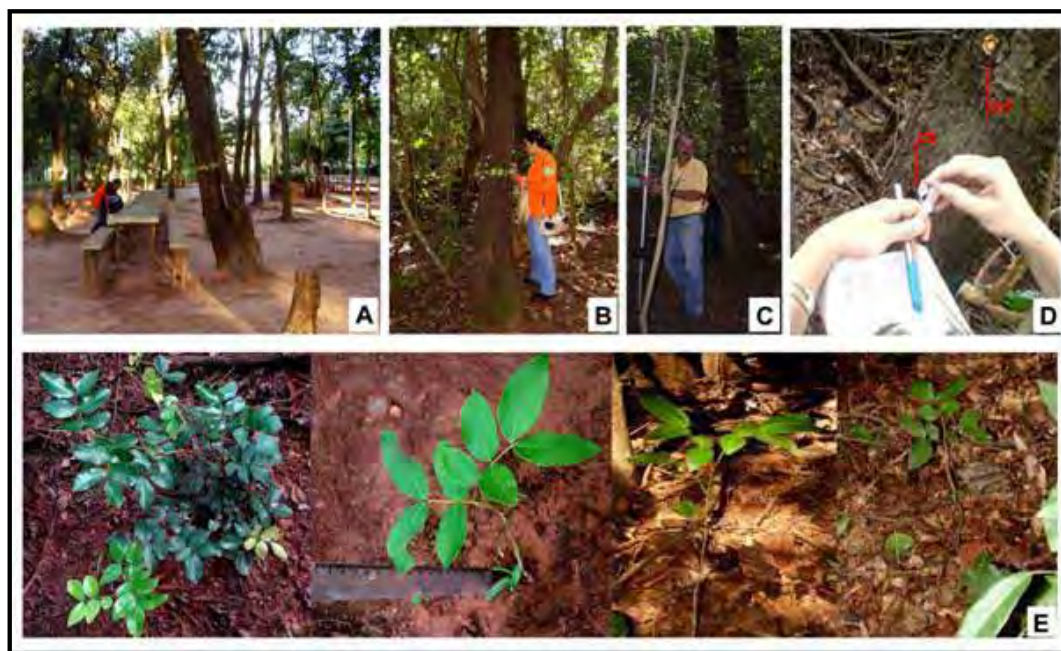


Figura 4. Indivíduos de *C. langsdorffii* amostrados no Bosque Municipal de São José do Rio Preto. A- Vista Central do Bosque, tronco. B- Medição do DAP (diâmetro à altura do peito); C- Coleta com o auxílio de podão; D- Coleta de amostra de câmbio; E- Regenerantes. orf (orifício), cb (cambio em micro tubo). Fotos: Ana Cristina M. Carvalho, Alexandre Marques da Silva.

3.2.3 Análise de microssatélite

As análises microssatélites foram conduzidas no Laboratório de Genética de Populações e Silvicultura (LGPS), da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira/UNESP. O material vegetal foi submetido à extração de DNA genômico total e a amplificação a partir de reações da polimerase em cadeia (PCR) de regiões de microssatélites utilizando oito *primers* SSR. A extração de DNA foi efetuada com base na metodologia de Doyle e Doyle (1990) modificada por Alzate-Marin et al. (2005), para *C. langsdorffii*. O DNA foi quantificado em gel de agarose a 1%, corado com Gel RedTM. Procedeu-se à amplificação de regiões de microssatélites por meio de reações da polimerase em cadeia (PCR) utilizando condições descritas por Ciampi et al. (2000). As amplificações foram efetuadas usando-se os conjuntos de iniciadores (*primers*) discriminados na Tabela 1. A reação de amplificação de 10 µL foi realizada utilizando-se 1 ng de DNA genômico, 200 uM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,25 µM de cada par de *primers* 3' e 5' (*forward e reverse*), 1X Go Taq Master Mix PROMEGA e água MiliQ estéril até completar o volume total da reação.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador marca Eppendorf. Os locos amplificados foram separados sob condições desnaturantes em gel contendo 5% de poliacrilamida (8M), 420g de uréia e 10 X TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). 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.

3.2.4 Análises dos dados

A diversidade genética para amostra dos adultos e sub-adultos da população foi caracterizada para o número total de alelos nos locos (k), número médio de alelos (A), número efetivo de alelos por locos (A_e), heterozigiosidade observada (H_o) e esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e). Os níveis de endogamia dentro das amostras foram quantificados pelo índice de fixação (F) de acordo com o método de Weir e Cockerham (1984). A significância estatística dos valores de F foram testados por permutação (10.000). Aplicou-se também neste caso uma correção sequencial de Bonferroni pra múltiplas comparações (95%,

$\alpha=0,05$) para evitar falsos positivos. Todas estas análises foram realizadas com o uso do programa FSTAT, versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002).

As estimativas do fluxo gênico contemporâneo a partir do pólen e de sementes (sub-adultos) foram realizadas utilizando análise de parentesco e o programa CERVUS 3.0 (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI et al., 2007). As análises de maternidade e paternidade foram conduzidas a partir dos genótipos de 65 sub-adultos (DAP<40 cm) e dos 47 genótipos dos adultos (DAP≥40 cm). O fluxo gênico crítico ou, em outros termos, 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 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 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 sub-adulto 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 sub-adulto foi usado para inferir a distância de dispersão de sementes. Quando um genótipo sub-adulto tinha dois candidatos determinados dentro da população, o candidato localizado mais próximo ao sub-adulto foi considerado como o parental materno e o mais distante como o parental paterno. Embora esse procedimento possa introduzir alguns erros na estimativa da distância direta de dispersão de sementes, o mesmo 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 monóicas e hermafroditas (DOW; ASHLEY, 1998, SCHUELER et al., 2006, NAKANISHI et al., 2008).

Foram extraídas as informações referentes a distância entre o subadulto e seu provável parental materno que forneceram as distâncias de dispersão de sementes e a distância entre os prováveis parentais paternos e maternos que forneceram a distância de dispersão de pólen. A taxa de imigração de pólen e sementes (m) foi calculada como a proporção de sementes que não tiveram um candidato a pai ou mãe determinado dentro das populações ($n_{imigrante}$) em relação ao total de sementes genotipadas (n_{total}) dentro da população, $\hat{m} = \hat{n}_{imigrante} / n_{total}$ (BURCZYK et al., 1996, BURCZYK et al., 2004, SMOUSE; SORK, 2004). Também foi estimado o coeficiente de coancestria entre os sub-adultos e os putativos parentais maternos e paternos determinados por análise de paternidade. O valor esperado para o coeficiente de coancestria entre um pai e um filho é de 0,25.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existem indícios de que *C. langsdorffii* possa regenerar vegetativamente a partir das raízes. Contudo, a inspeção dos genótipos microssatélites não indicou a presença de clones na população, visto que não houve genótipos idênticos.

A população de *C. langsdorffii* apresentou um alto nível de diversidade genética para os locos analisados. Os adultos apresentaram um número menor de alelos (142) do que o observado nos sub-adultos (164), sendo 20 alelos exclusivos aos adultos e 41 aos sub-adultos (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 sub-adultos sugere fluxo gênico ou que os parentais não se encontram mais na população.

Tabela 1. Diversidade genética e endogamia em locos microssatélites de árvores adultas e sub-adultas de *Copaifera langsdorffii*. 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; $P_{1^\circ \text{ Parente}}$ é o probabilidades de excluir o primeiro parente (quando nenhum dos parentes é conhecido).

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

EP (95%) % Calculado por reamostragem *jackknife* entre locos.

* $P < 0,05$. ** $P < 0,01$.

Tabela 1. cont...

Loco	k	A_e	H_o	H_e	F	$P_{1^\circ \text{ Parente}}$
Sub-dultos (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%)	$\pm 0,65$	$\pm 0,29$	$\pm 0,012$	$\pm 0,003$	$\pm 0,013$	--
Total	164	--	--	--	--	--

EP (95%) % Calculado por reamostragem *jackknife* entre locos.

* $P < 0,05$. ** $P < 0,01$.

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 sub-adultos (Tabela 1), indicando que há alelos raros (frequência $\leq 0,05$). Todos os índices de diversidade genética, e o índice de fixação foram significativamente diferentes entre adultos e sub-adultos, 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) e a heterozigosidade esperada (H_e) foram maiores nos sub-adultos do que nos adultos, enquanto que a estimativa do índice de fixação (F) foi menor nos sub-adultos que nos adultos. Isso mostra que os sub-adultos 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 sub-adultos do que nos adultos. Uma explicação para este resultado é de que os sub-adultos 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 sub-adultos e para média dos locos em ambos adultos e sub-adultos (Tabela 1), sugerindo desvios das proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido a excesso de homozigotos, provavelmente endogamia. *C. langsdorffii* é espécie predominantemente de cruzamento, embora uma certa taxa de autofecundação (8%) e de

cruzamentos entre parentes (4%) tenham 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 igual ao coeficiente de coancestria na geração parental. Assim, a endogamia observada nos adultos poderia ter sido originada do cruzamento entre irmãos-completos ($\theta_{xy} = 0,25$) e nos sub-adultos do cruzamento entre meios-irmãos ($\theta_{xy} = 0,125$).

Outra explicação para os altos níveis de endogamia observados em ambos adultos e sub-adultos pode ser a presença de alelos nulos segregando nos locos microssatélites. Alelos nulos aumentam o número de indivíduos supostamente homozigotos, visto que apenas um dos alelos amplifica em caso de plantas heterozigotas para o alelo nulo. Existem forte indícios da segregação de alelos nulos nestes 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 multilocos que também poderia ter sido gerado por uma árvore local da população) foi baixo para o primeiro parente [$0,028=(1-0,999447)$]. Assim, o número de sub-adultos 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 paternidade. 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 paternidade 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 sub-adultos 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 parentais determinados dentro da população, provavelmente representam pólen e

sementes de árvores que vivem fora da população, ou de árvores que viviam na presente população e foram cortadas, considerando que este parque sofreu corte seletivo de árvores.

Tabela 2. Dispersão efetiva de sementes e pólen em população de *Copaifera langsdorffii* no Bosque Municipal de São José do Rio Preto.

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

A alta taxa de imigração de sementes e pólen foi inesperada, visto que a referida população encontra-se dentro de um fragmento isolado por área urbana e agricultura e a área encontra-se cercada, o que é uma forte barreira para certos animais dispersores das sementes da espécie. Na região existem outros pequenos fragmentos florestais, mas distantes em pelo menos 3 km. A dispersão de sementes em *C. 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-laranjeira (*Turdus rufiventris*). Estas aves engolem o arilo e regurgitam as sementes (MOTTA JUNIOR; LOMBARDI, 1987). Contudo, 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 nigritus*) também atuam provavelmente como dispersores (MENDONÇA FILHO, 1996), mas devido à fragmentação intensa da região, e possível que estes não ocorram mais na região. Assim, uma explicação para esta alta taxa de imigração de sementes e pólen e de que os parentais desses sub-adultos não ocorram mais na população e região, devido ao corte seletivo de árvores e fragmentação da paisagem local.

Para os sub-adultos que tiveram pelo menos um suposto parental 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, Figura 5). Aproximadamente 58% das sementes foram dispersas até 30 m, embora uma alta taxa também (33%) tenha sido dispersos na distância de 70 m da putativa árvore materna.

Com base em apenas duas árvores sub-adultas que tiveram o suposto parental paterno determinado dentro da área, verificou-se que o pólen foi disperso a uma distância maior que

as sementes (93 e 143 m). Contudo, este tamanho amostral é insuficiente para tirarem-se conclusões consistentes sobre o padrão de dispersão de pólen. Uma interpretação mais acurada deste padrão poderá ser observada com regenerantes e sementes de polinização aberta.

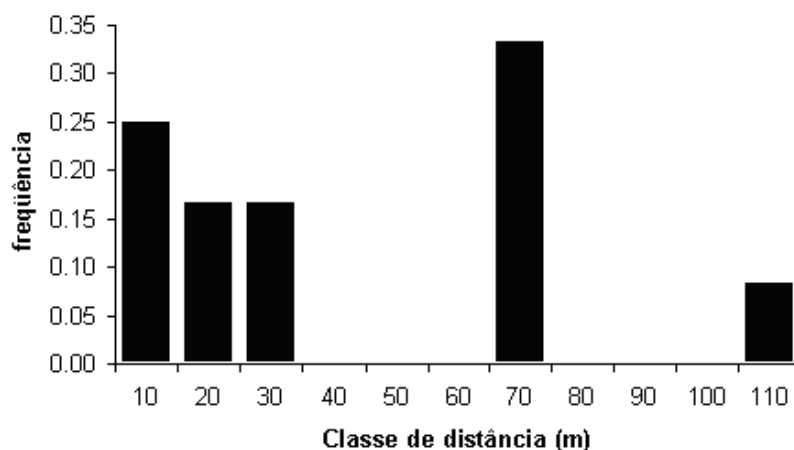


Figura 5. Distância de dispersão de sementes de *Copaifera langsdorfii* determinada por análise de paternidade nos sub-adultos.

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 sub-adultos e as supostas mães determinadas por análise de paternidade variaram de 0,219 a 0,538, com média de 0,349 (Tabela 2), reforçando a hipótese destes indivíduos serem realmente parentes. O coeficiente de parentesco entre os dois sub-adultos e os supostos 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 para os esperados (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 para o genótipo A_3A_4 pode gerar filhos com genótipo A_1A_3 e A_2A_4 . 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 entre si, 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 considerado que as estimativas obtidas refletem o parentesco esperado entre pais e filhos.

3.4 CONCLUSÕES

1. A população de *Copaifera langsdorfii* estudada é pequena. No entanto apresenta altos níveis de diversidade genética nas gerações adulta e sub-adulta;
2. Não houve clones na população;
3. No passado ocorreu uma alta taxa de imigração de sementes e pólen na população, o que explica a alta diversidade genética presente na população;
4. As sementes são dispersas a distâncias mais curtas do que o pólen o que proporcionou a ocorrência de estrutura genética espacial.

4. Fluxo gênico via pólen e semente de *Copaifera langsdorffii* Desf. em pequeno fragmento florestal

RESUMO

Os padrões de dispersão de pólen e sementes e a estrutura genética espacial (EGS) foram investigados em um pequeno (4,8 ha) e isolado fragmento florestal da árvore tropical *Copaifera langsdorffii*, utilizando análise de paternidade e oito locos microssatélites. Todas as 112 árvores adultas e os 128 regenerantes encontrados no povoamento foram amostrados, mapeados e genotipados. Não foi detectada imigração de sementes ($m_{sementes} = 0$) e a imigração de pólen foi baixa ($m_{pólen} = 0,047$). A taxa de autofecundação foi também baixa no estágio de regenerantes ($s=0,078$). A distância média de dispersão realizada de pólen dentro do fragmento foi 94 m, com 81% do pólen sendo disperso a menos do que 150 m. Embora foi observada uma correlação significativa e negativa entre a frequência e a distância de dispersão de pólen ($r = -0,79$, $P < 0,01$), o teste Kolmogorov-Smirnov's ($D=0,092$, $P=0,26$) indicou que o padrão observado de dispersão de pólen pode ser explicado pela distribuição espacial das árvores no fragmento. A distância média de dispersão de sementes foi mais curta (61 m) do que a do pólen, com 82% dos regenerantes crescendo dentro de 100 m de raio da árvore materna. Em concordância, foi observado um significativo EGE para ambos adultos (~50 m) e regenerantes (~20 m). Os padrões de estrutura genética espacial para ambos alelos maternos e paternos foram similares, com coeficiente de coancestria na primeira classe de distância (10 m) próximo ao valor esperado em progênies de meios-irmãos (0,125). Os resultados mostram que o isolamento espacial da população pela fragmentação do habitat pode restringir o fluxo de pólen e sementes e aumentar a estrutura genética espacial nas futuras gerações.

Palavras-chave: *Copaifera langsdorffii*, árvores tropicais, locos microssatélites, dispersão de sementes, dispersão de pólen, estrutura genética espacial.

ABSTRACT

Pollen and seed dispersal patterns and spatial genetic structure (SGS) were investigated in a small (4.8 ha) and isolated forest fragment of the tropical tree *Copaifera langsdorffii*, using paternity analysis and eight microsatellite loci. All 112 adult trees and 128 seedlings found in the stand were sampled, mapped and genotyped. No seed immigration was detected ($m_{seeds} = 0$) and pollen immigration was very low ($m_{pollen} = 0.047$). Selfing rate was also very low at the seedling stage ($s=0.078$). The average distance of realized pollen dispersal within the stand was 94 m, with 81% of the pollen traveling lesser than 150 m. Although we observed a significant negative correlation between the frequency and the distance of pollen dispersal ($r = -0.79$, $P < 0.01$), the Kolmogorov-Smirnov's test ($D=0.092$, $P=0.26$) indicated that the observed patterns of pollen dispersal can be explained by the spatial distribution of the trees in the stand. The average seed dispersal distance was shorter (61 m) than pollen, with 82% of the seedlings growing within a 100 m radius from the mother-tree. Accordingly, a significant SGS for both adult (~50 m) and seedlings (~20 m) was found. Patterns of SGS for maternal and paternal alleles were similar, with coancestry coefficients in the first distance

class (10 m) close to the expected value in half-sib families (0.125). Our results showed that the spatial isolation of populations by habitat fragmentation can restrict pollen and seed gene flow and increase the spatial genetic structure in future generations.

Keywords: *Copaifera langsdorffii*, tropical trees, microsatellite loci, seed dispersal, pollen dispersal, spatial genetic structure.

4.1 INTRODUÇÃO

Há décadas o homem vem explorando as florestas de forma desordenada, e a cada ano que passa novas formas de usos são descobertas, provocando a extinção de um grande número de espécies nos diferentes biomas do planeta, especialmente naqueles situados nos trópicos. Entre as várias causas dessas extinções, as mais comuns são a perda e a fragmentação de habitats (OLIVEIRA, 2000). A maior parte dos remanescentes florestais se encontra na forma de fragmentos, os altos índices de extinção por ação antrópica não comprometem somente a viabilidade dos ecossistemas, mas também a qualidade de vida humana, uma vez que podem gerar graves desequilíbrios ambientais. Além disto, possivelmente diversas espécies são extintas antes mesmo de serem identificadas pela comunidade científica e terem suas potencialidades de uso descobertas (PRIMACK; RODRIGUES, 2006).

Se as populações mantiverem-se isoladas e pequenas por longas gerações, pode-se esperar um aumento da estrutura genética espacial e, portanto, da endogamia por cruzamento entre parentes e, conseqüentemente, uma perda rápida de diversidade genética. Os três mais óbvios efeitos genéticos da fragmentação são: a) perda de diversidade genética no nível de população e espécie; b) aumento da estrutura genética entre as populações e; c) aumento da endogamia (YOUNG; BOYLE, 2000). Por outro lado, se as populações mantiverem certos níveis de fluxo gênico e ocorrer um crescimento da população, estes efeitos podem ser minimizados e a variabilidade genética das populações pode voltar aos níveis pré-fragmentação (JUMP; PENUELAS, 2006). A resposta das espécies a estes efeitos vai depender das suas características genéticas e ecológicas, como sistema de reprodução, síndrome de dispersão, longevidade, nível de ploidia e demografia (YOUNG; BOYLE, 2000), afetando diretamente as futuras gerações das populações, porque reduz o número de indivíduos reprodutivos, desencadeando a deriva genética no processo de recombinação dos gametas a cada geração. 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).

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 (SORK; SMOUSE, 2006). Em populações naturais o fluxo gênico intenso pode efetivamente contrapor os efeitos detrimenais da deriva genética ou seleção direcional e pode ser a origem de novos alelos nas populações (BURCZYK et al., 2004). Para prever as mudanças genéticas causadas pela fragmentação em populações de espécies arbóreas tropicais, é necessário estudar o fluxo gênico contemporâneo via sementes e via pólen (HAMILTON, 1999, HAMRICK, 2004) e caracterizar a distribuição genética espacial e a vizinhanças reprodutivas. Tais análises incluem a determinação da paternidade de sementes de polinização aberta e da distância entre a planta materna e o doador de pólen (NASON et al., 1996), bem como da distância de dispersão das sementes (BURCZYK et al., 2004).

Segundo Leite e Lleras (1993), a espécie *Copaifera langsdorffii* (Leguminosae-Caesalpinioideae) é conhecida como copaíba e óleo-de-copaíba, apresenta uma grande importância no Brasil, por estar distribuída por todo o território (da Amazônia a Santa Catarina, no nordeste e centro-oeste) e por possuir quatro diferentes variedades: *C. langsdorffii* var. *grandifolia*, *grandiflora*, *laxa* e *glabra* (LEITE; LLERAS, 1993). Ocorre principalmente nas áreas de floresta semidecídua e bordas da mata, apresenta folhas alternas, as folhas novas são avermelhadas, compostas paripinadas, com 3 a 5 jugos, folíolos opostos ou alternos, glabros, as flores são brancas, pequenas, hermafroditas, reunidas em panículas terminais, os frutos são legumes deiscentes com 3,5 a 4,0 cm, com uma semente preta exalbuminosa ovóide envolvida por arilo de cor laranja, sendo dispersa por animais, principalmente aves (ALMEIDA et al., 1998, PEDRONI et al, 2002, CARVALHO, 2003).

É uma árvore tropical, hermafrodita, as abelhas (*Apis mellifera* e *Trigona* sp) são o principal agente polinizador e as aves o agente dispersor das sementes (MOTTA JUNIOR, 1990). As flores são reunidas em inflorescências paniculadas, terminais, multifloras, com uma média de 125 flores, (FREITAS; OLIVEIRA, 2002). A floração pode iniciar a partir do cinco anos de idade, a dispersão das sementes envolve, gravidade, zoocoria e hidrocória, devido a sua ocorrência freqüente junto aos cursos dos rios (CARVALHO, 2003). O óleo é de uso medicinal considerado antiinflamatório, cicatrizante e anticancerígeno usado para tratamento de úlceras, sinusites, inflamações de pele, rins e garganta, utilizado na manufatura de

sabonetes, cremes e espumas de banho, xampus, cremes condicionadores loções hidratantes e capilares (CARVALHO, 1994, ALMEIDA et al., 1998). A madeira tem a superfície é lisa, lustrosa, durável, de alta resistência a ataque de xilófagos e baixa permeabilidade, usada para a construção civil, como vigas, caibros, ripas, batente de portas e janelas, própria para fabricação de peças torneadas e de marcenaria em geral (CARVALHO, 1994, LORENZI, 2002).

Os objetivos deste estudo foram investigar os padrões de dispersão de sementes e pólen e a estrutura genética espacial em uma pequena população isolada e fragmentada de *C. langsdorffii* do Bosque Municipal de São José do Rio Preto, um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual, usando locos microssatélites, análise de paternidade e análise da distribuição espacial de genótipos. Para tanto, foram amostrados todos indivíduos e a regeneração. As seguintes questões foram acessadas: i) Qual é a taxa de imigração de pólen e sementes no fragmento? ii) Qual é a taxa de cruzamento no estágio de sementes? iii) Qual é a distância e como são os padrões de dispersão de sementes e pólen dentro da área de estudo? iv) Existem diferenças na distribuição espacial dos genótipos entre adultos e regenerantes na população?

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Área de estudo e amostragem

Foram amostradas, mapeadas (georeferenciadas com um GPS) e medidos para o diâmetro a altura do peito (DAP) 112 árvores adultas reprodutivas ocorrentes no Bosque Municipal de São José do Rio Preto, o qual compreende 4,8 ha de floresta semi-decídua e localiza-se nas imediações periféricas do município (Figura 6). O DAP variou de 15 a 93 cm. Também foram amostrados e mapeados todos os 128 indivíduos da regeneração entre 7 a 116 cm de altura.

Tecidos foliares de 106 árvores adultas e das 128 regenerações foram coletados, identificados, acondicionados em sacos de papel e armazenados em caixa de isopor com sílica gel. Das seis das maiores árvores o câmbio foi retirado do tronco e acondicionado em micro tubos de marca Eppendorf em solução de ethanol a 70% (Figura 6), em seguida foram transportados para o Laboratório de Genética de Populações e Silvicultura (LGPS), da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira/UNESP para os estudos genéticos iniciais.



Figura 6. Indivíduos de *C. langsdorffii* dispersos na a área do Bosque Municipal de São José do Rio Preto. A - D. Fotos: *Alexandre Marques*.

4.2.2 Análise de microssatélite

O material vegetal foi submetido à extração de DNA genômico total e a amplificação através de reações da polimerase em cadeia (PCR) de regiões de microssatélites utilizando oito *primers* SSR. A extração de DNA foi efetuada com base na metodologia de DOYLE; DOYLE (1990) modificada por Alzate-Marin et al. (2005), para *C. langsdorffii*. O DNA foi quantificado em gel de agarose a 1%, corado com Gel RedTM. Procedeu-se à amplificação de regiões de microssatélites através de reações da polimerase em cadeia (PCR) utilizando condições descritas por Ciampi et al. (2000). As amplificações foram efetuadas usando-se os conjuntos de iniciadores (*primers*) discriminados na Tabela 1. A reação de amplificação de 10 μ L foi realizada utilizando-se 1 ng de DNA genômico, 200 μ M de cada dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,25 μ M de cada par de *primers* 3' e 5' (*forward e reverse*), 1X Go Taq Master Mix PROMEGA e água MiliQ estéril até completar o volume total da reação.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador marca Eppendorf. Os locos amplificados foram separados sob condições desnaturantes em gel contendo 5% de poliacrilamida (8M), 420g de uréia e 10 X TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). 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.

4.2.3 Análises estatísticas

4.2.3.1 Análises da diversidade genética e endogamia

O teste de desequilíbrio gamético entre os pares de locos de cada amostra foi calculado pelo teste G de máxima verossimilhança. As probabilidades de significância do teste foram obtidas por permutação (10000) e aplicando uma correção seqüencial de Bonferroni para múltiplas comparações (95%, $\alpha=0,05$). A diversidade genética para amostra dos adultos da população foi caracterizada para o número total de alelos nos locos (k), número médio de alelos (A), número efetivo de alelos por locos (A_e), heterozigosidade observada (H_o) e esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e). Os níveis de endogamia dentro das amostras foram quantificados pelo índice de fixação (F) de acordo com o método de Weir e Cockerham (1984). Os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram testados pelos valores individuais dos locos para o índice de fixação na população e utilizando o teste exato de Fisher e 1000 permutações. Aplicou-se também neste caso uma correção seqüencial de Bonferroni pra múltiplas comparações (95%, $\alpha=0,05$) para evitar falsos positivos. Todas estas análises foram realizadas utilizando o programa Fstat, versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002).

4.2.3.2 Análises da coancestria e do tamanho efetivo da população

Para conhecer o parentesco e a representatividade genética das árvores adultas reprodutivas das populações e regenerantes foram estimados os coeficientes de coancestria entre todos os pares de árvores (θ_{ij}) dentro das populações, usando o programa Spagedi (Hardy; Vekemans, 2002), os quais foram utilizados para calcular o coeficiente médio de coancestria dentro das populações (Θ_{xy}), que em termos práticos representa a endogamia que poderá ser gerada na geração descendente após cruzamentos aleatórios:

$$\hat{\Theta}_{xy} = \frac{0,5n(1 + \hat{F}_p) + \sum_{i=1}^n \sum_{i \neq j}^n \hat{\theta}_{ij}}{n^2} \quad (\text{SEBBENN; SEOANE, 2005}),$$

em que n representa o número de indivíduos na população, e F_p representa o coeficiente médio de endogamia na geração parental. O coeficiente Θ_{xy} foi então usado para calcular o

tamanho efetivo das árvores adultas (N_e) na população usando o método de Cockerham (1969): $N_e = 0,5 / \Theta_{xy}$. Também se estimou a relação entre o tamanho efetivo e o tamanho da população (n), N_e / N .

4.2.3.3 Análises da distribuição espacial dos genótipos

A distribuição espacial dos genótipos foi analisada para árvores adultas e regenerantes conjuntamente, separadamente para adultos e para regenerantes. Estas análises foram realizadas utilizando-se a estimativa do coeficiente de coancestria entre pares de árvores (θ_{xy}) proposto de Loiselle et al. (1995). O coeficiente θ_{xy} mede a extensão da similaridade entre os indivíduos X e Y, relativo a similaridade genética média entre dois indivíduos aleatórios da amostra (Hardy; Vekemans, 2002). Este coeficiente é definido para cada k-ésimo alelo do l-ésimo loco em cada par de indivíduos, x e y, como:

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

em que p_{xlk} e p_{yjk} são as freqüências 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 freqüência média do alelo k no loco l na subpopulação 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 θ_{xy} foram calculados para a média de pares de indivíduos dentro das classes de distância determinadas. Foram utilizadas 14 classes de distância de 5 m cada em cada geração. Para testar se os valores médios eram significativamente diferentes de zero, o intervalo de confiança a 95% de probabilidade foi calculado para cada valor observado em cada classe de distância, usando permutação (1000) de indivíduos entre diferentes classes de distância. O intervalo de confiança foi usado para construir o correlograma. Estas análises também foram conduzidas utilizando o programa Spagedi versão 1.2.

4.2.3.4. Análise do fluxo gênico contemporâneo

As estimativas do fluxo gênico contemporâneo a partir do pólen e de sementes (adultos e regenerantes) foi realizada utilizando análise de parentesco com uso do programa CERVUS 3.0 (MARSHALL et al., 1998, KALINOWSKI et al., 2007). Os 128 regenerantes foram usados para o estudo da dispersão de pólen e sementes, utilizando todas as 112 árvores adultas reprodutivas como candidatos maternos e paternos. O fluxo gênico crítico ou, em outros termos, 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 e Ashley (1998). Como todas as árvores da população apresentaram o seu genótipo determinado e sua posição espacial conhecida, em termos de coordenadas X e Y, as plantas que tiverem o pai determinado dentro das populações foram utilizadas para determinar com precisão as distâncias mínima, máxima, média e mediana de dispersão de pólen na população. A partir destas estimativas, uma média ponderada pela frequência de dispersão de pólen foi calculada. Quando um regenerante apresentou 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 regenerante foi usado para inferir a distância de dispersão de sementes. Quando um genótipo regenerante tinha dois candidatos determinados dentro da população, o candidato localizado mais próximo do regenerante foi considerado como o parental materno e o mais distante como o parental paterno. Embora isso possa introduzir alguns erros na estimativa da distância direta de dispersão de sementes, este método é 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 monóicas e hermafroditas (DOW; ASHLEY, 1998, 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 tiveram um candidato a pai ou mãe determinada dentro das populações ($n_{imigrante}$) em relação ao total de sementes genotipadas (n_{total}) dentro da população, $\hat{m} = \hat{n}_{imigrante} / n_{total}$ (BURCZYK et al., 1996, BURCZYK et al., 2004, SMOUSE; SORK, 2004). Para investigar se o sucesso reprodutivo era uma função da distância entre árvores, foi comparado a distribuição de frequências da dispersão de pólen com a distribuição

de frequência da distancia entre todas as árvores do fragmento, utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov (Sokal and Rohlf 1995). Também foi estimado o coeficiente de coancestria entre os regenerantes e os supostos parentes maternos e paternos determinados por análise de paternidade. O valor esperado para o coeficiente de coancestria entre um pai e um filho é 0,25.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Estrutura populacional

A distância espacial entre as árvores adultas amostradas variou entre 0,59 a 257 m. Observando-se a distribuição diamétrica da população de *C. langsdorffii* do Bosque Municipal de São José do Rio Preto, verifica-se a ausência de árvores juvenis com DAP entre 1 e 15 cm (Figura 7). O menor DAP detectado dentro da área tinha 15,9 cm, o que corresponde a uma idade entre 11 a 36 anos, considerando um incremento médio anual (IMA) em DAP variando entre 0,436 e 1,46 cm (CARVALHO, 2003). Existe regeneração relativamente intensa na área (Figuras 7 e 8). A altura dos indivíduos regenerantes variou de 7 a 116 cm, sugerindo que algumas plantas tenham no máximo dois anos de idade, considerando um incremento médio anual (IMA) em altura variando entre 46 a 108 cm (CARVALHO, 2003). Contudo, observou-se (Figura 8) que a maior parte da regeneração não ultrapassa os 40 cm de altura. A ausência de plantas nas primeiras classes diamétricas indica que algum fator está impedindo que os regenerantes atinjam a idade adulta. Uma explicação para este padrão populacional pode ser o manejo da área por capinas, visando eliminar a regeneração, visto que se trata de um parque público. Se for constatado que realmente tem ocorrido capinas constantes na área ocupada pela população, esta atividade de manejo deverá ser interrompida, visto que aparentemente está afetando o desenvolvimento da população. Outra explicação pode ser a intensa predação na área devido à falta de florestas na região.

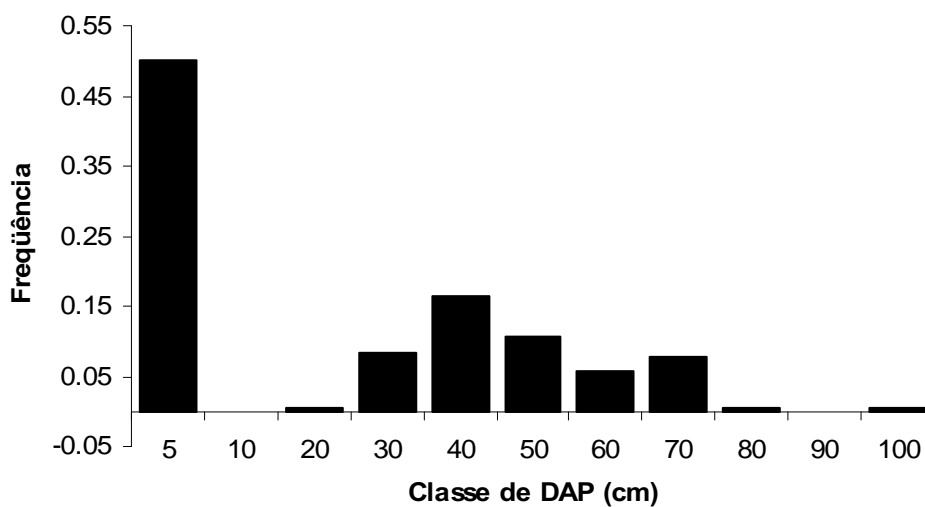


Figura 7. Distribuição de frequências do diâmetro a altura do peito (DAP) de todos os genótipos adultos e da regeneração de *Copaifera langsdorffii* amostrados no Bosque Municipal de São José do Rio Preto.

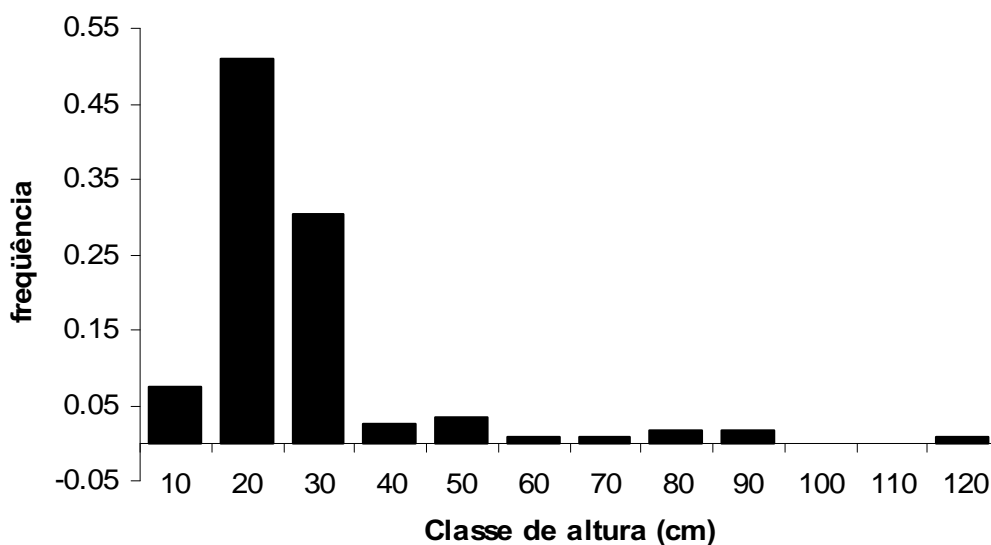


Figura 8. Distribuição de frequências da altura das plantas da regeneração de *Copaifera langsdorffii* amostrados no Bosque Municipal de São José do Rio Preto.

4.3.2 Diversidade genética, endogamia e desequilíbrio de ligação nos locos da amostra total

A presente população de *C. langsdorffii* apresentou um alto nível de polimorfismo e diversidade genética para os oito locos microssatélites analisados. Da amostra total dos oito locos em 240 genótipos foram observados 186 alelos (Tabela 3), indicando um alto nível de polimorfismo. O número de alelos por loco variou de 13 (CL06) a 34 alelos (CL32), com média de 23,25 alelos por loco. O número efetivo de alelos por locos foi menor do que o número médio de alelos por locos, variando de 5,02 a 12,66 alelos, com média de 8,67 alelos, indicando que muitos alelos são raros ($p \leq 0,05$). A heterozigosidade observada variou de 0,562 (CL06) a 0,879 (CL01), com média de 0,774. A heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi maior que a observada em todos os locos e para média dos locos, variando de 0,802 (CL06) a 0,921 (CL01), com media de 0,878.

Tabela 3. Diversidade genética e endogamia na amostra agrupada de árvores adultas e regenerantes de *Copaifera langsdorffii*. n é o tamanho da amostra; 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.

Loco	n	Tamanho dos fragmentos (pb)	k	A_e	H_o	H_e	F
CL01	223	152-240	33	12,66	0,879	0,921	0,046
CL02	236	236-312	29	9,62	0,771	0,896	0,140 *
CL06	235	126-178	13	5,05	0,562	0,802	0,299 *
CL20	181	100-148	14	7,25	0,856	0,862	0,007
CL27	216	176-238	20	8,13	0,796	0,877	0,092 *
CL32	218	142-250	34	8,70	0,807	0,885	0,088 *
CL34	229	192-266	24	8,77	0,799	0,886	0,098 *
CL37	224	118-176	19	9,17	0,719	0,891	0,193 **
Média	--	--	23,25	8,67	0,774	0,878	0,118 *
Total	240	--	186	--	--	--	--

$P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Existem indícios de que *C. 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 não havia genótipos idênticos.

O índice de fixação foi positivo e significativamente diferente de zero em seis locos e para média dos locos, variando de 0,007 (CL20) a 0,299 (CL06), com média de 0,118, sugerindo desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido a excesso de homozigotos, provavelmente endogamia (Tabela 3). *C. langsdorffii* é uma espécie predominantemente de cruzamento, embora certa taxa de autofecundação (8%) e de cruzamentos entre parentes (4%) tenham sido detectados em populações naturais (OLIVEIRA et al., 2002). 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 progênies e na população parental e s é taxa de autofecundação], enquanto que o cruzamento entre parentes gera endogamia em uma taxa de igual ao coeficiente de coancestria na geração parental. Assim, o nível médio de endogamia observada na presente população poderia ter sido originado do cruzamento entre meios-irmãos ($\theta_{xy} = 0,25$).

O equilíbrio de ligação em locos marcadores é uma das pressuposições básicas para sua utilização em análise de diversidade e estrutura genética, sistema de reprodução e análise de paternidade. Dos 56 testes realizados entre os pares de locos avaliados nos adultos e regenerantes, três pares nos regenerantes sugerem indícios de desequilíbrio gamético (Tabela 4), após a correção de Bonferroni ($\alpha=0,05$). Contudo, como este desequilíbrio foi encontrado apenas nos regenerantes e não nos adultos, isto é um indicativo de deriva genética e não ligação física entre locos, caso contrário o mesmo resultado deveria ter sido observado em ambas gerações. Portanto, estes locos não estão ligados e podem ser usados em estudos da estrutura e diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico contemporâneo, visto que não vão gerar vícios nessas estimativas.

Tabela 4. Desequilíbrio de ligação entre os locos de árvores adultas e regenerantes de *Copaifera langsdorffii*. Os valores na tabela são as probabilidades após 1000 permutações. O valor limite de significância após correção de Bonferroni é 0,000893.

Pares de locos	Adultos	Regenerantes
CL01 X CL02	0,28393	0,00804
CL01 X CL06	0,72054	0,00089
CL01 X CL20	0,10714	0,46786
CL01 X CL27	0,08393	0,34821
CL01 X CL32	0,00893	0,03839
CL01 X CL34	0,04554	0,00089
CL01 X CL37	0,48929	0,00893
CL02 X CL06	0,21071	0,01071
CL02 X CL20	0,96339	0,22857
CL02 X CL27	0,55000	0,22768
CL02 X CL32	0,34375	0,00714
CL02 X CL34	0,81429	0,04196
CL02 X CL37	0,24911	0,01250
CL06 X CL20	0,89821	0,04554
CL06 X CL27	0,09821	0,03304
CL06 X CL32	0,36607	0,07321
CL06 X CL34	0,01607	0,10536
CL06 X CL37	0,30893	0,02768
CL20 X CL27	0,22232	0,14464
CL20 X CL32	0,40446	0,11607
CL20 X CL34	0,85536	0,16696
CL20 X CL37	0,05893	0,05804
CL27 X CL32	0,05268	0,00357
CL27 X CL34	0,07679	0,24107
CL27 X CL37	0,41161	0,00893
CL32 X CL34	0,43214	0,00893
CL32 X CL37	0,71518	0,00089
CL34 X CL37	0,06875	0,00446

4.3.3 Diversidade genética e endogamia nas gerações

A presente população de *C. langsdorffii* apresentou um alto nível de polimorfismo e diversidade genética para os oito locos microssatélites analisados (Tabela 5). Os adultos

apresentaram um número muito maior de alelos (186) do que o observado nos regenerantes (132), e nenhum alelo exclusivo foi encontrado nos regenerantes. Isso 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. Contudo, a heterozigosidade média observada foi significativamente maior nos regenerantes ($\hat{H}_o=0,788$) do que nos adultos ($\hat{H}_o=0,757$). Já a heterozigosidade esperada foi significativamente maior nos adultos ($\hat{H}_e=0,893$) do que nos regenerantes ($\hat{H}_e=0,838$). O índice de fixação foi positivo e significativamente diferente de zero em ambos adultos e regenerantes, sugerindo endogamia.

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. No entanto, estes altos níveis de endogamia detectados nos adultos podem ter outras explicações, como a presença de alelos nulos nos adultos em alta frequência ou efeito Wahlund, devido à presença de estrutura genética espacial na população, como será discutido posteriormente.

Tabela 5. Diversidade genética e endogamia em locos microssatélites de árvores adultas e regenerantes de *Copaifera langsdorffii*. k é o número total de alelos; 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 probabilidades de excluir o primeiro parente (quando um dos parentes é conhecido).

Locus	Adultos (N=112)					Regenerantes (N=128)			
	A	H_o	H_e	F	$P_{1^\circ \text{ Parente}}$	A	H_o	H_e	F_1
CL01	33	0,909	0,912	0,003	0,308	17	0,850	0,885	0,144*
CL02	29	0,723	0,909	0,205*	0,311	21	0,815	0,881	0,085
CL06	13	0,477	0,829	0,425*	0,509	7	0,637	0,716	0,257*
CL20	14	0,818	0,855	0,043	0,459	14	0,885	0,865	-0,011
CL27	20	0,757	0,910	0,168*	0,315	16	0,832	0,830	0,039
CL32	34	0,860	0,931	0,076	0,254	20	0,763	0,805	0,149*
CL34	24	0,832	0,892	0,067	0,362	20	0,770	0,876	0,133*
CL37	19	0,682	0,906	0,247*	0,330	17	0,754	0,847	0,177*
Média	23,2	0,757	0,893	0,152*	--	16,5	0,788	0,838	0,124*
CI95%	$\pm 0,81$	$\pm 0,013$	$\pm 0,030$	--	--	$\pm 0,45$	$\pm 0,008$	$\pm 0,006$	--
Total	186	--	--	--	0,9998	132	--	--	--

* $P < 0,05$. CI95%: Intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade calculada por reamostragem *jackknife*. As medias dos parâmetros A, H_o e H_e são significativamente diferentes entre adultos e regenerantes, de acordo com o intervalo de confiança a 95% de probabilidade. 1: Índice de fixação intra-indivíduo, calculado usando as frequências alélicas dos adultos como referência e o programa Spagedi.

4.3.4 Tamanho efetivo

O coeficiente médio de coancestria entre todos os pares de árvores da população (Θ_{xy}) foi estimado em 0,007798 (Tabela 6). Este valor corresponde à endogamia que poderia ser esperada pelo cruzamento aleatório entre todas as árvores reprodutivas da população. Portanto, por cruzamentos aleatórios seria esperado um nível de endogamia muito menor do que observado na presente população adulta ($F_p = 0,152$). Isto reforça a expectativa de desvios de cruzamento aleatórios e será descrito detalhadamente quando as progênies estiverem genotipadas. Deste coeficiente de coancestria, foi estimado que a população tem um tamanho efetivo baixo, 64,2. Isto significa que as 112 árvores adultas reprodutivas correspondem a apenas 65 árvores não endogâmicas e parentes entre si, resultando em uma relação entre o tamanho efetivo e o número censo de 0,57. Os 128 regenerantes, por sua vez, tinham um tamanho efetivo de 67,4, indicando que estes representam a apenas 68 plantas não parentes e endogâmicas, resultando em uma relação entre N_e/n de 0,52. Esta baixa relação entre o tamanho efetivo e o número de plantas amostradas se deve a alta frequência de alelos idênticos por descendência entre indivíduos dentro da população, advindos da presença de parentesco e endogamia na população.

Tabela 6. Parentesco, tamanho efetivo e número censo em população adulta de *Copaifera langsdorffii*.

Geração	N	Θ_{xy}	N_e	N_e/N
Adultos	112	0,007798	64,2	0,57
Regeneração	128	0,007421	67,4	0,52

4.3.5 Estrutura genética espacial intrapopulacional

O coeficiente de coancestria nos adultos e regenerantes reduziu com o aumento da distância entre as árvores, como esperado em um modelo de isolamento por distância (Figura 9). A estrutura genética espacial foi significativa até a distância aproximada de 50 m nos

adultos e até 20 m nos regenerantes (Figura 9), sugerindo que árvores que ocorrem distantes entre si até esta distância possam ser parentes. O coeficiente de coancestria estimado na primeira classe para os adultos foi de 0,071 e para os regenerantes de 0,127, valores estes que estão entre o esperado entre primos de primeiro grau ($\theta_{xy}=0,0625$) e meios-irmãos ($\theta_{xy}=0,125$). Esta estrutura genética espacial pode ser causada pela dispersão de sementes próximas a árvore materna, dispersão curta de pólen e propagação vegetativa. Embora existam indícios de propagação vegetativa na espécie, nenhum genótipo idêntico foi encontrado na amostra, indicando que esta não é a causa da estrutura observada nesta população. Uma alta taxa de propagação vegetativa é esperada gerar uma forte estrutura genética espacial e um coeficiente de coancestria na primeira classe de distância próximo a 0,5.

A dispersão de sementes a curtas distâncias tem sido considerada como a principal causa da estrutura genética espacial em diversos estudos realizados em espécies arbóreas (DEGEN et al., 2004, HARDY et al. 2006, CARNEIRO et al., 2007, CLOUTIER et al., 2007, LACERDA et al., 2008, SILVA et al., 2008, BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; 2008) e é também a mais provável na presente população de *C. langsdorffii*. A fraca estrutura deve estar associada à dispersão de frutos e sementes por zoocoria. Aves são importantes dispersores das sementes desta espécie e tem o potencial de transportar sementes a longas distâncias. Em um estudo dos dispersores das sementes de *C. langsdorffii* foram observados dez diferentes tipos de pássaros como dispersores, como por exemplo, *Ramphastos toco*, *Cyanacorax cristellus* e *Turdus rufiventris*, entre outros (CARVALHO, 2003). Estes engolem o arilo e regurgitam as sementes. Os macacos *Brachyteles arachnoides* e o *Cebus apella nigrinus* abrem o fruto para retirar o arilo das sementes, que muitas vezes é engolida e liberada nas fezes (CARVALHO, 2003). A dispersão de sementes por estes animais pode explicar a fraca estrutura observada, visto que embora muitas sementes sejam dispersas nas vizinhanças da árvore matriz, a dispersão secundária por animais mistura as sementes de diferentes origens na população, reduzindo a estruturação genética espacial.

É importante ressaltar que a estruturação genética espacial detectada na geração adulta se manteve na regeneração, de fato foi maior na regeneração do que nos adultos, sugerindo que a população esteja sofrendo os efeitos da deriva genética devido à fragmentação.

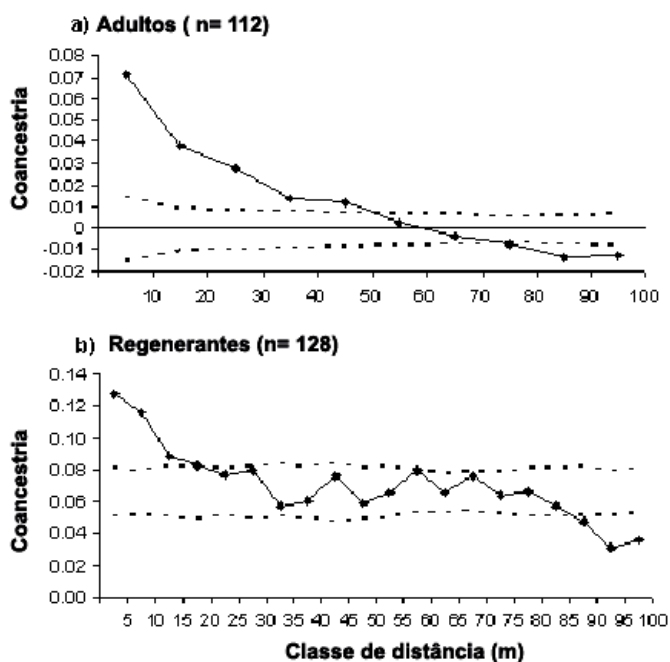


Figura 9. Estrutura genética espacial na população adulta e na regeneração de *Copaiifera langsdorffii* no Bosque Municipal de São José do Rio Preto e na região. A linha contínua refere-se a estimativa do coeficiente de coancestry médio e as linhas pontilhadas referem-se a estimativa do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade da hipótese de ausência de estrutura genética espacial ($H_0: \theta_{xy} = 0$).

4.3.6 Fluxo gênico via pólen e sementes

Dos 128 regenerantes amostrados, foi encontrado o parental materno de todos, indicando ausência de imigração de sementes ($m_{sementes} = 0\%$; Tabela 7). Estas 128 plantas regenerantes foram geradas por 45 (39%) das 112 árvores da população. Cinco destas 45 árvores foram responsáveis pela produção de 32% dos regenerantes. Uma correlação foi aplicada para verificar se a fertilidade das árvores ou capacidade de gerar mais descendentes estava associada ao DAP (Figura 10). Esta correlação foi não significativa e negativa ($R^2 = 0,0005$, $P > 0,05$), indicando que o número de filhos gerados por uma árvore não está associado ao tamanho do DAP.

Tabela 7. Dispersão de pólen e sementes medida nos regenerantes de *Copaifera langsdorffii*.

Amostra	N	s (%)	Dispersão			Distância de dispersão (m)			Coancestria	
			Dentro	Fora		Media	Mediana	Min/Max	Média	Min/Max
Pólen	128	0,78 (1)a	95% (122)	5% (6)	94 ± 55	86	4,9/229	0,252 ± 0,015	0,001/0,527	
Sementes	128	--	100% (128)	0% (0)	61 ± 41	52	1/170	0,255 ± 0,018	-0,110/0,527	

Min/Max: Mínima e máxima distância de dispersão.

N é o tamanho da amostra, s é a taxa de autofecundação. (media ± desvio padrão).

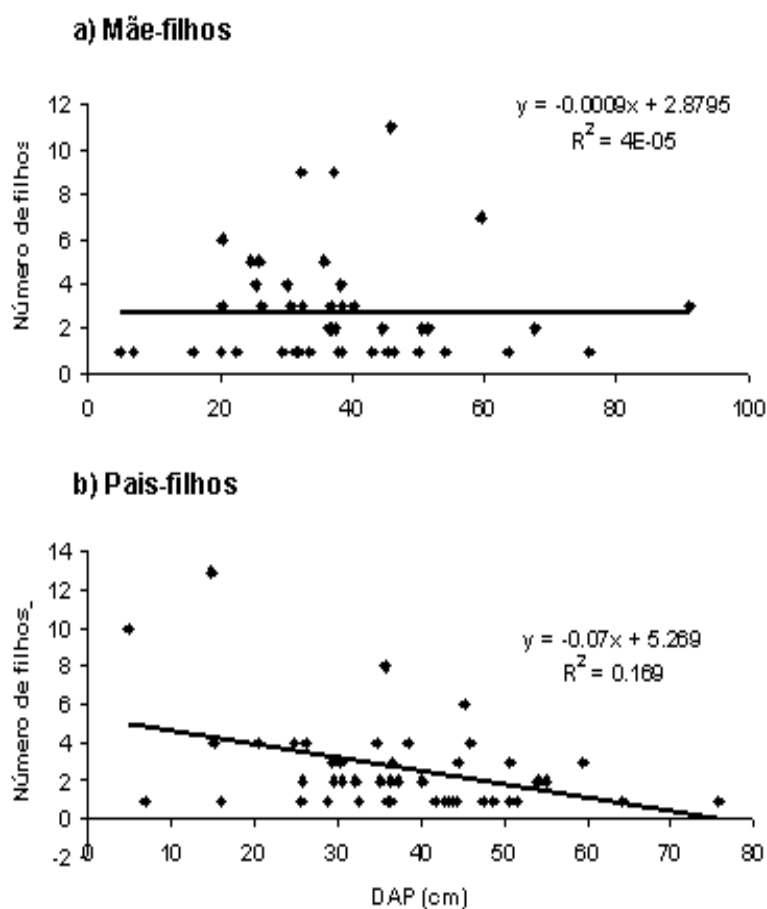


Figura 10. Correlação entre número de filhos gerados por árvores maternas (a) e paternas (b) com seus respectivos diâmetros a altura do peito (DAP).

O parental paterno foi encontrado para 122 dos 128 regenerantes, o que indica uma taxa de imigração de pólen de 4,7% ($m_{pólen}$; Tabela 8). Estes seis outros regenerantes foram originados provavelmente de pólen de árvores localizadas fora do fragmento. Estas 122 plantas regenerantes foram geradas por 46 (40%) das 112 árvores da população. Quatro destas 46 árvores foram responsáveis pela produção de 30% dos regenerantes. Igualmente como foi feito em relação às árvores maternas, uma correção foi aplicada para verificar se a fertilidade das árvores estava associada ao seu DAP. Esta correlação ($r = -0,41$, $P > 0,05$), foi fraca e não significativa, indicando que o número de filhos gerados por uma árvore não está associado ao tamanho do DAP (Figura 10b).

Para os regenerantes, à distância de dispersão de sementes variou de 1 a 170 m, com média de 61 m (Tabela 7, Figuras 11b). Cinquenta por cento das sementes (mediana) foram

dispersas até a distância de 52 m (Tabela 7) e aproximadamente 82% das sementes foram dispersas até 100 m. Detectou-se uma significativa e alta correlação ($r = -0,85$, $P < 0,01$) entre o número de juvenis e a distância da árvore materna (Figura 11b), confirmando que os filhos se regeneram predominantemente nas vizinhanças na árvore materna. Este resultado ajuda a explicar a estrutura genética observada dentro da população. Uma maior taxa de dispersão ocorre em curtas distancias, aparentemente até 30 m da árvore matriz, mas uma segunda alta proporção ocorre em uma distância maior do que 50 m, reduzindo a estrutura genética espacial da população em distâncias maiores do que 50 m.

A distância de dispersão de pólen medida nos regenerantes (Figura 11a, Tabela 7) pela distância entre as árvores determinadas como maternas e as determinadas como paternas, variou entre 4,9 e 229 m, com média de 94 m, e 50% do pólen sendo disperso até 86 m (mediana) e 81% até 150 m. Existe uma significativa e negativa correlação ($r = -0,79$, $P < 0,05$) entre o número de regenerantes fertilizados por doadores de pólen e a distância entre os parentais maternos e paternos (Figura 11a). Isto sugere que os cruzamentos tendem a ocorrer mais freqüentemente entre árvores próximas do que árvores localizadas distantes. Contudo, a comparação entre a curva de distribuição de frequências de dispersão realizada de pólen e a curva de frequência da distância entre todas as árvores reprodutivas da população, usando o teste de Kolmogorov-Smirnov ($D = 0,092$, $P = 0,26$; Figura 12), indicou que estas não são estatisticamente diferentes, sugerindo cruzamentos aleatórios entre os indivíduos da população.

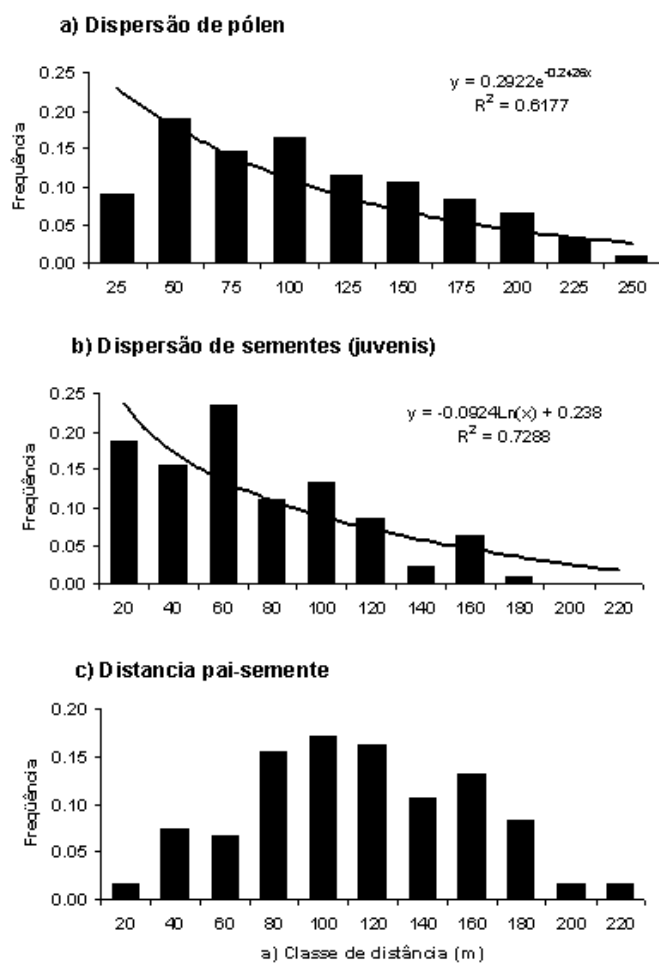


Figura 11. Distância de dispersão de pólen (a), sementes (b) e distância entre os regenerantes e a árvore polinizadora (c), determinada por análise de paternidade nos regenerantes e distância entre todas as árvores adultas da população.

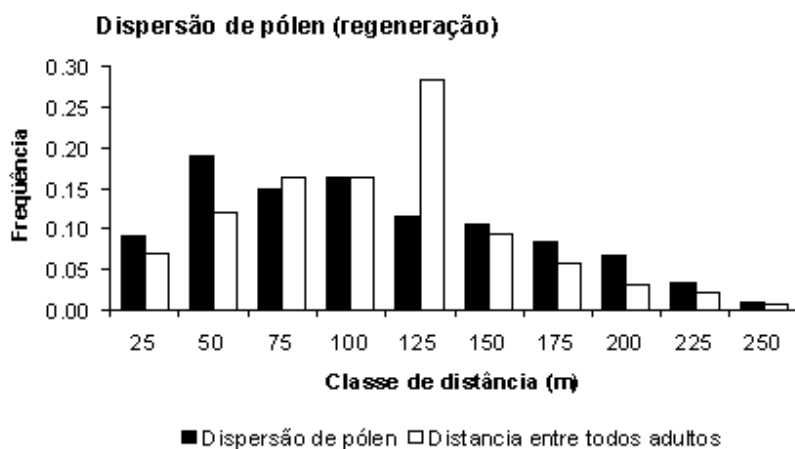


Figura 12. Distância de dispersão de pólen de *Copaifera langsdorfii* determinada por análise de paternidade nos regenerantes e distância entre todas as árvores adultas da população

O coeficiente de coancestria entre regenerantes e as supostas mães determinadas por análise de paternidade variaram de -0,110 a 0,527 e entre os regenerantes e os pais entre 0,001 a 0,527, com média de 0,255 e 0,252, respectivamente (Tabela 7). Em todos os casos o intervalo de confiança a 95% do erro das estimativas, indica que estas são significativamente diferentes de zero. Estes resultados também reforçam a hipótese destes indivíduos serem realmente parentes entre si. Estas diferenças dos valores estimados para o esperado (0,25) se devem às dificuldades em estimar parentesco usando marcadores genéticos, como comentado no capítulo anterior.

Os resultados da estrutura genética espacial das sementes e pólen dispersos foram derivados da análise de 128 e 122 juvenis que tiveram o parental materno e o paterno, respectivamente, determinado dentro da área. Valores significativos e positivos de coancestria foram detectados entre as classes de distância de 0 a 10 m para os alelos maternos e paternos ($P < 0,05$; Figura 13). Os valores de coancestria na primeira classe foram próximos aos esperados entre meios-irmãos para ambos os alelos maternos e paternos (Figura 13). Os valores de coancestria decrescem rapidamente e gradualmente quando a distância aumenta. Os valores positivos para as primeiras classes para os alelos maternos foram similares e não estatisticamente diferentes aos valores observados nos alelos paternos, de acordo com o intervalo de confiança do erro obtido por 1000 permutações. Em estudo similar, Nakanishi et al. (2008), estudando uma geração adulta e uma de regenerante de *Quercus salicina*,

encontraram grandes diferenças na estrutura genética dos alelos maternos e paternos. Os coeficientes de coancestria na primeira classe para os alelos maternos e paternos foram respectivamente de 0,275 e 0,046. Aqui, como visto, embora tenha sido detectada estrutura genética espacial para ambos alelos maternos e paternos, não foram encontradas diferenças entre estes dois grupos. A forte estrutura observada nos alelos maternos e paternos se deve a dispersão altamente localizada de sementes e próxima das matrizes e do cruzamento entre árvores próximas.

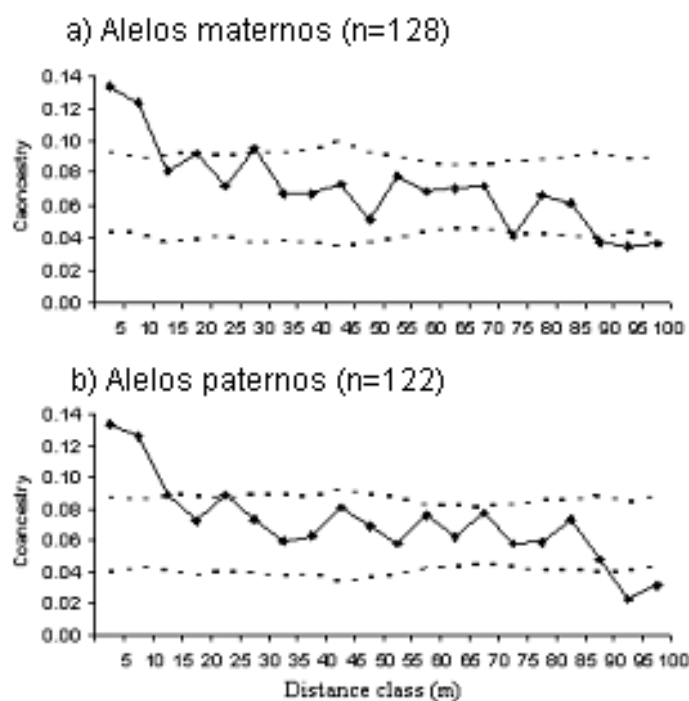


Figura 13. Estrutura genética espacial para gametas femininos (óvulos) e masculinos (pólen) em regenerantes de *Copaifera langsdorffii* no Bosque Municipal de São José do Rio Preto e na região. A linha contínua refere-se a estimativa do coeficiente de coancestria médio e as linhas pontilhadas referem-se a estimativa do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade da hipótese de ausência de estrutura genética espacial ($H_0: \theta_{xy}=0$).

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados de modo geral mostraram a partir da análise dos sub-adultos que no passado ocorreu alta taxa de imigração, tanto de sementes (81%) como de pólen (97%) na população (81%), ou os parentais foram cortados e não estão mais na população. Por outro lado, os resultados obtidos com os regenerantes, que representam o fluxo gênico contemporâneo, mostram justamente o oposto, que atualmente a taxa de imigração de sementes é nula (0%) e de pólen é baixa (5%). Este último resultado é reforçado com a constatação de que a presente população adulta de *Copaifera langsdorfii* apresenta 54 alelos exclusivos, enquanto os regenerantes não apresentam alelos exclusivos, sugerindo ausência de fluxo gênico.

Finalmente, os resultados também mostraram que o isolamento atual da população no pequeno fragmento causou o aumento dos níveis de endogamia e estrutura genética espacial. Isso, por sua vez causou o aumento no parentesco e redução no tamanho efetivo da população regenerante.

6 CONCLUSÕES

1. Os oito locos microssatélites avaliados não estão ligados e segregam independentemente. Portanto, permitem o estudo do fluxo gênico contemporâneo, pois não irão gerar vícios nestas estimativas;
2. O tamanho efetivo da população adulta e dos regenerantes é muito menor do que o tamanho censo, devido à endogamia e presença de parentesco entre os membros da população;
3. Existe estrutura genética espacial dentro da população para árvores adultas e regenerantes;
4. As sementes tendem a ser disperso próximas às árvores matrizes;
5. O pólen tende a ser disperso entre árvores próximas, ocorrendo em baixa frequência entre árvores distantes.

7 REFERÊNCIAS

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

ALENCAR, J. C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne - Leguminosae, na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, Manaus, v.12, n.1, p.75-89, 1982.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M. ; RIBEIRO, J.F. **Cerrado**: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p.464,. 1998.

ALVES, R.M. Caracterização genética de populações de cupuazeiro, *Theodroma grandiflorum* (Will. Ex. Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânicos. 2002. 146 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002.

ALVES, R.M.; SEBBENN, A. M.; ARTERO, A. S.; CLEMENT, C.; FIGUEIRA, A.V.O. High levels of genetic divergence and inbreeding in populations of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Tree Genetics and Genomics**, cidade, v. 3, p.289-298, 2007.

ALZATE-MARIN, A.L.; GUIDUGLI, M.; SORIANI, H.H; MESTRINER, M.A. Otimização de um método econômico e rápido de extração de DNA para quatro espécies de árvores tropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, Águas de Lindóia. **Anais...Águas de Lindóia**:S.n., 2005. p.510. (CD-ROM).

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

AZEVEDO, V.T.C.R. Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chen. Sapotaceae. 2007. 202 p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

BACLES, C.F.E.; ENNOS, R.A. Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior*. L. in a chronically fragmented landscape. **Heredity**, London, v. **101**, p 368–380.doi:10.1038/hdy. 2008.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L. F. **Frutos e sementes. Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, UFV, 1999. 443p.

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 in a continuous forest of *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. **Conservation Genetics**. Publisher. SPRINGER. 10.1007/s10592-007-9411-2, 2008.

BORÉM, E.; CAIXETA, T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Ed. UFV, 2006. 374p.

BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.V.; RANGEL, P.H.N. Utilização de marcadores moleculares em programas de ampliação da base genética de espécies cultivadas. Santo Antônio de Goiás, 2003. 36 p.

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.; DIFAZIO, S.P.; ADAMS, W.T. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel. **Forest Genetic**, Rome, v.11, p.1-14, 2004.

CARNEIRO, F.; 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**, Washington, v.39, p.628-636, 2007.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 640 p.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.1039 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**, Boston, v.16, p.137-147, 2002.

CIAMPI, A.Y.; BRONDANI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera Langsdorffii* Desf. (Copaíba) - Leguminosae-Caesalpinioideae e otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco. Brasília: Embrapa, 2000. 40 p. (Boletim de Pesquisa, 16)

CLOUTIER, D.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A.Y.; SCHOEN, D.J. Impact 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, p.29-34, 1976.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1984. 770p.

COSTA, B.R. (Org.). Fragmentação florestal alternativas de desenvolvimento rural na região Centro-Oeste. Campo grande: UCDB, 2003. 245p.

DAJOZ, R. **Princípios de ecologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed. 2005. 520p.

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

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

DOW, B.D.; ASHLEY, M.V. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. **Heredity**, London, 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. Estimation of gene flow into fragmented populations of *Bursera simaruba* (Burseraceae) in the dry-forest life zone of Puerto Rico. **American Journal of Botany**, Columbus, v.94, p.786-794, 2007.

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 Science**, Chicago, v.165, p.427-436, 2004.

DWYER, D. The Central American, West Indian and South American species of *Copaifera* (Caesalpinioideae). **Brittonia**, Bronx, v.7, n.3, p.143-172, 1951.

FALEIRO, F.G. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas e conservação e uso de recursos genéticos. Brasília: Embrapa Cerrado, 2006. 102p.

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

FREITAS, C.V.; OLIVEIRA, P.E. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.25, n.3, p.311-321, 2002.

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**, Boston, v.17, p.149-157, 2003.

FUKUE, Y.; KADO, T.; LEE, S.L.; NG, K.K.; MUHAMMAD, N.; THUMURA, Y. Effects of flowering tree density on the mating system and gene flow in *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae) in Peninsular Malaysia. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.120, p.413-420, 2007.

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

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

GUERRA, M.E.C.; FILHO, S.M.; GALLÃO, M.I. Morfologia de sementes, de plântulas e da germinação de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 4, p.322-328, 2006.

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

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

HARDESTY, B.D.; HUBBELL, S.; BERMINGHAM, E. Genetic evidence of frequent long-distance recruitment in a vertebrate-dispersed tree. **Ecology Letters**, Oxford, v.9, p.516-525, 2006.

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.

HARDY, O.J.; MAGGIA, L.; BANDOU, E.; BREYNE, P.; CARON, J.; CHEVALLIER, M.H.; DOLIGEZ, A.; DUTECH, C.; KREMER, A.; LATOUCHE-HALLÉ, C.; TROISPOUX V.; VERON, V.; DEGEN, B. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 neotropical tree species. **Molecular Ecology**, Oxford, v.15, p.559-571, 2006.

HIGA, A.R.; SILVA, L.D. **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba: FUFPEF, 2006. 266p.

ISAGI, Y.; SAITO, D.; KAWAGUCHI, H.; TATENO, R.; WATANABE, S. Effective pollen dispersal is enhanced by the genetic structure of an *Aesculus turbinata* populations. **Journal of Ecology**, Oxford, v.95, p.983-990, 2007.

JUMP, A.S.; PENUELAS, J. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.103, p.8096-8100, 2006.

KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M.; RIBAS, L.A.; GANDARA, F.B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M.B.; VENCOVSKY R.. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.64, p.93-107, 2003.

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.6, 1099-1106, 2007.

LACERDA, A.E. ; KANASHIRO, M. ; SEBBENN, A.M. Effects of Reduced Impact Logging on genetic diversity and spatial genetic structure of a *Hymenaea courbaril* population in the Brazilian Amazon Forest. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.255, p. 1034-1043, 2008.

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.

LEITE, A.M.C.; LLERAS, E. Áreas prioritárias na Amazônia para conservação dos recursos genéticos de espécies florestais nativas: fase preliminar. **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v.7, p.61-64, 1993.

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 do Brasil**. 2.ed. São Paulo: Nova Odessa, 2002. v.2, 384p.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUEK, 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.

MARTINS, P.S. Estrutura populacional, fluxo gênico e Conservação "in situ". **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais**, Piracicaba, n.35, p.71-78, 1987.

MENDONÇA FILHO, C.V. **Braúna, angico, jacarandá e outras leguminosas de mata atlântica**: Estação Biológica de Caratinga, Minas Gerais. Belo Horizonte: Fundação Botânica: Margaret Mee: Fundação Biodiversitas: AP.EBC: IEF: FZB-BH: SB-MG, 1996. 100p.

MILLAR, M.A.; BYRNE, M.; NUBERG, I.; SEDGLEY, M. High outcrossing and random pollen dispersal in a planted stand of *Acacia saligna* subsp. *saligna* revealed by paternity analysis using microsatellites. **Tree Genetics and Genomics**, v.4, n.3, p.367-377, 2008. Disponível em: <<http://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/handle/2440/46232>>. Acesso em: 12 jan. 2009.

MOTTA JUNIOR, J.C.; LOMBARDI, J.A. Sobre a dispersão e germinação de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf.), Leguminosae-Caesalpinioideae. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 38., 1987, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: Sociedade Botânica do Brasil: Universidade de São Paulo, 1987. p. 262.

NAITO, Y.; KANZAKI, M.; IWATA, H.; OBAYASHI, K.; LEE, S.L.; MUHAMMAD, N.; OKUDO, T.; TSUMURA, Y. Density-dependent selfing and its effects on seed performance in a tropical canopy tree species, *Shorea acuminata* (Dipterocarpaceae). **Forest Ecology and**

Management, Amsterdam, v.256, n.3, p.375-383, 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T6X-4SNXT6M2&_user=972052&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000049647&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972052&md5=65ffcd7c6418c54f0dec3b06907b479e>. Acesso em: 15 fev. 2008.

NAKANISHI, A.; TOMARU, N.; YOSHIMARU, H.; MANABE, T.; YAMAMOTO, S. Effects of seeds- and pollen-mediated gene dispersal on genetic structure among *Quercus salicina* samplings. **Heredity**, London, v.96, p.79-84, 2006.

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, p.501-512, 1996.

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

NASS, L.L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa, 2007. 858p.

OLIVEIRA, A.F. Estrutura genética de populações naturais de *Copaifera langsdorffii* Desf. a partir de Isoenzimas. 2000. 114 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2000.

OLIVEIRA, A.F.; CARVALHO, D.; ROSADO, S.C.S. 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**, São Paulo, v.25, n.3, p.331-338, 2002.

PAKKAD, G.; UENO, S.; YOSHIMARU, H. Gene flow and mating system in a small population of *Quercus semiserrata* Roxb. (*Fagaceae*). **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.255, n.11, 3819-3826, 2008.

PEDRONI, F.; SANCHEZ, M.; SANTOS, F.A.M. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Leguminosae, Caesalpinioideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.2, p.183-194, 2002.

PHILLIPS, O.L.; HALL, P.; GENTRY, A.H.; SAWYER, S.H.; VASQUEZ, R. Dynamics and species richness of tropical rain forests. **Proc. Natl. Acad. Sci. St. Louis, USA**, v.91, p.2805-2809, 1994.

PIRES, I.E. **Melhoramento florestal II**. Viçosa: Dep. de Eng. Florestal, UFV, 2006. (Módulo 3. Apostila do curso).

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Ed. Planta, 2006. 328p.

RAJORA, O.P.; RAHMAN, M.H.; BUCHERT, G.P.; DANCİK, B.P. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobes*) in Ontario, Canada. **Molecular Ecology**, Oxford, v.9, p.339-348, 2000.

REZENDE, M.D.V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 975p.

RIGAMONTE - AZEVEDO, O. C.; WADT, P. G. S.; WAD, L.H.O. Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.30, n.4, p.583-591, 2006.

ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J.; GIL, L. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. **Heredity**, London, v.94, p.13-22, 2005.

SANGUINETTI, C.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamylde gels. **Biotechniques**, Natick, v.17, p.914-921, 1994.

SCHUELER, S.; TUSCH, A.; SCHOLZ, F. Comparative analysis of the within-population genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.) at the self-incompatibility locus and nuclear microsatellites. **Molecular Ecology**, Oxford, v.15, p.3231-3243, 2006.

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, p.115-132, 2002.

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.; SEOANE, C.E.S. Estimativa de tamanho efetivo de variância usando marcadores genéticos. **Revista Árvore**, Viçosa, v.16, p.1-7, 2005.

SILVA, E.L.; ALVES R. M.; ALBUQUERQUE P.B.; SEBBENN. A. M. Diversidade genética entre clones de cupuaçuzeiro com o uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRA, 5, SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL (AVALIAÇÃO - 2008), 12, 2008, Belém. **Anais...** Belém, PA: UFRA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC). Disponível em: <http://anaispibic2008.cpatu.embrapa.br/Trabalhos/Apresentacao_Oral/Oral_1/03_Erika_Lindbergh_Silva.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2008.

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.

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

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

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry: principles and practices of statistics in biological research**. Third Edition. W.H. Freeman and Company, New York. 1989.

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

SOUZA, S.A.C.D. **Avaliação da variabilidade genética em *Musa spp* utilizando marcadores microssatélites**. 2002. 86 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SUGANUMA, E.; CIAMPI, A.Y. **Análise genética populacional de jatobá (*Hymenaea spp - Leguminosaea*) utilizando microssatélites**. Embrapa/Cenargen. Laboratório de Genética de Plantas. Disponível em: http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/03/03pdf/03-007.pdf. Acesso em: 15 dez. 2008.

TOWNSEND, C.R.; BEGON, M.; HARPER, L. J. **Fundamentos em ecologia**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 502p.

VALERI, S.V.; SENÔ, M.A.A.F. . A importância dos corredores ecológicos para a fauna e a sustentabilidade de remanescentes florestais. **Atualidades Jurídicas**, SP. v. 1, p. 5, 2004.

VAN DER BERG, M.E. **Plantas medicinais na Amazônia**: contribuição ao seu conhecimento sistemático. Belém: CNPq/PTU, 1982. 223p.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, São Paulo, v.25, p.273-286, 2002.

VERON, V.; CARON, H.; DEGEN, B: Gene flow and mating system of the tropical tree *Sextonia rubra*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.54, p.275-280. 2005.

VIANA, J.M.S.; CRUZ, D.C.; BRARROS, E.G. **Genética**: fundamentos. 2.ed. Viçosa: Ed UFV, 2006. 330p.

WANG, J.; YE, Q.; KANG, M.; HUANG, H. Novel polymorphic microsatellite loci and patterns of pollen-mediated gene flow in an ex situ population of *Eurycorymbus cavaleriei* (Sapindaceae) as revealed by categorical paternity analysis. **Conservation Genetics**, 10.1007/s10592-007-9369, 2007.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lancaster, v.38, p.1358-1370, 1984.

WHITE, G.M.; BOSCHER, D.H.; POWELL, W. Increased pollen flow counteracts fragmentation in tropical dry Forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, North Carolina, v.99, p.2038-2042, 2002.

YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SHODA, M.; BAN, Y.; HAYASHI, T.; MATSUTA, N. Development of microsatellite in the japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). **Molecular Ecology Notes**, Vancouver, v. 2, n. 1, p. 14-16, 2002.

YOUNG, A.; BOYLE, T. Forest Fragmentation. In: YOUNG, A.; BOSCHER, D.; BOYLE, T. (Eds.). **Forest conservation genetics**: principles and practice. Collingwood: CSIRO Publishing, 2000. 352p.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.11, p.413-418, 1996.