UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Estudos genéticos da espécie florestal *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntez: diversidade, sistema de cruzamento e fluxo gênico contemporâneo.

Marcela Corbo Guidugli

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Ana Lilia Alzate Marin

RIBEIRÃO PRETO – SP

2011

MARCELA CORBO GUIDUGLI

Estudos genéticos da espécie florestal *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntez: diversidade, sistema de cruzamento e fluxo gênico contemporâneo.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Genética.

ORIENTADORA: PROF^A.^ DR^A.^ ANA LILIA ALZATE MARIN

RIBEIRÃO PRETO – SP

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Guidugli, Marcela Corbo.

Estudos genéticos da espécie florestal *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntez: diversidade, sistema de cruzamento e fluxo gênico contemporâneo. Marcela Corbo Guidugli – Ribeirão Preto, 2011.

170 f

Tese (Doutorado em Ciências. Área de Concentração: Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientadora: Ana Lilia Alzate Marin

1. Jequitibá branco 2. Microssatélites 3. Fragmentação florestal 4. Conservação genética

Dedico,

Aos meus amados pais, Rômulo e Vera, e marido Daniel por fazerem parte de minhas alegrias, e estarem sempre ao meu lado na superação das dificuldades.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro na realização deste trabalho, pela bolsa concedida durante o Doutorado (Processo 2007/04787-4), permitindo assim uma dedicação integral à pesquisa e pelo apoio financeiro para participação em eventos científicos.

Às Instituições: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA); Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq); Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, pelo apoio financeiro.

À Prof$^{a.}$ Dr$^{a.}$ Ana Lilia Alzate Marin pela orientação e ensinamentos acadêmicos, pela oportunidade e confiança a mim depositada, e em especial pelo respeito, pelas palavras amigas e bons momentos de descontração compartilhados durante esses seis anos de aprendizado e amor crescente pelas florestas.

Ao Prof. Dr. Moacyr Antônio Mestriner por idealizar, incentivar e apoiar o desenvolvimento das pesquisas no Laboratório de Genética Vegetal, pela agradável convivência e carinho com que me recebeu e acolheu no seu grupo de pesquisa.

À Prof$^{a.}$ Dr$^{a.}$ Eucleia Primo Betioli Contel, que gentilmente aceitou a condição de me orientar no doutorado por tempo determinado, permitindo o meu ingresso no programa de pós-graduação e pelo seu constante apoio durante minha formação.

À Prof$^{a.}$ Dr$^{a.}$ Anete Pereira de Souza (CBMEG/UNICAMP), pela valiosa colaboração nas etapas iniciais deste trabalho, fundamental para o desenvolvimento dos marcadores moleculares usados nessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Alexandre Magno Sebbenn pelos ensinamentos durante minha formação acadêmica, agradeço por contribuir com seu grande conhecimento de genética de populações e por todas as vezes que esclareceu minhas dúvidas estatísticas.

Aos docentes Dr. Jorge Lobo Segura (Universidade de Costa Rica) e Dr$^{a.}$ Rosane Collevatti (Universidade Federal de Goiânia) pelos ensinamentos e esclarecimentos de dúvidas estatísticas relacionadas a esta pesquisa.

Ao pesquisador do Instituto Florestal de São Paulo, Dr. Miguel Luiz Menezes de Freitas pelo apoio e parceira com relação às coletas de material biológico.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Martinez Y Huaman por sempre oferecer apoio e atenção ao nosso grupo de pesquisa e, principalmente, pela valiosa colaboração de corrigir o inglês dos meus trabalhos.

Aos docentes Dr. Ademilson Espencer Egea Soares e Drª Silvana Giuliatti (coordenador e vice-coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP/USP) pelo constante incentivo e apoio ao nosso grupo de pesquisa.

Aos técnicos, Antônio Justino da Silva (Prefeitura da USP/RP) e Marco Aurélio Cândido dos Reis (Associação Verde Tambaú), pelo auxílio imprescindível na pesquisa de campo, pelos ensinamentos e experiências vividas.

Aos funcionários do viveiro de mudas da USP/RP, Flávio e Fláusio, pela colaboração no plantio e tratamentos fornecidos às mudas, pelos bons momentos de descontração e pelo carinho e respeito que sempre me tratam.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Genética pelos conhecimentos repassados e contribuição na minha formação.

À Susie, Maria, Sílvia e Gustavo, secretários do Departamento de Genética, pela dedicação e trabalho imprescindíveis.

A todos os docentes, alunos e funcionários do Bloco B do Departamento de Genética pelo acolhimento, convívio agradável, além dos conselhos acadêmicos e pessoais que tornaram os dias de trabalhos mais divertidos e felizes. Com certeza sentirei muitas saudades dessa "família".

Aos colegas do Laboratório de Genética Vegetal, presentes e passados: Juliana, Ronai, Rômulo, Fernanda, Alison, Marcelo, Matheus, Klaus, Ariany, Paulo, Hilda e Adriana pela agradável convivência e contribuições durante minha formação acadêmica.

À minha eterna amiga e "irmã" Juliana Massimino Feres pela dedicação e participação constante na minha vida pessoal e profissional. Muito obrigada pela amizade, companheirismo, confiança, ensinamentos, conselhos e, principalmente, por me acalmar nos momentos em que a tese parecia não ter fim. Você é uma pessoa muito especial!

Ao doutorando Ronai Ferreira Ramos por ter dedicado parte do seu tempo para me auxiliar nas coletas de material biológico, imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho, e pelas experiências vivenciadas durante esses anos.

Ao doutorando Alison Gonçalvez Nazareno que me proporcionou valiosas colaborações na finalização deste trabalho, além da amizade sincera.

Aos membros da banca examinadora por participarem desta etapa tão importante da minha formação, oferecendo especiais contribuições ao trabalho.

Aos meus amados pais, Rômulo e Vera, e irmãos, Rômulo e Renato, especiais na educação, nas lições de vida, nas belas expressões de amor e respeito, até mesmo por nunca esquecerem os "puxões de orelha".

Ao meu eterno e amado marido Daniel por todo incentivo, apoio, paciência e participação na minha formação pessoal e profissional, dedico todos os aspectos positivos deste trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu sincero obrigado.

RESUMO

GUIDUGLI, M. C. **Estudos genéticos da espécie florestal *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntez: diversidade, sistema de cruzamento e fluxo gênico contemporâneo.** 2011. 170 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Cariniana estrellensis (Raddi) Kuntez (Lecythidaceae), popularmente conhecida como jequitibá branco, é uma espécie arbórea climácica neotropical cuja sobrevivência encontra-se ameaçada devido aos processos de degradação de seus ambientes naturais e exploração indevida. Visando contribuir para a conservação *in situ* e *ex situ* deste recurso genético, o objetivo deste trabalho foi investigar a diversidade genética, o sistema de reprodução, a estrutura genética espacial e o fluxo gênico contemporâneo de *C. estrellensis* em um pequeno remanescente florestal (8 ha) localizado na Região de Ribeirão Preto – SP (município de Cravinhos), usando como ferramenta de análise um conjunto de nove marcadores microssatélites (SSR) desenvolvidos para a espécie. Todas as árvores adultas reprodutivas (30) e regenerantes (39) existentes no referido fragmento foram mapeadas e tiveram tecidos foliares amostrados para as análises genéticas. Sementes de polinização natural foram também aleatoriamente coletadas em algumas destas árvores adultas durante dois eventos reprodutivos, obtendo-se um total de 644 progênies. Através das análises SSR constatou-se que todas as gerações de *C. estrellensis* apresentaram altos níveis de diversidade genética e ausência de endogamia, evidenciando a alogamia da espécie. Em concordância, as taxas de cruzamentos (t_m) estimadas para os dois eventos reprodutivos não diferiram estatisticamente da unidade, permitindo afirmar que *C. estrellensis* é uma espécie perfeitamente alógama, com indícios de mecanismos de auto-incompatibilidade. Estimativas da correlação de paternidade ($r_{p(m)\ (evento\ 1)} = 0{,}121$ e $r_{p(m)\ (evento\ 2)} = 0{,}145$) e do coeficiente de coancestralidade médio dentro de progênies ($\Theta_{xy\ (evento\ 1)} = 0{,}140$ e $\Theta_{xy\ (evento\ 2)} = 0{,}141$) indicaram a ocorrência de pequenos desvios de cruzamentos aleatórios na população de *C. estrellensis*. O número efetivo de doadores de pólen estimado foi mais alto entre frutos de uma mesma árvore ($10{,}20_{(evento\ 1)}$; $10{,}31_{(evento\ 2)}$) do que dentro de um mesmo fruto ($1{,}33_{(evento\ 1)}$; $1{,}17_{(evento\ 2)}$). Os resultados também revelaram que não existe estruturação genética espacial na população de *C. estrellensis*. As análises de parentesco em *C. estrellensis* revelaram distâncias médias curtas do fluxo de pólen dentro do fragmento tanto para as progênies ($69{,}95 \pm 60$ $m_{(evento\ 1)}$; $112{,}02 \pm 94$ $m_{(evento\ 2)}$) quanto para os regenerantes ($146{,}94 \pm 98$ m). Além disso, os resultados das análises de parentesco nos regenerantes apontaram ausência de imigração de sementes na

população e indicaram que a taxa de imigração de pólen realizado (variando entre 53 % e 62 %) foi maior que as taxas de imigração de pólen efetivo (variando entre 23,5 % e 37 %) para os dois eventos reprodutivos estudados. Os altos níveis de imigração de pólen detectados no fragmento em estudo sugeriram que a população de *C. estrellensis* não está isolada reprodutivamente, o que pode ser essencial para prevenir perdas de diversidade genética da espécie, garantindo sua sobrevivência em longo prazo. Em termos gerais, a população estudada mostrou resiliência aos efeitos adversos da fragmentação e potencial para fins de conservação *in situ* e *ex situ*.

ABSTRACT

GUIDUGLI, M. C. **Genetic studies of forest species *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntez: diversity, mating system and contemporary gene flow.** 2011. 170 f. Thesis (Doctor) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto.

Cariniana estrellensis (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae), commonly known as jequitibá branco, is a large neotropical tree, characteristic of the climax forest whose survival is threatened due to processes of degradation of natural environments and improper exploitation. In this study, it was investigated the temporal patterns of genetic variability, reproductive systems, spatial genetic structure and contemporary gene flow in the remaining population of the tropical forest species *C. estrellensis* that occurs naturally in a small fragment (8 ha) located in the Ribeirão Preto region-SP (municipality of Cravinhos), using nine pairs of microsatellite loci. All adult trees (30) and saplings (39) found in the fragment were mapped and sampled. Naturally-pollinated seeds were randomly collected from seed-trees that were reproductive for two consecutive years resulting in a total of 644 offspring. Through the analysis with SSR, all generations of *C. estrellensis* (adults, saplings and offspring) showed high levels of genetic diversity and no inbreeding. Estimates of multi-locus outcrossing rates (t_m) suggested that *C. estrellensis* is a perfectly allogamus species, with evidence of self-incompatibility. Estimates of the correlation of paternity ($r_{p(m)\ (\text{event } 1)} = 0.121$ and $r_{p(m)\ (\text{event } 2)} = 0.145$) and the average of the coefficient of coancestry within progenies ($\Theta_{xy\ (\text{event } 1)} = 0.140$ and $\Theta_{xy\ (\text{event } 2)} = 0.141$) indicated a small deviation from random mating. The effective number of pollen donors was higher among fruits from the same tree ($10.20_{(\text{event } 1)}$, $10.31_{(\text{event } 2)}$) than within the same fruit ($1.33_{(\text{event } 1)}$, $1.17_{(\text{event } 2)}$). The results also revealed a lack of spatial genetic structure in *C. estrellensis* population. Parentage analyses revealed short average distances of pollen flow within the fragment for both offspring generations (69.95 ± 60 m $_{(\text{event } 1)}$; 112.02 ± 94 m $_{(\text{event } 2)}$) as well as for saplings (146.94 ± 98 m). Furthermore, the parentage analyses in the saplings pointed no seed immigration in the population studied and indicated that the realized pollen immigration (ranging between 53 % and 62 %) was higher than the rates of effective pollen immigration (ranging between 23.5 % and 37 %) for both reproductive events studied. High levels of pollen immigration from outside study site suggested that the population of *C. estrellensis* is not reproductively isolated, which may be essential to prevent losses of genetic diversity in the species, ensuring its long-term survival. Overall, the studied population shows resilience to adverse effects of fragmentation and potential for *in situ* and *ex situ* conservation.

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Extensão e distribuição dos vários ecossistemas (fitofisionomias) que compõem o Bioma Mata Atlântica no Brasil. Fonte: http://www.rbma.org.br/anuario/mata_02_eco__ssistema.asp 16

Figura 2. Esquema ilustrativo das principais consequências genéticas para populações de plantas condicionadas pelo movimento limitado de sementes e grãos de pólen (fluxo gênico) entre elas. Fonte: Arquivo pessoal 23

Figura 3. Área de distribuição das Lecythidaceae neotropicais. Fonte: http://sweetgum.nybg.org/lp/index.php 35

Figura 4. Árvore adulta de *Cariniana estrellensis* (jequitibá branco) Fonte: Arquivo Pessoal 37

Figura 5. Distribuição de *C. estrellensis* na América do Sul. 1, Nordeste do Brasil; 2, Sudeste e Sul do Brasil; 3. Região Central do Brasil; 4. Oeste do Brasil, Bolívia e Peru. Fonte: Leite, 2007 37

Figura 6. Características da espécie *Cariniana estrellensis*: casca externa do tronco (A), detalhe das folhas (B), flores (C) frutos e sementes (D). Fonte: Fotos A, B e D são arquivos pessoal; Foto C foi retirada do site http://sweetgum.nybg.org/lp/index.php 39

Figura 7. Foto do ovário trilocular de *Cariniana estrellenis*. Fonte: http://sweetgum.nybg.org/lp/index.php 39

Figura 8. Etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida em SSR: digestão do DNA genômico, ligação dos adaptadores *Rsa21* e *Rsa25* e pré-amplificação com o *primer* Rsa21. (Fonte: Zane et al., 2002) 65

Figura 9. Etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida em microssatélites: hibridização de sondas (biotiniladas) de microssatélites com o DNA digerido e amplificado, e seleção dos fragmentos por magnetização. (Fonte: Zane et al., 2002) 66

Figura 10. Padrão de amplificação para os 12 clones de microssatélites obtidos a partir da biblioteca construída com o DNA de *C. estrellensis* 72

Figura 11. Géis de poliacrilamida 10 % mostrando a amplificação em uma família de *C. estrellensis*; com os locos Ces14 (A) e Ces16 (B). Para ambos os locos, observaram-se a presença de pelo menos um dos alelos da matriz (canaleta M1) nas progênies amplificadas (canaletas 1-6) 76

Figura 12. Gel de poliacrilamida 10 % mostrando os perfis de amplificação gerados com o loco Ces07 em indivíduos de *C. legalis* 78

Figura 13. A) Foto de satélite mostrando o isolamento geográfico da área de estudo (círculo vermelho). Fonte: *Google Earth*, agosto de 2010. B) Fragmento florestal onde foram coletadas sementes e amostras foliares de indivíduos adultos e jovens da espécie *C. estrellensis*. Fonte: Arquivo Pessoal 87

Figura 14. Coleta de folhas e frutos realizada em árvores adultas de *C. estrellensis* (Fotos A e B). Indivíduos jovens da espécie *C. estrellensis* que foram amostrados para as análises genéticas (Fotos C e D). Fonte: Arquivo Pessoal 88

Figura 15. Posição dos indivíduos de *C. estrellensis* amostrados para esta pesquisa 89

Figura 16. Bandejas com sementes de *C. estrellensis* no momento do plantio (A) e após a germinação (B). Observam-se no canto direito da figura B as placas de identificação do material. Fonte: Arquivo Pessoal..... 90

Figura 17. Gel de poliacrilamida 10 % contendo amostras de PCR biplex dos *primers* Ces01 (amostras inferiores no gel) e Ces11 (amostras superiores no gel)..... 93

Figura 18. A) Vista lateral do fragmento florestal onde estão localizadas as árvores de *Cariniana estrellensis* amostradas para a realização deste estudo (Fonte: Arquivo pessoal). Fotos de satélite mostrando a posição geográfica de indivíduos adultos (B) e regenerantes (C) de *C. estrellensis* dentro do referido fragmento (Fonte: *Google Earth,* acessado em maio de 2011)..... 134

Figura 19. Estrutura genética espacial nas gerações de adultos (A) e regenerantes (B) de *Cariniana estrellensis* na fazenda Águas Claras de Cravinhos - SP. A linha contínua refere-se à estimativa do coeficiente de coancestria médio e as linhas pontilhadas referem-se ao intervalo de confiança a 95% do erro padrão da média das estimativas para a hipótese de ausência de estrutura genética espacial (H_0: θ_{xy} =0)..... 138

Figura 20. Distância de dispersão de pólen efetiva (barras pretas) durante os eventos reprodutivos de 2007 (A) e 2008 (B) e distância entre todas as árvores reprodutivas de *Cariniana estrellensis* (barras brancas) amostradas dentro do fragmento florestal estudado 142

Figura 21. Distribuição das frequências das distâncias de dispersão de sementes (A) e pólen (B) em *Cariniana estrellensis* determinada por análise de paternidade nos regenerantes..... 144

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Relação dos locos microssatélites desenvolvidos para *C. estrellensis* 73

Tabela 2. Marcadores microssatélites desenvolvidos para *C. estrellensis*, cujas condições de amplificação foram padronizadas e apresentaram-se polimórficos..... 74

Tabela 3. Caracterização dos marcadores desenvolvidos para *C. estrellensis*: sequências dos *primers*, motivos e número de repetições, número de alelos por loco (*A*), heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E), probabilidades de exclusão de paternidade $Pr(Ex_1)$ e $Pr(Ex_2)$ 75

Tabela 4. Características dos locos microssatélites transferidos para *C. legalis*: temperatura de anelamento (*Ta* ºC), número de alelos por loco (*A*), heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E), probabilidades de exclusão de paternidade $Pr(Ex_1)$ e $Pr(Ex_2)$ 77

Tabela 5. Sequências dos *primers* microssatélites de *C. estrellensis* utilizados nesta pesquisa 92

Tabela 6. Condições das reações de PCR biplex testadas em *C. estrellensis*..... 93

Tabela 7. Testes *G* para hipótese de segregação codominante 1:1 em nove locos SSR de *C. estrellensis* 98

Tabela 8. Teste de desequilíbrio de ligação entre os locos microssatélites de *C. estrellensis*. Os valores na tabela são as probabilidades após 1000 permutações. O valor limite de significância após correção de Bonferroni é 0,000347 101

Tabela 9. Poder de exclusão de nove locos microssatélites em árvores adultas, regenerantes e progênies de *C. estrellensis*. *N* é o número de indivíduos analisados; *K* é o número total de alelos; A_e é o número efetivo de alelos nos locos; H_O é a heterozigosidade observada; H_E é a heterozigosidade esperada; $Pr(Ex_1)$ e $Pr(Ex_2)$ são respectivamente as probabilidades de excluir o primeiro parente e o segundo parente 102

Tabela 10. Probabilidades obtidas com o teste exato de Fisher para verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg na população de *C. estrellensis* em quatro gerações 103

Tabela 11. Características de nove locos microssatélites em quatro gerações de *C. estrellensis.* Tamanho amostral (*N*); número total de alelos (*K*); riqueza alélica (*R*); número efetivo de alelos nos locos (A_e); heterozigosidade observada (H_O); heterozigosidade esperada (H_E); índice de fixação (*F*). EP (95 %): erro padrão a 95 %, calculado via reamostragem *jackknife* 104

Tabela 12. Parâmetros de diferenciação genética entre as gerações de adultos, regenerantes e progênies de *C. estrellensis*. O F_{ST} é a diferenciação genética entre as gerações segundo Nei (1977); G_{ST} é a diferenciação genética entre as gerações segundo Hedrick (2005) 107

Tabela 13. Parâmetros do sistema de reprodução em progênies de *C. estrellensis* descendentes de dois eventos reprodutivos 109

Tabela 14. Estimativas por família dos parâmetros do sistema de reprodução durante dois eventos reprodutivos de uma população natural de *C. estrellensis*. *n* é o número de progênies analisadas por árvore matriz; t_m é a taxa de cruzamento multiloco; $r_{p(m)}$ é a correlação multiloco de paternidade; Θ_{xy} é o coeficiente de coancestria nas progênies; $N_{e(v)}$ é o tamanho efetivo de variância 110

Tabela 15. Número censo (*N*), coeficiente médio de coancestria (Θ_{xy}) e tamanho efetivo **(**N_e**)** para indivíduos adultos e regenerantes de uma população de *Cariniana estrellensis* 112

Tabela 16. Fluxo de pólen contemporâneo para matrizes de uma população de *Cariniana estrellensis* determinado por análises de paternidade para os anos de 2007 e 2008 140

Tabela 17. Dispersão realizada de sementes e pólen em população de *Cariniana estrellensis* no fragmento florestal de Cravinhos-SP 143

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13
1.1. A Mata Atlântica 15
1.2. Situação atual das Matas na Região de Ribeirão Preto, interior do Estado de São Paulo 17
1.3. Fragmentação e Efeitos genéticos 19
1.4. Fluxo gênico 22
1.5. Sistema de reprodução 26
1.6. Tamanho efetivo populacional 30
1.7. Marcadores microssatélites (SSR) 32
1.8. Considerações sobre a espécie 34
1.8.1. Características do gênero Cariniana 34
1.8.2. A espécie: Cariniana estrellensis (Raddi) Kuntez 36
1.8.2.1. Biologia reprodutiva 40
1.8.2.2. Importância sócio-econômica 40
1.8.2.3. Conservação genética de Cariniana estrellensis 41
1.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 43

2. OBJETIVOS 58
2.1. Objetivos Gerais 58
2.2. Objetivos Específicos 58

3. ORGANIZAÇÃO GERAL DA TESE 59

4. CAPÍTULO I 60
4.1. RESUMO 61
4.2. INTRODUÇÃO 62
4.3. MATERIAL E MÉTODOS 64
4.3.1. Amostragem 64
4.3.2. Extração e quantificação de DNA 64
4.3.3. Desenvolvimento de marcadores microssatélites 64
4.3.4. Banco enriquecido em microssatélites 65
4.3.5. Sequenciamento 66
4.3.5.1. Análise das sequências 67
4.3.5.2. Desenho dos primers 67
4.3.6. Ensaios de amplificação dos marcadores microssatélites 68
4.3.7. Estudo de polimorfismo dos locos SSR desenvolvidos para C. estrellensis 68
4.3.8. Teste de segregação mendeliana 68
4.3.9. Estudos de amplificação heteróloga 68
4.3.10. Eletroforese 69
4.3.11. Coloração do gel com nitrato de prata e secagem 70
4.3.12. Determinação fenotípica 70
4.3.13. Análises estatísticas 71
4.3.13.1. Estimativa do desequilíbrio de ligação 71
4.3.13.2. Caracterização da diversidade genética 71
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 72
4.4.1. Desenvolvimento e caracterização de marcadores SSR para C. estrellensis 72
4.4.1.1. Desenho dos primers e ensaios de amplificação 72
4.4.1.2. Estudo de polimorfismo dos locos SSR desenvolvidos para C. estrellensis 74
4.4.1.3. Teste de segregação mendeliana 76
4.4.2. Estudos de amplificação heteróloga em C. legalis 76
4.5. CONCLUSÃO 79
4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 80

5. CAPÍTULO II 83
5.1. RESUMO 84
5.2. INTRODUÇÃO 85
5.3. MATERIAL E MÉTODOS 87
5.3.1. Local de estudo 87
5.3.2. Coleta do material biológico 87
5.3.3. Obtenção de sementes e produção de mudas 89
5.3.4. Extração e quantificação de DNA 91
5.3.5. Marcadores microssatélites e ensaios de amplificação multiplex 91
5.3.6. Eletroforese, coloração e leitura dos géis 94
5.3.7. Análises estatísticas 94
5.3.7.1. Análise de segregação dos locos SSR 94
5.3.7.2. Análise do desequilíbrio de ligação 95
5.3.7.3. Análises da diversidade genética e do índice de fixação 95
5.3.7.4. Análises do sistema de reprodução, coancestria e tamanho efetivo 95
5.4. RESULTADOS 98
5.4.1. Herança dos locos SSR 98
5.4.2. Desequilíbrio de ligação 100
5.4.3. Análises da diversidade genética e do índice de fixação na amostra total 102
5.4.4. Equilíbrio de Hardy-Weinberg, diversidade, estrutura genética e endogamia nas gerações 103
5.4.5. Sistema de reprodução, coancestria e tamanho efetivo de variância 108
5.4.6. Coancestria e tamanho efetivo para as árvores adultas e regenerantes 112
5.5. DISCUSSÃO 113
5.5.1. Análises da herança e do desequilíbrio de ligação entre locos SSR 113
5.5.2. Análises de diversidade, estrutura genética e endogamia nas gerações 114
5.5.3. Sistema de reprodução, coancestria e tamanho efetivo de variância 118
5.6. CONCLUSÕES 123
5.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 124

6. CAPÍTULO III 129
6.1. RESUMO 130
6.2. INTRODUÇÃO 131
6.3. MATERIAL E MÉTODOS 133
6.3.1. Local de estudo e amostragem 133
6.3.2. Análise do DNA 134
6.3.3. Análises estatísticas 135
6.3.3.1. Análise da distribuição espacial dos genótipos 135
6.3.3.2. Fluxo gênico contemporâneo via pólen e sementes 135
6.4. RESULTADOS 138
6.4.1. Estrutura genética espacial intrapopulacional 138
6.4.2. Fluxo gênico contemporâneo 139
6.4.2.1. Análise do fluxo de pólen para as progênies 139
6.4.2.2. Análise do fluxo de pólen e sementes para os regenerantes 142
6.5. DISCUSSÃO 145
6.5.1. Estrutura genética espacial intrapopulacional 145
6.5.2. Análise do movimento de genes dentro e entre a área de estudo 148
6.6. CONCLUSÕES 153
6.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 154

7. ANEXO I 159

8. ANEXO II 163

9. ANEXO III 167

10. ANEXO IV 168

11. ANEXO V 169

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. A Mata Atlântica

As florestas brasileiras ocupam cerca de 61 % do território brasileiro e desempenham importantes funções sociais, econômicas e ambientais. Ofertam uma variedade de bens, como produtos florestais madeireiros e não madeireiros, e prestam serviços ambientais essenciais, como a conservação dos recursos hídricos e edáficos, a conservação da biodiversidade, a estabilidade climática, além de possuir valores culturais (Serviço Florestal Brasileiro, 2010).

Estima-se que o Brasil tenha cerca de 2.000.000 de espécies distintas, entre animais, vegetais e microorganismos com grande complexidade e variedades de ecossistemas, o que requer atenção e cautela por parte das autoridades quanto à questão de acesso e proteção a essa biodiversidade, principalmente na área vegetal. Destacam que o Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, com cerca de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies distribuídas entre os diferentes Biomas, dos quais merece destaque, pela expressividade, a Mata Atlântica (Sandes & Di Blasi, 2000).

Apesar de ser considerado um dos mais importantes biomas do mundo, a Mata Atlântica também carrega o dogma de ser um dos biomas mais ameaçados (Durigan et al., 2000; Juvenal & Mattos, 2002; Rodrigues et al., 2009). No passado, a Mata Atlântica cobria cerca de 150 milhões de hectares distribuídos ao longo da costa brasileira, com uma faixa de largura variável, adentrando para o interior nas Regiões Sudeste, Sul, e Centro-Oeste, e penetrando até o leste do Paraguai e nordeste da Argentina em sua porção sul (Tabarelli et al., 2005; Ribeiro et al., 2009).

Extremamente heterogênea em sua composição, a Mata Atlântica estende-se de 4° a 32°S e cobre um amplo rol de zonas climáticas e formações vegetacionais, de tropicais a subtropicais. Esse bioma contempla diferentes formações florestais, tais como Floresta Ombrófila (Densa, Mista e Aberta), Floresta Estacional Semidecidual e Estacional Decidual, além de vários ecossistemas associados como Mangues, Restingas, Formações Campestres de Altitude e Brejos (Campanili & Schaffer, 2010) (Figura 1).

Desde a colonização pelos portugueses e espanhóis, a história da Mata Atlântica tem sido marcada pelo uso intensivo da terra para exportação de mercadorias, incluindo os ciclos de exploração do pau-brasil, cana-de-açúcar, café, cacau, e pastagem para gado. Mais recentemente, subsídios do governo brasileiro aceleraram a expansão da agricultura (em especial cana-de-açúcar, café e soja) e estimularam as plantações comerciais de eucaliptos e pinus (Galindo-Leal & Câmara, 2005; Tabarelli et al., 2005).

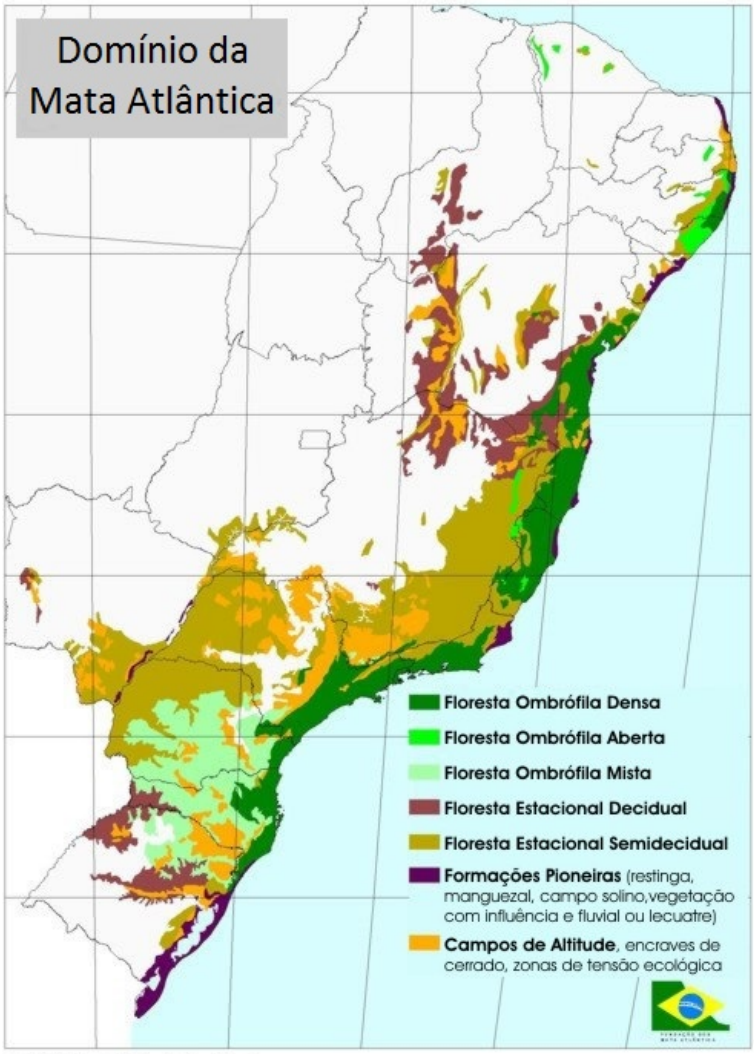

Figura 1. Extensão e distribuição dos vários ecossistemas (fitofisionomias) que compõem o Bioma Mata Atlântica no Brasil. Fonte: http://www.rbma.org.br/anuario/mata_02_eco__ssistema.asp.

De acordo com Galindo-Leal & Câmara (2005), os remanescentes de vegetação nativa da Mata Atlântica continuam a ser deteriorados devido à exploração madeireira, corte ilegal, caça e introdução de espécies exóticas, sendo que as regiões Nordeste, Sul e Sudeste, onde estão concentrados 85 % da população brasileira, foram as mais atingidas por desflorestamentos provocados pelas necessidades de urbanização e crescimento econômico (Juvenal & Mattos, 2002).

Em função dessa constante ação antrópica, a Mata Atlântica de hoje encontra-se extremamente reduzida, com a maioria da vegetação natural remanescente presente em pequenos fragmentos, isolados uns dos outros e compostos, principalmente, por espécies florestais de crescimento secundário em estádios iniciais ou médios de sucessão (Metzger et

al., 2009). Além disso, parte significativa de seus remanescentes está hoje localizada em encostas de grande declividade, consideradas inaptas às práticas agrícolas (Ribeiro et al., 2009; Rodrigues et al., 2009).

Em um trabalho recente, Ribeiro et al. (2009) analisaram, através de ferramentas de geoprocessamento, 94 % da cobertura original de Mata Atlântica no Brasil. Nesse trabalho, os pesquisadores encontraram que, dos 139.584.893 ha de mata mapeados, restam apenas 15.719.337 ha (11.26 %) de floresta e 658.135 ha (0.47 %) de restinga e mangue conservados. Sendo assim, 88,27 % da floresta Atlântica original foram perdidos (considerando a possibilidade de erros de amostragem no trabalho, os autores afirmam que deva existir de 11,4 a 16 % de remanescente florestal natural). Ainda segundo Ribeiro et al. (2009), o remanescente de Mata Atlântica está distribuído em 245.173 fragmentos florestais, sendo que mais de 80 % destes remanescentes apresentam uma área menor que 50 hectares.

Apesar da devastação acentuada, a Mata Atlântica ainda sustenta um dos mais altos graus de riqueza de espécies e taxas de endemismo do planeta. Estima-se que nela ainda existam mais de 8.000 espécies endêmicas de plantas vasculares, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Myers et al., 2000), sendo considerada, portanto, um dos 25 *hotspots* mundiais de biodiversidade prioritários para conservação (Myers et al., 2000; Silva & Casteleti, 2005; Tabarelli et al., 2005). Por esse motivo, a conservação do pouco que sobrou e a restauração daquilo que inadequadamente foi desflorestado, ou por uma questão legal ou pelas características do ambiente, se faz necessária e urgente.

Embora o número e a escala das iniciativas de conservação da biodiversidade da Mata Atlântica tenham crescido consideravelmente durante as últimas décadas, o conhecimento sobre esse bioma é ainda bastante incipiente, principalmente quanto à estruturação genética populacional de suas espécies, e procedimentos adequados de amostragem para fins conservacionistas e de manejo (Moraes, et al., 1999; Tabarelli et al., 2005). Além disso, cabe ressaltar que a Mata Atlântica é responsável por cerca de 70 % do PIB nacional, abriga mais de 60 % da população brasileira, e possui as maiores extensões dos solos mais férteis do país (Rodrigues et al., 2009), dificultando o controle e fiscalização efetivos de qualquer estratégia para conservação desse bioma.

1.2. Situação atual das Matas na Região de Ribeirão Preto, interior do Estado de São Paulo

No início do século XIX, o Estado de São Paulo possuía aproximadamente 81,8 % (20.450.000 ha) de seu território coberto pelo Bioma Mata Atlântica, o qual foi drasticamente reduzido a pequenas porções de terra devido aos sucessivos ciclos de uso do solo e também à

pressão pelo crescimento populacional (Victor, 1975). De acordo com um recente levantamento do Instituto Florestal de São Paulo, restam apenas 13,9 % da cobertura vegetal natural paulista, o equivalente a 3,46 milhões de hectares (Zorzetto et al., 2003).

A Floresta Estacional Semidecidual foi o tipo de formação florestal da Mata Atlântica mais rápida e extensamente devastada na região do Estado de São Paulo onde se situa o Município de Ribeirão Preto (região do estudo em questão). A devastação dessas florestas ocorreu associada à expansão da fronteira agrícola, já que ocupavam os solos de maior fertilidade, em regiões com relevo favorável à agricultura (Durigan et al., 2000).

Segundo Kotchetkoff-Henriques (2003), a supressão da vegetação natural da região de Ribeirão Preto foi insignificante até 1870, quando o plantio de café começou a substituir a vegetação nativa, principalmente as florestas. Com a crise da economia cafeeira, ocorrida no fim da década de 20, os produtores rurais encontraram na região condições para a sua rápida substituição pela pecuária e a diversificação de culturas (notadamente a cana-de-açúcar, amendoim, algodão, cítricos, milho e soja), produtos esses fornecedores de matérias-primas às agroindústrias que se instalam na região (Alessi & Navarro, 1997). A Região de Ribeirão Preto é considerada hoje um ponto de referência para o agronegócio brasileiro, tendo nas últimas décadas a cultura da cana-de-açúcar como a principal alavanca desta economia e tornando-se a maior região sucro-alcooleira do mundo. Também é expressiva a produção de soja, amendoim, milho, bovinos e aves (Semeghini, 1992).

Entretanto, em decorrência do desenvolvimento econômico adotado no interior do Estado de São Paulo, profundas alterações na vegetação original e consequentemente na biodiversidade associada a esta paisagem foram ocasionadas (Melo et al., 2010). Atualmente a paisagem da região de Ribeirão Preto pode ser considerada um mosaico formado de áreas antropizadas, em que se destacam as áreas rurais com atividades agro-pecuárias, estreitas faixas de matas ciliares e remanescentes florestais condicionados às pequenas manchas ou fragmentos isolados (Kotchetkoff-Henriques, 2003).

Os poucos remanescentes preservados da formação florestal característica do interior paulista são, portanto, de grande valor ecológico e taxonômico, funcionando como uma coleção viva de espécies representativas da flora local e de sua diversidade genética, bem como banco de informações acerca da estrutura e funcionamento desse tipo de ecossistema (Ortega & Engel, 1992). A manutenção da biodiversidade remanescente é atualmente um desafio para todos, pois não sabemos quais espécies individuais são críticas para a sustentabilidade dos ecossistemas (Burton et al., 1992).

Neste contexto, as pesquisas sobre recuperação das áreas degradadas no Estado de São Paulo, considerando, sobretudo, a conservação e/ou restauração da biodiversidade, associadas

aos processos de licenciamento ambiental e o estímulo aos programas de reflorestamento, constitui-se hoje um dos desafios estabelecidos nos principais programas de políticas públicas da Secretaria de Estado do Meio Ambiente de São Paulo. Dentre as espécies a serem utilizadas no reflorestamento do estado de São Paulo de acordo com as resoluções *SMA 21 de 21/11/2001*, *SMA 47 de 26/11/2003* e *SMA 8 de 07/03/2008* da secretaria de meio ambiente, destacamos a *Cariniana estrellensis* (jequitibá branco) por sua importância ecológico-econômica (http://www.ambiente.sp.gov.br/contAmbientalLegislacaoAmbiental.php).

1.3. Fragmentação e Efeitos genéticos

Os processos de desmatamento de florestas tropicais têm sido intensos nas últimas décadas. A devastação de florestas tropicais no mundo foi estimada em 9,4 milhões de hectares por ano, dos quais 2,3 milhões correspondem às florestas tropicais úmidas no Brasil (FAO, 2001). A exploração intensiva da madeira e mudanças no uso da terra pela agricultura e ocupação urbana são os principais fatores responsáveis pela perda florestal (Salgueiro et al., 2004). Na Mata Atlântica, como descrito anteriormente, a maior parte dos remanescentes florestais, especialmente em paisagens intensamente cultivadas, encontra-se na forma de pequenos fragmentos, altamente perturbados, isolados, pouco conhecidos e pouco protegidos (Viana, 1995).

Segundo Viana & Tabanez (1996), a fragmentação florestal, um dos principais resultados do avanço do desmatamento, é a modificação de uma grande extensão de habitat em áreas menores, incluindo fragmentos de diferentes tamanhos, formas, grau de isolamento, tipo de vizinhança e histórico de alterações, o que compromete a conservação da diversidade biológica presente nestas áreas.

As respostas das espécies vegetais ao processo de fragmentação são altamente variáveis, dependendo de suas características e das alterações ambientais ocorridas (Lowe et al., 2005). Essas mudanças afetam de forma diferenciada os parâmetros demográficos de mortalidade e natalidade de diferentes espécies e, portanto, a estrutura e dinâmica de ecossistemas. No caso de espécies arbóreas, a alteração na abundância de polinizadores, dispersores, predadores e patógenos alteram as taxas de recrutamento de plântulas; e os incêndios e mudanças microclimáticas, que atingem de forma mais intensa as bordas dos fragmentos, alteram as taxas de mortalidade das árvores (Viana & Pinheiro, 1998). Também, entende-se que o maior impacto da fragmentação florestal seja a redução dos habitats e o consequente desaparecimento ou perda da biodiversidade regional de várias espécies, comprometendo o patrimônio genético nesses ecossistemas, componente que fornece o

material básico para seleção natural e, portanto, para a evolução de todas as espécies (Pinto et al., 2004; Collevatti et al., 2001; Viana, 1995).

Em face dessa situação, avaliar os efeitos que a fragmentação de habitat possui sobre a diversidade e estrutura genética das espécies animais e vegetais tornou-se fundamental para que medidas efetivas de conservação sejam tomadas. Dentro desse referencial conceitual, a questão genética adquiriu importância destacada nos projetos de restauração ecológica, passando-se a considerar que é preciso conservar um *pool* genético (conjunto de genes) característico da espécie, que representem boa parte das variações intrínsecas à mesma (Jones, 2003).

Fragmentos florestais pequenos, isolados e não sustentáveis devem ser considerados como remanescentes de uma rica e ameaçada biodiversidade e, portanto, merecedores de uma abordagem séria, priorizando o manejo e conservação destas unidades (Viana, 1995). Nessa perspectiva, Rodrigues et al. (2009) ressaltam que o simples isolamento e proteção destes remanescentes podem não ser suficientes para garantir a conservação plena de sua biodiversidade, incluindo o patrimônio genético. Segundo esses mesmos autores, os fragmentos florestais juntamente com as áreas naturais protegidas poderiam adquirir uma nova função ambiental: a de fornecer material genético com alta diversidade florística e genética para a recuperação florestal das áreas de seu entorno imediato, o que aumentaria a conectividade com os demais fragmentos do entorno e consequentemente reduziria a probabilidade de que eventos ambientais imprevisíveis venham a eliminar parte significativa das espécies e de seu patrimônio genético.

Contudo, a sobrevivência e manutenção de populações fragmentadas de espécies arbóreas dependerão da definição de estratégias adequadas de manejo dos remanescentes florestais. Para que essas estratégias sejam efetivas é fundamental primeiramente entender e quantificar os principais efeitos populacionais e genéticos da fragmentação (Martins et al., 2008).

Particularmente, a variabilidade genética pode exercer papel decisivo na sobrevivência das espécies quando há alteração repentina do ambiente, tal como decorrentes das mudanças climáticas globais, e passarão a ter cada vez mais participação significativa como agente determinante do sucesso das ações de restauração ecológica. Quando os indivíduos de uma espécie apresentam base genética estreita, ou seja, pouca variabilidade genética, os mesmos serão certamente mais sensíveis a pragas, doenças e estresses ambientais, tendo menores chances futuras de sobrevivência (Ellstrand & Elam, 1993).

A perda de diversidade genética provocada pela fragmentação florestal é decorrente do isolamento de populações em pequenos remanescentes, que podem conter um número

limitado de indivíduos reprodutivos, afetando a densidade populacional e os principais processos evolutivos como deriva genética, fluxo de genes, seleção natural e sistema de reprodução (Young & Boyle, 2000). Além disso, o processo de fragmentação, em um cenário mais drástico, pode isolar reprodutivamente as populações e aumentar a estrutura genética espacial intrapopulacional.

Em suma, se populações fragmentadas permanecerem pequenas e isoladas por muitas gerações, poderá haver um aumento da endogamia, da deriva genética e da divergência genética entre populações, devido à ocorrência de cruzamentos entre os poucos indivíduos remanescentes e à limitação do fluxo de genes via pólen e sementes entre os fragmentos. A principal consequência desses processos é a redução da diversidade genética. Em último caso, a perda de diversidade genética pode resultar na redução da adaptabilidade de populações remanescentes e na extinção da espécie (England et al., 2002).

A avaliação das consequências da redução e isolamento de populações naturais é uma tarefa complexa porque a maior parte da fragmentação do habitat tem ocorrido sobre um período de tempo (cerca de 100-200 anos) considerado curto em relação ao tempo de geração de muitas espécies arbóreas, podendo impossibilitar a detecção de efeitos decorrentes da ação da deriva genética aleatória (Williams et al., 2007). Em parte, isto pode ser a explicação para os resultados de alta diversidade genética em populações arbóreas fragmentadas (Young et al., 1993; Muir et al., 2004; Bacles et al., 2005, Victory et al., 2006). Por outro lado, também é possível que a fragmentação favoreça o fluxo de pólen mediado pelo vento através da paisagem fragmentada, mantendo assim os níveis de diversidade genética em pequenos fragmentos isolados (Young et al., 1993; Bacles et al., 2005).

Embora a fragmentação seja um distúrbio comum nas florestas tropicais, o entendimento dos seus efeitos sobre o fluxo gênico, sistema de reprodução e diversidade genética ainda é pobre (Nason & Hamrick, 1997; White et al., 2002; Lowe et al., 2005; Barreira et al., 2006; Martins et al., 2008; Bittencourt & Sebbenn, 2009; Moura et al., 2009; Gaino et al., 2010). Portanto, o entendimento de como a fragmentação do habitat afeta os processos ecológicos que envolvem populações de animais e plantas e como isto pode influenciar as espécies e sua persistência no habitat em longo prazo é um dos maiores desafios para biólogos evolutivos, ecólogos e biólogos da conservação e enfatiza a importância do presente estudo.

De acordo com Sebbenn et al. (2011), estudos da diversidade genética, fluxo gênico contemporâneo, sistema de reprodução e distribuição espacial de genótipos em populações fragmentadas são fundamentais para entendimento detalhado das consequências desses processos sobre as populações remanescentes, permitindo o delineamento de estratégias para

a conservação *in situ* e *ex situ*, bem como para a coleta de sementes em árvores matrizes para fins de recuperação ambiental.

1.4. Fluxo gênico

A paisagem é uma unidade heterogênea que reúne um complexo interativo de sub-unidades geralmente compostas por ecossistemas nativos e outras classes de uso da terra (Fahrig, 2003). Os fatores principais capazes de interferir na dinâmica de fragmentos florestais são: tamanho, forma, grau de isolamento, o tipo de vizinhança e o histórico de perturbações desses fragmentos. A análise desses fatores é fundamental para identificar estratégias conservacionistas e prioridades para a pesquisa, visando proteger a biodiversidade remanescente. Sendo assim, a conectividade pode ser definida como a capacidade da paisagem de permitir fluxos biológicos de organismos, sementes e grãos de pólen (Urban et al., 1987). Vários estudos empíricos têm mostrado a importância da conectividade em processos de recolonização após extinção local e na manutenção de uma metapopulação em paisagens fragmentadas (Metzger, 1999).

Nessa perspectiva, o conceito de conectividade é essencial, já que as espécies sobrevivem em habitats fragmentados (ou heterogeneamente dispersos na paisagem) e dependem da sua capacidade natural para atravessar as unidades da matriz. A matriz é uma unidade heterogênea da paisagem que controla sua dinâmica (Forman, 1995). Em geral, essa unidade pode ser reconhecida por recobrir a maior parte da paisagem (é a unidade dominante em termos de recobrimento espacial) ou por ter maior grau de conexão em uma área (um menor grau de fragmentação), influenciando na conectividade da paisagem e alterando a capacidade dos indivíduos de encontrarem recursos dispersos pelo ambiente (Adriaensen et al., 2003; Baum et al., 2004).

Especificamente em populações de plantas, a conectividade é determinada pelo fluxo gênico entre elas (Sork & Smouse, 2006). Fluxo gênico é definido como o movimento de alelos em populações e, portanto, inclui todos os movimentos de gametas, propágulos e indivíduos que efetivamente trocam alelos na distribuição espacial (Neigel, 1997). Em plantas a transferência de genes pode ocorrer tanto pelo movimento de organismos individuais (sementes, rizomas, estolões), como pelo movimento de gametas (pólen) (Zucchi, 2002).

Movimento de genes mediado por pólen é frequentemente importante para promover a diversidade genética dentro e entre populações de plantas. Já a dispersão de sementes é fator determinante para colonização de novos locais, extinção de populações locais e migração entre subpopulações vizinhas (Barluenga et al., 2010). O transporte de pólen ou sementes

pode aumentar a multiplicidade genética da população, se os genes presentes em uma população migrarem para outra que não os possuam, diminuindo a diferenciação genética entre populações (Finkeldey, 1998) (Figura 2).

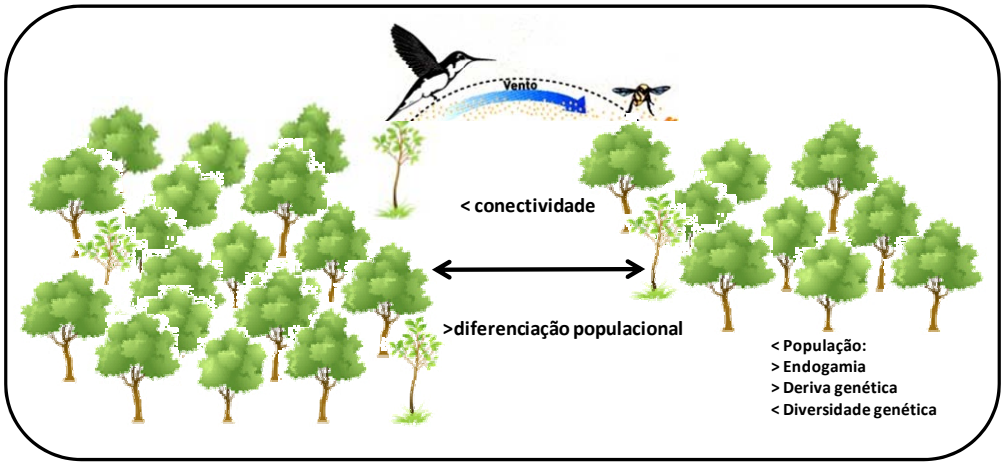

Figura 2. Esquema ilustrativo das principais consequências genéticas para populações de plantas condicionadas pelo movimento limitado de sementes e grãos de pólen (fluxo gênico) entre elas. Fonte: Arquivo pessoal.

Plantas são organismos sésseis e, portanto, dependentes de agentes polinizadores e dispersores de sementes para alcançar o sucesso reprodutivo. Consequentemente foram selecionados, ao longo do curso evolutivo, flores e frutos capazes de atrair polinizadores e dispersores de sementes de locais distantes (Ghazoul, 2005). Muitas espécies arbóreas possuem meios efetivos de dispersão de genes e com isso mantêm altos níveis de variação genética dentro das populações com pouca diferenciação genética entre populações (Hamrick et al., 1979; Hamrick, 1983; Loveless & Hamrick, 1984; Hamrick & Godt, 1990).

De um modo geral, plantas que dispersam suas sementes pelo vento, ingestão animal ou através de aderência a animais mantêm níveis de variação mais altos dentro de suas populações que espécies com outros mecanismos menos eficientes de dispersão de sementes. Espécies com sementes explosivas ou aquelas com sementes que se dispersam pela gravidade são as que, em regra, apresentam menor variação intrapopulacional (Cavalli & Winge, 2003).

Ghazoul (2005) menciona que o fluxo gênico entre populações fragmentadas e amplamente separadas pode ser sustentado se polinizadores forem capazes de se movimentar através de longas distâncias. Grandes abelhas e beija-flores são capazes de atravessar várias centenas de metros (Jennersten, 1998; Schulke & Waser, 2001; Dick et al., 2003) e morcegos vários quilômetros (Law & Lean, 1999) de terreno com recursos escassos de modo que as

plantas polinizadas por estes grupos podem ser menos suscetíveis ao declínio reprodutivo induzido pela fragmentação.

Assim, a estrutura genética de populações de espécies arbóreas está intimamente relacionada com a capacidade de dispersão da espécie. De acordo com Burczyk et al. (2004), em populações de plantas o fluxo gênico intenso pode efetivamente contrapor os efeitos detrimentais da deriva genética ou seleção direcional e ser a origem de novos alelos. Contudo, muito da endogamia observada dentro de populações naturais de espécies florestais é determinada pela distância e taxa com que os genes migram dentro e entre populações (Coles & Fowler, 1976).

Segundo Sork et al. (2002), para o manejo e conservação de populações arbóreas é muito importante conhecer as distâncias de dispersão efetiva do pólen e sistema de cruzamento em função da densidade de árvores. A redução no tamanho das populações, associada à baixa densidade populacional favorece a ocorrência de baixo número de indivíduos reprodutivos e se o movimento dos vetores de polinização e dispersão de sementes também for reduzido pela fragmentação, então os fragmentos se tornam unidades geneticamente e demograficamente isoladas de pequenos tamanhos efetivos, tornando as espécies vulneráveis à extinção local (Nason & Hamrick, 1997).

Portanto, a intensidade do fluxo gênico entre as populações pode ser considerada como o elemento-chave para predizer os efeitos da fragmentação. Com altas taxas de fluxo gênico, pouca variabilidade genética será perdida nos fragmentos em níveis individuais e na espécie como um todo. Por outro lado, se as taxas de fluxo gênico são reduzidas abaixo dos níveis anteriores à fragmentação, então a estrutura genética entre fragmentos aumentará e a variabilidade genética dentro destes diminuirá (Hamrick, 2004). Nesse contexto, investigações sobre as distâncias e os níveis de dispersão de pólen e sementes em paisagens fragmentadas, podem auxiliar no entendimento do fluxo gênico entre fragmentos e na manutenção da variabilidade genética dentro de cada fragmento.

O fluxo gênico pode ser quantificado por medidas diretas e indiretas através de estudos genéticos baseados em dados de marcadores moleculares. Os métodos indiretos baseiam-se nas análises da estrutura genética de populações (estimativas de F_{ST}, alelos privados e auto-correlação espacial) e referem-se ao fluxo gênico histórico (passado). Os métodos diretos referem-se ao fluxo gênico contemporâneo (atual) e são inferidos através das análises de parentesco (maternidade e paternidade) (Ouborg et al., 1999; Zucchi, 2002; Ashley, 2010).

As análises de parentesco consistem na utilização de locos gênicos para identificar o mais provável parental de um conjunto de candidatos (Hamrick & Schnabel, 1985). O

procedimento básico para este tipo de análise consiste em determinar os genótipos de todos os adultos reprodutivos da população sob consideração e compará-los com os genótipos de uma amostra representativa de progênies oriundas de polinização natural e/ou plântulas estabelecidas *in situ* (Ouborg et al., 1999). Por meio de métodos de máxima verossimilhança (Meagher & Thompsom, 1987) ou formas de análises de exclusão de paternidade (Devlin et al., 1988; Devlin & Ellstrand, 1990) pode ser possível identificar o provável parental (paterno e/ou materno) de cada indivíduo juvenil. Uma vez que o parental paterno do indivíduo é identificado, o padrão do movimento de pólen dentro da área estudada pode ser determinado. Já a frequência de indivíduos que carregam alelos encontrados nos juvenis, mas não na população parental, corresponde à estimativa da dispersão de sementes realizadas na população (Ouborg et al., 1999).

Este método de estimação do fluxo gênico é extremamente atrativo, pois permite identificar os prováveis pais envolvidos nos cruzamentos, conhecer sobre o sucesso reprodutivo dos indivíduos, detectar contaminação de pólen externo e inferir sobre os padrões de dispersão do pólen e sementes (Lian et al., 2001; Wang, 2004; Robledo-Arnuncio & Gil, 2005). A resolução deste procedimento é dependente do número de locos polimórficos, número de alelos por loco, frequência alélica e número de pais potenciais (Zucchi, 2002).

Recentemente, a determinação da dispersão contemporânea de pólen e sementes dentro de populações arbóreas tem sido eficientemente conduzida com base em marcadores genéticos altamente polimórficos, como microssatélites (Sato et al., 2006; Bittencourt & Sebbenn, 2007; Garcia et al., 2007; Bacles & Ennos, 2008; Geng et al., 2008; Lacerda et al., 2008; Carneiro et al., 2009; Nakanishi et al., 2009; Barluenga et al., 2010; Collevatti et al., 2010; Gaino et al., 2010; Moraes & Sebbenn, 2010; Braga & Collevatti, 2011; Buschbom et al., 2011; Sebbenn et al., 2011).

A quantificação dos padrões de dispersão de pólen e sementes também poderá contribuir para o entendimento dos impactos de mudanças climáticas sobre a distribuição de espécies arbóreas tropicais (Dick et al., 2008). Em espécies arbóreas o movimento do pólen pode ser bastante extensivo para permitir a troca de variação genética adaptativa em resposta às mudanças nas condições climáticas (Hamrick, 2004). Entretanto, devido à colonização de novas áreas somente ocorrer através da dispersão de sementes, a compreensão do movimento potencial das sementes ajudará a predizer se populações de plantas serão capazes de se expandir por meio da migração em habitats adequados ao longo das gerações seguintes (Hamrick, 2004).

Em suma, pesquisas envolvendo estimativas da dinâmica espacial e temporal do fluxo de pólen e sementes, que considerem as características da paisagem remanescente, são

fundamentais para predizer as mudanças genéticas causadas pela fragmentação em populações de espécies arbóreas tropicais (Hamilton, 1999) e promover uma conservação efetiva dos remanescentes florestais.

1.5. Sistema de reprodução

Em estudos de genética populacional, o conhecimento do sistema reprodutivo é de extrema importância, pois os padrões de cruzamentos influenciam a quantidade e distribuição da variabilidade genética e, portanto, os processos evolucionários em populações naturais (Ritland & Jain, 1981; Hedrick, 1990). De acordo com Wright (1921), o sistema de reprodução refere-se à forma como um indivíduo, população ou espécie transfere suas informações genéticas de uma geração para outra, podendo ser assexuado ou sexuado.

As plantas, ao longo de sua evolução, têm se adaptado para diferentes formas de reprodução assexuada e sexuada. A reprodução assexuada pode ser classificada em duas grandes categorias: reprodução vegetativa e reprodução apomítica. Em ambos os casos não há a participação de gametas, a descendência é gerada a partir de tecidos de um único organismo somente por divisões mitóticas e, portanto, todas as células resultantes têm a mesma constituição genética. Assim, excetuando-se os casos em que ocorram mutações somáticas, a constituição genética de uma população propagada assexuadamente tende permanecer constante e igual a dos genitores (Cavalli, 2003; Karasawa et al., 2009).

Entretanto, a reprodução de vegetais superiores geralmente envolve o processo sexual, onde dois indivíduos produzem gametas de tipos opostos que se fundem e formam um zigoto, originando uma descendência com diferentes genótipos multilocos (Finkeldey, 1998). Segundo Richards (1997), este modo de reprodução se fundamenta em dois princípios: gerar variabilidade por meio da recombinação, segregação e fusão sexual (singamia), e promover a migração gênica pela troca e incorporação de genes.

Os sistemas de reprodução sexuada vegetal podem ser divididos em três classes principais quanto à forma de cruzamento: alógamas, autógamas e mistas (Fryxell, 1957). O processo conhecido como alogamia pode envolver o cruzamento entre diferentes indivíduos, bem como a transferência de pólen entre diferentes flores de uma mesma planta (geitonogamia). Na autogamia verifica-se a fusão dos gametas masculinos e femininos de uma mesma flor (autofecundação). No sistema misto, por sua vez, os dois processos anteriores são detectados, com predominância de um deles, conforme a relação entre as taxas de cruzamento e autofecundação (Wendt, 2005).

Segundo Finkeldey (1998), os possíveis eventos reprodutivos que podem ocorrer entre os membros de uma população estão relacionados ao sistema sexual da planta ou espécie (dioicia, monoicia ou hermafroditismo). As espécies dióicas, por exemplo, só se reproduzem por cruzamentos (alogamia), visto que os gametas masculinos e femininos são produzidos sempre em indivíduos diferentes. Já na monoicia, a separação espacial dos sexos dentro de um mesmo indivíduo favorece a fertilização cruzada, mas não impede a ocorrência de autofecundação. A polinização em plantas hermafroditas pode levar a ocorrer misturas de cruzamentos e autofecundação.

Nas florestas tropicais, o sistema sexual predominante é o hermafroditismo, sendo seguido pela dioicia, enquanto nas temperadas predomina a monoicia (Raven et al., 2001). Estima-se que a unissexualidade ocorra em 10 % das espécies de Angiospermas. Estas espécies unissexuais estão distribuídas entre 75 % das famílias, sugerindo que tenham surgido por eventos evolutivos independentes (Santos, 2003). Segundo esse mesmo autor, a unissexualidade evoluiu como um sistema promotor da alogamia, a qual evita os efeitos deletérios do endocruzamento e promove a heterozigosidade, aumentando assim a variabilidade genética e, consequentemente, gerando vantagem adaptativa.

Bawa (1974), estudando o sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais na floresta tropical semidecídua da Costa Rica, através de polinização controlada e observações da biologia floral, verificou que, de 130 espécies, 14 % eram autocompatíveis, 54 % auto-incompatíveis, 68 % hermafroditas, 22 % dióicas e 10 % monóicas. Os resultados de Bawa mostraram claramente as estratégias adotadas pelas espécies florestais para evitar a autofecundação e forçar o cruzamento, consequentemente, forçar a recombinação, permitindo desse modo, a manutenção de alta variabilidade genética nas populações.

Em síntese, o modo de reprodução (sexual ou assexual) e o sistema de cruzamento (autogamia, alogamia ou misto) que cada espécie apresenta têm um efeito marcante na composição genética de suas populações (Finkeldey, 1998). Ambos exercem controle na distribuição das frequências genotípicas e afetam o potencial de recombinação das populações, podendo moderar ou acelerar a taxa em que novas combinações gênicas são produzidas (Zanettini & Cavalli, 2003). Neste aspecto, Allard (1999) pontua que a determinação da forma preferencial de acasalamento nas plantas é importante para o correto delineamento dos métodos de melhoramento e conservação genética a serem aplicados à espécie estudada, já que estas estratégias diferem de acordo aos sistemas reprodutivos.

Segundo Allard (1999), são consideradas espécies alógamas todas aquelas que apresentarem nível de cruzamento superior a 90 %, enquanto as autógamas correspondem às espécies que possuem até 10 % de cruzamento. Por sua vez, todas as espécies que se

reproduzem utilizando os sistemas sexuais alógamo e autógamo simultaneamente são consideradas como sendo espécies mistas. Estas espécies apresentam taxas de cruzamentos que variam de 10 até 90 % dependendo das condições ambientais e da frequência de polinizadores (Allard, 1999). Goodwillie et al. (2005) sugerem que esta forma de reprodução seja comum entre angiospermas e gimnospermas compreendendo, em média, 80 % ou mais.

O sistema misto de reprodução prediz variabilidade genética intermediária entre espécies de autofecundação e de reprodução cruzada (Loveless & Hamrick, 1984). Espécies que permitem um elevado nível de autofecundação devem ter um excesso de homozigotos, podendo apresentar níveis relativamente altos de diferenciação entre populações, resultante da deriva genética (Dick et al., 2008). Além disso, espera-se que populações autógamas, em decorrência do elevado nível de homozigose, não apresentem variabilidade potencial dentro de populações, pois as mutações que surgem são eliminadas mais rapidamente que nas alógamas, o que pode limitar sua capacidade de responder as alterações ambientais (Karasawa et al., 2009).

Segundo Hamrick & Loveless (1986), o sistema de reprodução, junto com o mecanismo de dispersão de pólen e sementes, determina parte da estrutura genética de populações. De modo geral, espécies que apresentam ampla distribuição geográfica, gerações longas, polinização pelo vento, sistema de reprodução por cruzamentos, longo tempo de fecundidade e ocorrem em estágios finais de sucessão, tendem a manter maiores níveis de variabilidade genética do que espécies com outras combinações destes fatores (Hamrick et al., 1979; Hamrick, 1983; Loveless & Hamrick, 1984).

Contudo, visto que as plantas têm pouco ou nenhum controle direto sobre o ambiente em que vivem, as taxas de cruzamentos podem variar em resposta a uma série de fatores que afetam os eventos de polinização cruzada (Eckert et al., 2009). Diversas variáveis ecológicas têm sido propostas como fatores que podem afetar os padrões de acasalamento em espécies arbóreas, como por exemplo, o isolamento espacial (Cascante et al., 2002; Fuchs et al., 2003), a fenologia de floração (Oddou-Muratorio et al., 2006), densidade de plantas (Murawski & Hamrick, 1991) e, a atividade dos polinizadores (Hirao et al., 2006).

Segundo Eckert et al. (2009), existem fortes evidências de que intervenções antrópicas podem afetar de forma negativa os padrões de acasalamento em plantas. Alterações antrópicas na densidade de população de plantas reprodutivas, por exemplo, podem afetar o sistema reprodutivo de árvores e resultar em um aumento da autofecundação e cruzamentos correlacionados (Robledo-Arnuncio et al., 2004). O aumento da autofecundação em árvores isoladas espacialmente pode resultar em endogamia na descendência e ao longo de sucessivas

gerações ocasionar uma diminuição da aptidão da população, devido à depressão endogâmica (Nason & Hamrick, 1997).

Neste contexto, estratégias de conservação devem exigir conhecimentos sobre os níveis das taxas de fecundação cruzada, cruzamentos correlacionados, cruzamentos entre parentes e autofecundação, pois estes afetam a diversidade genética das novas gerações e, consequentemente, determinam a capacidade de resposta de uma espécie à perturbação antrópica. Ainda Hall et al. (1996), ressaltam que estudos sobre sistema de acasalamento são importantes determinantes do tamanho efetivo populacional, parâmetro este de importância crítica para elaboração dos planos de conservação.

Os métodos tradicionais para avaliação do sistema reprodutivo baseiam-se na observação dos cruzamentos e do comportamento dos agentes polinizadores, no exame da morfologia floral das plantas e de resultados de experimentos de polinização controlada. Esses métodos fornecem indicações sobre o sistema reprodutivo de uma espécie, mas não permitem uma medida direta do sucesso reprodutivo de populações (Paiva et al., 1994).

Com o advento dos marcadores moleculares, as taxas de cruzamentos puderam ser estimadas mais efetivamente do que pelos métodos tradicionais (Bawa, 1976). Segundo Ritland (1983), um método mais acurado e realista sobre a taxa de cruzamentos pode ser obtido pelo exame dos padrões de segregação de progênies derivadas de um genótipo materno conhecido. Isto pode ser facilmente feito se progênies de polinização natural e o seu respectivo genótipo materno forem acessados com marcadores codominantes como isoenzimas, RFLP e SSR.

No Brasil, as taxas de cruzamento de diversas espécies já foram estudadas utilizando marcadores isoenzimáticos (*Genipa americana,* Sebbenn et al., 1998; *Cariniana legalis,* Sebbenn et al., 2000; *Esenbeckia leiocarpa,* Seoane et al., 2001; *Copaifera langsdorfii,* Oliveira et al., 2002; *Chorisia speciosa*, Souza et al., 2003; *Senna multijuga,* Ribeiro & Lovato, 2004; *Caesalpinia echinata*, Neto et al., 2005; *Eschweilera ovata*, Gusson et al., 2006; *Couratari multiflora*, Lepsch-Cunha, et al., 2011) e marcadores microssatélites (*Caryocar brasiliense*, Collevatti et al., 2001; *Theobroma grandiflorum*, Alves et al., 2003; *Euterpe edulis*, Seoane et al., 2005; *Solanum lycocarpum*, Martins et al., 2006; *Hymenaea courbaril*, Lacerda et al., 2008; Feres et al., 2009; *Copaifera langsdorffi*, Manoel, 2011; *Tabebuia roseo-alba*, Feres, 2009).

Embora algumas pesquisas sobre o sistema de cruzamento em espécies arbóreas tropicais têm sido realizadas, estudos genéticos similares em *Cariniana estrellensis*, espécie alvo do presente estudo, ainda não foram efetuados. De acordo com o exposto, esse tipo de

estudo é fundamental para o conhecimento genético de uma espécie quando se objetiva sua conservação e/ou seu melhoramento genético.

1.6. Tamanho efetivo populacional

A diversidade genética intrapopulacional depende principalmente do tamanho da população (*N*). Populações com pequeno número de indivíduos, normalmente, estão mais sujeitas a fatores evolutivos como deriva genética e endogamia, exibindo uma menor variabilidade genética e, consequentemente, um potencial adaptativo mais limitado (Futuyma, 1992). A avaliação da representatividade genética de amostras pode ser feita através do tamanho efetivo populacional (N_e) que é um parâmetro crucial para o julgamento do impacto da deriva sobre a estrutura genética de populações (Moraes, et al., 1999).

O tamanho efetivo pode ser definido como o tamanho de uma população idealizada na qual todos os indivíduos têm igual probabilidade de contribuir com gametas para a próxima geração, podendo gerar a mesma quantidade de endogamia ou variância nas frequências alélicas como a observada na população sob consideração (Wright, 1931; Treuren, 1959; Kimura & Crow, 1963; Crow & Kimura, 1970; Caballero, 1994).

Em termos práticos, esse parâmetro refere-se ao número de indivíduos geneticamente diferentes que compõem uma amostra e que efetivamente participam para a formação da próxima geração. Ele pode ser definido com relação ao parâmetro genético de interesse. Assim, a definição em função da endogamia recebe a denominação de "tamanho efetivo de endogamia" e refere-se à população parental (ou avós), enquanto a definição em função da variância nas frequências alélicas é conhecido como "tamanho efetivo de variância", estando diretamente relacionado às populações de progênies (Kimura & Crow, 1963).

Em adição, cabe ressaltar que o tamanho efetivo é sempre determinado em relação a uma população de referência ideal. A população ideal consiste de uma população de tamanho infinito, subdividida em infinitas subpopulações de cruzamentos aleatórios, cada uma com número (*N*) constante de indivíduos reprodutivos por geração. Em cada subpopulação, todos os indivíduos sobrevivem do nascimento à fase adulta e têm iguais chances de procriar, pois produzem um infinito número de gametas masculinos e femininos dentro de um grande conjunto, do qual apenas $2N$ gametas são aleatoriamente amostrados e unidos para para produzir *N* zigotos da seguinte geração. Mudanças sistemáticas nas frequências alélicas (seleção) são excluídas nessa população idealizada, as gerações não se sobrepõem e apenas locos autossomais são considerados (Caballero, 1994).

Entretanto, é muito improvável que populações reais, sejam elas naturais ou não, estejam em conformidade com todas as simplificações feitas para a população idealizada. Sendo assim, o tamanho efetivo populacional (N_e) pode diferir muito do tamanho censo (N) de uma população, sendo usualmente muito menor (Wright, 1938). A diminuição do tamanho efetivo da população é, portanto, um dos principais responsáveis pela perda de variabilidade em populações ameaçadas de extinção (Solé-Cava, 2001). Contudo, as diferenças entre os tamanhos censo (N) e efetivo (N_e) dependem de peculiaridades reprodutivas de cada espécie.

Disparidades entre esses parâmetros podem ocorrer quando apenas uma fração da população participa da reprodução. Se, por exemplo, em uma população de plantas alguns indivíduos florescem e outros não, os poucos indivíduos que se reproduzem contribuem desproporcionalmente às gerações subsequentes, podendo ocorrer aumento da deriva genética (Treuren, 1959; Futuyma, 1992). Além disso, número desigual de machos e fêmeas, sobreposição de gerações, acasalamentos não aleatórios, fertilidade diferencial e flutuações em tamanhos populacionais, entre outros fatores, contribuem para que o tamanho efetivo (N_e) das populações sejam menores do que seu tamanho censo (N) (Barret & Kohn, 1991; Futuyma, 1992; Lawrence & Marshall, 1997).

Uma questão comumente levantada é a que diz respeito ao tamanho efetivo ideal que se deve procurar atingir para a conservação de uma espécie. Nesse sentido, diferentes considerações a respeito de um N_e mínimo têm sido relatadas na literatura. O tamanho efetivo de 50 tem sido sugerido por Frankel & Soulé (1981) como suficiente para evitar os danos da depressão por endogamia no curto prazo (até 10 gerações). Já para o propósito de manter grande proporção da variação genética de uma população por longo tempo, Franklin (1980) sugeriu o tamanho efetivo de 500. Por outro lado, Lande (1995) estimou que o tamanho efetivo de 5.000, em vez de 500, seria necessário para minimizar os efeitos da deriva genética e manter uma alta variação genética nas populações, podendo servir como um reservatório para futuras adaptações da espécie em resposta aos processos de seleção natural e evolução das condições ambientais. Lynch (1996), por sua vez, determinou o tamanho efetivo de 1.000 para manter o potencial adaptativo e sobrevivência de uma população.

A idéia geralmente aceita, contudo, é que um N_e menor do que 50 é vulnerável ao efeitos imediatos da depressão por endogamia (Rieman & Allendorf, 2001). Nunney & Campbell (1993), têm sugerido utilizar como referência os valores de 50 e 500 multiplicados por duas a quatro vezes, e para algumas espécies possivelmente por mais, para compensar as diferenças genéticas, reprodutivas e demográficas das populações naturais em relação à população ideal hipotetizada.

Em suma, o tamanho efetivo populacional é um parâmetro muito importante nas atividades de preservação de germoplasma, coleta de sementes e conservação genética *in situ*, auxiliando projetos de manejo e conservação genética das espécies (Vencovsky, 1987; Sebbenn, 2002; Sebbenn, 2003). Segundo esses mesmos autores, informações a respeito da representatividade genética dos indivíduos adultos e juvenis de uma população (N_e) são importantes para a maximização das atividades de coleta de sementes, permitindo, então, calcular o número de matrizes a serem amostradas. No enriquecimento da vegetação ou recuperação de áreas, a coleta de sementes a partir deste princípio proporcionará infinitas novas recombinações genotípicas na população, elevando o potencial evolutivo.

1.7. Marcadores microssatélites (SSR)

A análise genética de espécies florestais progrediu com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgindo diversos métodos de detecção de polimorfismo genético no DNA, usando-se marcadores moleculares. Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico do DNA (relacionado a regiões expressas ou não do DNA). O polimorfismo refere-se às diferenças nas sequências de nucleotídeos ao longo da fita de DNA observadas entre indivíduos (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para verificar a variabilidade genética no DNA, destacando-se: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA)*, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), SSR (*Simple Sequence Repeats*) e, mais recentemente, polimorfismos de base individual (SNP). Estes marcadores podem diferir quanto o tipo de herança, a abundância dentro do genoma, o nível de polimorfismo e informação genética detectados, a especificidade dos locos, a reprodutibilidade, os requerimentos técnicos e o investimento financeiro (Buso et al., 2003).

Entre as classes de marcadores existentes, os microssatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSR) constituem uma das classes que mais se aproximam do marcador ideal para os estudos de genética de populações (Rafalski et al., 1996), constituindo uma ferramenta útil na construção de mapas genéticos, análise de paternidade, fluxo gênico, diagnóstico de doenças, investigação forense, análise populacional, estudos ecológicos e biologia da conservação (Chase et al., 1996).

Os microssatélites ou SSR consistem de sequências curtas de 1 a 6 nucleotídeos repetidas na mesma ordem, encontrados frequentemente e aleatoriamente em todos os DNAs

nucleares eucarióticos examinados (Tautz & Renz, 1984; Gupta et al., 1996; Oliveira et al., 2006). São considerados marcadores ideais para estudos genéticos em plantas por possuírem uma série de características desejáveis como: distribuição ao acaso e ocorrência em grande quantidade em genomas de eucariotos; codominância dos alelos, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados no gel; facilidade de detecção via PCR e alta diversidade alélica (Dayanandan et al., 1997; Chase et al., 1996; Rossetto et al., 1999).

Segundo Eisen (1999), estes marcadores apresentam uma alta taxa de mutação, variando de 10^{-6} a 10^{-2} por geração, sendo que a maioria das mutações é ocasionada por alterações no número das unidades de repetição. Acredita-se que esta instabilidade surge através de um mecanismo específico de mutação chamado deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase (Tautz & Schlotterer, 1994), que ocorre durante a replicação do DNA e conduz ao aumento ou à diminuição do número de repetições. Outro motivo pelo qual a taxa de mutação é alta nos microssatélites é devido ao fenômeno de *crossing-over* desigual, causado pelo pareamento errôneo destas sequências durante os quiasmas (Eisen, 1999).

Devido à distribuição preferencial nas regiões não codificadoras, os microssatélites podem não sofrer ação da seleção natural, o que os torna seletivamente neutros e muito úteis para estudos da genética das populações naturais (Eisen, 1999). Entretanto, atualmente sabe-se que a expansão no número de repetições pode causar doenças humanas (como a de Huntington) além de desordens neurodegenerativas que também têm sido associadas à ampliação no número de repetições em determinadas regiões microssatélites (Oliveira et al., 2006). Em plantas, microssatélites têm ocorrido frequentemente dentro e próximos a genes (Morgante et al., 2002).

Outra característica muito interessante desses marcadores é sua grande reprodutibilidade, dado que é possível obter os mesmos resultados em qualquer laboratório do mundo (Cenis, 2000). Cada uma das regiões de microssatélites constitui um loco genético e os diferentes tamanhos de bandas que se podem amplificar constituem os diversos alelos desse loco. Sendo assim, a comparação de dados é facilitada pelo fato de que os resultados de microssatélites se expressam numericamente, mediante o tamanho dos pares de nucleotídeos dos alelos de cada loco (Cenis, 2000).

Segundo Grattapaglia (2001) a grande desvantagem do marcador baseado em SSR é o custo relativamente alto e a necessidade de conhecimento e infraestrutura em biologia molecular para o desenvolvimento de sequências específicas de *primers*. Apesar disso, o elevado custo é facilmente recompensado pela ampla gama de potencialidades de pesquisa e desenvolvimento que se abrem ao se possuir tal tecnologia para uma determinada espécie.

No Brasil, o desenvolvimento e o uso de marcadores microssatélites de plantas são recentes e está sendo empregado em estudos populacionais de espécies florestais como *Caryocar brasilense* (Collevatti et al., 1999), *Swietenia macrophylla* (Lemes et al., 2002), *Ceiba pentandra* (Brondani et al., 2003), *Oenocarpus bacaba* (Lepsch-Cunha et al., 2003), *Copaifera langsdorffii* (Ciampi et al., 2000; Gonela, 2005), *Hymenaea courbaril* (Ciampi et al., 2008), *Araucaria angustifolia* (Schmidt et al., 2007), *Caesalpinia echinata* (Melo et al., 2007), *Eugenia uniflora* (Ferreira-Ramos et al., 2007), *Tabebuia aurea* (Braga et al., 2007), *Butia eriospatha* (Nazareno et al., 2011), *Anadenanthera colubrina* (Feres et al., 2011), *Aspidosperma polyneuron* (Ferreira-Ramos et al., 2011), *Metrodorea nigra* (Guidugli et al., 2011).

Visando a realização de estudos genéticos que auxiliem na conservação *in situ* e *ex situ* da espécie florestal *Cariniana estrellensis* (jequitibá branco), um dos objetivos do presente trabalho foi realizar o desenvolvimento de marcadores microssatélites para esta espécie. A fim de verificar a aplicabilidade dos marcadores desenvolvidos para estudos genéticos de outras espécies da família Lecythidaceae, estudos de amplificação heteróloga para a espécie *Cariniana legalis* também foram realizados.

1.8. Considerações sobre a espécie

1.8.1. Características do gênero *Cariniana*

A família Lecythidaceae é dividida em três subfamílias: Planchonioideae, Foetidioideae e Lecythidoideae. Possui distribuição pantropical, com 440 espécies descritas em 20 gêneros (Morton et al., 1997), sendo que cerca de 200 espécies da subfamília Lecythidoideae têm distribuição exclusivamente neotropical e formam possivelmente um táxon monofilético (Prance & Mori, 2004; Mori et al., 2007). Segundo Mori & Prance (2006), as Lecythidaceae neotropicais estão entre as mais espetaculares plantas do mundo devido as suas flores vistosas e seus grandes frutos, podendo ser encontradas desde o norte do México até o sul do Paraguai (Figura 3).

Figura 3. Área de distribuição das Lecythidaceae neotropicais. Fonte: http://sweetgum.nybg.org/lp/index.php.

Cariniana Casar. é um gênero pertencente a esta família e foi nomeado em 1842, após a viagem de Cassareto para o Brasil (Leite, 2007). No entanto, o gênero foi reconhecido por apenas poucos botânicos após sua publicação e espécies de *Cariniana* foram geralmente publicadas em *Couratari* Aubl. Durante um longo período, a distinção entre *Cariniana* e *Couratari* não foi estabelecida porque espécies de ambos os gêneros apresentam frutos campanuliformes ou cilíndricos e sementes aladas (Huang et al., 2008).

Em 1874, Miers salientou grandes diferenças entre *Cariniana* e *Couratari* com relação ao androceu e as sementes aladas, reintegrando a definição do gênero *Cariniana.* Atualmente, *Cariniana* é um gênero composto por 16 espécies restritas a habitats de florestas neotropicais em locais bem drenados. Os representantes do gênero apresentam as menores flores em Lecythidaceae, possuem ovários triloculares, frutos cilíndricos e sementes aladas unilaterais (Huang et al., 2008).

No entanto, uma análise cladística do gênero indicou claramente que existem dois grupos em *Cariniana* e que um desses grupos está estreitamente relacionado com *Allantoma*. Assim, Huang et al. (2008) têm redefinido *Cariniana* em dois clados: um clado *Allantoma/Cariniana decandra* que inclui *Allantoma lineata* e sete espécies de *Cariniana* (*C. integrifolia*, *C. decandra*, *C. kuhlmannii*, *C. multiflora*, *C. pachyantha*, *C. pauciramosa*, *C. uaupensis*) com androceu actinomórfico; e o clado *C. legalis* representado por nove espécies (*C. domestica*, *C. estrellensis*, *C. ianeirenses*, *C. micrantha*, *C. pedunliflora*, *C. pyriformes*, *C. rubra*, *C. legalis*, *C. parviflora*) que apresentam flores com androceu zigomórfico.

Nas espécies de *Cariniana* com flores zigomorfas, o androceu é caracterizado por muitos estames férteis, soldados ou não na base, dispostos ao redor do gineceu, formando um

anel estaminal que se prolonga e forma o capuz estaminal. Essa estrutura floral, encontrada apenas em flores de espécies de Lecythidoideae (Tsou & Mori, 2007), possui estames ou estaminódios, que podem apresentar anteras férteis, anteras estéreis e/ou podem produzir néctar (Prance & Mori, 2004). O aumento da complexidade do androceu pela evolução do capuz estaminal é a principal tendência evolutiva floral na subfamília Lecythidoideae (Tsou & Mori, 2007).

Prance (1976) propõe que a formação do capuz estaminal tenha ocorrido para aumentar a eficiência dos polinizadores, para proteger os estames férteis e para a produção de néctar. Mori & Prance (1981) observaram que o capuz estaminal serve de plataforma de pouso para os insetos; força o dorso dos polinizadores contra o anel estaminal e o estigma; fornece recompensas alimentícias para os polinizadores; e, em alguns gêneros, limita o acesso de determinados insetos com tamanho insuficiente para promover a polinização à recompensa oferecida.

De acordo com Aguiar & Gaglianone (2008), as profundas variações morfológicas no androceu de Lecythidaceae estão relacionadas a diferentes sistemas de polinização. De maneira geral, flores cujo androceu é menos complexo, apresentam-se disponíveis para muitos grupos de polinizadores, enquanto flores morfologicamente complexas, devido a modificações do androceu, restringem a visitação a um menor grupo de polinizadores efetivos.

Em *Cariniana estrellensis*, espécie alvo deste trabalho, a simetria zigomórfica da flor é conferida pela complexidade do seu androceu, estrutura resultante da fusão de numerosos estames que formam um tubo curto, marcadamente prolongado de um lado para formar a lígula (Monteiro-Scanavacca, 1975).

1.8.2. A espécie: Cariniana estrellensis *(Raddi) Kuntez*

Cariniana estrellensis (Raddi) Kuntez, espécie popularmente conhecida como jequitibá branco, bingueiro, cachimbeiro, estopeira, pito de macaco entre outros nomes, é considerada uma árvore típica dos estágios sucessionais avançados, característica de floresta clímax, prefere solos úmidos e profundos, sendo rara no cerrado e em terrenos mais secos. Caracteriza-se como uma planta semidecídua no inverno, heliófila ou de luz difusa, que tolera sombreamento na fase juvenil (Lorenzi, 2002) (Figura 4).

Esta espécie apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo no Brasil, Bolívia, Paraguai e Peru. É principalmente encontrada em florestas pluvial atlântica e subtropical na costa do Brasil, desde sul da Bahia até o Rio Grande do Sul. A espécie também pode ocorrer

em florestas secas do interior dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Aparece ainda no Acre e florestas de galeria do Brasil Central (Leite, 2007) (Figura 5).

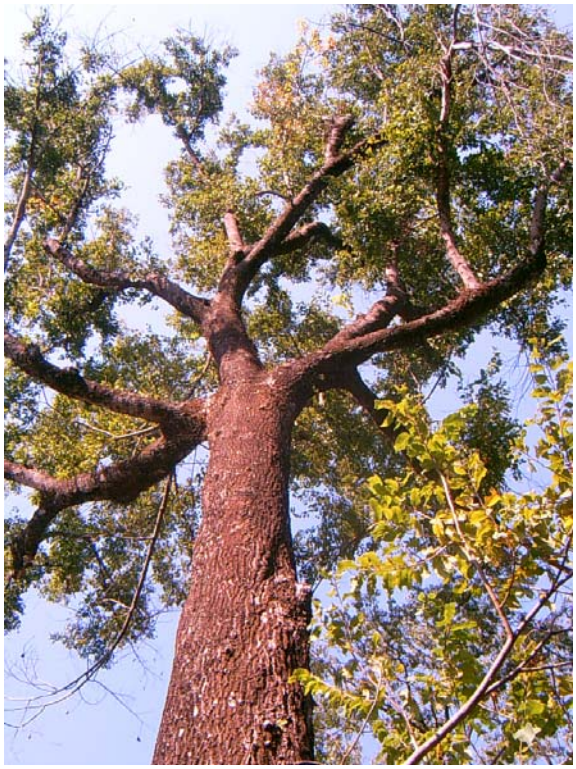

Figura 4. Árvore adulta de *Cariniana estrellensis* (jequitibá branco) Fonte: Arquivo Pessoal.

Figura 5. Distribuição de *C. estrellensis* na América do Sul. 1, Nordeste do Brasil; 2, Sudeste e Sul do Brasil; 3. Região Central do Brasil; 4. Oeste do Brasil, Bolívia e Peru. Fonte: Leite, 2007.

No Brasil, *Cariniana estrellensis* é uma das espécies consideradas mais longevas, e as grandes árvores remanescentes desse gênero pertencem a um grupo de vegetais em via de extinção, podendo apresentar-se como uma espécie rara ou de baixa densidade dependendo da região de ocorrência. Leite (2001), por exemplo, observou padrão de agrupamento da distribuição espacial de *C. estrellensis* em uma área com densidade de 0,96 árvores/ha dentro do Parque Nacional de Brasília. Por outro lado, em levantamento fitossociológico realizado à margem do Rio do Peixe, no Estado de São Paulo, foram encontradas 27 árvores/ha de *Cariniana estrellensis* junto ao rio e 14 árvores/ha, na encosta da área (Toledo-Filho et al., 2000).

Quanto aos aspectos morfológicos, a planta pode apresentar entre 35-45 m de altura e tronco com 90-120 cm de diâmetro, podendo atingir excepcionalmente 50 m de altura e 215 cm de diâmetro na idade adulta (Lorenzi, 2002; Carvalho, 2003). O tronco de *C. estrellensis* é reto, cilíndrico, com casca de até 20 mm de espessura e de cor creme na parte interna. A casca externa é cinza-clara a marrom-escura, rugosa, com numerosos sulcos não muito profundos, desprendendo-se em placas pequenas, irregulares (Figura 6A). Sua copa alta, flabeliforme ou arredondada, apresenta folhagem pouco densa e ramos grossos, angulosos, intensamente cobertos por epífitas (Carvalho, 2003). Suas folhas são alternas, simples, oblongo-elípticas a lanceoladas, lâmina do limbo com 3-11 cm de comprimento por 1,5-6,0 cm de largura, com margens serreadas, ápice acuminado e pecíolo levemente alado (Leite, 2007) (Figura 6B).

As flores desta espécie são pequenas, reunidas em racemos axilares ou panículas racemosas de 3-6 cm de comprimento inseridas nas axilas das folhas (Carvalho, 2003; Figura 6C). Occhioni (1975) notou poucas flores (5-12) na inflorescência, ao contrário de López (1987) que chama atenção para numerosas flores. A corola é constituída por seis pétalas de 4-7 mm de comprimento cada uma e de coloração creme-branca. O androceu é prolongado em apenas um lado, caracterizando uma flor zigomórfica, possui 5 cm de diâmetro basal, cor branca e cerca de 40 estames inseridos em todo o interior. As flores de *C. estrellensis* possuem ovário inferior e trilocular (Figura 7) e o estilete é muito curto (Leite, 2007).

A espécie apresenta frutos com cápsula cilíndrica, lisa, do tipo pixídio, com tamanho de 5-9 cm de comprimento e 3,0-3,5 cm de largura. O pericarpo é fino e existe uma fila de protrusões em torno da linha de deiscência opercular. O opérculo, em forma de prego de cabeça convexa, possui de 1,5 a 2,5 cm em diâmetro no ápice e até 7 cm de comprimento. Em geral, cada fruto contém cerca de 6 a 17 sementes aladas e piriformes (Figura 6D) (Leite, 2007). Para obtenção de sementes os frutos devem ser colhidos da árvore antes da deiscência natural e expostos ao sol, em local ventilado, para a complementação da abertura e liberação

das sementes. A germinação das sementes de *Cariniana estrellensis* é epígea, iniciando entre 6 e 70 dias após a semeadura (Carvalho, 2003).

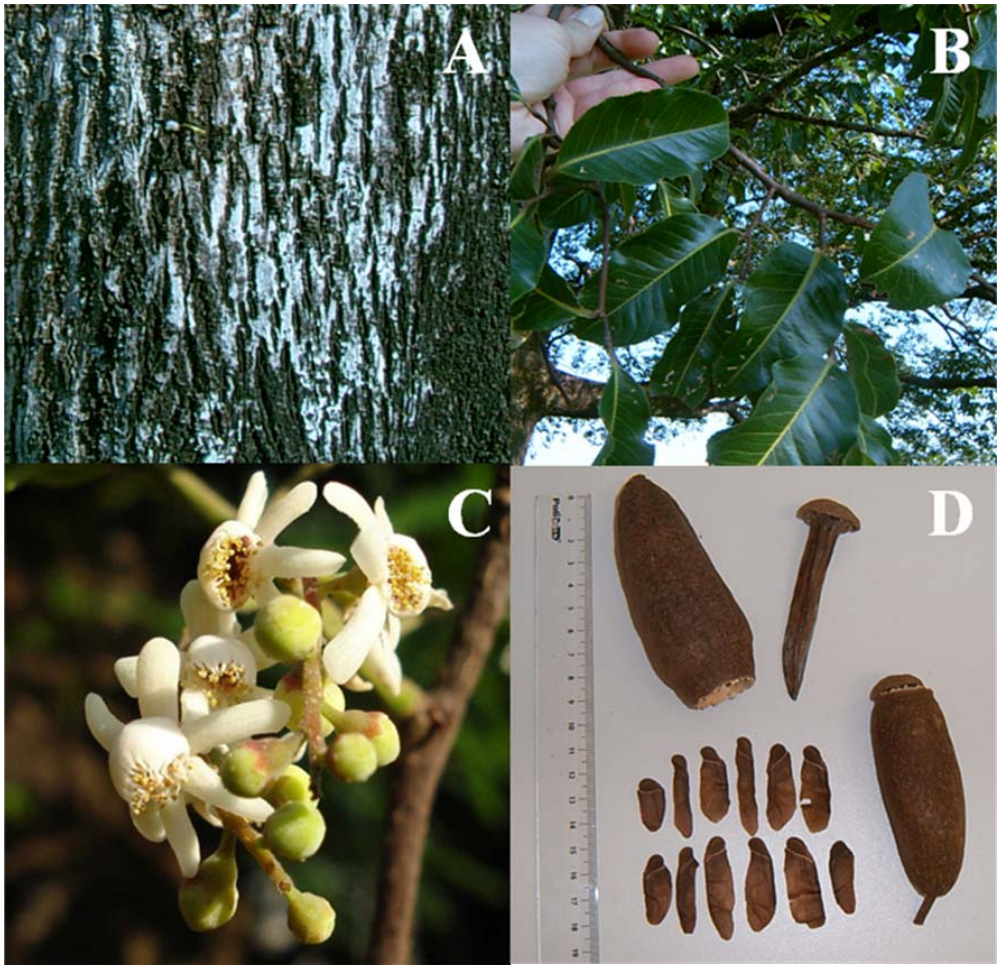

Figura 6. Características da espécie *Cariniana estrellensis*: casca externa do tronco (A), detalhe das folhas (B), flores (C) frutos e sementes (D). Fonte: Fotos A, B e D são arquivos pessoal; Foto C foi retirada do site http://sweetgum.nybg.org/lp/index.php.

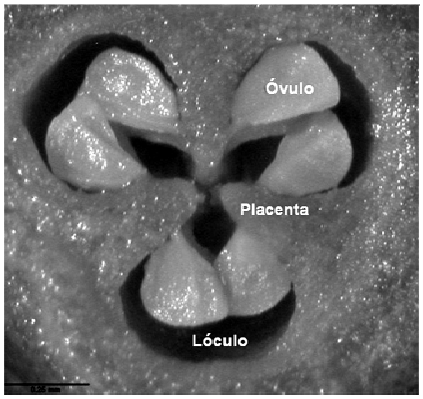

Figura 7. Foto do ovário trilocular de *Cariniana estrellenis*. Fonte: http://sweetgum.nybg.org/lp/index.php.

1.8.2.1. Biologia reprodutiva

Embora Prance & Mori (1979) tenham apontado para as Lecythidaceae um padrão geral de florescimento durante a estação seca, sabe-se que o período de florescimento para a espécie *C. estrellensis* varia muito de acordo com a localidade em que se encontra. Segundo Lorenzi (2002), a espécie floresce durante os meses de outubro-dezembro junto com o surgimento da nova folhagem; os frutos amadurecem em julho-setembro com a planta totalmente despida da folhagem. Em plantios, o processo reprodutivo inicia a partir dos dez anos de idade (Carvalho, 2003). Alogamia predomina na família (Leite, 2007).

A polinização em *C. estrellensis* é realizada possivelmente por diversos insetos pequenos, principalmente as abelhas (Carvalho, 2003). Prance & Mori (1979) relataram muitas abelhas dos gêneros *Melipona* e *Trigona* visitando flores de *Cariniana legalis*, um parente próximo de *C. estrellensis*. Segundo os mesmos autores, pólen parece ser a única recompensa para esses visitantes, pois néctar não é produzido.

Barbosa (1984) observou a polinização em *C. estrellensis*. Segundo relatos do mesmo autor, as flores perfumadas de *C. estrellensis* abrem ligeiramente antes do amanhecer e as anteras, as quais se encontram fechadas, liberam o pólen apenas após abertura da flor. As visitas intensificam uma hora após o sol nascer e o androceu bem como as pétalas caem juntos na parte da tarde. Existe uma barreira física que protege parcialmente pólen e estigma do contato com o inseto.

As sementes aladas unilaterais de *C. estrellensis* são dispersas por anemocoria (Leite, 2007), mas essa dispersão pode ser facilitada por macacos (*Alouatta caraya*) que consomem suas sementes durante as estações secas (Oliveira-Filho & Galetti, 1996; Lepsch-Cunha & Mori, 1999; Carvalho, 2003).

1.8.2.2. Importância sócio-econômica

A madeira de *C. estrellensis* tem substituído a utilização do cedro no Brasil (Barbosa, 1984), sendo amplamente empregada para propostas de construção em geral e carpintaria, mas designadamente para peças internas tais como molduras de janelas e portas, forros e persianas (Chudnoff, 1984; López, 1987). Segundo Leite (2007), a madeira do jequitibá branco é muito utilizada na construção naval, confecção de móveis, compensados, embalagens, brinquedos e canoas. Produz celulose para papel de boa qualidade, mas não é recomendada para energia, pois produz lenha de qualidade inferior (Carvalho, 2003).

As folhas e casca dessa espécie produzem tanino para curtimento de couro e o fruto é muito usado na confecção de cachimbos. As utilidades terapêuticas do jequitibá branco são inúmeras, inclusive na medicina popular, na forma de chás. Sua casca é um poderoso

adstringente e tem grande poder desinfetante, sendo por isso recomendada para as inflamações das mucosas e faringite (Carvalho, 2003). É útil, ainda, no tratamento de diarréias e anginas (Barbosa, 1984).

A espécie também possui qualidades ornamentais, mas devido ao seu grande porte é apenas recomendada para o paisagismo de parques e grandes jardins (Lorenzi, 2002). Além disso, é considerada planta indispensável nos reflorestamentos heterogêneos com fins ecológicos, sendo recomendada para reposição de mata ciliar para solos bem drenados ou com inundações periódicas de rápida duração (Carvalho, 2003).

Como consequência de seus atributos madeireiros, medicinais, e ecológicos, a espécie encontra-se em perigo de extinção, restando um número reduzido de populações remanescentes isoladas em pequenos fragmentos no interior do estado de São Paulo, o que justifica a necessidade de se realizar estudos que auxiliem na conservação *in situ* e *ex situ* dessa espécie.

1.8.2.3. Conservação genética de *Cariniana estrellensis*

Cariniana estrellensis é uma espécie de grande importância ecológica e comercial que, atualmente, encontra-se ameaçada de extinção principalmente devido à intensa exploração de sua madeira (Leite, 2007). Carvalho (2003) relata a presença desta espécie na lista de espécies em extinção, categoria vulnerável, no sul de Minas Gerais, e também na lista das espécies raras ou ameaçadas de extinção no Distrito Federal.

Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO (2002), *C. estrellensis* é uma espécie prioritária para programas de conservação de recursos genéticos florestais. O Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) inclui a espécie entre as suas prioridades de ação para conservar a variabilidade genética intra-específica (Leite, 2007).

Embora várias áreas protegidas no Brasil contenham a espécie, estas áreas são individualmente muito pequenas e, portanto, as populações não estão totalmente protegidas contra erosão genética e endogamia (Leite, 2007). Quanto à conservação *ex situ*, esta é deficiente, sendo que recentemente um banco de sementes contendo exemplares da espécie foi implantado dentro do *Campus* da USP de Ribeirão Preto, interior do Estado de São Paulo. Plantios comerciais são raros e não existe um programa específico de conservação *in situ* e melhoramento genético de *C. estrellensis*.

Contudo, o sucesso de qualquer programa de conservação e/ou melhoramento genético de uma espécie dependerá da magnitude da variação genética disponível em populações

remanescentes, bem como do conhecimento e entendimento de processos reprodutivos que promovam a coesão genética da espécie. Portanto, com o intuito de fornecer subsídios para conservação *in situ* e *ex situ* de *C. estrellensis*, o presente estudo foi delineado com o objetivo de investigar os padrões temporais do sistema reprodutivo e da dispersão de genes para a espécie através de marcadores moleculares microssatélites.

1.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAENSEN, F.; CHARDON, J. P.; DE BLUST, G.; SWINNEN, E.; VILLALBA, S.; GULINCK, H.; MATTHYSEN, E. The application of 'least-cost' modelling as a functional landscape model. **Landscape and Urban Planning**, v. 64, p. 233–247, 2003.

AGUIAR, W. M.; GAGLIANONE, M. C. Comportamento de abelhas visitantes florais de *Lecythis lurida* (Lecythidaceae) no norte do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, p. 277-282, 2008.

ALESSI, N. P.; NAVARRO, V. L. Saúde e trabalho rural: o caso dos trabalhadores da cultura canavieira na região de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 13, p. 111-121, 1997.

ALLARD, R. W.; **Principles of plant breeding**. 2ªed. John Wiley, New York, 1999. 254p.

ALVES, R. M.; ARTERO, A. S.; SEBBENN, A. M.; FIGUEIRA, A. Mating system in natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Shumm., by microsatellite markers **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 373-379, 2003.

ASHLEY, M. V. Plant parentage, pollination, and dispersal: how DNA microsatellites have altered the landscape. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, p. 148-161, 2010.

BACLES, C. F. E.; BURCZYK, J.; LOWE, A. J.; ENNOS, R. A. Historical and contemporary mating patterns in remnant populations of the forest tree *Faxinus excelsior* L. **Evolution**, v. 59, p. 979-990, 2005.

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

BARBOSA, M. R. V. ***Cariniana* (Casar.) of the Tijuca masif. M.Sc.** 1984, 88 f. Tese, Universidade Rural do Rio de Janeiro, 1984.

BARLUENGA, M.; AUSTERLITZ, F.; ELZINGA, J. A.; TEIXEIRA, S.; GOUDET, J.; BERNASCONI, G. Fine-scale spatial genetic structure and gene dispersal in *Silene latifolia*. **Heredity**, p. 1-12, 2010.

BARREIRA, S.; SEBBENN, A. M.; SCOLFORO, J. R. S.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade genética e sistema de reprodução em população nativa de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish sob exploração. **Scientia Forestalis**, v. 71, p. 119-130, 2006.

BARRETT, S. C. H.; KOHN, J. R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: Falk, D. A.; Holsinger, K. E. (Eds.) **Genetics and conservation of rare plants.** New York: Oxford University Press, p. 3–30, 1991.

BAUM, K. A.; HAYNES, K. J.; DILLEMUTH, F. P.; CRONIN, J. T. The matrix enhances the effectiveness of corridors and stepping stones. **Ecology**, v. 85, p. 2671–2676, 2004.

BRAGA, A. C.; COLLEVATTI, R. G. Temporal variation in pollen dispersal and breeding structure in a bee-pollinated Neotropical tree. **Heredity**, v. 106, p. 911–919, 2011.

BRAGA, A. C.; REIS, A. M. M.; LEOI, L. T.; PEREIRA, R. W.; COLLEVATTI, R. G. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes,** v. 7, p. 53–56, 2007.

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

BAWA, K. S. Breeding of tropical hardwoods: an evaluation of underlying bases, current status and future prospects. In: Burley, J.; Styles, B. T. (Eds.). **Tropical trees: variation, breeding and conservation**. London: Academic Press, 1976. p. 43-59.

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

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

BRONDANI, R. P. V.; GAIOTTO, F. A.; MISSIAGGIA, A. A.; GRIBEL, R.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 177-179, 2003.

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

BURTON, P. J.; BALISKY, A. C.; COWARD, L. P.; CUMMING, S. G.; KNEESSHAW, D. D. The value of managing for biodiversity. **The Forest Chronicle**, v. 68, p. 225-237, 1992.

BUSCHBOM, J.; YANBAEV, Y.; DEGEN, B. Efficient Long-Distance Gene Flow into an Isolated Relict Oak Stand. **Journal of Heredity**, Doi:10.1093/jhered/esr023, 2011.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **Circular Técnica**, v. 20, p. 1-11, 2003.

CABALLERO, A. Developments in the prediction of effective population size. **Heredity**, v. 73, p. 657-679, 1994.

CAMPANILI, M.; SCHAFFER, W. B. **Mata Atlântica: patrimônio nacional dos brasileiros**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2010. 408 p.

CARNEIRO, F. S.; DEGEN, B.; KANASHIRO, M.; LACERDA, A. E. B.; SEBBENN, A. M. High levels of pollen dispersal detected through paternity analysis from a continuous *Symphonia globulifera* population in the Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management,** v. 258, p. 1260–1266, 2009.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. 2° ed. Brasília,DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 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**, v. 16, p. 137-147, 2002.

CAVALLI, S. S. Apomixia: um método de reprodução asexual. In: Freitas, L. B.; Bered, F. (Eds.) **Genética & Evolução Vegetal.** Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003, p. 41-55.

CAVALLI, S. S.; WINGE, H. Variabilidade genética em populações naturais In: Freitas, L. B.; Bered, F. (Eds.) **Genética & Evolução Vegetal.** Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003, p. 165-175.

CENIS, J. L. Nuevas técnicas moleculares para la identificación varietal de plantas. **Revista Terralia**, v. 12, p. 40-43, 2000.

CHASE, M.; KESSELI, R.; BAWA, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany,** v. 83, p. 51-57, 1996.

CHUDNOFF, M. **Tropical timbers of the world**. Agriculture Handbook, 607. USDA, Forest Products Laboratory, Madison, 1984. 462p.

CIAMPI, A. Y.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D**. Otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco e desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera langsdorfii* Desf. (Copaíba) Leguminosae-Caesalpinoideae**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 40 p.

CIAMPI, A. Y.; AZEVEDO, V. C. R.; GAIOTTO, F. A.; RAMOS, A. C. S.; LOVATO, M. B. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 1074-1077, 2008.

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

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

COLLEVATTI, R. G.; ESTOLANO, R.; GARCIA, S. F.; HAY, J. D. Short-distance pollen dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated neotropical tree. **Tree Genetics & Genomes**, v. 6, p. 555-564, 2010.

COLLEVATTI, R.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, v. 86, p. 60-67, 2001.

CROW, J. F; KIMURA, M. A. **An introduction to population genetics theory**. London: Harper Row, 1970. 591p.

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

DEVLIN, B.; ELLSTRAND, N. C. The development and application of a refined method for estimating gene flow from angiosperm paternity analysis. **Evolution**, v. 44, p. 248-259, 1990.

DEVLIN, B.; ROEDER, K.; ELLSTRAND, N. C. Fractional paternity assignment: theoretical development and comparison to other methods. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 76, p. 369 –380, 1988.

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

DICK, C. W.; HARDY, O. J.; JONES, F. A.; PETIT, R. J. Spatial Scales of Pollen and Seed-Mediated Gene Flow in Tropical Rain Forest Trees. **Tropical Plant Biology**, v. 1, p. 20-33, 2008.

DURIGAN, G.; FRANCO, G. A. D. C.; SAITO, M.; BAITELLO, J. B. Estrutura e diversidade do componente arbóreo da floresta na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, p. 371-383, 2000.

ECKERT, C. G.; KALISZ, S.; GEBER, M. A.; SARGENT, R.; ELLE, E.; CHEPTOU P-O.; GOODWILLIE, C.; JOHNSTON, M. O.; KELLY, J. K.; MOELLER, D. A.; PORCHER, E.; REE, R. H.; VALLEJO-MARÍN, M.; WINN, A. A. Plant mating system in a changing world. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, p. 35-43, 2009.

EISEN, J. A Mechanistic basis for microsatellite instability. In: GOLDSTEIN, D. B et al. (Ed.) **Microsatellites – evolution and applications**. Oxford: Oxford University Press, 1999, p. 34-48.

ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation. **Annual Review Ecology Systematics,** v. 24, p. 217-242, 1993.

ENGLAND, P. R.; USHER, A. V.; WHELAN, R. J.; AYRE, D. J. Microsatellite diversity and genetic structure of fragmented populations of the rare, fire-dependent shrub *Grevillea macleayana*. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 967-977, 2002.

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

FAO's report. Global forest resources assessment 2000, tropical South America. **FAO Forestry Paper**, v. 140, p. 287-291, 2001.

FAO, 2002. Report on the 12th session of the Panel of Experts in Forest Genetic Resources. FO/FGR/12/Rep. Disponível em : http://www.fao.org/DOCREP/MEETING/005/Y3947E/Y3947E00.HTM. Acesso: 8 de Junho de 2011.

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

FERES, J. M.; GUIDUGLI, M. C.; MESTRINER, M. A.; SEBBENN, A. M.; CIAMPI, A. Y.; ALZARE-MARIN, A. L. Microsatellite diversity and effective population size in a germplasm bank of *Hymenaea courbaril* var. stilbocarpa (Leguminosae), an endangered tropical tree: recommendations for conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 56, p. 797-807, 2009.

FERES, J. M. et al. Development of microsatellite markers for *Anadenanthera colubrina* (Mimosidae), a neotropical tree species. *In press*, 2011.

FERREIRA, M. E.; GATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 1995. 220p.

FERREIRA-RAMOS, R.; LABORDA, P. R.; SANTOS M. O.; MAYOR M. S.; MESTRINER M. A.; SOUZA A. P.; ALZATE-MARIN A. L. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers**. Conservation Genetics**, v. 9, p. 1281-1285, 2007.

FERREIRA-RAMOS, R.; MONTEIRO, M.; ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO J. B.; MARTINEZ, C. A.; MESTRINER, M. A.; ALZATE-MARIN, A. L. Microsatellite markers for *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae), an endangered tropical tree species. **American Journal of Botany**, 2011 (*in press*).

FINKELDEY, R. **An introduction to tropical forest genetics**. Lecture Notes. Göttingen: Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, 1998, 225 p.

FORMAN, R.T.T. **Land Mosaics: The Ecology of Landscapes and Regions**. Cambridge/New York: Cambridge University Press, 1995, 632 p.

FRANKEL, O.; SOULÉ, M. E. **Conservation and evolution**. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1981, 327p.

FRANKLIN, J. R. Evolutionary changes in small populations. In: Soule, M. (Ed.) **Conservation Biology: and evolutionary-ecological perspective**. Sunderland: Sinauer Associates, p. 135-149, 1980.

FRYXELL, P. Mode of reproduction of higher plants. **Botanical Review**, v. 23, p. 135-233, 1957.

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

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992. 631p.

GAINO, A. P. S. C.; SILVA, A. M.; MORAES, M. A.; ALVES, P. F.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree species *Myracrodruon urundeuva*. **Conservation Genetics**, v. 11, p. 1631–1643, 2010.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. Atlantic forest hotspots status: an overview. In: Galindo-Leal, C.; Câmara, I. G (Eds.). **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Washington: Center for Applied Biodiversity Science e Island Press, 2005. p. 3-11.

GARCÍA, C.; JORDANO, P.; GODOY, J. A. Contemporary pollen and seed dispersal in a *Prunus mahaleb* population: patterns in distance and direction. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1947-1955, 2007.

GENG, Q.; LIAN, C.; GOTO, S.; TAO, J.; KIMURA, M.; ISLAM, M. D. S.; HOGETSU, T. Mating system, pollen and propagule dispersal, and spatial genetic structure in a high-density population of the mangrove tree *Kandelia candel*. **Molecular Ecology**, v. **17**, p. 4724–4739, 2008.

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

GONELA, A. **Análise da estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais e respectivas progênies de *Copaifera langsdorffii* Desf. utilizando marcadores microssatélites.** 2005. 84 f. Relatório de Pós-Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

GOODWILLIE, C.; KALISZ, S.; ECKERT, C. G. The Evolutionary Enigma of Mixed Mating Systems in Plants: Occurrence, Theoretical Explanations, and Empirical Evidence. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 36, p. 47-79, 2005.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: Nass, L.; Valois, A. C. C.; Melo, I. S.; Valadares-Inglis, M. C. (Eds.) **Recursos genéticos e melhoramento – plantas.** Rondonópolis: Fundação MT, 2001, p. 967-994.

GUIDUGLI, M. C.; FERREIRA-RAMOS, R.; SOUSA, A. C. B.; CIDADE, F. W.; MARCONI, T. G.; MESTRINER, M. A.; GROPPO, M.; ALZATE-MARIN, A. L. Genetic diversity of *Metrodorea nigra* assessed with microsatellite markers in a small forest remnant. **Genetics and Molecular Research,** 2011 (*in press*).

GUPTA, P. K.; BALYAN, H. S.; SHARMA, P. C.; RAMESH, B. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. **Current Sei**, v. 70, p. 45–54, 1996.

GUSSON, E.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em populações de *Eschweilera ovata* (Cambess) Miers. **Revista árvore**, v. 30, p. 491-503, 2006.

HALL, P.; WALKER, S.; BAWA, K. Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Pithecellobium elegans*. **Conservation Biology**, v. 10, p. 757–768, 1996.

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

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: Schone-Wald-Cox, C. M. et al. (Eds.) **Genetics and Conservation.** California: Benjamin Cummings Publishing Company, 1983, p. 335-348.

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

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A. H. D.; Clegg, M. T.; Kahler, A. L.; Weir, B. S. (Eds.) **Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 1990, p. 43 – 63.

HAMRICK, J. L.; LINHART, Y. B.; MITTON, J. B. Relationships between life history characteristic and eletrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics,** v. 10, p. 173-200, 1979.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: Estrada, A.; Fleming, T. H. (Eds.) **Fugivores and Seed Dispersal**. Junk Publishers, 1986. 392 pp.

HAMRICK, J. L.; SCHNABEL, A. Understanding the genetic structure of plant populations: some old problems and a new approach. In: Gregorius, H. R. (Ed.). **Population genetics in forestry: lecture notes in biomathematics**. Berlin: Spring-Verlag, 1985, p. 50-70.

HEDRICK, P. W. Mating systems and evolutionary genetics. In: Wohrmann, K.; Jain, S. K. (Eds.) **Population Biology: Ecology and Evolutionary Viewpoints.** New York: Springer-Verlag, 1990, p. 83-114.

HIRAO, A. S.; KAGEYAMA, P. Y.; OHARA, M.; ISAGI, Y.; KUDO, G. Seasonal changes in pollinator activity influence pollen dispersal and seed production of the alpine shrub *Rhododendron aureum* (Ericaceae). **Molecular Ecology**, v. 15, p. 1165-1173, 2006.

HUANG, YA-YI.; MORI S. A.; PRANCE G. T. A phylogeny of *Cariniana* (Lecythidaceae) based on morphological and anatomical data. **Brittonia**, v. 60, p. 69–81, 2008.

JENNERSTEN, O. Pollination in *Diantbus deltoids* (Caryophylaceae): effecets of habitat fragmentation on visitation and seed set. **Conservation Biology**, v. 2, p. 359-366, 1988.

JONES, T. A. The restoration gene pool concept: Beyond the native versus non native debate. **Restoration Ecology**, v. 11, p. 281-290, 2003.

JUVENAL, T. L.; MATTOS, R. L. G. O Setor Florestal no Brasil e a importância do reflorestamento. **BNDES Setorial**, v. 16, p. 3-30, 2002.

KARASAWA, M. M. G.; DORNELAS, M. C.; ARAÚJO, A. C. G.; OLIVEIRA, G. C. X. Biologia e genética dos sistemas reprodutivos. In: Karasawa, M. M. G (Ed.) **Diversidade Reprodutiva de Plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 2009, p. 26-52.

KIMURA, M.; CROW, J. F. The effective population number. **Evolution**, v. 17, p.279-288, 1963.

KOTCHETKOFF-HENRIQUES, O. K. **Caracterização da vegetação natural em Ribeirão Preto, SP: Bases para conservação.** 2003. 270 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

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

LANDE, R. Mutation and conservation. **Conservation Biology**, v. 9, p. 782-791, 1995.

LAW, B. S.; LEAN, M. Common blossom bats (*Syconycteris australis*) as pollinators in fragmented Australian tropical rainforest. **Biological Conservation**, v. 91, p. 201-212, 1999.

LAWRENCE, M. J.; MARSHALL, D. F. Plant population genetics. In: Maxted, N.; Ford-Lloyd, B.V.; Hawkes, J. G. (Eds.) **Plant genetic conservation**. London: Chapman & Hall, 1997.

LEITE, E. D. Spatial distribution patterns of riverine forest taxa in Brasilia, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 140, p. 257-264, 2001.

LEITE, E. D. State-of-knowledge on *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae) for Genetic Conservation in Brazil. **Research Journal of Botany**, v. 2, p. 138-160, 2007.

LEMES, M. R.; BONDANI, R. P.; GRATTAPAGLIA D. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of mahogany, *Swietenia macrophylla* king (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. **The Journal Heredity**, v. 93, p. 287-291, 2002.

LEPSCH-CUNHA, N.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R.; NASCIMENTO, H. E. M. Outcrossing rate of *Couratari multiflora* (J.Smith) Eyma (Lecythidaceae), a low-density tropical tree species from a central Amazonian rainforest. **Acta Amazonica**, v. 41, p. 153 – 162, 2011.

LEPSCH-CUNHA, N.; LUND, C. A.; HAMILTON, M. B. Isolation and characterization of nuclear microsatellite locos in the tropical arboreal palm *Oenocarpus bacaba* (Arecaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 435 - 437, 2003.

LEPSCH-CUNHA, N.; MORI, S. A. Reproductive phenology and mating potential in a low density tree population of *Couratari multiflora* (Lecythidaceae) in central Amazonia. **Journal of Tropical Ecology**, v. 15, p. 97-121, 1999.

LIAN, C.; MIWA, M.; HOTETSU, T. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. **Heredity**, v. 87, p. 88-98, 2001.

LÓPEZ, J. A. **Common trees of Paraguay**. Nande Yvirá Mata Kuera. Peace Corps, Assuncion, 1987.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 4° ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 352p.

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

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

LYNCH, M. A quantitative-genetic perspective on conservation issues. In: Avise, J. C.; Hamrick, J. L. **Conservation genetics: case studies from nature.** New York: Chapman & Hall, 1996, p. 471-501.

MANOEL, R. O. **Distância e padrões de dispersão contemporânea de pólen e sistema de reprodução em pequeno fragmento isolado de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinoideae).** 2011, 72 f. Dissertação (Mestre em Agronomia), Faculdade de Engenharia – UNESP, Ilha Solteira, 2011.

MARTINS, K.; CHAVES, L. J.; BUSO, G. S. C.; KAGEYAMA, P. Y. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, v. 7, p. 957–969, 2006.

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

MEAGHER, T. R., THOMPSON, E. A. Analysis of parentage for naturally established seedlings of *Chamelirium Luteum* (Liliaceae). **Ecology**, v. 68, p. 803–812, 1987.

MELO, S. C. O.; GAIOTTO, F. A.; CUPERTINO, F. B.; CÔRREA, R. X.; REIS, A. M. M.; GRATTAPAGLIA, D.; BRONDANI, R. P. V. Microsatellite markers for *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), a tree that named a country. **Conservation Genetics**, v. 8, p. 1261-1271, 2007.

MELO, S. N.; GUARDA, A. F.; ARAÚJO, G. C. C.; BATISTA, J. L. Medidas mitigadoras para fragmentações florestais: o caso de São José do Rio Preto, SP. **Caminhos de Geografia,** v. 11, p. 189-201, 2010.

METZGER, J. P. Estrutura da paisagem e fragmentação: análise bibliográfica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, p. 445–463. 1999.

METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; DIXO, M.; BERNACCI, L. C.; RIBEIRO, M. C.; TEIXEIRA, A. M. G.; PARDINI, R. Time-lag in biological responses to landscape changes in a highly dynamic Atlantic forest region, **Biological Conservation**, v. 142, p. 1166–1177, 2009.

MONTEIRO-SACANAVACCA, W. R. Vascularização e natureza de estruturas do androceu em Lecythidaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 3, p. 61-74, 1975.

MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R.; VENCOVSKY, R. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, p. 237-248, 1999.

MORAES, M. L. T.; SEBBENN, A. M. Pollen Dispersal Between Isolated Trees in the Brazilian Savannah: A Case Study of the Neotropical Tree *Hymenaea stigonocarpa*. **Biotropica,** v. 43, p. 1–8, 2010.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with no repetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v. 30, p. 194 -200, 2002.

MORI, S. A. & PRANCE, G. T. Relações entre a classificação genérica de Lecythidaceae do Novo Mundo e seus polinizadores e dispersores. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 4, p. 31-37, 1981.

MORI, S. A.; PRANCE, G. T. 2006 onward. The Lecythidaceae Pages (http://sweetgum. nybg.org/lp/index.php). The New York Botanical Garden, Bronx, New York.

MORI, S. A.; TSOU, C. H.; WU C. C.; CRONHOLM B.; ANDERBERG A. A. Evolution of Lecythidaceae with an Emphasis on the Circumscription of Neotropical Genera: Information from Combined Ndhf and Trnl-F Sequence Data. **American Journal of Botany**, v. 94, p. 289–301, 2007.

MORTON, C. M.; MORI S. A.; PRANCE G. T.; KAROL K. G.; CHASE M. W. Phylogenetic relationships of Lecythidaceae: A cladistic analysis using rbcL sequence and morphological data. **American Journal of Botany**, v. 84, p. 530–540, 1997.

MOURA, T. M.; SEBBENN, A. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; OLIVEIRA, G. C. X.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic diversity and spatial genetic structure in fragmented populations of *Solanum* spp. from the Brazilian savannah, based on microsatellite loci. **Scientia Forestalis,** v. 37, p. 143-150, 2009.

MUIR, G.; LOWE, A. J.; FLEMING, C. C.; VOLG, C. High nuclear genetic diversity, high levels of outcrossing and low differentiation among remnant populations of *Quercus petraea* at the margin of its range in Ireland. **Annals of Botany**, v. 93, p. 691-697, 2004.

MURAWSKI, D. A.; HAMRICK, J. L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, v. 67, p. 167-174, 1991.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; ENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NAKANISHI, A.; TOMARU, N.; YOSHIMARU, H.; MANABE, T.; YAMAMOTO, S. Effects of seed- and pollen-mediated gene dispersal on genetic structure among *Quercus salicina* saplings. **Heredity**, v. 102, p. 182–189, 2009.

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

NAZARENO A. G.; ZUCCHI, M. I.; REIS, M. S. Microsatellite markers for *Butia eriospatha* (Arecaceae), a vulnerable palm species from the Atlantic Rainforest of Brazil: Isolation of plant DNA from fresh tissue. **American Journal of Botany**, *in press*, 2011.

NEIGEL, J. E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review Ecology Systematics**, v. 28, p. 105-128, 1997.

NETO, J. D. G.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em *Caesalpinia echinata* Lam. implantada em arboreto experimental. **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, p.409-418, 2005.

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

OCCHIONI, P. Árvores Centenárias do Parque Nacional "Tijuca" (RJ). **Leandra**, v. 5, p. 5-32, 1975.

ODDOU-MURATORIO, S.; KLEIN, E. K.; DEMESURE-MUSH, B.; AUSTERLITZ, F. Real-time patterns of pollen flow in the wild-service tree, *Sorbus torminalis* (Rosaceae). III. Mating patterns and the ecological maternal neighborhood. **American Journal of Botany**, v. 93, p. 1650-1659, 2006.

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

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

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; GALETTI, M. Seed predation of *Cariniana estrellensis* (Lecythidaceae) by black howler monkeys, Alouatta caraya. **Primates**, v. 37, p. 87-90, 1996.

ORTEGA, V. R.; ENGEL, V. L. Conservação da biodiversidade de remanescentes de Mata Atlântica na região de Botucatu, SP. **Revista do Instituto Florestal**, v. 4, p. 839-852, 1992.

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

PAIVA, J. R.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Genetic of rubber tree (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Müll Arg.). 2. Mating system. **Silvae Genetica**, v. 43, p. 373-376, 1994.

PINTO, S. I. C.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffi* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia Forestalis**, v. 1, p. 40-48, 2004.

PRANCE, G. T. The Pollination and Androphore Structure of Some Amazonian Lecythidaceae, **Biotropica**, v. 8, p. 235–241, 1976.

PRANCE, G. T.; MORI, S. A. Lecythidaceae-Part 1. **Flora Neotropica Monograph**, v. 21, p. 1-272, 1979.

PRANCE, G. T.; MORI, S. A. Lecythidaceae. In: K. Kutbitski (Ed.). **The Families and Genera of Vascular Plants**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. p. 221–232, 2004.

RAFALSKI, J. A.; MORGANTI, M.; POWELL, W.; VOGEL, J. M.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: Bierren, B. et al. (Eds.). **Analysis of non-mammalian genomes: a practical guide**. New York: Academia Press, 1996, p. 75-134.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** 6° ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2001, 906 p.

RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Mating system in a neotropical tree species, *Senna multijuga* (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 418-424, 2004.

RICHARDS, A. J. 1997. **Plant breeding systems.** 2° ed. Cambridge: Chapmann & Hall, 1997, 529 p.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141- 1153, 2009.

RIEMAN, B. E.; ALLENDORF, F. W. Effective Population Size and Genetic Conservation Criteria for Bull Trout. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 21, p. 756–764, 2001.

RITLAND, K. Estimation of mating systems. In: Tanksley, S. D.; Orton, T. J. **Isozymes in plant genetics and breeding. Part A.** Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. p. 289-302, 1983.

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

ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; ALÍA, R.; GIL, L. Increased selfing and correlated paternity in a small population of a predominantly outcrossing conifer, *Pinus sylvestris*. **Molecular Ecology,** v. 13, p. 2567–2577, 2004.

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**, v. 94, p. 13-22, 2005.

RODRIGUES, R. R.; BRANCALION, P. H. S.; ISERNHAGEN, I. **Pacto pela restauração da mata atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal**. São Paulo: LERF/ESALQ: Neoband, 2009. 256 p.

ROSSETTO, M.; McLAUCHLAN, A.; HARRISS, F. C. L.; HENRY, R. J.; BAVERSTOCK, P. R.; LEE, L. S.; MAGUIRE, T. L., EDWARDS, K. J. Abundance and polymorphism of microsatellite markers in the tea tree (*Melaleuca alternifolia*, Myrtaceae). **Theoretical Applied Genetics**, v. 98, p. 1091-1098, 1999.

SALGUEIRO, F.; FELIX, D.; CALDAS, J. F.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. **Diversity and Distributions**, v. 10, p. 201-210, 2004.

SANDES, A. R. R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e Diversidade Química e Genética. **Biotecnologia**, v. 13, p. 28-32, 2000.

SANTOS, E. K. Determinação do sexo em angiospermas. In: Freitas, L. B.; Bered, F. (Eds.) **Genética & Evolução Vegetal.** Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003, p. 111-130.

SATO, T.; ISAGI, Y.; SAKIO, H.; OSUMI, K.; GOTO, S. Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. **Heredity**, v. 96, p. 79–84, 2006.

SCHMIDT, A. B.; CIAMPI, A.Y.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 340-342, 2007.

SCHULKE, B.; WASER, N. M. Long distance pollinator flights and pollen dispersal between populations of *Delphinium nuttallianum*. **Oecologia**, v. 127, p. 239-245, 2001.

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

SEBBENN, A. M. Tamanho amostral para conservação *ex situ* de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Revista do Instituto Florestal**, v. 15, p. 147-162, 2003.

SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffi* Desf. **Heredity**, v. 106, p. 134-145, 2011.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; ZANATTO, A. C. S. Sistema de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze.: implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis,** v. 58, p. 25-40, 2000.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOSVKY, R. Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética espacial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. **Scientia Florestalis**, v. 53, p. 15-30, 1998.

SEMEGHINI, V. C. A região administrativa de Ribeirão Preto. In: Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados (ed.) **Cenários da Urbanização Paulista – Regiões Administrativas**. São Paulo: SEADE, 1992.

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

SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em duas populações naturais de *Euterpe edulis* M. sob diferentes condições de fragmentação florestal. **Scientia Forestalis**, v. 69, p. 13-24, 2005.

SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO. **Florestas do Brasil em resumo - 2010: dados de 2005-2010**. Brasília: SFB, 2010. 152 p.

SILVA, J. M. C.; CASTELETI, C. H. M. Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. In: Galindo-Leal, C.; Câmara, I. G. (Eds.) **Mata Atlântica – Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas.** Belo Horizonte: SOS Mata Atlântica/ Conservação Internacional, 2005, p. 43-59.

SMA – SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE. Disponível em: http://www.ambiente.sp.gov.br/contAmbientalLegislacaoAmbiental.php. Acesso em: 07 de Junho de 2011.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli, S. R. (Ed.) **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202 p.

SORK, V. L.; DAVIS, F. W.; SMOUSE, P. E.; APSIT, V. J.; DYER, R. J.; FERNANDEZ-M, J. F.; KUHN, B. Pollen movement in declining populations of California Valley oak, *Quercus lobata*: where have all the fathers gone? **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1657-1668, 2002.

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

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

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; IROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, p. 132-138, 2005.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 4127- 4138, 1984.

TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. Simple sequences. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 4, p. 832 - 837, 1994.

TREUREN, R. V. **The significance of genetic erosion for the extiction of locally endangered plant populations**. Thesis. 1959. 116 f. University of Groningen, The Netherlands, Gravenhage, 1959.

TOLEDO-FILHO, D. V.; BERTONI, J. E. A.; BATISTA, E. A.; PARENTE, P. R. Fitossociologia de um fragmento Florestal à margem do Rio do Peixe, Município de Lindóia (SP). **Revista do Instituto Florestal**, v. 12, p. 37-45, 2000.

TSOU, C. H.; MORI, S. A. Floral organogenesis and oral evolution of the Lecythidoideae (Lecythidaceae). **American Journal of Botany**, v. 94, p. 716-736, 2007.

URBAN, D. L.; O'NEILL, R. V.; SHUGART, H. H. Landscape ecology. **BioScience**, v. 37, p. 119–127, 1987.

VENCOVSKY, R. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas. **IPEF**, v. 35, p. 79-84, 1987.

VIANA, V. M. Conservação da biodiversidade de fragmentos florestais em paisagens tropicais intensamente cultivadas. In: **Conferência Internacional: Abordagens interdisciplinares para a conservação da biodiversidade biológica e dinâmica do uso da terra**. Belo Horizonte, Anais: 1995, p. 135-154.

VIANA, V. M.; PINHEIRO, L. A. F. V. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. **Série Técnica IPEF**, v. 12, p. 25-42, 1998.

VIANA, V. M.; TABANEZ, A. J. A. Biology and conservation of forest fragments in brazilian atlantic moist forest. In: Schellas, J.; Greenberg, R. (Eds.). **Forest patches in tropical landscapes**. Washington: Island Press, p. 151-167, 1996.

VICTOR, M. A. M. **A devastação florestal**. São Paulo, Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1975.

VICTORY, E. R.; GLAUBITZ, J. C.; RHODES JR., O. E.; WOESTE, K. E. Genetic homogeneity in *Juglans nigra* (Juglandaceae) at nuclear microsatellites. **American Journal of Botany**, v. 93, p. 118-126, 2006.

WANG, K. S. Gene flow in European beech (*Fagus sylvatica* L.). **Genetica**, v. 122, p. 105-113, 2004.

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

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

WILLIAMS, D. A.; WANG, Y.; BORCHETTA, M.; GAINES, M. S. Genetic diversity and spatial structure of a keystone species in fragmented pine rockland habitat. **Biological Conservation**, v. 138, p. 256-268, 2007.

WRIGHT, S. Systems of mating. **Genetics**, v. 6, p. 11-178, 1921.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, Baltimore, v. 16, p. 97-159, 1931.

WRIGHT, S. Size of population and breeding structure in relation to evolution. **Science**, v. 87, p. 430-2264, 1938.

YOUNG, A. G.; BOYLE, T. J. Forest Fragmentation. In: YOUNG, A. G.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. J. (Eds.) **Forest Conservation Genetics: principles and practice.** Collingwood, CSIRO Publishing: 2000, p. 123-134.

YOUNG, A. G.; MERRIAN, H. G.; WARWICK, S. I. The effects of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations. **Heredity,** v. 71, p. 277-289, 1993.

ZANETTINI, M. H. B.; CAVALLI, S. S. Variabilidade Genética em Função do Modo de Reprodução. In: Freitas, L. B.; Bered, F. (Eds.) **Genética & Evolução Vegetal.** Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003, p. 177-188.

ZORZETTO, R.; FIORAVANTI, C.; FERRONI, M. A floresta renasce. **Pesquisa Fapesp**, v. 91, p. 48-52, 2003.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR.** 2002. 130 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Os objetivos deste estudo foram investigar a diversidade e estrutura genética, o sistema de reprodução e o fluxo gênico contemporâneo de uma população natural de *Cariniana estrellensis* presente em um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual de aproximadamente 8,0 ha, localizado na Região de Ribeirão Preto (nordeste do estado de São Paulo), com auxílio de marcadores moleculares microssatélites.

2.2. Objetivos Específicos

a) Desenvolver e caracterizar marcadores microssatélites para a espécie florestal *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze bem como investigar a transferibilidade destes locos em *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze;

b) Estimar e comparar os níveis de diversidade genética entre gerações (árvores adultas, regenerantes e progênies) de uma população de *C. estrellensis*, utilizando nove locos microssatélites;

c) Estimar e comparar parâmetros do sistema de reprodução como taxas de cruzamento, autofecundação e cruzamentos correlacionados entre dois eventos reprodutivos de uma população natural de *C. estrellensis*;

d) Determinar a coancestria e o tamanho efetivo das árvores adultas, regenerantes e progênies e, com base nestas informações, estimar o número de árvores matrizes necessárias para a coleta de sementes para fins de conservação genética e restauração florestal;

e) Estudar a distribuição espacial de genótipos de indivíduos adultos e regenerantes de *C. estrellensis* em um pequeno fragmento florestal;

f) Determinar as distâncias e os padrões de dispersão de pólen e sementes dentro do fragmento, bem como a taxa de fluxo gênico via pólen e sementes externos à população de *C. estrellensis*, usando análises de parentesco;

g) Fornecer dados genéticos que contribuam para a conservação da diversidade genética *in situ* e *ex situ* da espécie arbórea tropical *C. estrellensis* no Estado de São Paulo.

3. ORGANIZAÇÃO GERAL DA TESE

Para facilitar o entendimento, a tese encontra-se dividida em três capítulos. No **Capítulo I** são apresentados os estudos de desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites para a espécie *C. estrellensis*, bem como os estudos de transferência e caracterização destes marcadores para *C. legalis*. Já no **Capítulo II** um conjunto de marcadores microssatélites foi selecionado para investigar a diversidade genética e os padrões de cruzamentos de *C. estrellensis* entre diferentes eventos reprodutivos de uma população localizada no interior do Estado de São Paulo. Por último, o estudo sobre a estrutura genética espacial e o fluxo gênico contemporâneo em uma pequena população de *C. estrellensis* foi relatado no **Capítulo III**.

Vale ressaltar, que os estudos descritos no Capítulo I deram origem a dois artigos científicos que foram publicados em revistas internacionais indexadas no ISI (Anexos 1 e 2).

4. CAPÍTULO I

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *Cariniana estrellensis* E TRANSFERIBILIDADE PARA *Cariniana legalis**

***Artigos publicados:**

GUIDUGLI MC, CAMPOS T, SOUSA ACB, FERES JM, SEBBENN AM, MESTRINER MA, CONTEL EPB, ALZATE-MARIN AL (2009). Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. **Conservation Genetics**, v. 10, p. 1001-1004. **(Anexo 1).**

GUIDUGLI MC, ACCORONI KAG, MESTRINER MA, CONTEL EPB, MARTINEZ CA, ALZATE-MARIN AL (2010). Genetic characterization of 12 heterologous microsatellite markers for the giant tropical tree *Cariniana legalis* (Lecythidaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 131-134. **(Anexo 2).**

4.1. RESUMO

A partir de uma biblioteca genômica enriquecida para repetições GA/CA, 15 marcadores microssatélites altamente polimórficos foram desenvolvidos para *Cariniana estrellensis*, uma espécie arbórea tropical. Os locos microssatélites foram caracterizados utilizando-se amostras de DNA provenientes de 49 árvores adultas encontradas entre as bacias dos rios Pardo e Mogi-Guaçu, no Estado de São Paulo, Brasil. Para este conjunto amostral, um total de 140 alelos foram detectados com uma média de 9,33 alelos por loco. A heterozigosidade esperada variou de 0,37 a 0,88 e estes locos apresentaram alta probabilidade de exclusão de paternidade. Adicionalmente, 12 locos foram efetivamente transferidos e caracterizados para *Cariniana legalis*. O polimorfismo dos locos heterólogos foi avaliado em 28 indivíduos adultos de *C. legalis* coletados na região de Ribeirão Preto-SP. Dos 12 locos, 10 foram polimórficos e exibiram herança mendeliana. A riqueza alélica em cada loco variou de 2 a 11, com uma média de 7 alelos por loco, e a heterozigosidade esperada variou de 0,07 a 0,88. Em suma, as características do conjunto de locos microssatélites desenvolvidos para a espécie florestal *C. estrellensis* e transferidos para *C. legalis* indicam que esses marcadores são ferramentas aplicáveis em estudos de genética populacional de ambas as espécies.

4.2. INTRODUÇÃO

Estudos de genética de populações ganharam grande impulso, a partir da década de 70, com o advento das técnicas de biologia molecular, especialmente marcadores isoenzimáticos. Porém, foi com o desenvolvimento de metodologias de marcadores moleculares baseados em polimorfismo ao nível de sequência de DNA, que esses estudos ganharam uma poderosa ferramenta para caracterizar e avaliar recursos genéticos, especialmente para entender a estrutura e organização da diversidade genética das populações e seu monitoramento ao longo do tempo (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Em termos gerais, informações sobre a variabilidade genética existente entre e dentro de populações são fundamentais para fazer inferências e previsões sobre diversos processos de manutenção de diversidade, tais como endogamia, deriva genética, fluxo gênico e seleção natural. A obtenção de dados a partir de marcadores moleculares tem se tornado uma forma eficiente de gerar informações para um grande número de indivíduos, populações e espécies em um curto período de espaço e tempo (Ciampi, 1999).

Dentre as técnicas disponíveis, a que envolve microssatélites (SSR) tem sido muito utilizada nos estudos de populações naturais face à sua robustez, confiabilidade, praticidade operacional e por serem altamente polimórficos quando comparados com outras classes de marcadores (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

A maior desvantagem desses marcadores é o grande volume de trabalho necessário para desenvolvimento de *primers* específicos para os locos de microssatélites de cada espécie. Isto é necessário devido ao fato de os microssatélites serem usualmente encontrados em regiões não codificadoras, onde a taxa de substituição dos nucleotídeos é maior do que em regiões codificadoras. Consequentemente, a estratégia de desenhar "*primers* universais" correspondentes às sequências conservadas, que foi muito efetiva para DNA mitocondrial, é mais problemática para microssatélites (Zane et al., 2002). Entretanto, tem sido observado que ocorre conservação de regiões flanqueadoras para alguns locos microssatélites entre espécies relacionadas, sendo possível, portanto, aproveitar *primers* que foram desenvolvidos para uma espécie e empregá-los nos demais representantes do gênero, e inclusive entre táxons mais distantes (White & Powell, 1997; Zucchi et al., 2003).

Contudo, o desenvolvimento de marcadores microssatélites tem se tornado mais acessível nos últimos anos, principalmente, devido às novas estratégias de enriquecimento de bibliotecas genômicas e à rapidez no sequenciamento automático baseado na fluorescência (Powell et al., 1996). Ainda que o desenvolvimento de marcadores SSR demande tecnologias

moleculares refinadas, o esforço se torna compensador pela quantidade de informações genéticas que podem ser geradas.

Para *Cariniana estrellensis* (jequitibá branco), espécie florestal alvo deste trabalho, não existem marcadores microssatélites específicos desenvolvidos. Sendo assim, o objetivo principal desta pesquisa foi obter um conjunto de 15 pares de *primers* que amplificam locos independentes de microssatélites polimórficos do genoma de *C. estrellensis*. Adicionalmente, investigou-se a transferência e caracterização destes locos em *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze (jequitibá rosa) com o intuito de verificar a aplicabilidade destes marcadores para estudos genéticos de outras espécies da família Lecythidaceae.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1. Amostragem

Para estes estudos foram amostrados tecidos foliares de 49 indivíduos de *C. estrellensis* e 28 indivíduos de *C. legalis*, provenientes de uma extensa área, localizada na região de Ribeirão Preto-SP, entre as bacias dos rios Pardo e Mogi-Guaçu. Para ambas as espécies, as árvores adultas amostradas estão presentes dentro de várias propriedades privadas, em meio a plantações (principalmente cana-de-açúcar e cítricos), pastagens e em alguns fragmentos de florestas, sendo isoladas por aglomerados urbanos e estradas. Além disso, vale ressaltar que parte dos adultos de *C. estrellensis* (34,7 %) e *C. legalis* (57,2 %) amostrados para este trabalho correspondem às árvores matrizes que originaram um banco de sementes no *Campus* da USP/RP. Todas as amostras foram identificadas, embaladas em papel alumínio e armazenadas a -20 °C até a extração do DNA genômico.

4.3.2. Extração e quantificação de DNA

As condições da extração de DNA das amostras foliares foram efetuadas com base na metodologia de Alzate-Marin et al. (2009).

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro (Spectronic Genesys 5), medindo-se a absorbância em contraste com uma amostra de TE, nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Para estimar a quantidade de DNA, tomou-se como referência que uma unidade de densidade óptica (DO) equivale a 50 µg de DNA por mL (Sambrook et al., 1989) e aplicou-se a seguinte fórmula:

$$[DNA]\mu g/\mu L = (A_{260} * DO * f)/1000 \text{ , onde:}$$

A_{260} = absorbância sob luz UV no comprimento de onda 260 nm;

DO = unidade de densidade óptica (50 µg/mL);

f = 8,33 (fator de diluição).

4.3.3. Desenvolvimento de marcadores microssatélites

Para a realização desta etapa foi necessário extrair o DNA das folhas de um único indivíduo de *C. estrellensis*, coletado na região de Ribeirão Preto. As primeiras etapas do trabalho de desenvolvimento (construção da biblioteca genômica até sequenciamento) foram realizadas utilizando os equipamentos do Laboratório de Análise Genética e Molecular do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP, em pesquisa colaborativa com a Prof[a.] Dr[a.] Anete Pereira de Souza.

A seguir, serão descritas, sucintamente, as etapas necessárias para construção da biblioteca enriquecida em SSR para a espécie *C. estrellensis*.

4.3.4. Banco enriquecido em microssatélites

Inicialmente, o DNA de um único indivíduo de *C. estrellensis* foi extraído e quantificado no Laboratório de Genética Vegetal – USP/RP (~5 µg), sendo posteriormente transportado ao CBMEG congelado. Subsequentemente, foi realizada a digestão do DNA com uma enzima de restrição de corte freqüente (*Rsa*I, Invitrogen) de forma que fossem obtidos fragmentos entre 300 e 600 pb. Em seguida, adaptadores com sequências conhecidas de 21 e 25 pb (Rsa21-5´CTCTTGCTTACGCGTGGACTA3´ e Rsa25-5'TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA3') foram ligados aos fragmentos obtidos. Com a finalidade de aumentar a quantidade de fragmentos que se ligaram aos adaptadores, uma pré-amplificação usando como *primer* o oligonucleotídeo Rsa21 foi realizada (Figura 8).

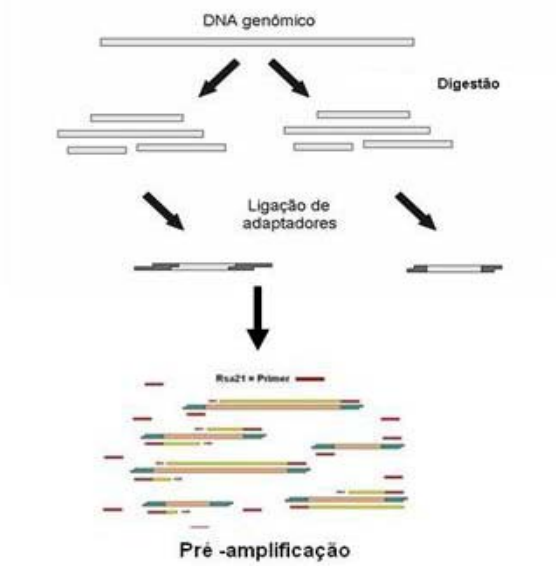

Figura 8. Etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida em SSR: digestão do DNA genômico, ligação dos adaptadores *Rsa21* e *Rsa25* e pré-amplificação com o *primer* Rsa21. (Fonte: Zane et al., 2002).

O produto de amplificação foi purificado (*Quiaquick PCR Purification Kit*, Qiagen) e submetido ao passo de enriquecimento da biblioteca para fragmentos contendo microssatélites por meio da hibridização com os oligonucleotídeos biotinilados $(GT)_8$ e $(CT)_8$. Dessa forma, fragmentos que continham as sequências repetitivas $(AC)_n$ e $(AG)_n$, os dois motivos mais comuns em genomas eucariotos, foram preferencialmente selecionados. Esses fragmentos foram recuperados pela ligação entre as moléculas de biotina e as moléculas de streptavidina

associadas com partículas magnéticas (*Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles*, Promega) (Figura 9).

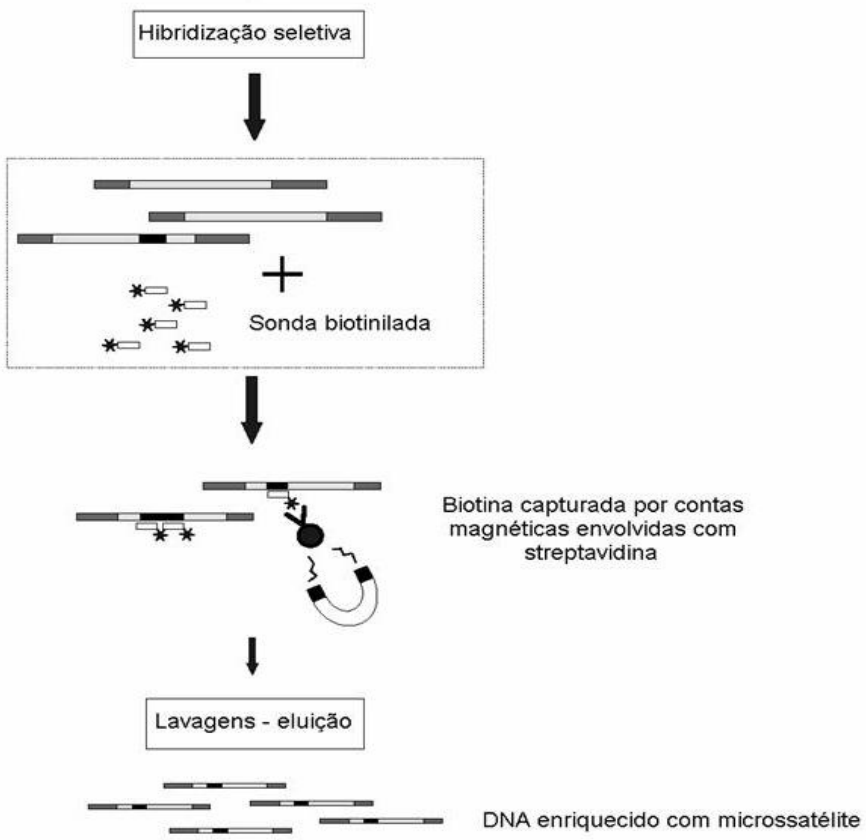

Figura 9. Etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida em microssatélites: hibridização de sondas (biotiniladas) de microssatélites com o DNA digerido e amplificado, e seleção dos fragmentos por magnetização. (Fonte: Zane et al., 2002).

Os fragmentos selecionados foram amplificados novamente usando o oligonucleotídeo Rsa21, e posteriormente, ligados a um vetor de clonagem (*pGEM-T Vector System*, Promega). Essa construção foi utilizada para transformar células competentes de *E. coli* XL1-Blue. As colônias recombinantes foram selecionadas para resistência ao antibiótico ampicilina e pelo sistema branco-azul, transferidas para placa ELISA contendo meio 2YT-HMFM, incubadas a 37 ºC por aproximadamente 16 horas e estocadas a -80 ºC.

4.3.5. Sequenciamento

Após a construção do banco com fragmentos enriquecidos em microssatélites foi realizada a etapa de sequenciamento dos clones. Para tanto, foi isolado o DNA plasmidial de cada um dos clones por meio da metodologia de lise alcalina. A obtenção das sequências foi

realizada com o *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) no sequenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) e com os *primers T7* (5´TAATACGACTCACTATAGGG3´) e *SP6* (5´ATTTAGGTGACACTATAGAA3´) *promoter*, os quais permitem a amplificação das duas fitas dos fragmentos clonados no vetor *pGEM-T*.

4.3.5.1. Análise das sequências

Para identificação das regiões microssatélites dentro das sequências obtidas foi utilizada a ferramenta de busca "SSRIT - *The Simple Sequence Repeat Identification Tool*" (Temnykh et al., 2001) disponível na página http://www.gramene.org. Essa ferramenta possibilita a localização apenas de microssatélites perfeitos, de forma que muitos potenciais locos de microssatélites imperfeitos e interrompidos podem não ser identificados. Somente foram consideradas para desenvolvimento de marcadores microssatélites as repetições simples e/ou compostas que possuíam número igual ou superior a 5 unidades repetidas para dinucleotídeos, 4 para os tri e 3 para os tetra, penta e hexanucleotídeos. O programa Microsat foi utilizado para encontrar os adaptadores e os possíveis sítios de enzima *Rsa*I. Uma vez editadas, as sequências foram alinhadas para remoção de redundâncias através do programa SeqMan do pacote computacional LaserGene (DNAStar Inc.). Locos de microssatélites encontrados em mais de uma sequência foram descartados e apenas os marcadores não ambíguos foram avaliados.

4.3.5.2. Desenho dos *primers*

Os oligonucleotídeos (*primers*) complementares às sequências flanqueadoras dos microssatélites foram desenhados com o auxílio do programa PRIMER3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Para desenho dos *primers* foram adotados os seguintes critérios: não conter bases redundantes; estar a uma distância adequada dos SSR (entre 20 a 60 pb); ser constituídos por 17 a 23 nucleotídeos sem sequências repetitivas; conter uma porcentagem de bases G e C entre 50 a 55 %; começar em 5' e terminar em 3' com duas bases G ou C, ou G e C, se possível; produtos de PCR com comprimento entre 150 e 250 pb; e ter temperatura de anelamento entre 45 e 60 °C, com diferença máxima de 2 ºC entre as temperaturas dos *primers* direto e reverso, de modo que possam ser usados na mesma reação e não hibridizem um com o outro, ou sofram auto-hibridização.

4.3.6. Ensaios de amplificação dos marcadores microssatélites

DNA de dez indivíduos adultos de *C. estrellensis* foi utilizado para testar e padronizar as condições de amplificação dos locos microssatélites. O equipamento utilizado para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi o termociclador Mastercycler® Eppendorf. Foram realizados ensaios de temperaturas de anelamento entre 45 °C a 57 °C a fim de avaliar a melhor temperatura para amplificação de cada loco. A sequência geral das condições de amplificação foi a seguinte: 1 ciclo: 96 ^{o}C por 5 minutos, 30 ciclos: 94 ^{o}C por 30 segundos, 45-57 °C por 1 minuto, 72 ^{o}C por 1 minuto, 1 ciclo: 72 ^{o}C por 7 minutos, 22 ^{o}C indefinidamente.

Para cada reação de PCR, 2,5 ng de DNA genômico foram utilizados em um volume total de 10 µL contendo 1x tampão de reação livre de $MgCl_2$ [75 mM Tris-HCl pH 9.0; 50mM KCl; 20 mM $(NH_4)_2SO_4$], 1,5 mM $MgCl_2$, 250 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,3 µM de cada *primer* microssatélite (direto e reverso) e 1 U de *Taq* DNA polimerase. Para cada reação foi mantido um tubo contendo água MilliQ como controle negativo.

4.3.7. Estudo de polimorfismo dos locos SSR desenvolvidos para *C. estrellensis*

A fim de avaliar o polimorfismo dos marcadores SSR desenvolvidos neste trabalho, realizou-se a genotipagem de um grupo de 49 árvores adultas de *C. estrellensis*, descritas anteriormente no subitem 4.3.1.

4.3.8. Teste de segregação mendeliana

Após a padronização das condições de amplificação e verificação do polimorfismo dos locos SSR, foi feito um teste de segregação mendeliana para demonstrar a utilidade desses marcadores nos estudos de parentesco propostos nesse trabalho. Sendo assim, duas árvores matrizes de *C. estrellensis* e 15 progênies de cada uma foram escolhidas e amplificadas com os marcadores SSR desenvolvidos.

4.3.9. Estudos de amplificação heteróloga

Uma vez padronizada as condições de amplificação dos marcadores SSR desenvolvidos para *C. estrellensis*, estudos de transferibilidade e caracterização para *C. legalis* (jequitibá rosa) foram realizados. Para esses experimentos, utilizaram-se amostras de DNA de 28 indivíduos de *C. legalis* coletados na região de Ribeirão Preto-SP (ver subitem 4.3.1).

As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler® Eppendorf. Temperaturas variando de 46 a 58 ^{o}C foram testadas, para cada marcador, para se obter a temperatura ótima de anelamento dos *primers*. As reações de amplificação do DNA de *C. legalis* foram realizadas em um volume final de 10 µl. Com exceção do DNA, todos os reagentes (tampão, dNTP, *primers* – solução de trabalho, $MgCl_2$ e a *Taq* - DNA polimerase) foram misturados em um único tubo para garantir a homogeneidade das reações e em quantidades específicas para cada loco, conforme descrito por Guidugli et al. (2010) (Anexo 2).

Após a padronização e confirmação das regiões de amplificação SSR em *C. legalis*, herança mendeliana foi investigada para cada loco através da análise de uma árvore materna e 20 progênies de polinização natural.

4.3.10. Eletroforese

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese sob condições não desnaturantes e desnaturantes em géis de poliacrilamida 10 %. Para a escolha da temperatura de anelamento dos *primers* microssatélites e confirmação da região de amplificação esperada, os produtos de PCR foram primeiro aplicados em géis de poliacrilamida 10 % não desnaturantes contendo um padrão de 50pb (Amersham Biosciences). Tais géis não desnaturantes 10 % (20 mL) possuíam: 1,4 mL de glicerol, 9,72 mL de H_2O destilada, 6,7 mL de solução acrilamida/bis-acrilamida (29:1), 2,0 mL de TBE (10X – 108,0 g de Tris; 53,0 g de ácido bórico; 40,0 mL de solução de EDTA pH 8,0; completar o volume para 1 litro de H_2O), 15 µL de TEMED (tetrametiletilenodiamina- Pharmacia Biotech) e 300 µL de solução de persulfato de potássio.

Após a escolha da temperatura de anelamento e a confirmação da região de amplificação, as separações dos produtos de PCR foram feitas em géis de poliacrilamida 10 % sob condições desnaturantes para a determinação fenotípica. Tais géis (30 mL) continham: 14,4 g de uréia, 10,0 mL solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), 3,0 mL de TBE (10X), 22,5 µL de TEMED, 450 µL de solução de persulfato de potássio e água destilada.

Os géis polimerizados foram montados em cuba de eletroforese vertical contendo tampão TBE (1X – 100 mL Tampão TBE (10X); 900 mL H_2O) em ambos os pólos (porção superior e inferior). Esta cuba foi conectada a uma fonte de voltagem, Amershan Pharmacia Biotech (EPS 1001), ajustada à corrente elétrica de 23 mA constante durante 4h, necessária para uma boa separação dos fragmentos amplificados.

Antes da aplicação das amostras nos géis desnaturantes, estas foram submetidas às condições de desnaturação em um tratamento prévio com formamida: foram colocados 7 µL de tampão de amostra (900 µL de bromofenol, 900 µL de xilenocianol, 900 µL de TBE 10X, 4,5 mL de Ficol 30 % diluído em água destilada, 1,8 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, 3,6 g de sacarose; na proporção de 3:1 com formamida) em tubo *eppendorf*, junto com 5 µL do produto amplificado. Estes tubos foram aquecidos a 94 ^{o}C por 7 minutos e subsequentemente colocados em banho de gelo (tratamento desnaturante), seguindo-se à aplicação no gel.

4.3.11. Coloração do gel com nitrato de prata e secagem

Com o término da corrida eletroforética, os géis de poliacrilamida 10 % desnaturantes e não desnaturantes foram retirados cuidadosamente das placas de vidro e corados com nitrato de prata de acordo com o protocolo adaptado de Sanguinetti et al. (1994):

- Fixação: após a retirada das placas de vidros e dos espaçadores, o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 200 mL de solução fixadora (160 mL de etanol (PA), 7,0 mL de ácido acético glacial (PA) e 833 mL de água destilada);
- Impregnação com nitrato de prata: adicionou-se 3,0 mL de solução de nitrato de prata 20 % (2 g de nitrato de prata, 10 mL de água destilada) e agitou-se por 5 minutos. A solução foi então descartada adequadamente e o gel lavado em água pré-aquecida (40 ^{o}C) por cerca de 10 segundos, agitando levemente e, ao final, descartou-se a água;
- Revelação: 200 mL solução reveladora (22 g de NaOH, 1 litro de água destilada) foram despejadas cuidadosamente no recipiente contendo o gel juntamente com 1,5 mL de formaldeído, sendo submetido à agitação por alguns minutos até que as bandas aparecessem nitidamente. A solução reveladora foi pré-aquecida em forno de microondas por 3 minutos em potência máxima para facilitar a reação de coloração;
- Bloqueio da reação: após o gel ter sido revelado, a solução reveladora foi descartada e a reação bloqueada com a lavagem direta do gel em 200 mL de solução fixadora.

Após a conclusão do processo de revelação dos fragmentos amplificados, os géis foram secos em papel celofane para análise e posterior armazenagem.

4.3.12. Determinação fenotípica

Os alelos de todos os locos SSR foram identificados por ordem crescente de tamanho, definida pela migração eletroforética, ou seja, em um gel de eletroforese os fragmentos de DNA com menor peso molecular (tamanho) migram mais rápido que os de maior tamanho. A

quantificação do tamanho dos alelos, em pares de bases, foi realizada utilizando-se um marcador de peso molecular de 10 pares de bases (Invitrogen).

4.3.13. Análises estatísticas

Para caracterização dos locos microssatélites em indivíduos de *C. estrellensis* e *C. legalis* a seguinte metodologia estatística foi adotada.

4.3.13.1. Estimativa do desequilíbrio de ligação

O teste de desequilíbrio de ligação foi realizado com o programa FSTAT (Goudet, 2002), aplicando correção de Bonferroni. Esse teste permitirá determinar quais locos são adequados para as análises genéticas populacionais.

4.3.13.2. Caracterização da diversidade genética

As frequências alélicas e genotípicas de cada loco foram obtidas a partir da leitura dos fragmentos obtidos nos géis, sendo estimadas com o programa GDA versão 1.1 (Lewis & Zaykin, 2000). Com o auxílio deste programa, os locos polimórficos foram caracterizados considerando o número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E) e número efetivo de alelos por loco (A_e=1/(1-H_E)). Também foi estimado o índice de fixação (F), conforme Weir (1996). A significância estatística dos valores médios entre locos do índice F foi calculada por permutação (10.000), usando o programa FSTAT (Goudet, 2002). Probabilidades de exclusão do primeiro [$\Pr(Ex_1)$] e segundo parentes [$\Pr(Ex_2)$] também foram estimadas com auxílio do programa CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2007).

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1. Desenvolvimento e caracterização de marcadores SSR para *C. estrellensis*

4.4.1.1. Desenho dos *primers* e ensaios de amplificação

A extração do DNA através do protocolo adotado possibilitou o isolamento de grande quantidade de material de boa qualidade, requisito necessário para as etapas iniciais da construção do banco. Assim, o desenvolvimento de marcadores microssatélites para a espécie *C. estrellensis* foi iniciado, contando com 96 clones, distribuídos em uma microplaca de manutenção.

Na primeira etapa, amostras de 12 clones foram analisadas por PCR utilizando-se o *primer* Rsa21 para: 1) confirmar a presença do adaptador nos insertos clonados no vetor pGEM-T e 2) verificar a faixa de tamanho dos insertos simples clonados. As amplificações mostraram que houve sucesso na ligação dos insertos aos vetores de clonagem (Figura 10). Os insertos apresentaram variações entre 300 e 1.600 pares de base.

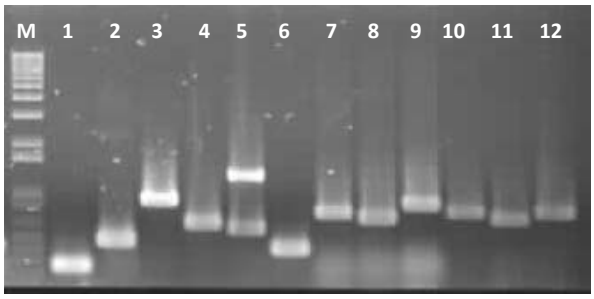

Figura 10. Padrão de amplificação para os 12 clones de microssatélites obtidos a partir da biblioteca construída com o DNA de *C. estrellensis*.

Dentre os 96 clones constituintes da biblioteca enriquecida, 54 foram sequenciados utilizando-se os *primers* T7 (um lado da fita de DNA) e SP6 (fita reversa). O sequenciamento de ambas as fitas foi adotado visando à obtenção da sequência correta de bases adjacentes aos microssatélites para desenho dos *primers*. Dos 54 clones sequenciados, 37 (68,52 %) continham microssatélites em suas sequências, demonstrando a eficiência da metodologia de enriquecimento utilizada na construção da biblioteca.

Como critério para a seleção dos microssatélites a serem desenvolvidos, foi utilizado um número mínimo de 5 repetições para dinucleotídeos, 4 para os tri e 3 para os tetra, penta e

hexanucleotídeos. O número de repetições variou de 4 em tetranucleotídeos a 25 em dinucleotídeos. Como esperado, a classe de microssatélites mais frequente foi a de dinucleotídeos, a qual corresponde por 36 dos marcadores encontrados (~ 97 %), enquanto a classe do tetra- estava presente em apenas 1 dos marcadores (~ 3 %). Resultados com valores percentuais próximos a estes também foram encontrados por Brondani et al. (1998), no desenvolvimento de marcadores SSR em *Eucalyptus* ssp.

Segundo Wang et al. (1994), a frequência de cada classe de SSR é altamente variável entre as espécies vegetais. Entretanto, neste trabalho foi observada uma predominância da combinação CA/TG entre os dinucleotídeos, onde esta combinação foi encontrada 15 vezes. Tal dado era esperado, uma vez que os motivos escolhidos para o enriquecimento da biblioteca foram CT e GT. De acordo com a classificação apresentada por Oliveira et al. (2006), a maioria dos microssatélites presentes nas sequências constitui-se de microssatélites simples e perfeitos (71 %), seguido dos compostos perfeitos (11 %), compostos imperfeitos (11 %) e compostos interrompidos (7 %). Algumas sequências com microssatélites apropriados não puderam ter seus *primers* desenhados, pois estas regiões SSR se apresentavam na extremidade inicial ou final da sequência. Contudo, dezenove pares de *primers* foram desenhados para *C. estrellensis* (Tabela 1).

Tabela 1. Relação dos locos microssatélites desenvolvidos para *C. estrellensis*.

	Loco	Motivo Repetitivo	Temperatura de anelamento predita (°C)	Tamanho esperado fragmento (pb)
1	Ces01	$(CA)_9$	48,5	154
2	Ces02	$(ATAC)_4(AC)_{15}$	59,0	183
3	Ces03	$(AC)_{10}$	48,3	209
4	Ces04	$(TC)_{16}$	46,1	187
5	Ces05	$(AC)_{11}$	48,5	149
6	Ces06	$(AC)_6AG(AC)_3AGG(AC)_{12}$	49,0	199
7	Ces07	$(GA)_{16}$	53,0	192
8	Ces08	$(AG)_{25}$	49,0	223
9	Ces09	$(TG)_2CG(TG)_9$	50,0	187
10	Ces10	$(CA)_8$	53,8	200
11	Ces11	$(CT)_{25}$	50,6	232
12	Ces12	$(TG)_{12}C(GT)_{11}$	48,6	287
13	Ces13	$(CA)_{16}$	50,0	156
14	Ces14	$(TG)_{13}$	52,0	188
15	Ces15	$(AC)_8$	45,6	200
16	Ces16	$(CA)_{11}$	48,7	202
17	Ces17	$(CA)_{12}$	49,3	171
18	Ces18	$(GT)_6$	45,5	160
19	Ces19	$(TG)_9(AG)_{13}$	53,2	195

Os *primers* foram sintetizados e submetidos a ensaios de amplificação com dez indivíduos adultos de jequitibá branco. Destes ensaios preliminares, quinze marcadores tiveram suas condições de amplificação padronizadas e mostraram-se polimórficos (Tabela 2). Entretanto, a caracterização da variabilidade genética para esses locos SSR foi realizada em 49 indivíduos adultos de *C. estrellensis* procedentes da região de Ribeirão Preto-SP.

Tabela 2. Marcadores microssatélites desenvolvidos para *C. estrellensis*, cujas condições de amplificação foram padronizadas e apresentaram-se polimórficos.

Locos	Temperatura de Anelamento (ºC)
Ces01, Ces04, Ces09, Ces11, Ces12, Ces13	48
Ces10	49
Ces03	50
Ces14, Ces16, Ces18	51
Ces05, Ces06, Ces07	53
Ces02	57

4.4.1.2. Estudo de polimorfismo dos locos SSR desenvolvidos para *C. estrellensis*

Para as 49 árvores de jequitibá branco genotipadas com os 15 locos SSR, detectou-se indício de desequilíbrio de ligação apenas entre os locos Ces04 e Ces07. Os demais locos não apresentaram resultado significativo de ligação, permitindo afirmar que os alelos dos diferentes locos analisados não estão associados e, portanto, segregam independentemente.

Um total de 140 alelos foi identificado, sendo que o número de alelos por loco variou de cinco (Ces13) a 18 (Ces04) com uma média de 9,33. Esse valor é similar ao número médio de alelos por loco observado em outras espécies arbóreas tropicais como *Swietenia humilis* (9,7) (White & Powell, 1997), *Corythophora alta* (10,7) (Hamilton, 2002) e *Hymenaea courbaril* (10,7) (Ciampi et al., 2008).

Conforme pode ser visto na Tabela 3, a heterozigosidade observada variou de 0,08 (Ces14) a 0,81 (Ces04) com uma média de 0,46, enquanto que, a estimativa da heterozigosidade esperada foi mais elevada. O menor valor de heterozigosidade esperada foi atribuído ao loco Ces14 (0,37) enquanto o loco Ces05 (0,88) apresentou o maior valor desta estimativa.

Tabela 3. Caracterização dos marcadores desenvolvidos para *C. estrellensis*: sequências dos *primers*, motivos e número de repetições, número de alelos por loco (*A*), heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E), probabilidades de exclusão de paternidade $Pr(Ex_1)$ e $Pr(Ex_2)$.

Locos	Sequências 5'-3'	Motivos	*A*	H_O	H_E	$Pr(Ex_1)$	$Pr(Ex_2)$
Ces01	F:CCTTTTAATACCTTTTATTGC R:CCATCTCATCCTAATATATTTTC	$(CA)_9$	10	0,46	0,80	0,553	0,377
Ces02	F:GGACATGGGTTGTTATCCG R:TCTCAACCTCAAAATGTAATAGC	$(ATAC)_4(AC)_{15}$	9	0,47	0,83	0,522	0,349
Ce03	F:GGTGTATCCTAAGGTAGAGC R:CCTTTGGAAGATATGGAAG	$(AC)_{10}$	7	0,37	0,70	0,707	0,525
Ces04	F:AGCATCCTTTGAATTGG R:CTTCAAAGTAAAGATATAAAAC	$(TC)_{16}$	18	0,81	0,86	0,436	0,277
Ces05	F:CCAGATTGATAAGCTACTCC R:CATTCAAGCAAGTCAAACC	$(AC)_{11}$	10	0,23	0,88	0,415	0,259
Ces06	F:GGGGCATATGTTTATTATTC R:GTGGTAAATCACAAATGTGC	$(AC)_6AG(AC)_3$ $AGG(AC)_{12}$	9	0,45	0,85	0,478	0,311
Ces07	F:TTGTAAAAACGGCATGTCC R:GTTCGGAACAGACAAAGAGG	$(GA)_{16}$	10	0,43	0,82	0,533	0,360
Ces09	F:CAGAGTTTTTCAATAGCGG R:TTTCATTGCAATCATAGGC	$(TG)_2CG(TG)_9$	6	0,33	0,38	0,919	0,773
Ces10	F:GGGCAGACCAAATCAAGAG R:GCCATTCATAAACCATTCAAG	$(CA)_8$	7	0,46	0,70	0,710	0,536
Ces11	F:AAGTAATTTCATTCTCAAGTGG R:GTTCTGATATGGGCTTTCC	$(CT)_{25}$	12	0,77	0,85	0,455	0,292
Ces12	F:ACGCACTTTCTCAATTCC R:TGTAGACTTGTAGGATAAATGG	$(TG)_{12}C(GT)_{11}$	6	0,31	0,76	0,639	0,461
Ces13	F:CTGAAGGGACTGAGGGG R:ATATCAGGAGGTTAAGGGC	$(CA)_{16}$	5	0,45	0,69	0,743	0,583
Ces14	F:CTGGTAAGCTCTTGGTTGTG R:CCATGGGTTTTCTGTTTCC	$(TG)_{13}$	6	0,08	0,37	0,929	0,794
Ces16	F:GGACATACCTGCCAAAAC R:AGAGTTAGTTGCTGTTATATGG	$(CA)_{11}$	12	0,60	0,82	0,539	0,363
Ces18	F:ATAATCATGACCTGTGCC R:GTCCCTGATCAAGTATGC	$(GT)_6$	13	0,66	0,70	0,696	0,522
Média[1]/ Probabilidade de exclusão cumulativa[2]			9,33[1]	0,46[1]	0,73[1]	0,9996[2]	0,9999[2]

Para todos os locos, exceto Ces04, Ces09, Ces11 e Ces18, as frequências genotípicas mostraram desvios significantes do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), provavelmente em decorrência do efeito Wahlund (árvores dispersas amostradas em uma ampla área). Contudo, o índice de diversidade genética em *C. estrellensis* (H_E = 0,73) foi maior que os relatados em outras espécies florestais da América do Sul: *Swietenia macrophylla* (H_E = 0.66, Novick et al., 2003) e *Solanum lycocarpum* (H_E = 0.33, Martins et al., 2006).

Além do elevado polimorfismo, este conjunto de marcadores apresentou alta probabilidade de exclusão de paternidade (Tabela 3). Assim, concluiu-se que para a espécie *C. estrellensis* estes 15 marcadores microssatélites são suficientemente informativos e, poderão ser empregados como ferramentas adequadas para a realização dos estudos genéticos propostos nesse trabalho.

4.4.1.3. Teste de segregação mendeliana

Após a etapa de avaliação do polimorfismo dos marcadores desenvolvidos, realizou-se um teste da segregação mendeliana com duas famílias de polinização natural compostas por quinze progênies cada. Para os 15 locos analisados foi constatado que todas as progênies continham pelo menos um dos alelos presentes em suas respectivas matrizes (Figura 11). A genotipagem dessas duas famílias nos permitiu concluir que esse conjunto de marcadores é apropriado para os estudos de parentesco propostos nesse trabalho.

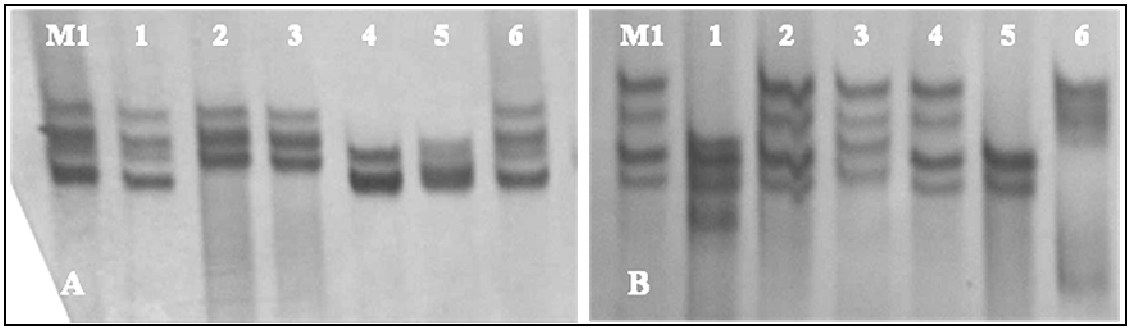

Figura 11. Géis de poliacrilamida 10 % mostrando a amplificação em uma família de *C. estrellensis*; com os locos Ces14 (A) e Ces16 (B). Para ambos os locos, observaram-se a presença de pelo menos um dos alelos da matriz (canaleta M1) nas progênies amplificadas (canaletas 1-6).

4.4.2. Estudos de amplificação heteróloga em *C. legalis*

Os 15 pares de *primers* desenvolvidos para *C. estrellensis* foram testados para amplificar o DNA genômico de dez indivíduos de *Cariniana legalis*, espécie popularmente conhecida como jequitibá rosa. Destes, 12 pares de *primers* (80 %) amplificaram regiões SSR com sucesso em *C. legalis* (Tabela 4).

A fim de avaliar o polimorfismo dos doze pares de *primers* SSR transferidos para *C. legalis* realizou-se a genotipagem de um grupo de 28 árvores adultas coletadas entre as bacias do Rio Pardo e Mogi-Guaçu, na região de Ribeirão Preto-SP. Para esta amostra, dos 12 *primers* transferidos, dois (16,7 %) foram monomórficos e os outros 10 foram polimórficos, mostrando clara variação no tamanho dos alelos (Tabela 4).

Um total de 70 alelos foram identificados para os 28 indivíduos de *C. legalis*, usando os 10 locos SSR polimórficos. O número de alelos detectado nesta espécie variou de 2 (Ces02) a 11 (Ces03), com uma média de 7,0. Esse valor foi menor quando comparado ao encontrado em *C. estrellensis* (8,5) para esses mesmos locos (ver Tabela 3 subitem 4.4.1.2.; Guidugli et al., 2009). Os padrões observados neste estudo estão de acordo com estudos

anteriores que relataram uma diminuição do polimorfismo na espécie analisada com *primers* heterólogos (Ciampi et al., 2008; Feres et al., 2009). De acordo com Peakall et al. (1998), fragmentos relacionados amplificados em diferentes espécies podem incluir mutações, rearranjos e duplicações na região flanqueadora, ocasionando mudanças no número de repetições, o que por sua vez, poderia acarretar uma redução do polimorfismo.

Tabela 4. Características dos locos microssatélites transferidos para *C. legalis*: temperatura de anelamento (*Ta* ºC), número de alelos por loco (*A*), heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E), probabilidades de exclusão de paternidade $Pr(Ex_1)$ e $Pr(Ex_2)$.

Locos	Variação do tamanho dos alelos (pb)	*Ta* ºC	*A*	H_O	H_E	$Pr(Ex_1)$	$Pr(Ex_2)$
Ces02	163-165	57	2	0	0,07	0,998	0,967
Ces03	207-235	50	11	0,50	0,86	0,460	0,297
Ces05	149-163	53	6	0,43	0,73	0,680	0,501
Ces06	159	51	1	-	-	-	-
Ces07	178-202	51	10	0,74	0,87	0,451	0,289
Ces09	185	48	1	-	-	-	-
Ces10	196-228	49	6	0,44	0,59	0,799	0,621
Ces12	265-287	46	10	0,26	0,88	0,417	0,261
Ces13	142-156	47	5	0,16	0,59	0,817	0,680
Ces14	180-186	51	4	0,24	0,29	0,958	0,846
Ces16	204-214	51	6	0,07	0,71	0,695	0,514
Ces18	166-186	51	10	0,40	0,84	0,499	0,330
Média[1]/Probabilidade de exclusão cumulativa[2]				**0,32[1]**	**0,64[1]**	**0,872[2]**	**0,999[2]**

O valor médio da heterozigosidade observada foi 0,32 e os valores da heterozigosidade esperada variaram de 0,07 (Ces02) a 0,88 (Ces12), com uma média de 0,64 (Tabela 4). O índice de diversidade genética em *C. legalis* (0,64) também foi menor que o valor encontrado em *C. estrellensis* (0,73), mas foi maior que o relatado para outras espécies arbóreas tropicais: *Carapa guianensis* (H_E = 0,61, Dayanandan et al., 1999), *Swietenia humilis* (H_E = 0,53, White et al., 1999) and *Solanum lycocarpum* (H_E = 0,33, Martins et al., 2006). Uma deficiência de heterozigotos foi observada para a maioria dos locos, provavelmente devido à estratégia de amostragem dos indivíduos utilizados para a caracterização dos locos (Efeito Wahlund) ou à presença de alelos nulos. De fato, o teste para alelo nulo (MICRO_CHECKER, van Oosterhout et al., 2004) revelou que a maioria dos locos (Ces02, Ces03, Ces05, Ces12, Ces13, Ces16 e Ces18) mostraram evidência de alelos nulos. Segundo Kim et al. (2004), a probabilidade de ocorrência de alelos nulos é maior nas espécies que foram analisadas com marcadores microssatélites heterólogos do que nas espécies em que os marcadores foram desenvolvidos.

Nenhum dos locos mostrou indício de desequilíbrio de ligação significante, indicando que estes marcadores são apropriados para estudos genéticos populacionais. Os perfis microssatélites gerados pelos 10 pares de *primers* heterólogos foram capazes de distinguir todos os 28 indivíduos de *C. legalis* amostrados no sudeste do Brasil (Figura 12). Através da análise de uma família de polinização natural com os 10 locos SSR confirmou-se a herança mendeliana dos marcadores heterólogos. Os valores de probabilidade de exclusão de paternidade sobre os 10 locos polimórficos foram altos (Tabela 4), demonstrando que os marcadores microssatélites transferidos poderão ser usados em estudos de parentesco em populações naturais de *C. legalis*.

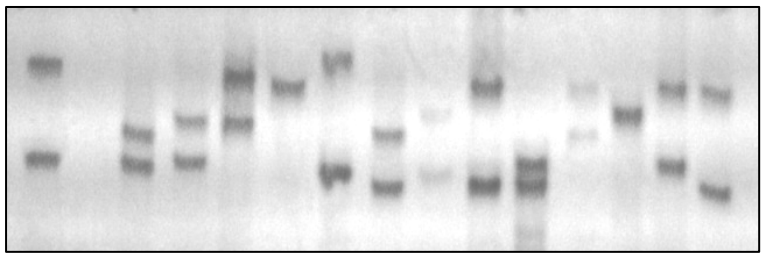

Figura 12. Gel de poliacrilamida 10 % mostrando os perfis de amplificação gerados com o loco Ces07 em indivíduos de *C. legalis*.

4.5. CONCLUSÃO

O elevado polimorfismo e a alta probabilidade de exclusão de paternidade do conjunto de marcadores microssatélites desenvolvidos para a espécie *C. estrellensis* demonstram que estes locos são suficientemente informativos e poderão ser empregados como ferramentas adequadas para a realização dos estudos genéticos propostos nesse trabalho. Através dos estudos de amplificação heteróloga, também se constatou a aplicabilidade geral dos marcadores microssatélites desenvolvidos em *C. estrellensis* na espécie florestal *C. legalis.*

Indubitavelmente, este primeiro conjunto de marcadores SSR desenvolvidos para *C. estrellensis* abre uma perspectiva para gerar dados genéticos sobre a espécie, podendo auxiliar no planejamento de programas de conservação deste importante recurso genético brasileiro, bem como de outros representantes do gênero por meio de estudos de transferibilidade.

4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZATE-MARIN, A. L.; GUIDUGLI, M. C.; SORIANI, H. H.; MARTINEZ, C. A. H.; MESTRINER, M. A. A DNA minipreparation procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1217-1224, 2009.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 816-827, 1998.

CIAMPI, A. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélites, AFLP e sequenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de Copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado**.1999. 204 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.

CIAMPI, A. Y.; AZEVEDO, V. C. R.; GAIOTTO, F. A.; RAMOS, A. C. S.; LOVATO, M. B. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 1074-1077, 2008.

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

FERES, J. M.; MARTINEZ, M. L. L.; MARTINEZ, C. A.; MESTRINER, M. A.; ALZATE-MARIN, A. L. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 434-437, 2009.

FERREIRA, M. E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 1995. 220p.

GOUDET, J. (2002) FSTAT version 2.9.3 Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Disponível em: http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm. Acesso: 06 de Abril de 2008.

GUIDUGLI, M. C.; CAMPOS, T.; SOUSA, A. C. B.; FERES, J. M.; SEBBENN, A. M.; MESTRINER, M. A.; CONTEL, E. P. B.; ALZATE-MARIN, A. L. Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. **Conservation Genetics**, v. 10, p. 1001-1004, 2009.

GUIDUGLI, M. C.; ACCORONI, K. A. G.; MESTRINER, M. A.; CONTEL, E. P. B.; MARTINEZ, C. A.; ALZATE-MARIN, A. L. Genetic characterization of 12 heterologous microsatellite markers for the giant tropical tree *Cariniana legalis* (Lecythidaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 131-134, 2010.

HAMILTON, M. B. Isolation and characterization of nuclear microsatellite loci in the tropical tree *Corythophora alta* (Lecythidaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 363-365, 2002.

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**, v. 16, p. 1099–1106, 2007.

KIM, K. S.; MIN, M. S.; AN, J. H.; LEE, H. Cross-species amplification of Bovidae microsatellites and low diversity of the endangered Korean Goral. **Journal of Heredity**, v. 95, p. 521-525, 2004.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. GDA - Genetic Data Analysis: version 1.1 for Windows 95/NT. http://www.lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/. 2002.

MARTINS, K.; CHAVES, L. J.; BUSO, G. S. C.; KAGEYAMA, P. Y. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, v. 7, p. 957–969, 2006.

NOVICK, R. R.; DICK, C. W.; LEMES, M. R.; NAVARRO, C.; CACCONE, A.; BERMINGHAM, E. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Switenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2885−2893, 2003.

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

PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANTE, M.; RAFALSKI, A. Cross species amplification of Soybean (*Glycine max*) simple-sequence-repeats (SSRs) within the genera and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, p. 1275-1287, 1998.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 209-245, 1996.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, p. 365–386, 2000.

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

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

TEMNYKH, S.; DECLERCK, G.; LUKASHOVA, A.; LIPOVICH, L.; CARTINHOUR, S.; McCOUCH, S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. **Genome Research**, v. 11, p. 1441-1452, 2001.

WANG Z.; WEBER J. L.; ZHONG G.; TANKSLEY, S. D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics,** v. 88, p. 1-6, 1994.

WEIR, B. S. **Genetics data analysis II – Methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers. 1996.

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

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

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATERNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO J. B.; CHAVES L. J.; COELHO A. S. G.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 449-457, 2003.

5. CAPÍTULO II

DIVERSIDADE GENÉTICA E SISTEMA DE REPRODUÇÃO DA ESPÉCIE FLORESTAL *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (LECYTHIDACEAE) EM PEQUENA POPULAÇÃO REMANESCENTE NO INTERIOR DO ESTADO DE SÃO PAULO

5.1. RESUMO

Nove pares de locos microssatélites foram utilizados para investigar os padrões temporal da variabilidade genética e do sistema reprodutivo em uma população remanescente da espécie florestal *Cariniana estrellensis* presente em fragmento de 8 ha no interior do Estado de São Paulo. Para tanto, foram mapeadas e amostradas todas as 30 árvores adultas e 39 regenerações existentes no referido fragmento. Além disso, coletaram-se sementes de polinização natural em dois anos consecutivos, das quais foram obtidas 644 progênies para as análises genéticas deste trabalho (399 em 2007 + 245 em 2008). Evidências de herança genética mendeliana 1:1 e indícios de nenhuma ligação física entre os nove locos avaliados indicaram que estes marcadores são apropriados para os estudos genéticos propostos. Através das análises utilizando SSR constatou-se que todas as gerações de *C. estrellensis* (adultos, regenerantes e progênies) apresentaram altos níveis de diversidade genética, no entanto, a riqueza alélica e a heterozigosidade média observada foram significativamente maiores nos adultos em comparação aos juvenis, sugerindo uma tendência de redução na diversidade genética entre as gerações. Em adição, ausência de endogamia foi detectada em todas as gerações, evidenciando a alogamia da espécie. As estimativas das taxas de cruzamento multilocos (t_m) a nível populacional não diferiram estatisticamente da unidade nos dois eventos reprodutivos, sugerindo que *C. estrellensis* seja uma espécie perfeitamente alógama, com indícios de mecanismos de auto-incompatibilidade. Estimativas da correlação de paternidade ($r_{p(m)\ (2007)} = 0{,}121$ e $r_{p(m)\ (2008)} = 0{,}145$) e do coeficiente de coancestralidade médio dentro de progênies ($\Theta_{xy\ (2007)} = 0{,}140$ e $\Theta_{xy\ (2008)} = 0{,}141$) indicaram a ocorrência de pequenos desvios de cruzamentos aleatórios na população de *C. estrellensis*, sendo a maioria das progênies aparentadas no grau de meios-irmãos. A partir das estimativas de correlação de paternidade estimou-se que o número efetivo de doadores de pólen foi mais alto entre frutos de uma mesma árvore (10,20 em 2007 e 10,31 em 2008) do que dentro de um mesmo fruto (1,33 em 2007 e 1,17 em 2008). De forma geral, não foram detectadas grandes diferenças nos parâmetros do sistema reprodutivo entre os dois anos e a população estudada mostrou-se potencial para fins de conservação *in situ* e *ex situ*.

5.2. INTRODUÇÃO

Atualmente, a proteção da diversidade genética dentro das espécies em geral é uma prioridade inerente aos planos de conservação, sendo o objetivo de longo prazo manter a viabilidade evolutiva das espécies. A diversidade genética das populações de espécies arbóreas é fundamental para a sustentabilidade, pois fornece matéria-prima para sua adaptação, evolução e sobrevivência (Rajora & Mosseller, 2001).

A fragmentação do habitat ocasionada por atividades humanas tem reduzido o tamanho de muitas populações de plantas e aumentado seu isolamento espacial, o que pode levar a um risco real de erosão genética e até mesmo de extinção de espécies, especialmente nos biomas tropicais (Pinto et al., 2004). Processos antropogênicos, como a fragmentação florestal e o corte seletivo de árvores, podem levar a um aumento da distância entre coespecíficos e dos cruzamentos correlacionados, acarretando mudanças no sistema de reprodução e no fluxo gênico dentro e entre as populações de plantas (Cascante et al., 2002; Fuchs et al., 2003; Smouse & Sork, 2004; Lobo et al., 2005).

O sistema reprodutivo de uma espécie determina como a variabilidade genética se organiza no espaço e no tempo, podendo fortemente influenciar a extensão da endogamia e diferenciação genética entre populações (Pakkad et al., 2008). De acordo com Allard (1999), a determinação da forma preferencial de acasalamento (alogamia ou autogamia) nas plantas é importante para o correto delineamento dos métodos de melhoramento e conservação genética a serem aplicados à espécie estudada, já que estas estratégias diferem de acordo aos sistemas reprodutivos. Ainda, Hall et al. (1996) pontuam que estudos sobre sistema de acasalamento são importantes determinantes do tamanho efetivo populacional, parâmetro este de importância crítica para elaboração dos planos de conservação.

Em populações naturais de plantas a reprodução pode ocorrer por cruzamentos aleatórios, cruzamentos biparentais, autofecundações, apomixia e suas combinações. Tais mecanismos podem apresentar grande variação entre espécies e entre e dentro de populações devido ao fato de seu controle estar sob influência genética e ambiental (Souza et al., 2003).

Atualmente, tem-se verificado um crescente interesse em descrever os padrões de acasalamento de espécies vegetais, contudo, a maioria dos estudos sobre os padrões de reprodução de plantas são realizados em um único evento reprodutivo (Souza et al., 2003; Freitas et al., 2004; Neto et al., 2005; Veron et al., 2005; Azevedo et al., 2007; Lacerda et al., 2008). Para os organismos perenes, no entanto, estudos em uma única época reprodutiva pode fornecer uma caracterização limitada dos padrões de acasalamento da geração sob consideração (Irwin et al., 2003).

Plantas individuais perenes, muitas vezes não florescem todos os anos e os efeitos ambientais, tais como, variação ou abundância de polinizadores e variação climática, podem gerar substancial variação interanual na quantidade e qualidade do pólen recebido por uma planta particular. A variabilidade temporal dos indivíduos doadores de pólen para determinadas plantas individuais ou entre plantas dentro de populações é mal compreendido, mas é provável que exista variação ano a ano, a qual não pode ser detectada por estudos que avaliam um único evento reprodutivo (Irwin et al., 2003).

De acordo com Alves et al. (2003), estudos sobre sistemas reprodutivos têm se beneficiado do desenvolvimento de marcadores bioquímicos, como isoenzimas, desde 1970. No entanto, com o desenvolvimento dos marcadores de DNA, em especial os de herança codominante e altamente polimórficos como os microssatélites, o estabelecimento dos sistemas de acasalamento tornou-se mais preciso (Alves et al., 2003).

Visando contribuir para a conservação de recursos genéticos da espécie *Cariniana estrellensis*, examinou-se neste trabalho a variação genética em diferentes estágios do ciclo de vida de uma população dessa espécie no interior do estado de São Paulo e investigou-se o padrão do sistema reprodutivo em dois diferentes anos usando marcadores moleculares microssatélites.

Assim, as seguintes questões foram abordadas: a) Quais são os níveis de diversidade genética na população de *C. estrellensis*? b) As gerações da população de *C. estrellensis* apresentam diferenças quanto à diversidade e estrutura genética? c) Existe endogamia nesta população? d) Qual o tipo de sistema reprodutivo da espécie? e) Quais as taxas de cruzamento, cruzamento entre parentes e cruzamentos correlacionados entre os dois eventos reprodutivos? f) Qual o número médio de árvores doadoras de pólen e a proporção de diferentes parentescos nas gerações de progênies? g) Qual é o número de árvores matrizes necessárias para a coleta de sementes objetivando a conservação genética *ex situ* da espécie?

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1. Local de estudo

O estudo foi conduzido na localidade de Cravinhos, região de Ribeirão Preto (SP), em um fragmento florestal de aproximadamente 8 ha, altamente perturbado e isolado, presente dentro da Fazenda Águas Claras (21º17'47''S; 47º40'29''W). O fragmento corresponde a um remanescente de Floresta Estacional Semidecidual e fica nas imediações periféricas do município (Figura 13).

Figura 13. A) Foto de satélite mostrando o isolamento geográfico da área de estudo (círculo vermelho). Fonte: *Google Earth*, agosto de 2010. B) Fragmento florestal onde foram coletadas sementes e amostras foliares de indivíduos adultos e jovens da espécie *C. estrellensis*. Fonte: Arquivo Pessoal.

5.3.2. Coleta do material biológico

A amostragem do material biológico para o desenvolvimento desta pesquisa foi realizada em duas etapas. A primeira iniciou-se em junho de 2007, período em que se verificou a maturação dos frutos para a espécie *C. estrellensis* na região de Ribeirão Preto-SP. Para a amostragem do material biológico foi imprescindível a colaboração dos técnicos: Antônio Justino da Silva (responsável pelo viveiro de mudas da USP/RP), Marco Aurélio Cândido dos Reis, Dirceu de Souza e Benedito Lopes (especialistas em técnicas de escaladas em árvores).

As últimas 30 árvores adultas reprodutivas de *C. estrellensis* remanescentes no fragmento florestal foram georreferenciadas (GPS) (Anexo 3), identificadas com uma numeração específica gravada em placa de metal e tiveram tecidos foliares amostrados. Além disso, frutos foram colhidos aleatoriamente em oito árvores matrizes (denominadas M1, M2, M3, M4, M10, M12, M13 e M16) que frutificaram dentro da área. A altura média das árvores

adultas de *C. estrellensis* foi estimada em 20 m e a medida da circunferência a altura do peito (CAP) variou de 0,94 a 5 m (Figuras 14A e B).

Figura 14. Coleta de folhas e frutos realizada em árvores adultas de *C. estrellensis* (Fotos A e B). Indivíduos jovens da espécie *C. estrellensis* que foram amostrados para as análises genéticas (Fotos C e D). Fonte: Arquivo Pessoal.

Para conhecer a dinâmica da endogamia entre gerações, foram coletados tecidos foliares de 39 regenerantes, ou seja, indivíduos jovens que não estavam em fase reprodutiva. Todos os regenerantes amostrados foram georreferenciados (GPS) (Anexo 4) e receberam uma placa de identificação (Figuras 14C e D). Com as coordenadas geográficas obtidas através do GPS para cada árvore adulta e regenerante, foi obtido o gráfico de posição espacial dos indivíduos dentro do fragmento (Figura 15).

Na segunda etapa, um ano após a primeira coleta, foram amostradas novamente as árvores que haviam frutificado dentro da área de estudo. Estas novas coletas foram realizadas com o intuito de avaliar e comparar o padrão de cruzamento da espécie entre diferentes

eventos reprodutivos de uma população. Assim, em julho de 2008 verificou-se que a frutificação dentro do fragmento estava ocorrendo em apenas seis árvores (denominadas M2, M3, M4, M10, M12 e M15), sendo que cinco correspondiam às mesmas matrizes que haviam frutificado no ano anterior. Portanto, nesta segunda etapa de coleta, sementes de polinização natural foram obtidas destas seis famílias.

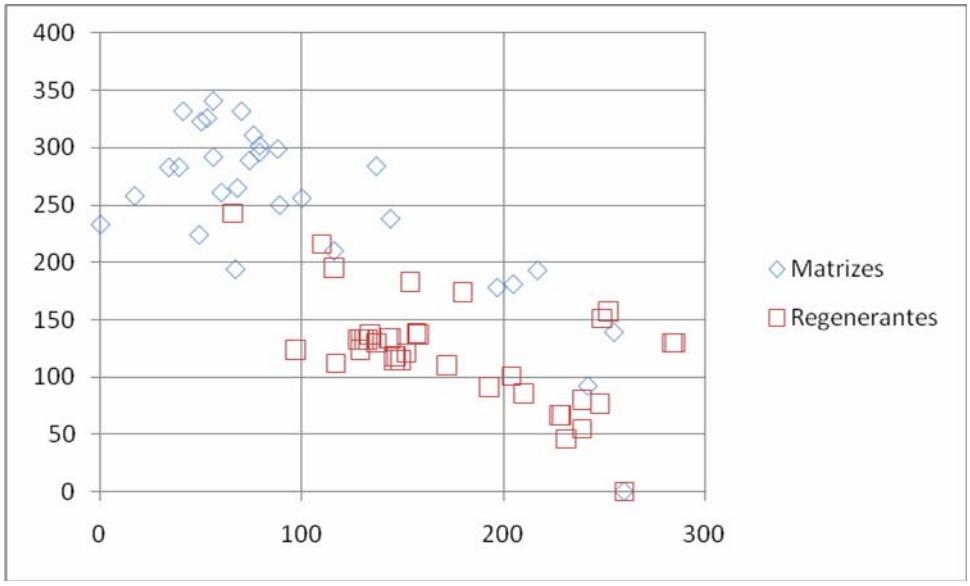

Figura 15. Posição dos indivíduos de *C. estrellensis* amostrados para esta pesquisa.

5.3.3. Obtenção de sementes e produção de mudas

Todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados para os dois anos consecutivos de coletas (2007 e 2008). Após a identificação das matrizes de jequitibá branco que haviam frutificado dentro do fragmento (8 árvores em 2007 e 6 árvores em 2008), os frutos foram colhidos diretamente de cada árvore com auxílio de técnicas de escaladas e tesoura de poda (Figuras 14A e B). Tais frutos foram preferencialmente colhidos quando os primeiros iniciaram a abertura espontânea, garantindo a obtenção de uma semente já formada, com o embrião suficientemente desenvolvido para o plantio.

Em média, de cada árvore matriz foram coletados 17 e 15 frutos aleatórios para os anos de 2007 e 2008, respectivamente. Todos os frutos foram acondicionados em sacos de papel, separados e identificados (um fruto por saco) para garantir a correspondência entre fruto, semente e genitor. A identificação das sementes por fruto permitirá determinar a correlação de paternidade entre e dentro de frutos. Após a coleta dos frutos, estes foram expostos ao sol para completar a abertura e liberação das sementes. Logo em seguida, as sementes foram plantadas no viveiro de mudas da USP/RP, sendo colocadas para germinar

em recipientes de plástico individuais (tubetes) contendo substrato e adubo, sem nenhum outro tratamento químico (Figura 16A).

Em cada tubete foram colocadas duas sementes de mesma procedência, totalizando uma média de 230 sementes plantadas por árvore matriz no ano de 2007 e 211 sementes plantadas por árvore matriz em 2008. Os tubetes foram então identificados e colocados em bandejas que comportam até 154 dos mesmos, nas quais foram colocadas placas de identificação (Figura 16B). Após o plantio, as sementes e as posteriores mudas foram irrigadas uma vez por dia no período da manhã.

Decorrido um tempo após o início da germinação, os tubetes foram analisados com o objetivo de identificar aqueles que apresentaram germinação de mais de uma semente. Neste caso, escolheu-se aleatoriamente uma das mudas para ser mantida no tubete, enquanto a outra foi removida e replantada, um procedimento denominado "repique de mudas".

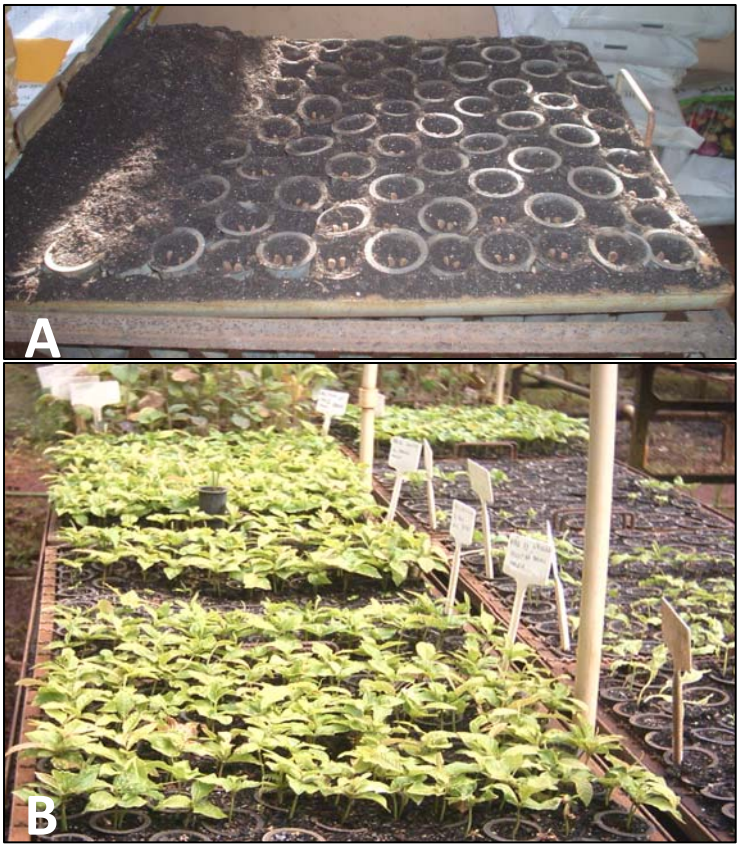

Figura 16. Bandejas com sementes de *C. estrellensis* no momento do plantio (A) e após a germinação (B). Observam-se no canto direito da figura B as placas de identificação do material. Fonte: Arquivo Pessoal.

Para ambos os anos de coletas, foi observada variação na taxa de germinação das sementes de jequitibá branco, provenientes de árvores matrizes coletadas dentro do fragmento

florestal. Do total de oito famílias plantadas no ano de 2007, apenas sete apresentaram sementes viáveis sendo que cinco destas famílias obtiveram uma taxa de germinação de sementes superior a 50 %. Nenhuma das sementes coletadas da matriz M3 germinou. Assim, para o primeiro ano de coleta (2007) foram amostradas folhas de 399 progênies procedentes de 7 famílias de polinização natural (5 famílias com 65 progênies cada; 1 família com 50 progênies e 1 família com 24 progênies).

Já para as 6 famílias plantadas em 2008, apenas três apresentaram taxa de germinação superior a 50 %. A menor taxa de germinação (8 %) foi constatada especificamente para as sementes oriundas da matriz M3 (árvore cujas sementes não germinaram em 2007). Contudo, após o período de desenvolvimento das primeiras folhas, amostras foliares foram coletadas de 245 progênies procedentes de 6 famílias de polinização natural (4 famílias com 50 progênies cada; 1 família com 32 progênies e 1 família com 13 progênies).

Assim, um total de 644 progênies procedentes de polinização natural (399 progênies produzidas em 2007 + 245 progênies produzidas em 2008) foi amostrado para a realização deste trabalho. Todas as 644 amostras foliares coletadas foram acondicionadas em papel de alumínio, identificadas e armazenadas em *freezer* a -20 °C para posterior extração do DNA.

5.3.4. Extração e quantificação de DNA

As condições da extração de DNA das amostras foliares foram efetuadas com base na metodologia de Alzate-Marin et al. (2009) e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro (Spectronic Genesys 5), como descrito anteriormente no subitem 4.3.2.

Obteve-se boa qualidade e um bom rendimento em todos os ensaios realizados. Estima-se que cerca de 280 a 328 ng/µL de DNA foram obtidos, a partir de 250-300 mg de tecido foliar das árvores de *C. estrellensis*.

5.3.5. Marcadores microssatélites e ensaios de amplificação multiplex

Dos 15 pares de *primers* microssatélites desenvolvidos para a espécie *C. estrellensis* (Guidugli et al., 2009; Anexo 1), nove marcadores que apresentaram facilidade de amplificação e leitura foram selecionados para realização do presente trabalho (Tabela 5).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler® Eppendorf, programado nas seguintes condições: 1 ciclo: 96 ^{o}C por 5 minutos, 30 ciclos: 94 ^{o}C por 30 segundos, 45-57 °C por 1 minuto, 72 ^{o}C por 1 minuto, 1 ciclo: 72 ^{o}C por 7 minutos, 22 ^{o}C indefinidamente. Para cada reação de PCR, 2,5 ng de DNA genômico foram utilizados em um volume total de 10 µL contendo 1x tampão de reação livre de $MgCl_2$ [75 mM Tris-HCl

pH 9.0; 50mM KCl; 20 mM $(NH_4)_2SO_4$], 1,5 mM $MgCl_2$, 250 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,3 µM de cada *primer* microssatélite (direto e reverso) e 1 U de *Taq* DNA polimerase. Para cada reação foi mantido um tubo contendo água MilliQ como controle negativo.

Tabela 5. Sequências dos *primers* microssatélites de *C. estrellensis* utilizados nesta pesquisa.

Loco SSR	Sequências 5´-3´	Motivos
Ces01	F:CCTTTTAATACCTTTTATTGC R:CCATCTCATCCTAATATATTTTC	$(CA)_9$
Ces02	F:GGACATGGGTTGTTATCCG R:TCTCAACCTCAAAATGTAATAGC	$(ATAC)_4(AC)_{15}$
Ces04	F:AGCATCCTTTGAATTGG R:CTTCAAAGTAAAGATATAAAAC	$(TC)_{16}$
Ces09	F:CAGAGTTTTTCAATAGCGG R:TTTCATTGCAATCATAGGC	$(TG)_2CG(TG)_9$
Ces10	F:GGGCAGACCAAATCAAGAG R:GCCATTCATAAACCATTCAAG	$(CA)_8$
Ces11	F:AAGTAATTTCATTCTCAAGTGG R:GTTCTGATATGGGCTTTCC	$(CT)_{25}$
Ces13	F:CTGAAGGGACTGAGGGG R:ATATCAGGAGGTTAAGGGC	$(CA)_{16}$
Ces14	F:CTGGTAAGCTCTTGGTTGTG R:CCATGGGTTTTCTGTTTCC	$(TG)_{13}$
Ces18	F:ATAATCATGACCTGTGCC R:GTCCCTGATCAAGTATGC	$(GT)_6$

Com a finalidade de otimizar a genotipagem dos indivíduos analisados nesta pesquisa, quatro sistemas de PCR biplex foram testados: Ces01/Ces04, Ces01/Ces10, Ces01/Ces11 e Ces09/Ces13. Esses ensaios foram feitos em um volume final de 15 µL de reação de PCR, misturando todos os reagentes (tampão, dNTP, *primers*, $MgCl_2$ e a *Taq* DNA polimerase), com exceção do DNA, em um único tubo para garantir a homogeneidade das reações. As quantidades exatas de cada reagente para cada um dos testes de PCR biplex estudados estão resumidas na Tabela 6. Todas as amplificações biplex foram realizadas a uma temperatura de anelamento de 48 °C, utilizando o termociclador Mastercycler® Eppendorf.

Tabela 6. Condições das reações de PCR biplex testadas em *C. estrellensis*.

Reagentes	**Locos**			
	Ces01/Ces04	**Ces01/Ces10**	**Ces01/Ces11**	**Ces09/Ces13**
DNA (10 ng/µL)	4,5 µL	3,75 µL	3,75 µL	3,75 µL
dNTP (2,5 mM)	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL
Tampão (10X)	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL
$MgCl_2$ (50 mM)	0,45 µL	0,45 µL	0,45 µL	0,45 µL
Primers (2,5 µM)	1,8 µL (Ces01) 2,3 µL (Ces04)	1,8 µL (Ces01) 1,8 µL (Ces10)	1,8 µL (Ces01) 1,8 µL (Ces11)	1,8 µL (Ces09) 2,3 µL (Ces13)
Taq (1U/µL)	0,38 µL	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL
Água	2,57 µL	3,9 µL	3,9 µL	3,4 µL
Volume final	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL

Dos quatro conjuntos de PCR biplex testados, dois conjuntos Ces01/Ces11 e Ces09/Ces13 foram satisfatoriamente úteis (Figura 17). Os demais sistemas biplex (Ces01/Ces04 e Ces01/Ces10) sofreram sobreposição dos produtos de amplificação, e não puderam ser utilizados para realização desta pesquisa.

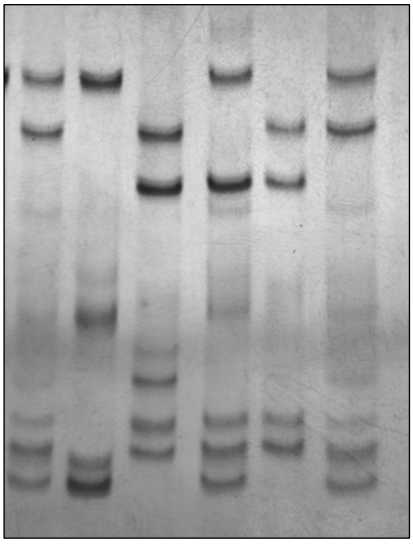

Figura 17. Gel de poliacrilamida 10 % contendo amostras de PCR biplex dos *primers* Ces01 (amostras inferiores no gel) e Ces11 (amostras superiores no gel).

5.3.6. Eletroforese, coloração e leitura dos géis

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese sob condições desnaturantes em géis de poliacrilamida 10 %. 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. Estimativas dos tamanhos dos produtos de amplificação em pares de bases foram realizadas comparando-se com um marcador de peso molecular de 10 pares de bases (Invitrogen).

5.3.7. Análises estatísticas

5.3.7.1. Análise de segregação dos locos SSR

O estudo da herança dos locos microssatélites desenvolvidos para *C. estrellensis* foi realizado com base no método descrito por Gillet e Hattemer (1989), que compara o genótipo de uma árvore materna heterozigota com a segregação de suas progênies de polinização natural. Assume-se que os locos que apresentam segregação regular de seus genes estão sob a clássica herança Mendeliana, atendendo três requerimentos básicos: *i)* apresentam uma segregação meiótica regular durante a produção dos óvulos; *ii)* apresentam uma fertilização aleatória dos óvulos para cada tipo de pólen; *iii)* que entre o evento de fertilização e o momento de genotipagem das sementes, não ocorreu seleção devido a diferenças na viabilidade. Assumindo-se também que existe uma relação de co-dominância entre todos os alelos, o método prevê que as seguintes condições sejam satisfeitas: a) Toda progênie de uma árvore materna A_iA_i deve possuir o alelo A_i da árvore mãe; b) Em caso de uma árvore mãe heterozigota (ex. A_iA_j, $i \neq j$) deve-se proceder da seguinte maneira: *i*) cada indivíduo de uma progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna, A_i ou A_j; *ii*) o número de progênies heterozigotas A_iA_j (N_{ij}) é esperado ser igual a soma das progênies homozigotas A_iA_i (N_{ii}) e A_jA_j (N_{jj}), $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$; *iii*) o número de progênies heterozigotas A_iA_k (N_{ik}) é esperado ser igual ao número de progênies heterozigotas A_jA_k (N_{jk}), $N_{ik} = N_{jk}$ ($k \neq i, j$).

Os fenótipos observados em cada progênie de árvores maternas heterozigotas, para um dado loco, foram comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1, usando um teste *G* (Sokal e Rohlf, 1981) com um grau de liberdade. A hipótese de segregação regular foi aceita ou descartada com base em um teste *G* padrão calculado para cada progênie individualmente e agrupando as progênies de árvores maternas de mesmo genótipo para o loco sob consideração.

5.3.7.2. Análise do desequilíbrio de ligação

O desequilíbrio de ligação é um procedimento estatístico que analisa a recombinação das frequências entre pares de locos para determinar se dois locos não segregam independentemente. Caso isso ocorra, significa que o número de marcadores microssatélites utilizados no trabalho não são nove como foi assumido e sim um número menor, de acordo com o número de ligações.

No presente trabalho, o teste de desequilíbrio de ligação foi realizado entre todos os pares de locos com auxílio do programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002). As probabilidades de significância do teste foram obtidas por permutação (1000) e aplicando uma correção sequencial de Bonferroni para múltiplas comparações (95 %, α = 0,05). Esses testes permitiram determinar quais locos são adequados para as análises genéticas populacionais.

5.3.7.3. Análises da diversidade genética e do índice de fixação

A diversidade genética da geração adulta, regenerantes e progênies foi caracterizada para o número total de alelos (K), número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E) e número efetivo de alelos por loco (A_e=1/(1-H_E)). A aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificada pelo teste exato de Fisher, utilizando o programa GDA versão 1.1 (Lewis & Zaykin, 2000).

A estrutura genética entre as gerações de adultos, progênies e regenerantes de *C. estrellensis* foi acessada através de dois métodos: estatística F_{ST} clássica de Nei (1977) e estatística G_{ST} de Hedrick (2005). Também foi estimado o índice de fixação (F), conforme Weir (1996). A significância estatística dos valores médios entre locos do índice F foi calculada por permutação (10.000), usando o programa FSTAT (Goudet, 2002). Além disso, calculou-se a probabilidade de exclusão do primeiro [$\Pr(Ex_1)$] e segundo parentes [$\Pr(Ex_2)$], utilizando o programa CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2007).

5.3.7.4. Análises do sistema de reprodução, coancestria e tamanho efetivo

O sistema de reprodução foi caracterizado pelos modelos misto de reprodução (Ritland & Jain, 1981) e de cruzamentos correlacionados (Ritland, 1989), utilizando o programa MLTR (Ritland, 2004). Os seguintes parâmetros foram estimados para cada um dos eventos reprodutivos analisados nesta pesquisa: a) taxa de cruzamento multiloco (t_m); b) taxa de cruzamento uniloco (t_s); c) taxa de cruzamento entre aparentados (t_m - t_s); d) correlação

multiloco de paternidade ($r_{p(m)}$); e) correlação uniloco de paternidade ($r_{p(s)}$). O erro padrão dos parâmetros foi estimado por 1000 reamostragens *bootstraps*. Estas análises foram conduzidas em nível de população (obtendo-se os valores médios das estimativas para a espécie dentro do fragmento estudado) e de árvores matrizes (calculando-se as estimativas médias de cada parâmetro por família). As unidades de reamostragens foram as famílias na análise populacional e os indivíduos dentro de famílias nas análises individuais por árvore matriz. Além disso, a estimativa da correlação de paternidade foi analisada entre progênies de diferentes frutos em uma mesma árvore e entre progênies de um mesmo fruto.

Os parâmetros do sistema de reprodução foram utilizados para estimar outros parâmetros demográficos e genéticos como: a) o número efetivo de árvores polinizadoras, $\hat{N}_{ep} = 1/\hat{r}_p$; b) a proporção média de pares de irmãos de autofecundação ($\hat{P}_{IA} = \hat{s}$), irmãos-completos ($\hat{P}_{IC} = \hat{t}_m \hat{r}_p$) e meios-irmãos [$\hat{P}_{MI} = \hat{t}_m (1 - \hat{r}_p)$] contidos nas progênies. Também foi estimado o coeficiente médio de coancestria (Θ_{xy}) entre plantas dentro de progênies e o tamanho efetivo de variância ($N_{e(v)}$). O Coeficiente de Coancestria (Θ_{xy}) é uma medida de parentesco dos indivíduos dentro das populações. Esse coeficiente pode variar de -1,0 (sem genes em comum) até 1,0 (gêmeos idênticos ou clones). No presente trabalho, o coeficiente médio de coancestria dentro de progênies foi estimado em nível de população utilizando-se a seguinte expressão:

$$\Theta_{xy} = 0{,}125\ (1+F_p)\ [4s + (t_m^2 + s t_m r_s)\ (1+r_p)] \text{ (Ritland, 1989)}$$

Para conhecer a representatividade genética das progênies foi estimado o tamanho efetivo de variância ($N_{e(v)}$) médio das progênies conforme propôs Cockerham (1969):

$$N_{e(v)} = 0{,}5\ /\ \theta_{xy}\ [\ (n-1)/\ n] + (1+F_o)/2n$$

em que n é o tamanho da amostra das progênies e F_o representa o coeficiente médio de endogamia na geração de progênies.

O número de árvores matrizes (m) necessário para a coleta de sementes foi calculado utilizando-se a expressão:

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

em que $N_{e(referência)}$ é o tamanho efetivo de referência ou que se pretende reter na amostra das sementes. No presente trabalho, adotou-se como tamanho efetivo de referência o valor de 100 (2x50; Nunney & Campbell, 1993).

O parentesco e a representatividade genética das árvores adultas e regenerantes foram avaliados pelas estimativas dos coeficientes de coancestria entre todos os pares de árvores (θ_{xy}) dentro das gerações, usando o programa Spagedi (Hardy & Vekemans, 2002). Estas estimativas foram utilizadas para calcular o coeficiente médio de coancestria dentro das gerações (Θ_{xy}) de acordo com o proposto por Lindgren & Mullin (1998):

$$\Theta_{xy} = \frac{0{,}5n(1+F_p) + \sum_{i=1}^{n} \sum_{i \neq j}^{n} \theta_{xy}}{n^2}$$

em que n representa o número de indivíduos amostrados e F_p representa o coeficiente médio de endogamia na geração parental.

O coeficiente Θ_{xy} foi usado para calcular o tamanho efetivo (N_e) das árvores adultas e regenerantes na população usando o método de Cockerham (1969): N_e=0,5/ Θ_{xy}. Finalmente, a relação entre o tamanho efetivo (N_e) e o tamanho da população (N), N_e /N foi estimada.

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Herança dos locos SSR

Os valores da soma dos testes *G* individuais da segregação esperada total 1:1 ($\sum G_{Total_1:1}$), agrupando as progênies de árvores maternas de mesmo genótipo para o loco sob consideração são apresentados na Tabela 7. Através destes testes foi possível constatar que os locos Ces09, Ces10, Ces11, Ces14 e Ces18 não apresentaram desvios de segregação para todas as famílias analisadas; o loco Ces13 apresentou desvio em apenas uma das famílias e na análise agrupada. Nos locos Ces01 e Ces02 foram observados desvios de segregação em duas famílias e em uma das análises agrupadas. Por último, no loco Ces04 foram observadas três famílias de 12 (25 %) em desacordo com as proporções de segregação 1:1.

Assim, neste trabalho o teste de segregação para locos em heterozigose nas matrizes foi realizado 69 vezes. Destes 69 casos em 61 (88,4 %) foi confirmada a segregação mendeliana esperada 1:1, o que indica que os respectivos pares de *primers* amplificam locos moleculares com herança genética mendeliana de acordo com as proporções 1:1.

Tabela 7. Testes *G* para hipótese de segregação codominante 1:1 em nove locos SSR de *C. estrellensis.*

Loco/matriz		Genótipo materno	n_{ij}	n_{ii}	n_{jj}	n_1	n_{ik}	n_{jk}	n_2	$G_{(1:1)}$ (GL=1)	$G'_{(1:1)}$ (GL=1)
Ces01											
2007	**2008**										
M1	--	148/174	20	25	0		12	1		0,56	10,97**
M2	--	148/174	11	11	4		13	6		0,62	2,64
M13	--	148/174	14	15	1		0	30		0,13	---
--	M2	148/174	11	14	0		14	10		0,36	0,67
Agrupado			56	65	5	126	39	47	86	1,56	0,75
M10	--	148/154	16	23	16		1	9		9,92**	7,36**
--	M10	148/154	18	6	16		6	2		0,40	2,09
Agrupado			34	29	32	95	7	11	18	7,78**	0,90
M12	--	172/174	5	0	0		30	28		---	0,07
--	M12	172/174	0	0	0		23	25		---	0,08
Agrupado			5	0	0	5	53	53	106	---	---
M16	--	154/174	10	10	0		25	19		---	0,82
--	M15	154/174	8	11	2		17	10		1,20	1,84
Agrupado			18	21	2	41	42	29	71	0,61	2,39
--	M3	148/156	3	6	1		0	1		1,65	---

Continuação Tabela 7.

Loco/matriz		Genótipo materno	n_{ij}	n_{ii}	n_{jj}	n_1	n_{ik}	n_{jk}	n_2	$G_{(1:1)}$ (GL=1)	$G'_{(1:1)}$ (GL=1)
Ces02											
2007	**2008**										
M1	--	199/201	3	0	0		36	22		---	3,41
M12	--	199/201	9	5	7		19	19		0,43	---
--	M12	199/201	9	6	5		8	12		0,20	0,81
Agrupado			21	11	12	44	63	53	116	0,09	0,86
M2	--	179/183	9	2	6		19	14		0,06	0,76
--	M2	179/183	6	1	9		14	19		1,01	0,76
Agrupado			15	3	15	33	33	33	66	0,27	---
M4	--	187/199	0	3	2		8	11		---	0,48
--	M4	187/199	0	3	7		11	11		---	---
Agrupado			0	6	9	15	19	22	41	---	0,22
M10	--	181/187	14	21	5		16	8		3,66	2,72
--	M10	181/187	1	15	6		17	10		22,36**	1,84
Agrupado			15	36	11	62	33	18	51	17,34**	4,48
M13	--	179/181	16	4	8		16	18		0,57	0,12
M16	--	181/201	12	8	0		23	21		0,81	0,09
--	M3	181/183	1	5	4		3	0		7,36**	---
Ces04											
2007	**2008**										
M1	--	185/213	10	13	0		20	21		0,39	0,02
M10	--	185/213	13	14	2		19	16		0,31	0,26
--	M10	185/213	1	0	0		21	27		---	0,75
Agrupado			24	27	2	53	60	64	124	0,47	0,13
M2	--	185/189	7	10	0		7	26		0,53	11,64**
--	M2	185/189	5	9	1		22	13		1,70	2,34
Agrupado			12	19	1	32	29	39	68	2,02	1,48
M4	--	181/187	6	4	5		5	4		0,60	0,11
--	M4	181/187	3	5	0		13	11		0,51	0,17
Agrupado			9	9	5	23	18	15	33	1,10	0,27
M12	--	183/205	9	17	0		13	26		2,50	4,42
--	M12	183/205	3	6	0		20	19		1,02	0,03
Agrupado			12	23	0	36	33	45	78	3,52	1,85
M13	--	183/187	1	15	13		29	7		31,5**	14,44**
M16	--	183/185	13	9	13		7	22		2,34	8,15**
--	M15	183/201	2	9	0		20	19		4,82	0,03
Ces09											
2007	**2008**										
M4	--	187/193	13	8	0		1	0		1,20	0,50
--	M4	187/193	13	16	0		0	0		0,31	---
Agrupado			26	24	0	50	1	0	1	0,08	---
--	M3	187/189	7	5	1		0	0		0,08	---
Ces10											
2007	**2008**										
M4	--	196/216	8	6	10		0	0		2,72	---
--	M3	196/216	5	3	0		2	1		0,51	0,34
--	M4	196/216	8	3	14		2	3		3,31	0,20
--	M15	196/216	27	6	14		0	0		1,05	---
Agrupado			48	18	38	104	4	4	8	0,62	---

Continuação Tabela 7.

Loco/matriz		Genótipo materno	n_{ij}	n_{ii}	n_{jj}	n_1	n_{ik}	n_{jk}	n_2	$G_{(1:1)}$ (GL=1)	$G'_{(1:1)}$ (GL=1)
Ces11											
2007	**2008**										
M1	--	228/232	4	0	6		29	24		0,40	0,47
M13	--	228/232	5	0	2		33	23		1,33	1,80
Agrupado			9	0	8	17	62	47	109	0,06	2,07
M12	--	218/228	15	11	0		13	17		0,62	0,53
M16	--	218/228	9	10	1		20	22		0,20	0,10
--	M12	218/228	10	8	0		9	19		0,22	3,65
Agrupado			34	29	1	64	42	58	100	0,25	2,57
M2	--	224/230	6	0	0		21	20		---	0,02
--	M2	224/230	8	4	1		15	19		0,70	0,47
Agrupado			14	4	1	19	36	39	75	4,44	0,12
M4	--	232/240	3	1	1		9	9		0,20	---
--	M4	232/240	6	3	0		8	7		1,02	0,07
Agrupado			9	4	1	14	17	16	33	1,16	0,03
M10	--	230/240	12	4	7		23	19		0,04	0,38
--	M10	230/240	5	6	1		12	20		0,33	2,02
Agrupado			17	10	8	35	35	39	74	0,03	0,22
--	M3	218/240	0	0	0		4	3		---	0,14
--	M15	218/224	3	6	3		20	16		3,14	0,45
Ces13											
2007	**2008**										
M1	--	154/160	29	32	1		0	3		0,26	---
M13	--	154/160	21	34	2		0	4		3,99	---
M16	--	154/160	26	26	1		0	2		0,02	---
--	M15	154/160	12	26	2		3	6		6,58**	1,02
Agrupado			88	118	6	212	3	15	18	6,14	8,73**
--	M3	152/154	2	2	5		3	1		2,94	1,05
Ces14											
2007	**2008**										
M4	--	190/196	9	9	0		3	3		---	---
M13	--	190/196	33	29	0		1	1		0,26	---
--	M4	190/196	10	13	1		0	0		0,67	---
Agrupado			52	51	1	104	4	4	8	---	---
--	M15	188/196	1	3	0		22	25		1,05	0,19
Ces18											
2007	**2008**										
M1	--	168/170	30	15	18		0	0		0,14	---
M13	--	168/170	38	17	10		0	0		1,87	---
Agrupado			68	32	28	128	0	0	0	0,50	---
M12	--	168/182	24	23	2		6	10		0,02	1,01
--	M12	168/182	14	12	4		12	5		0,13	2,97
Agrupado			38	35	6	79	18	15	33	0,11	0,27
--	M15	168/186	8	14	0		15	7		1,66	2,98

**P<0,01;

n_{ij}, n_{ii} + n_{jj} são os números observados de heterozigotos e homozigotos, respectivamente;

n_{ik}, n_{jk} são os números observados de genótipos heterozigotos do tipo *ik* e *jk*, respectivamente.

5.4.2. Desequilíbrio de ligação

No presente trabalho, a análise do desequilíbrio de ligação após correção de Bonferroni (α=0,05), não detectou indícios de desequilíbrio de ligação entre todos os possíveis pares de locos avaliados nas gerações de adultos, regenerantes e progênies (Tabela

8). Portanto, pode-se afirmar que os alelos de diferentes locos não estão associados e segregam independentemente. Certamente estes locos poderão 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 8. Teste de desequilíbrio de ligação entre os locos microssatélites de *C. estrellensis*. Os valores na tabela são as probabilidades após 1000 permutações. O valor limite de significância após correção de Bonferroni é 0,000347.

Pares de locos	Matrizes	Regenerantes	Progênies	
			2007	2008
Ces01 X Ces02	0,88819	0,13715	0,00035	0,00035
Ces01 X Ces04	0,22500	0,62708	0,00035	0,00035
Ces01 X Ces09	0,07257	0,46910	0,00035	0,00035
Ces01 X Ces10	0,13542	0,68611	0,00035	0,00035
Ces01 X Ces11	0,09340	0,00208	0,00035	0,00035
Ces01 X Ces13	0,20417	0,37500	0,00035	0,00035
Ces01 X Ces14	0,37396	0,03750	0,00521	0,00035
Ces01 X Ces18	0,01667	0,15799	0,00035	0,00035
Ces02 X Ces04	1,00000	1,00000	0,00035	0,00035
Ces02 X Ces09	0,23333	0,35347	0,01667	0,03646
Ces02 X Ces10	0,26736	0,22257	0,00035	0,00035
Ces02 X Ces11	0,08611	0,05694	0,00035	0,00035
Ces02 X Ces13	0,55799	0,60764	0,00035	0,00035
Ces02 X Ces14	0,01319	NA	0,00035	0,00035
Ces02 X Ces18	0,28125	0,32743	0,00035	0,00035
Ces04 X Ces09	0,25417	0,59896	0,00035	0,00035
Ces04 X Ces10	0,48576	0,59444	0,00035	0,00035
Ces04 X Ces11	0,20590	0,19028	0,00035	0,00035
Ces04 X Ces13	0,25104	0,80278	0,00035	0,00035
Ces04 X Ces14	0,68611	0,65660	0,00035	0,00035
Ces04 X Ces18	0,64965	0,18993	0,00035	0,00035
Ces09 X Ces10	0,07083	0,28993	0,01389	0,04792
Ces09 X Ces11	0,45243	0,57465	0,02083	0,00035
Ces09 X Ces13	0,92292	0,98681	0,00208	0,02153
Ces09 X Ces14	0,41910	0,56910	0,14931	0,55556
Ces09 X Ces18	0,65278	0,25694	0,02708	0,01215
Ces10 X Ces11	0,01042	0,95694	0,00035	0,00035
Ces10 X Ces13	0,02222	0,10556	0,00035	0,00035
Ces10 X Ces14	0,25451	0,46042	0,75729	0,08368
Ces10 X Ces18	0,14410	0,22743	0,00035	0,00035
Ces11 X Ces13	0,56007	0,70729	0,00035	0,00035
Ces11 X Ces14	0,18854	0,78403	0,37431	0,00035
Ces11 X Ces18	0,13715	0,55417	0,00035	0,00035
Ces13 X Ces14	0,64028	0,20938	0,69722	0,00035
Ces13 X Ces18	0,02431	0,66181	0,00035	0,00035
Ces14 X Ces18	0,28854	0,00035	0,03194	0,00035

5.4.3. Análises da diversidade genética e do índice de fixação na amostra total

Durante as análises o número de indivíduos variou de 652 a 703 (do total de 713). Esta diferença na amostragem é atribuída a problemas de rotina laboratorial devido à qualidade do DNA (presença de impurezas) e sua diluição, que acarretam falhas na amplificação de determinados locos. Apesar disso, o número de indivíduos utilizados para as análises pode ser considerado ótimo.

Para os nove locos microssatélites analisados em todos os 713 indivíduos de *C. estrellensis* (adultos + regenerantes + progênies), 69 alelos foram identificados. O número de alelos por loco variou de 4 (Ces13) a 15 (Ces04) com uma média de 7,66 alelos/loco (Tabela 9). O número efetivo de alelos por loco foi menor do que o número médio de alelos por loco, variando de 1,19 (Ces09) a 6,62 (Ces04) alelos, com média de 2,36 alelos/loco. Isso indica que embora existam muitos alelos nos locos, muitos têm baixa frequência. De fato, do total de 69 alelos encontrados com os nove locos microssatélites, apenas 14 e 11 alelos tiveram frequência superior a 10 % e 25 %, respectivamente. A maioria (54 %) apresentou frequência menor ou igual a 5 %.

Tabela 9. Poder de exclusão de nove locos microssatélites em árvores adultas, regenerantes e progênies de *C. estrellensis*. *N* é o número de indivíduos analisados; *K* é o número total de alelos; A_e é o número efetivo de alelos nos locos; H_O é a heterozigosidade observada; H_E é a heterozigosidade esperada; $Pr(Ex_1)$ e $Pr(Ex_2)$ são respectivamente as probabilidades de excluir o primeiro parente e o segundo parente.

Locos	***N***	***K***	A_e	H_O	H_E	$Pr(Ex_1)$	$Pr(Ex_2)$
Ces01	678	9	3,31	0,677	0,698	0,711	0,536
Ces02	674	7	5,55	0,765	0,820	0,536	0,360
Ces04	703	15	6,62	0,774	0,849	0,461	0,298
Ces09	660	5	1,19	0,162	0,160	0,987	0,918
Ces10	682	5	2,10	0,626	0,525	0,862	0,780
Ces11	661	11	6,02	0,879	0,834	0,509	0,336
Ces13	674	4	1,90	0,494	0,473	0,887	0,766
Ces14	652	5	1,30	0,239	0,233	0,973	0,881
Ces18	689	8	2,44	0,660	0,590	0,821	0,694
Média	**674,78**	**7,66**	**2,36**	**0,586**	**0,576**	**---**	**---**
Total	**---**	**69**	**---**	**---**	**---**	**0,946118**	**0,993520**

A heterozigosidade observada variou de 0,239 (Ces14) a 0,879 (Ces11), com média de 0,586. A heterozigosidade esperada sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg variou de 0,233 (Ces14) a 0,849 (Ces04), apresentando valor médio de 0,576, inferior a heterozigosidade média observada (Tabela 9). Em concordância, o índice de fixação médio para todos os locos apresentou valor negativo de -0,0185, não diferindo estatisticamente de zero.

O poder de exclusão total para identificação de um candidato a pai em uma progênie arbitrária, quando nenhum dos pais é conhecido ($Pr(Ex_1)$) foi estimado em 0,946118. Quando é conhecido o genótipo de um dos pais, a probabilidade de exclusão ($Pr(Ex_2)$) do conjunto de locos é de 0,993520 (Tabela 9). Isto indica que o poder de exclusão de tais locos é adequado para análise de parentesco, especialmente análises de paternidade.

5.4.4. Equilíbrio de Hardy-Weinberg, diversidade, estrutura genética e endogamia nas gerações

Nesta pesquisa, verificou-se que todos os nove locos SSR ajustaram-se às proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na geração de árvores adultas, enquanto seis locos (Ces01, Ces04, Ces09, Ces11, Ces13, Ces18) encontraram-se nessa situação na geração de regenerantes (Tabela 10). Para as gerações de progênies, por sua vez, ajustes das frequências genotípicas ao EHW foram constatados para cinco (Ces01, Ces02, Ces09, Ces13, Ces14) e oito (Ces01, Ces04, Ces09, Ces10, Ces11, Ces13, Ces14, Ces18) locos SSR nos anos de 2007 e 2008, respectivamente.

Tabela 10. Probabilidades obtidas com o teste exato de Fisher para verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg na população de *C. estrellensis* em quatro gerações.

Gerações		**Ces01**	**Ces02**	**Ces04**	**Ces09**	**Ces10**	**Ces11**	**Ces13**	**Ces14**	**Ces18**
Matrizes		0,7576	0,4876	0,4376	0,3074	0,8008	0,0938	0,2840	0,1816	0,7992
Regenerantes		0,2596	0,0000*	0,1828	0,9194	0,0486*	0,2716	0,4124	0,0326*	0,1836
Progênies	2007	0,3900	0,7464	0,0000*	0,2530	0,0000*	0,0012*	0,1598	0,7774	0,0000*
	2008	0,5684	0,0016*	0,9484	0,6332	0,6998	0,2752	0,6766	0,1204	0,1118

*Desvio significativo (P<0,05).

Os resultados da variação genética nas gerações de adultos, regenerantes e progênies de *C. estrellensis* estão apresentados na Tabela 11. Os adultos apresentaram um número maior de alelos (62) do que os observados nas gerações de regenerantes (55) e progênies descendentes dos anos de 2007 (56) e 2008 (51). Com relação à presença de alelos exclusivos,

foi constatado um total de nove, sendo cinco pertencentes à geração de adultos; dois à geração de regenerantes e um único alelo exclusivo às progênies descendentes de 2007 e 2008, respectivamente. A distribuição das frequências alélicas para os nove locos SSR nas quatro gerações de jequitibá branco analisadas nesse trabalho encontra-se no Anexo 5.

Tabela 11. Características de nove locos microssatélites em quatro gerações de *C. estrellensis.* Tamanho amostral (*N*); número total de alelos (*K*); riqueza alélica (*R*); número efetivo de alelos nos locos (A_e); heterozigosidade observada (H_O); heterozigosidade esperada (H_E); índice de fixação (*F*). EP (95 %): erro padrão a 95 %, calculado via reamostragem *jackknife*.

Matrizes (*N* = 30)							
Locos	***N***	***K***	***R***	A_e	H_O	H_E	***F***
Ces01	28	8	7,9	3,48	0,750	0,713	-0,0519
Ces02	28	7	6,9	5,91	0,785	0,831	0,0556
Ces04	27	12	12	6,94	0,925	0,856	-0,0824
Ces09	29	5	4,9	1,50	0,310	0,335	0,0769
Ces10	29	5	4,8	2,38	0,620	0,581	-0,0677
Ces11	28	10	9,8	6,37	0,964	0,843	-0,1462
Ces13	28	3	3	2,36	0,678	0,577	-0,1793
Ces14	28	5	4,9	1,30	0,214	0,233	0,0847
Ces18	30	7	6,7	2,46	0,633	0,594	-0,0667
Média	**--**	**6,89**	**6,76**	**3,63**	**0,653**	**0,618**	**-0,0576^{ns}**
-EP(95 %)	**--**	**6,66**	**6,53**	**3,45**	**0,632**	**0,600**	**--**
+EP(95 %)	**--**	**7,12**	**6,98**	**3,80**	**0,674**	**0,636**	**--**
Regenerantes (*N* = 39)							
Locos	***N***	***K***	***R***	A_e	H_O	H_E	***F***
Ces01	38	7	6,5	2,62	0,552	0,619	0,1094
Ces02	34	6	5,9	4,01	0,411	0,751	0,4555
Ces04	38	14	12,3	7,14	0,789	0,860	0,0834
Ces09	32	4	3,9	1,54	0,375	0,351	-0,0674
Ces10	39	4	3,6	2,32	0,717	0,569	-0,2644
Ces11	38	9	8,1	5,68	0,894	0,824	-0,0863
Ces13	35	4	3,7	1,96	0,457	0,490	0,0692
Ces14	35	2	1,9	1,05	0,057	0,056	-0,0149
Ces18	39	5	4,6	2,82	0,743	0,646	-0,1533
Média	**--**	**6,11**	**5,61**	**3,23**	**0,555**	**0,574**	**0,0333^{ns}**
-EP(95 %)	**--**	**5,81**	**5,35**	**3,06**	**0,534**	**0,553**	**--**
+EP(95 %)	**--**	**6,40**	**5,86**	**3,39**	**0,576**	**0,595**	**--**

Continuação Tabela 11.

Progênies_Ano2007 (*N* = 399)							
Locos	***N***	***K***	***R***	A_e	H_O	H_E	***F***
Ces01	378	8	6,1	3,41	0,690	0,707	0,0244
Ces02	384	7	6,3	5,55	0,815	0,820	0,0069
Ces04	396	13	9,5	5,85	0,712	0,829	0,1414
Ces09	370	3	2,7	1,16	0,145	0,138	-0.0572
Ces10	388	4	2,4	2,01	0,670	0,503	-0.3306
Ces11	379	9	6,5	5,71	0,886	0,825	-0,0737
Ces13	377	3	2,8	1,78	0,466	0,438	-0,0643
Ces14	378	5	2,8	1,21	0,179	0,175	-0,0237
Ces18	397	4	3,1	2,22	0,642	0,551	-0,1653
Média	**--**	**6,22**	**4,68**	**3,21**	**0,578**	**0,554**	**-0,0437**[ns]
-EP(95 %)	**--**	**5,94**	**4,47**	**3,04**	**0,557**	**0,532**	**--**
+EP(95 %)	**--**	**6,49**	**4,88**	**3,37**	**0,599**	**0,576**	**--**
Progênies_Ano2008 (*N* = 245)							
Locos	***N***	***K***	***R***	A_e	H_O	H_E	***F***
Ces01	234	8	5,4	3,12	0,666	0,680	0,0207
Ces02	228	6	5,9	5,37	0,732	0,814	0,1008
Ces04	242	12	9,7	6,89	0,855	0,855	-0,0001
Ces09	229	3	2,6	1,16	0,139	0,139	0,0011
Ces10	226	3	2,8	2,09	0,535	0,522	-0,0238
Ces11	216	8	6,9	5,68	0,851	0,824	-0,0336
Ces13	234	4	3,5	2,03	0,521	0,508	-0,0248
Ces14	211	3	2,9	1,53	0,379	0,349	-0,0854
Ces18	223	4	3,9	2,71	0,681	0,631	-0,0792
Média	**--**	**5,66**	**4,84**	**3,39**	**0,595**	**0,591**	**-0,0068** [ns]
-EP(95 %)	**--**	**5,40**	**4,64**	**3,22**	**0,576**	**0,571**	**--**
+EP(95 %)	**--**	**5,91**	**5,03**	**3,55**	**0,614**	**0,611**	**--**

[ns:] não significativo (de acordo com o Intervalo de Confiança a 99 %, calculado via 10.000 reamostragens *bootstraps*).

Conforme pode ser visto na Tabela 11, a riqueza alélica, no conjunto amostral, variou de 4,68 (geração de progênies descendentes em 2007) a 6,76 (geração de adultos). Em todas as gerações o número efetivo de alelos por loco (A_e) foi menor do que o número de alelos encontrado por loco (*K*) (Tabela 11), o que novamente indica a existência de alelos em baixa frequência nos locos analisados. De acordo com o intervalo de confiança a 95 % calculado via reamostragem *jackknife*, os valores médios de heterozigosidades esperada (H_E) e observada (H_O), estimados para as quatro gerações, não foram estatisticamente diferentes entre si (Tabela 11). Contudo, a heterozigosidade média observada foi significativamente maior nos

adultos do que nas demais gerações, sugerindo uma tendência de redução na diversidade genética entre as gerações.

Em relação à dinâmica da endogamia entre gerações, o índice de fixação apresentou valores variando entre locos de negativos a positivos, sugerindo em alguns casos, excesso de heterozigotos e em outros de homozigotos. Por sua vez, a média entre locos não diferiu estatisticamente de zero em todas as quatro gerações analisadas, indicando ausência de endogamia e evidenciando a alogamia da espécie (Tabela 11).

A divergência genética entre as gerações de jequitibá branco foram examinadas no presente trabalho através de duas metodologias: estatística F de Nei (F_{ST}) e de Hedrick (G_{ST}). Ambas estimativas sugeriram baixa diferenciação genética entre as gerações, embora as estimativas obtidas pelo método de Nei tenham apresentado valores inferiores aos obtidos pelo método de Hedrick (Tabela 12).

Tabela 12. Parâmetros de diferenciação genética entre as gerações de adultos, regenerantes e progênies de *C. estrellensis*. O F_{ST} é a diferenciação genética entre as gerações segundo Nei (1977); G_{ST} é a diferenciação genética entre as gerações segundo Hedrick (2005).

	Adultos, Regenerantes, Progênies_Ano2007 e Progênies_Ano2008		**Adultos e Regenerantes**		**Adultos e Progênies_Ano2007**		**Adultos e Progênies_Ano2008**	
Locos	$F_{ST\ (Nei)}$	$G_{ST\ (Hedrich)}$	$F_{ST\ (Nei)}$	$G_{ST\ (Hedrich)}$	$F_{ST\ (Nei)}$	$G_{ST\ (Hedrich)}$	$F_{ST\ (Nei)}$	$G_{ST\ (Hedrich)}$
Ces01	0,015	0,079	0,008	0,040	-0,001	-0,006	0,001	0,006
Ces02	0,014	0,130	0,005	0,044	-0,003	-0,031	0,001	0,010
Ces04	0,019	0,236	0,005	0,066	0,011	0,129	0,006	0,077
Ces09	0,017	0,028	-0,007	-0,014	0,017	0,028	0,013	0,021
Ces10	0,016	0,054	-0,001	-0,004	-0,001	-0,003	0,013	0,045
Ces11	0,013	0,139	0,005	0,055	0,008	0,088	0,011	0,121
Ces13	0,005	0,015	-0,000	0,000	0,013	0,040	0,001	0,003
Ces14	0,024	0,036	0,012	0,016	-0,002	-0,003	0,007	0,013
Ces18	0,01	0,041	0,001	0,004	0,002	0,007	0,015	0,063
Média	0,014*	0,053*	0,003*	0,012*	0,004*	0,015*	0,007*	0,028*

*: $P<0,05$.

5.4.5. Sistema de reprodução, coancestria e tamanho efetivo de variância

As estimativas das taxas de cruzamento multilocos (t_m) e unilocos (t_s) a nível populacional foram, respectivamente 0,999 e 1,015 para as árvores analisadas no ano de 2007 e 0,991 e 1,065 para os indivíduos amostrados em 2008. Todos os valores de t_m e t_s estimados não diferiram estatisticamente da unidade, indicando que *C. estrellensis* é uma espécie perfeitamente alógama (Tabela 13). Em conformidade, as estimativas das taxas de cruzamentos multilocos individuais apresentaram pequena variação entre as árvores, sendo também encontrados valores altos e não diferentes da unidade para a maioria das famílias analisadas durante os dois eventos reprodutivos (Tabela 14). As altas taxas de cruzamentos detectadas sugerem a presença de mecanismos de auto-incompatibilidade na espécie.

A comparação dos parâmetros t_m e t_s evidenciou ausência de cruzamentos entre parentes em ambos os anos de pesquisa (2007 e 2008), uma vez que a diferença entre eles ($t_m - t_s$) não foi significativamente diferente de zero (Tabela 13). Em concordância com tais resultados, não foi detectado endogamia na geração de árvores adultas (F_a = -0,0576; IC 95 % -0,1219 a 0,0177) e nas gerações de progênies descendentes em 2007 (F_o = -0,0437; IC 95 % -0,1830 a 0,0611) e 2008 (F_o = -0,0068; IC 95 % -0,0548 a 0,0455).

Conceitualmente, a correlação de paternidade $r_{p(m)}$ mede a proporção de progênies de cruzamentos que são irmãos-completos. Na Tabela 13, verifica-se que para ambos os anos de análises, as estimativas das correlações multilocos de paternidade foram relativamente baixas e estatisticamente diferentes de zero.

Com base em tais resultados, estima-se que em média 12,1 % e 14,5 % dos cruzamentos de *C. estrellensis* realizados em 2007 e 2008, respectivamente, foram gerados pelo mesmo parental materno e paterno. Já as estimativas de $r_{p(m)}$ em nível de plantas individuais (Tabela 14) foram significativamente diferentes de zero em todas as famílias, com valores variando de 0,061 a 0,255 no ano de 2007 e de 0,078 a 0,217 em 2008, o que confirma a presença de certa proporção de irmãos-completos dentro das famílias.

Tabela 13. Parâmetros do sistema de reprodução em progênies de *C. estrellensis* descendentes de dois eventos reprodutivos.

Parâmetros	**Eventos reprodutivos**	
	2007	**2008**
Número de árvores matrizes doadoras de sementes: n_m	7	6
Número total de progênies analisadas: n_p	399	245
Taxa de cruzamento multiloco: t_m	0,999 (0,084)	0,991 (0,062)
Taxa de cruzamento uniloco: t_s	1,015 (0,033)	1,065 (0,052)
Taxa de cruzamento entre parentes: t_m - t_s	-0,016 (0,085)	-0,074 (0,091)
Correlação multiloco de paternidade: $r_{p(m)}$	0,121 (0,027)	0,145 (0,026)
Correlação uniloco de paternidade: $r_{p(s)}$	0,089 (0,043)	0,070 (0,038)
Presença de parentesco entre doadores de pólen: $r_{p(s)}$- $r_{p(m)}$	-0,032 (0,035)	-0,075 (0,027)
Correlação multiloco de paternidade dentro de frutos: $r_{p(m)d}$	0,750 (0.052)	0,855 (0,067)
Correlação multiloco de paternidade entre frutos: $r_{p(m)e}$	0,098 (0,032)	0,097 (0,031)
Índice de fixação na geração de árvores adultas: F_a	-0,0576 (-0,1219 a 0,0177)[a]	-0,0576 (-0,1219 a 0,0177)[a]
Índice de fixação nas progênies: F_o	-0,0437 (-0,1830 a 0,0611)[a]	-0,0068 (-0,0548 a 0,0455)[a]
Coancestria média dentro de progênies: Θ_{xy}	0,140 (0,051 a 0,226)[a]	0,141 (0,112 a 0,214)[a]
Tamanho efetivo de variância: $N_{e(v)}$	3,42 (2,31 a 3,96)[a]	3,33 (2,27 a 3,58)[a]
Número médio de árvores polinizadoras: $1/r_{p(m)}$	8,2	6,9
Número médio de árvores polinizadoras dentro de frutos: $1/ r_{p(m)d}$	1,33	1,17
Número médio de árvores polinizadoras entre frutos: $1/ r_{p(m)e}$	10,20	10,31
Número de árvores para reter o tamanho efetivo de 100: m	29,24	30,03

( ): Desvio padrão da média, obtido por 1.000 reamostragens *bootstraps*.
[a]: Intervalo de confiança a 95 % de probabilidade, estimado para 1.000 reamostragens *bootstraps*.

Adicionalmente, a estimativa da correlação de paternidade $r_{p(m)}$ em nível populacional foi partida em dois componentes: entre progênies de um mesmo fruto [$r_{p(m)d}$] e entre progênies de diferentes frutos em uma mesma árvore [$r_{p(m)e}$]. Os cálculos mostraram que, em média, em um mesmo fruto, 75 % e 85,5 % dos cruzamentos são biparentais para as árvores amostradas em 2007 e 2008, respectivamente. Já quando são analisados frutos distintos, somente cerca de 9 % dos cruzamentos realizados em ambos os anos de pesquisa foram gerados pelo mesmo parental materno e paterno (Tabela 13).

A diferença entre as correlações de paternidade uniloco e multiloco ($r_{p(s)} - r_{p(m)}$) tem sido utilizada para quantificar a presença de parentesco entre os doadores de pólen. Para a população de *C. estrellensis* analisada, esta estimativa foi negativa para os dois eventos reprodutivos estudados (Tabela 13), indicando que o pólen dos cruzamentos foi bem diversificado.

Tabela 14. Estimativas por família dos parâmetros do sistema de reprodução durante dois eventos reprodutivos de uma população natural de *C. estrellensis*. *n* é o número de progênies analisadas por árvore matriz; t_m é a taxa de cruzamento multiloco; $r_{p(m)}$ é a correlação multiloco de paternidade; Θ_{xy} é o coeficiente de coancestria nas progênies; $N_{e(v)}$ é o tamanho efetivo de variância.

Matrizes	***n***	t_m	$r_{p(m)}$	Θ_{xy}	$N_{e(v)}$
Ano_2007					
M1	65	1,000±0,000	0,255±0,054	0,157	3,08
M2	50	0,999±0,002	0,083±0,016	0,173	2,78
M4	24	0,988±0,001	0,101±0,010	0,195	2,41
M10	65	0,973±0,019	0,131±0,027	0,147	3,28
M12	65	1,000±0,000	0,061±0,013	0,173	2,81
M13	65	0,998±0,002	0,107±0,024	0,138	3,48
M16	65	1,000±0,000	0,095±0,020	0,146	3,30
Ano_2008					
M2	50	0,980±0,026	0,078±0,016	0,178	2,71
M3	13	0,986±0,001	0,110±0,018	0,142	2,94
M4	32	0,999±0,002	0,149±0,034	0,199	2,40
M10	50	0,967±0,027	0,217±0,045	0,159	3,02
M12	50	1,000±0,000	0,150±0,036	0,187	2,59
M15	50	1,000±0,000	0,124±0,031	0,141	3,37

±desvio padrão da média.

A partir da correlação de paternidade também foi possível estimar o número médio de indivíduos polinizadores efetivos por árvore ($1/r_{p(m)}$), ou seja, a média do número provável de indivíduos que contribuíram com pólen no evento de reprodução de uma árvore materna.

Assim, no presente trabalho, as correlações de paternidade média populacional sugerem que cerca de 8 e 7 árvores efetivamente polinizaram cada uma das árvores matrizes nos anos de 2007 e 2008, respectivamente. Contudo, quando analisamos esta estimativa para frutos individualmente, evidenciamos que o conjunto de frutos de uma mesma árvore pode ter recebido pólen de aproximadamente 11 indivíduos distintos, enquanto que um único fruto pode ter sido polinizado por apenas duas árvores (Tabela 13).

Combinando a estimativa da correlação de paternidade ($r_{p(m)}$) com a estimativa de taxa de cruzamento multiloco (t_m), é possível conhecer a proporção dos diferentes tipos de parentesco dentro das progênies. Neste trabalho, constatou-se que a proporção de irmãos de autofecundação ($P_{IA} = 1 - t_m$) foi nula para ambas as gerações de progênies descendentes da população de *C. estrellensis*, sendo a maioria das progênies (87,8 % em 2007 e 84,7 % em 2008) originada por cruzamentos aleatórios e aparentadas no grau de meio-irmãos [$P_{MI} = t_m(1 - r_p)$]. Além disso, estima-se que apenas 12,2 % e 14,4 % das progênies produzidas em 2007 e 2008, respectivamente, foram oriundas de cruzamentos biparentais, sendo aparentadas no grau de irmãos-completos ($P_{IC} = r_p t_m$).

A análise do evento reprodutivo ocorrido em 2007 para a população de *C. estrellensis* evidenciou um coeficiente de coancestralidade médio estimado em nível de famílias variando entre 0,138 a 0,195 (Tabela 14), com média populacional de 0,140 (Tabela 13). No ano de 2008, por sua vez, os cruzamentos geraram um coeficiente de coancestria médio dentro de progênies variando entre árvores matrizes de 0,141 a 0,199 (Tabela 14), com média de 0,141 (Tabela 13). Estes resultados demonstram que ambas estimativas do coeficiente de coancestrialidade médio populacional estão entre os valores esperados em progênies de meios-irmãos (0,125) e irmãos-completos (0,250), indicando a ocorrência de pequenos desvios de cruzamentos aleatórios na população de *C. estrellensis*.

Em consequência disso, as estimativas do tamanho efetivo de variância ($N_{e(v)}$) dentro das progênies para os dois eventos reprodutivos foram menores do que o esperado em populações panmíticas ($N_{e(v)} = 4$), variando de 2,41 a 3,48 em 2007 e de 2,40 a 3,37 em 2008(Tabela 14), e com média populacional de 3,42 e 3,33 para os anos de 2007 e 2008, respectivamente (Tabela 13). Isso, por sua vez, resultou na necessidade de coletar sementes em pelo menos 30 árvores do fragmento florestal com intuito de reter amostras de progênies com tamanho efetivo de 100.

5.4.6. Coancestria e tamanho efetivo para as árvores adultas e regenerantes

Os coeficientes médios de coancestria (Θ_{xy}) entre todos os pares de árvores adultas e regenerantes da população foram estimados (Tabela 15). A partir destes coeficientes, estimou-se que a geração de árvores adultas tem um tamanho efetivo de 13,87. Isto significa que as 30 árvores adultas reprodutivas amostradas no fragmento florestal correspondem a apenas 14 árvores não endogâmicas e parentes entre si, resultando em uma relação entre o tamanho efetivo e o número censo de 0,46. Os 39 regenerantes, por sua vez, apresentaram um tamanho efetivo de 13,57, indicando que estes representam somente 14 plantas não parentes e endogâmicas, resultando em uma relação entre N_e /N de 0,35.

Tabela 15. Número censo (N), coeficiente médio de coancestria (Θ_{xy}) e tamanho efetivo (N_e) para indivíduos adultos e regenerantes de uma população de *Cariniana estrellensis*.

Geração	N	Θ_{xy}	N_e	N_e /N
Adultos	30	0,036033	13,87	0,46
Regenerantes	39	0,036827	13,57	0,35

5.5. DISCUSSÃO

5.5.1. Análises da herança e do desequilíbrio de ligação entre locos SSR

A análise clássica mendeliana requer progênies de cruzamentos controlados, o que para muitas espécies arbóreas pode ser problemático devido à dificuldade de se realizar tais cruzamentos e ao número de descendentes ser muitas vezes pequeno para a realização dos testes estatísticos (Gillet & Hattemer, 1989). Assim, o uso de progênies de polinização natural é uma alternativa para o estudo da segregação de marcadores genéticos no caso de espécies arbóreas de vida longa, como *Cariniana estrellensis*.

No presente estudo, através da comparação dos genótipos de árvores maternas heterozigotas com a segregação de suas progênies de polinização natural, constatou-se que apenas quatro locos microssatélites apresentaram desvios de segregação mendeliana na descendência de algumas famílias analisadas.

Segundo Gillet & Gregorius (1992), as distorções de segregação podem ser pré-zigóticas (ocorrem entre a meiose e a fusão dos gametas) ou pós-zigóticas (ocorrem entre a fertilização e o momento de acesso ao genótipo do indivíduo). De acordo com esses mesmos autores, as distorções pré-zigóticas podem ser causadas por: deriva meiótica (maior quantidade de um tipo de gameta do que de outro para um genótipo heterozigoto); viabilidade seletiva gamética (o tipo gamético presente no produto da meiose difere em sua habilidade de sobreviver para o estágio de fertilização) e sucesso diferencial (auto-incompatibilidade gamética). Já as distorções pós-zigóticas são causadas por viabilidade seletiva pós-zigótica (como a seleção contra homozigotos), que alteram o padrão de segregação gamética. Para avaliar precisamente se um desses casos está ocorrendo é necessário um estudo genético sobre taxa de germinação de sementes e estabelecimento de plântulas, para que as análises da frequência de segregação entre os tipos gaméticos considerem a possibilidade de ocorrer mortalidade entre os estágios de zigoto.

Outra possível explicação para os desvios de segregação detectados é a ocorrência de erro de amostragem, visto que o número de progênies analisadas variou muito entre as famílias (de 24 a 65 indivíduos em 2007 e de 13 a 50 indivíduos em 2008). Assim, novos testes de segregação, baseados em um número maior de descendentes por árvore materna heterozigota, são desejados a fim de reduzir as chances de se aceitar ou rejeitar as hipóteses de segregação devido a erros amostrais (pequeno número de progênies por família).

Por último, a rejeição da hipótese de codominância com base no método anteriormente apresentado pode ser causada por um alelo nulo não detectado. Desta forma, um alelo nulo entre as árvores paternas poderia estar causando um excesso de indivíduos nas progênies

fenotipicamente homozigotas para um dos alelos maternos. Contudo, pode-se afirmar que todos os nove locos microssatélites segregaram de forma perfeitamente mendeliana na maioria das famílias analisadas, indicando que estes marcadores moleculares podem ser utilizados como marcadores genéticos nas análises populacionais.

Adicionalmente, não foram constatados indícios de desequilíbrio de ligação entre os nove locos nas quatro gerações da população de *Cariniana estrellensis*. Estudos de ligação entre locos são importantes porque geralmente os locos detectados são utilizados para calcular médias entre si, de forma que locos ligados tendem a gerar vícios nas estimativas, por aumentarem o peso de um padrão observado no cálculo da média entre locos. O conhecimento da ligação entre locos também é importante em estudos do sistema de reprodução e análise de paternidade, visto que a independência de segregação dos locos é um dos pressupostos básicos para tais análises. Desta forma, todos os nove locos foram considerados adequados para as análises de diversidade, sistema de reprodução e fluxo gênico de *C. estrellensis*.

5.5.2. Análises de diversidade, estrutura genética e endogamia nas gerações

A caracterização da variabilidade genética dentro de populações remanescentes de *C. estrellensis* pode ter implicações importantes para a sobrevivência da espécie, pois a manutenção desta variabilidade é a base para conservação de espécies (Yeeh et al., 1996) e, portanto, a sua descrição é fundamental para o estabelecimento de práticas conservacionistas efetivas.

No presente estudo, os desvios significativos ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg detectados em locos supostamente neutros como os microssatélites para as gerações juvenis (regenerantes e progênies) implicam que na população de *C. estrellensis* estejam ocorrendo desvios de cruzamentos aleatórios e/ou algum fator evolutivo como deriva genética ou fluxo gênico. De fato, uma das evidências de que a população de *C. estrellensis* amostrada não está isolada reprodutivamente, é a constatação da presença de alelos exclusivos nos regenerantes e progênies, sugerindo fluxo gênico proveniente de indivíduos de outras localidades. Por outro lado, a presença de alelos exclusivos nos indivíduos adultos indicou que nem todos os alelos presentes nesta geração foram transmitidos para as gerações descendentes. Este fato sugere a ocorrência de deriva genética entre o processo de reprodução e descendência e/ou que nem todos os indivíduos aptos a deixarem descendentes estejam se reproduzindo.

De acordo com Kalinowski (2004), a presença de alelos raros e exclusivos nas populações naturais é importante para a tomada de decisões no âmbito da conservação dos recursos genéticos. Portanto, tendo observado alelos exclusivos e raros nas quatro gerações da

população de *C. estrellensis* presente no fragmento em estudo, estratégias para a conservação genética *in situ* e *ex situ* são fundamentais para conservar e garantir a manutenção da variabilidade genética dessa espécie.

Todas as gerações de *C. estrellensis* (adultos, regenerantes e progênies) apresentaram altos níveis de diversidade genética ($H_{\text{Emédia}}$) quando comparadas com outras espécies vegetais tais como *Betula maximowicziana* (Goto et al., 2004), *Simarouba amara* (Hardesty et al., 2005), *Primula vulgaris* (Geert et al., 2008). Segundo Seoane et al. (2000), altas heterozigosidades são desejáveis, considerando o grande número de recombinações genotípicas possíveis de ocorrer nas próximas gerações, capacitando as populações a melhor adaptação local e colonização de novos ambientes.

Contudo, uma das dificuldades em avaliar as consequências negativas da fragmentação sobre as populações arbóreas (como a erosão genética, por exemplo) é que em muitos casos, a redução de habitat é recente em relação ao tempo de geração de muitas espécies arbóreas, especialmente em espécies longevas que apresentam banco de sementes ou plântulas que sobrevivem por muito tempo, dificultando avaliar os efeitos da deriva genética (Templeton & Levin, 1979; Cabin, 1996; Martins et al., 2008). Alterações recentes no fluxo gênico e nas taxas de cruzamento das populações fragmentadas correm o risco de não serem detectados por um longo período (England et al., 2002).

No presente trabalho, a pequena população de *C. estrellensis* amostrada está inserida numa paisagem amplamente fragmentada há pelo menos 100 anos, sendo o tempo muito curto para que a deriva genética e a seleção provoquem diferença tão acentuada entre as gerações. No entanto, embora a heterozigosidade média esperada (H_E ou diversidade gênica) não tenha apresentado diferenças significativas entre as gerações de *C. estrellensis*, foi detectada uma redução significativa na riqueza alélica e na heterozigosidade média observada para as gerações juvenis (regenerantes e progênies) comparadas à geração de árvores adultas, apontando perda de diversidade genética entre os estádios do ciclo de vida da população de *C. estrellensis*.

Uma explicação para tais constatações é de que os indivíduos adultos representam a recombinação entre muitos genótipos de uma população muito maior do que a constituída atualmente e que foi dizimada com o processo de fragmentação. Assim, é esperado que a estrutura da variação genética na fase adulta seja, portanto, composta por sucessivas gerações sobrepostas resultantes de diferentes conjuntos gênicos e apresente diferentes histórias de estabelecimento sendo influenciadas por diferentes processos aleatórios.

A geração analisada como regenerantes, por sua vez, são plântulas resultantes da germinação das sementes existentes nas amostras da superfície do solo. Deve-se considerar

que estas foram submetidas a um processo forte de seleção tendo sido excluídos parte dos indivíduos endogâmicos ou menos vigorosos. Diante dessas considerações, o estabelecimento e permanência de indivíduos regenerantes dentro da população de *C. estrellensis* podem ser considerados um fator chave na reposição da diversidade genética para a espécie.

No entanto, salienta-se que dentro do fragmento em estudo, a pequena população de *C. estrellensis* mostrou uma estrutura demográfica senescente, com uma alta proporção de indivíduos adultos, portanto oriundos de antigas gerações, e ausência de indivíduos regenerantes com altura superior a 2 m, possivelmente em decorrência da presença de distúrbios que afetassem o seu estabelecimento e/ou sua permanência dentro da área. Esse fato aliado à constatação da redução de diversidade genética entre os estádios do ciclo de vida analisados sugerem que a fragmentação de habitat, mesmo recente (< 200 anos), esteja afetando negativamente a espécie *C. estrellensis*, podendo comprometer a sobrevivência desta pequena população em longo prazo. Desta forma, faz-se necessária a tomada de providências no sentido de aumentar o fluxo gênico aliado às medidas de manejo que promovam condições favoráveis ao estabelecimento e permanência de novas gerações de plântulas no habitat em questão.

Quanto às estimativas do índice de fixação, os valores médios observados não diferiram estatisticamente de zero em todas as gerações de *C. estrellensis*, indicando ausência de endogamia. Essas evidências contrapõem-se a hipótese de que os níveis de endogamia medidos na pequena população remanescente de *C. estrellensis* fossem maiores na fase de plântulas, seguido pelos regenerantes e finalmente menor, nulo ou até negativo na fase adulta, devido à presença de depressão por endogamia. Contudo, esses resultados foram consistentes com os encontrados por Pakkad et al. (2008) que também investigaram padrões de cruzamentos e diversidade genética em uma pequena população da espécie arbórea *Quercus semiserrata* durante dois eventos reprodutivos diferentes e, tal como no presente trabalho, não detectaram indícios de endogamia nas gerações de adultos e progênies.

Lowe et al. (2005) revisaram estudos de várias espécies arbóreas neotropicais e para a maioria não encontraram efeito sobre a diversidade após fragmentação, mas observaram que endogamia na geração de progênies, processo reprodutivo e aptidão foram impactados. No presente estudo, acredita-se que este padrão seria esperado se a geração parental fosse derivada de grandes populações onde os cruzamentos fossem limitados e, portanto, as gerações atuais de progênies seriam derivadas de um número limitado de árvores parentais. Adicionalmente, esta ausência de endogamia detectada em todas as gerações pode ser decorrente da probabilidade da espécie ser auto-incompatível, como será discutido posteriormente.

Com relação à estruturação genética entre as gerações de jequitibá branco, vale salientar que, os valores estimados pela metodologia de Nei foram inferiores aos obtidos pela estatística de Hedrick. Isso porque o primeiro método (F_{ST} de Nei) é indicado apenas para genes com alelos com alta frequência. Como, no presente trabalho, o marcador utilizado (microssatélite) produz um grande número de alelos, muito deles em baixa frequência, tal estimativa pode apresentar valores não representativos da realidade (Hedrick, 2005). Além disso, a estatística de Nei mede a variação entre os grupos em relação à variação total da população, mas sem especificar a identidade dos alelos envolvidos. Em contraste, a estatística de Hedrick (2005) mede a diferenciação entre as populações levando em consideração a frequência e o tipo de alelo. Portanto, a medida de Hedrick (2005) pode ser considerada mais específica para microssatélites e será considerada como a estimativa mais plausível para a divergência genética entre as gerações estudadas.

Sendo assim, os resultados apontaram pequenas alterações na estrutura genética entre as gerações, apresentando uma tendência em aumentar essa diferenciação quando analisamos a diferenciação entre as gerações de adultos e progênies.

Segundo Seoane et al. (2005), essas alterações podem ser causadas por seleção natural, deriva genética e migração. Contudo, descarta-se a seleção, considerando-se que essas diferenças foram observadas a partir de um marcador considerado neutro, microssatélite. Provavelmente, as divergências genéticas observadas entre as gerações devem ter surgido devido à ocorrência de deriva genética no processo de reprodução, combinado com o provável fluxo gênico oriundo de outras populações localizadas em fragmentos florestais vizinhos. Por último, a pequena diferenciação genética entre as gerações de jequitibá branco avaliadas nesse estudo é consistente com as altas taxas de cruzamento que as espécies arbóreas tropicais costumam apresentar (Bawa et al., 1985; Murawski et al., 1994; Hall et al., 1996; Dick et al., 2008) e é coerente com a biologia reprodutiva da espécie, como será visto na seção seguinte deste trabalho.

De uma forma geral, os altos valores de heterozigosidades, a aderência das frequências genotípicas ao EHW na geração adulta e as evidências de ausência de endogamia nas gerações mostraram a habilidade da espécie de manter diversidade genética em condição antropizada, indicando a pequena população de *C. estrellensis* com potencial para a conservação *in situ* e *ex situ*.

5.5.3. Sistema de reprodução, coancestria e tamanho efetivo de variância

As taxas de cruzamentos estimadas para *Cariniana estrellensis* foram altas e similares entre os diferentes eventos reprodutivos, apresentando valores estatisticamente não diferentes de um. Não existem relatos de estimativas da taxa de cruzamento em *C. estrellensis*, no entanto, as altas taxas de cruzamentos detectadas nesta pesquisa apontam fortes indícios da presença de mecanismos de auto-incompatibilidade na espécie. Segundo Rodrigues et al. (2009), a existência de tais mecanismos é comum para a maioria das espécies arbóreas tropicais e justifica-se pelo fato de que populações com maior variabilidade genética apresentam maior capacidade de adaptação frente a mudanças ambientais, favorecendo a perpetuação de seus descendentes em longo prazo.

As taxas de cruzamentos multilocos estimadas para *C. estrellensis* são comparáveis às encontradas em outras espécies arbóreas tropicais perfeitamente alógamas tais como: *Quararibea asterolepis* (t_m=1,008; Muraswski et al., 1990), *Theobroma grandiflorum* (t_m=1,0; Alves et al., 2003), *Hymenaea courbaril* (t_m=1,002; Lacerda et al., 2008, t_m=0,978; Feres et al., 2009). Já em *Cariniana legalis* (Sebbenn et al., 2000) e *Eschweilera ovata* (Gusson et al., 2006), espécies da mesma família de *C. estrellensis* (Lecythidaceae), as estimativas das taxas de cruzamentos indicaram reprodução por sistema misto, com predomínio de alogamia e a provável inexistência de mecanismos de auto-incompatibilidade em ambas as espécies.

Segundo Murawski & Hamrick (1991), a taxa de cruzamento em plantas hermafroditas, como o jequitibá-branco, depende de fatores tais como: presença e intensidade de mecanismos de auto-incompatibilidade; grau de protogenia e protandria; comportamento forrageiro dos polinizadores entre e dentro de árvores, o qual é influenciado pela densidade de florescimento das árvores na população e; aborto seletivo de frutos e sementes de autofecundação. Ainda, de acordo com Bawa et al. (1985), a maioria das espécies tropicais hermafroditas apresentam fortes barreiras para autofecundação.

É possível que a própria estrutura floral da espécie esteja prevenindo a autofecundação em *C. estrellensis*. Segundo Mori (2001), representantes das Lecythidaceae com flores bilaterais, como é o caso de *C. estrellensis*, costumam possuir estigmas (região feminina receptiva) orientados de forma a forçar o polinizador a depositar o pólen na área receptiva, ao entrar na flor – e nunca ao sair. Desta forma, o pólen jamais é depositado no estigma da mesma flor na qual foi coletado. Por outro lado, Sebbenn et al. (2000) ressaltam que os mecanismos para evitar autofecundação podem não ocorrer obrigatoriamente em todos os indivíduos de uma população e durante todo o período de florescimento, podendo ter origem genética e ocorrer em apenas fases específicas do florescimento. Portanto, para confirmação e

identificação de como se processaria esse controle genético da auto-incompatibilidade em *C. estrellensis*, futuros estudos específicos são requeridos.

Em adição, estimativas de endogamia biparental (t_m–t_s) indicaram ausência de cruzamentos entre indivíduos parentes durante os dois anos, sugerindo que o sistema de reprodução destas árvores seja resiliente às reduções do tamanho populacional. A não ocorrência de cruzamentos entre parentes na população de *C. estrellensis* pode ser explicada pela ausência de estrutura genética espacial na geração parental e pela longa distância de dispersão de pólen, como será discutido no próximo capítulo. Além disso, estes resultados são suportados pelas estimativas não significativas do índice de fixação nas gerações de *C. estrellensis* analisadas.

É importante ressaltar que uma alta taxa de cruzamento para a população não implica necessariamente que as taxas de cruzamentos foram idênticas entre todos os indivíduos dentro da população ou que o acasalamento foi inteiramente casualizado, com relação a outras árvores. Nesse estudo, algumas árvores de cada evento reprodutivo exibiram taxas de cruzamentos individuais estatisticamente menores do que a unidade, e uma pequena e similar proporção de cruzamentos correlacionados ou biparentais ($r_{p(m)}$) entre os dois anos foi observada, sugerindo que parte das progênies seja aparentada no grau de irmãos-completos. Também se constatou que existe uma maior probabilidade de sementes compartilharem os mesmos parentais dentro de um mesmo fruto do que entre frutos de uma mesma árvore.

De acordo com Sun & Ritland (1998), as causas de cruzamentos biparentais podem ser atribuídas ao comportamento dos polinizadores, visitando de forma sistemática árvores próximas e pequeno número de vizinhos próximos, e ao assincronismo no florescimento das árvores. A variação no grau de sincronia entre os indivíduos dentro da população irá alterar a distância efetiva entre as árvores floridas, podendo limitar o número real de acasalamentos entre os indivíduos (Hall et al., 1996). Além disso, variações ambientais podem também afetar o comportamento e, ou, a densidade das populações de animais polinizadores, levando às alterações na taxa de cruzamento das espécies em diferentes populações e épocas (Murawski, 1995).

Contudo, pode-se considerar que os cruzamentos correlacionados na população de *C. estrellensis* ocorreram com frequência moderada em relação às taxas de $r_{p(m)}$ que foram reportadas para *Cariniana legalis* (Sebbenn et al., 2000) e *Eschweilera ovata* (Gusson et al., 2006), outras duas espécies arbóreas tropicais pertencentes à família das Lecythidaceae. Em muitas outras famílias de espécies arbóreas tropicais, estimativas de correlação de paternidade superiores às do presente estudo foram também observadas (*Theobroma grandiflorum*, Alves et al., 2003; *Caesalpinia echinata*, Neto et al., 2005; *Hymenaea courbaril,* Lacerda et al.,

2008; *Tabebuia roseo-alba*, Feres, 2009). Em populações de *Symphonia globulifera* (Clusiaceae), por exemplo, as estimativas das correlações de paternidade medidas em dois anos consecutivos variaram de $r_{p(m)\ (2002)} = 0{,}414$ a $r_{p(m)\ (2003)} = 0{,}386$ (Carneiro et al., 2007).

Nossas estimativas de taxas de cruzamentos indicam que há substancial movimento de pólen entre as árvores de *C. estrellensis*. Tais estimativas de taxas de cruzamentos, acompanhadas pelos valores moderados das estimativas de correlação de paternidade, fortemente sugerem que o número de doadores efetivos de pólen envolvidos na produção de sementes de *C. estrellensis* seja alto. Tais constatações poderiam ser explicadas com base no comportamento dos seus polinizadores. Embora no presente estudo, a polinização de *C. estrellensis* não tenha sido investigada, outros autores têm relatado as abelhas como os principais agentes polinizadores desse gênero (Prance & Mori, 1979), as quais apresentam a habilidade para dispersar pólen amplamente em florestas tropicais.

Diante dessas considerações, levanta-se a hipótese de que a baixa densidade de árvores adultas reprodutivas no habitat fragmentado possa ter contribuído para que os vetores de polinização de *C. estrellensis* visitassem um maior número de plantas em busca do recurso procurado, garantindo desta forma, a manutenção das altas taxas de cruzamentos e moderadas correlações de paternidade na população de *C. estrellensis* durante os dois anos. No entanto, estudos adicionais a respeito da abundância e comportamento dos vetores de polinização para *C. estrellensis* dentro da área de estudo também são requeridos para melhor compreensão das interações que existem entre planta e polinizador nesse habitat fragmentado.

Segundo Irwin et al. (2003), o tamanho efetivo do conjunto de doadores de pólen por geração é de interesse, uma vez que a variação anual da composição do pólen recebido por um indivíduo é susceptível em aumentar a variabilidade genética entre as progênies. Isso pode ter efeitos a longo prazo sobre a capacidade das populações em manter tamanhos populacionais efetivos capazes de resistir à estocasticidade demográfica e genética (Schemske et al., 1994).

O número médio de árvores efetivamente polinizadoras para *C. estrellensis* foram comparáveis aos obtidos em *Caryocar brasiliense* (Colevatti et al., 2001) e superiores aos valores encontrados em outras espécies florestais predominantemente alógamas como *Caesalpinia echinata* (Neto et al., 2005), *Eschweilera ovata* (Gusson et al., 2006), *Manilkara huberi* (Azevedo et al., 2007), *Hymenaea courbaril* (Lacerda et al. 2008) e *Copaifera langsdorffii* (Manoel, 2011).

Durante muito tempo acreditou-se que a polinização em populações naturais fosse gerada pela contribuição de grande número de árvores polinizadoras e que os cruzamentos eram predominantemente aleatórios, o que resultaria em progênies de meio-irmãos. Os resultados obtidos no presente estudo discordam dessa hipótese, mostrando que parte das

progênies em *C. estrellensis* são irmãos-completos e, portanto, assumir progênies exclusivamente de meios-irmãos para essa população poderá incorporar grandes erros nas estimativas de parâmetros genéticos. As correlações de paternidade estimadas implicam no aumento da coancestria nas progênies e na necessidade de se obter maiores tamanhos amostrais para a conservação *ex situ* do que seriam necessários, caso a população fosse perfeitamente panmítica.

Assim, os valores estimados para os coeficientes de coancestria dentro de progênies indicaram a presença de mistura de parentescos, apresentando implicações importantes para determinação do tamanho efetivo de variância ($N_{e(v)}$), o qual mede a representatividade genética de progênies em relação à população de referência ou parental. O tamanho efetivo de variância de uma população idealizada (tamanho infinito, cruzamentos aleatórios, ausência de seleção, mutação e migração) corresponde a quatro ($N_{e(v)}$= 4). Nas amostras estudadas, os tamanhos efetivos alcançados ($N_{e(v)2007}$= 3,42 e $N_{e(v)2008}$= 3,33) foram cerca de 14,5 % em 2007 e 16,8 % em 2008 inferiores ao esperado em progênies da população idealizada.

Em termos práticos, esta estimativa é uma medida de grande valor para a determinação de tamanhos amostrais em programas de melhoramento, conservação genética e para a coleta de sementes visando a recuperação ambiental, bem como para o monitoramento da variabilidade genética em populações sob manipulação. Por exemplo, se o objetivo for coletar sementes para restauração ecológica com a intenção de reter um tamanho efetivo de 100 em uma população, é necessário coletar sementes de pelo menos 30 árvores de jequitibá branco da população remanescente estudada. Além disso, as correlações de paternidade estimadas dentro e entre frutos de uma mesma árvore matriz indicam que para a atividade de coleta de sementes, o ideal é que se procure coletar vários frutos por árvore matriz e de preferência um número aproximadamente igual e pequeno de sementes de cada fruto. Esta estratégia aumentaria a variabilidade genética no conjunto das sementes, garantindo a adaptabilidade e manutenção em longo prazo da população a ser implantada.

Entretanto, na prática, sabemos que seria inviável amostrar sementes de todos os 30 indivíduos adultos de *C. estrellensis* para reter o tamanho efetivo de 100, visto que durante os dois anos consecutivos de coletas de frutos para esta pesquisa (2007 e 2008), poucas árvores (média de 7) frutificaram dentro da área de estudo. Sendo assim, o tamanho efetivo real amostrado nesta pesquisa foi muito menor, evidenciando a dificuldade da coleta de sementes e manutenção da diversidade genética em programas de restauração de áreas degradadas, reflorestamentos e coleções *ex situ.*

O coeficiente médio de coancestria entre todos os pares de árvores adultas da população ($\Theta_{xy'}$), por sua vez, foi estimado em 0,036033. Este valor corresponde à endogamia

que poderia ser esperada nas gerações descendentes pelo cruzamento aleatório entre todas as árvores reprodutivas da população. Portanto, por cruzamentos aleatórios seria esperado certo nível de endogamia tanto nas progênies quanto na regeneração presente dentro do fragmento, o que não foi observado com os índices de fixação estimados, ou seja, não há endogamia em todas as gerações descendentes desta população. Isto reforçou as expectativas de mecanismos de auto-incompatibilidade para espécie e de fluxo de pólen externo à população como será descrito posteriormente.

Em suma, o conjunto de dados obtidos neste trabalho revelou que sementes procedentes das árvores adultas de *C. estrellensis* remanescentes no fragmento em estudo podem ser utilizadas em programas de recuperação ambiental, dada a possibilidade de originar populações com alto potencial evolutivo. Para fins de conservação *in situ*, a população estudada também se mostrou útil considerando a heterozigosidade observada e a ausência endogamia nos adultos.

Por último, não observamos indícios de que a fragmentação florestal esteja afetando o sistema de reprodução da espécie, visto que não foram detectadas grandes diferenças nos parâmetros do sistema reprodutivo entre os dois anos. No entanto, devem ser realizados outros estudos que comparem o sistema de reprodução do jequitibá branco em outras diferentes condições de fragmentação florestal, para assim ter um melhor entendimento dos seus efeitos sobre o sistema reprodutivo desta espécie.

5.6. CONCLUSÕES

1. Os nove locos microssatélites avaliados possuem uma herança codominante com razão 1:1 e não estão associados, segregando independentemente;

2. Todas as gerações de *C. estrellensis* (adultos, regenerantes e progênies) apresentam altos níveis de diversidade genética e ausência de endogamia;

3. Os resultados do estudo do sistema de reprodução em *C. estrellensis* mostraram que a espécie se reproduz exclusivamente por alogamia e, aparentemente, é auto-incompatível;

4. Os cruzamentos dentro da população de *C. estrellensis* não ocorreram totalmente de forma aleatória, sendo parte atribuída a cruzamentos biparentais;

5. Embora grande parte das progênies seja aparentada no grau de meios-irmãos, existe mistura de parentesco entre plantas de diferentes famílias (meios-irmãos e irmãos-completos) o que reduz o tamanho efetivo do conjunto de progênies;

6. Ainda, observou-se que sementes de jequitibá branco, procedentes de indivíduos adultos remanescentes no fragmento em estudo, podem ser utilizadas em reflorestamentos, desde que sejam coletadas de um número grande de árvores e de preferência de frutos distintos.

5.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. M.; ARTERO, A. S.; SEBBENN, A. M.; FIGUEIRA, A. Mating system in natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Shumm., by microsatellite markers **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 373-379, 2003.

ALLARD, R. W.; **Principles of plant breeding**. 2ªed. John Wiley, New York, 1999. 254p.

ALZATE-MARIN, A. L.; GUIDUGLI, M. C.; SORIANI, H. H.; MARTINEZ, C. A. H.; MESTRINER, M. A. A DNA minipreparation procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1217-1224, 2009.

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

BAWA, K. S.; PERRY, D.R.; BEACH, J. H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. **American Journal of Botany**, v. 72, p. 331-345, 1985.

CABIN, R. J. Genetic comparisons of seed bank and seedling populations of a perennial desert mustard, *Lesquerella fendleri*. **Evolution**, v. 50, p. 1830-1841, 1996.

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

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**, v. 39, p. 628-636, 2007.

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

COLLEVATTI, R.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, v. 86, p. 60-67, 2001.

DICK, C. W.; HARDY, O. J.; JONES, F. A.; PETIT, R. J. Spatial Scales of Pollen and Seed-Mediated Gene Flow in Tropical Rain Forest Trees. **Tropical Plant Biology**, v. 1, p. 20-33, 2008.

ENGLAND, P. R.; USHER, A.V.; WHELAN, R. J.; AYRE, D.J. Microsatellite diversity and genetic structure of fragmented populations of the rare, fire-dependent shrub *Grevillea macleayana*. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 967-977, 2002.

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

FERES, J. M.; GUIDUGLI, M. C.; MESTRINER, M. A.; SEBBENN, A. M.; CIAMPI, A. Y.; ALZARE-MARIN, A. L. Microsatellite diversity and effective population size in a germplasm bank of *Hymenaea courbaril* var. stilbocarpa (Leguminosae), an endangered tropical tree: recommendations for conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 56, p. 797-807, 2009.

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

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

GEERT, A. V.; ROSSUM, F. V.; TRIEST, L. Genetic diversity in adult and seedling populations of *Primula vulgares* in a fragmented agricultural landscape. **Conservation Genetics**, v. 9, p. 845-853, 2008.

GILLET, E.; GREGORIUS, H. R. What can be inferred from open-pollination progenies about the source of observed segregation distortion? A case study in *Castanea sativa* Mill. **Silvae Genetica**, v. 41, p. 82-87, 1992.

GILLET, E.; HATTEMER, H. H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, v. 63, p, 135-141, 1989.

GOTO, S.; TSUDA, Y.; NAGAFUJI, K.; UCHIYAMA, K.; TAKAHASHI, Y.; TANGE, T.; IDE, Y. Genetic make-up and diversity of regenerated *Betula maximowicziana* Regel. sapling populations in scarified patches as revealed by microsatellite analysis. **Forest Ecology and Management**, v. 203, p. 273–282, 2004.

GOUDET, J. (2002) FSTAT version 2.9.3 Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Disponível em: http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm. Acesso: 06 de Abril de 2011.

GUIDUGLI, M. C.; CAMPOS T.; SOUSA A. C. B.; FERES J. M.; SEBBENN A. M.; MESTRINER M. A.; CONTEL E. P. B.; ALZATE-MARIN A. L. Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. **Conservation Genetics**, v. 10, p. 1001-1004, 2009.

GUSSON, E.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em populações de *Eschweilera ovata* (Cambess) Miers. **Revista árvore**, v. 30, p. 491-503, 2006.

HALL, P.; WALKER, S.; BAWA, K. Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Pithecellobium elegans*. **Conservation Biology**, v. 10, p. 757–768, 1996.

HARDESTY, B. D.; DICK, C. W.; KREMER, A.; HUBBELL, S.; BERMINGHAM E. Spatial genetic structure of *Simarouba amara* Aubl. (Simaroubaceae), a dioecious, animal-dispersed Neotropical tree, on Barro Colorado Island, Panama. **Heredity**, v. 95, p. 290–297, 2005.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDi 1. 2: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 618-620, 2002. Disponível em: http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/software.html

HEDRICK, P. W. A Standardized Genetic Differentiation Measure. **Evolution**, v. 59, p. 1633–1638, 2005.

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

KALINOWSKI, S. T. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. **Conservation Genetics**, v. 5, p. 539 - 543, 2004.

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**, v. 16, p. 1099–1106, 2007.

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

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. GDA - Genetic Data Analysis: version 1.1 for Windows 95/NT. http://www.lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/. 2002.

LINDGREN, D.; MULLIN, T. J. Relatedness and status number in seed orchard crops. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 28, p. 276-283, 1998.

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

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

MANOEL, R. O. **Distância e padrões de dispersão contemporânea de pólen e sistema de reprodução em pequeno fragmento isolado de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinoideae).** 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2011.

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

MORI, S. A. A Família da Castanha do Pará: Símbolo do Rio Negro. In: OLIVEIRA, A. A.; DALY, D. (Ed.) **Florestas do Rio Negro**. Companhia das Letras, Universidade Paulista e The New York Botanical Garden, 2001. p. 119-141.

MURAWSKI, D. A. Reproductive biology and genetics of tropical trees from a canopy perspective. In: Lowman, M. D.; Nadkarmi, N. M. (Ed.) **Forest Canopies**. Academic Press, New York, pp 457-493, 1995.

MURAWSKI, D. A.; DAYANANDAN, B.; BAWA, K . S. Outcrossing Rates of Two Endemic Shorea Species from Sri Lankan Tropical Rain Forests. **Biotropica**, v. 26, p. 23-29, 1994.

MURAWSKI, D. A; HAMRICK, J. L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, v. 67, p. 167-174, 1991.

MURAWSKI, D. A.; MURAWSKI, J. L.; HUBBEL, S. P.; FOSTER, R. B. Mating system of two Bombacaceous trees of a neotropical moist forest. **Oecologia**, v. 82, p. 501-506, 1990.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, v. 41, p. 225-233, 1977.

NETO, J. D. G.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em *Caesalpinia echinata* Lam. implantada em arboreto experimental. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p.409-418, 2005.

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

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

PINTO, S. I. C.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffi* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia Forestalis**, v. 1, p. 40-48, 2004.

PRANCE, G. T.; MORI, S. A. Lecythidaceae-Part 1. **Flora Neotropica Monograph**, v. 21, p. 1-272, 1979.

RAJORA, O. M.; MOSSELER, A. Challenges and opportunities for conservation of forest genetic resources. **Euphytica**, v. 118, p. 197–212, 2001.

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

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

RITLAND, K. Multilocus mating system program MLTR: Version 2.4. British Columbia: University of British Columbia, 2004. Disponível em http://genetics.forestry. ubc.ca/ritland/programs.

RODRIGUES, R. R.; BRANCALION, P. H. S.; ISERNHAGEN, I. **Pacto pela restauração da mata atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal**. São Paulo: LERF/ESALQ: Instituto BioAtlântica, 2009. 256 p.

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

SCHEMSKE, D. W.; HUSBAND, B. C.; RUCKELHAUS, M. H.; GOODWILLE, C.; PARKER, I. M.; BISHOP, J. G. Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. **Ecology** 75: 584–606, 1994.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; ZANATTO, A. C. S. Sistema de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze.: implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis,** v. 58, p. 25-40, 2000.

SEBBENN, A. M. Tamanho amostral para conservação *ex situ* de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Revista do Instituto Florestal**, v. 15, p. 147-162, 2003.

SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA P. Y.; RIBEIRO, A.; MATIAS, R.; REIS, M. S.; BAWA, K.; SEBBENN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. **Revista do Instituto Florestal**, v. 17, p. 25-43, 2005.

SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia. Florestalis**, v. 57, p. 123 - 139, 2000.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research.** London: Copyright Ltd, 1981. 859 p.

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

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

SUN, M.; RITLAND, K. Mating system of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*), a successful colonizer in North America. **Heredity**, v. 80, p. 225-232, 1998.

TEMPLETON, A. R.; LEVIN, D. A. Evolutionary consequences of seedbanks. **American Naturalist**, v. 114, p. 232-249, 1979.

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

WEIR, B. S. **Genetics data analysis II – Methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers. 1996.

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Thearaceae) in Korea based on allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 37, p. 141-146, 1996.

6. CAPÍTULO III

ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL E DOS PADRÕES DE DISPERSÃO DE PÓLEN E SEMENTES DE *Cariniana estrellensis* EM PEQUENO FRAGMENTO FLORESTAL

6.1. RESUMO

No presente estudo foram investigados a estrutura genética espacial e os padrões de dispersão de pólen e sementes de uma população da espécie arbórea tropical *Cariniana estrellensis* localizada em um pequeno fragmento florestal (8 ha) no município de Cravinhos, nordeste do estado de São Paulo. Todas as 30 árvores adultas e os 39 indivíduos regenerantes encontrados dentro do fragmento foram mapeados e tiveram amostras foliares coletadas para as análises genéticas com nove locos microssatélites. Além disso, foram estudadas 644 progênies de polinização natural oriundas de sementes coletadas aleatoriamente de 7 árvores matrizes em 2007 e de 6 matrizes em 2008. A partir dos genótipos de plantas adultas e regenerantes, constatou-se ausência de correlação entre a posição geográfica e a distância genética dos indivíduos de *C. estrellensis* dentro do fragmento em estudo. Análises de paternidade em progênies de *C. estrellensis* revelaram distâncias médias curtas de fluxo de pólen efetivo dentro do fragmento em ambos os eventos reprodutivos (69,95±60 m em 2007; 112,02±94 m em 2008). Em comparação, a distância de dispersão de pólen medida nos regenerantes apresentou valor médio mais elevado (146,94±98 m) e foi superior a estimativa da distância média de dispersão de sementes (119,64±78,2) dentro da área. Além disso, os resultados das análises de parentesco nos regenerantes apontaram ausência de imigração de sementes na população e indicaram que a taxa de imigração de pólen realizado (variando entre 53 % e 62 %) foi maior que as taxas de imigração de pólen efetivo (variando entre 23,5 % e 37 %) para os dois eventos reprodutivos estudados. Em suma, nossos resultados indicaram que a dispersão do pólen em *C. estrellensis* tende a atingir longas distâncias através da paisagem fragmentada, sugerindo que as árvores desta espécie não estão isoladas reprodutivamente dentro da área de estudo.

6.2. INTRODUÇÃO

Desmatamento, incluindo fragmentação de habitats florestados, é um problema mundial que as florestas tropicais e temperadas vêm sofrendo, colocando em risco a conservação e manutenção das espécies, como também dos ecossistemas existentes. O isolamento espacial de populações em pequenos fragmentos reduz o número de indivíduos e a densidade populacional, afetando o movimento de sementes e dispersão de pólen e, portanto, o fluxo gênico entre populações (Hamilton, 1999). Este, por sua vez, pode afetar processos evolucionários tais como seleção natural e deriva genética aleatória e, consequentemente, propiciar efeitos na estrutura genética espacial das populações (Pakkad et al., 2008).

Prejuízos da fragmentação de contínuos florestais intensificam-se quando o isolamento físico entre as populações remanescentes também se reflete no isolamento genético devido à ruptura do fluxo gênico entre elas. Estas consequências levam ao aumento da diferenciação entre populações e a erosão da variabilidade genética dentro das populações. Em longo prazo, a redução da diversidade genética pode limitar o potencial evolutivo da espécie para responder a alterações ambientais, aumentando assim o risco de extinção das populações (Jump & Peñuelas, 2006).

Entretanto, é importante ressaltar que as possíveis consequências diante do efeito da fragmentação variam em relação às características ecológicas e de história de vida de uma determinada espécie (Murren, 2003). Além disso, a capacidade de dispersão dentro das espécies pode apresentar variação entre populações em função da abundância e comportamento dos vetores de dispersão de sementes e pólen, características da paisagem e parâmetros demográficos, tais como, densidades locais e distribuição espacial das árvores (Born et al., 2008). Para espécies arbóreas com capacidade de dispersão de genes a longas distâncias, por exemplo, a separação física de grupos de indivíduos não necessariamente traduzem-se em isolamento genético.

Sendo assim, o fluxo de genes oriundo de fontes externas deve ser considerado como um componente importante para a conservação de espécies arbóreas em florestas fragmentadas ou pequenas populações, pois dependendo de sua magnitude pode promover a homogeneidade genética entre as populações, evitando a perda de diversidade genética pela deriva genética aleatória (Hamrick et al., 1989).

Diante do exposto, a distribuição da informação genética dentro e entre populações depende da intensidade do fluxo gênico entre elas e está intimamente relacionada com a organização física e a capacidade de dispersão da espécie (Nass, 2007). Revelar padrões e níveis de fluxo gênico pode, portanto, contribuir substancialmente para o entendimento da

estrutura genética de populações de plantas em escalas locais e regionais (Sato et al., 2006). Tais informações são importantes para programas de conservação florestal, melhoramento genético e coletas de sementes destinadas ao reflorestamento ambiental (Bittencourt & Sebbenn, 2007). Wang e colaboradores (2008) ainda ressaltam que este conhecimento é fundamental para delinear estratégias de manejo e de conservação a fim de manter corredores de fluxo gênico e / ou evitar o isolamento reprodutivo entre as populações remanescentes.

Estudos em fina escala da estrutura genética espacial podem fornecer informações indiretas sobre a extensão da dispersão de genes ocorrida no passado dentro da espécie. Esta técnica é especialmente conveniente para espécies arbóreas tropicais devido à dificuldade de se realizar o monitoramento dos movimentos de semente e pólen dentro e entre populações (Born et al., 2008).

Entretanto, recentemente, medidas diretas referentes ao fluxo gênico contemporâneo tornaram-se possíveis através das análises de parentesco (maternidade e paternidade) com base em dados de marcadores genéticos altamente polimórficos, neutros e co-dominantes, como os microssatélites (Ashley, 2010).

Estes estudos podem ser realizados em amostras de mudas ou sementes oriundas de polinização natural e estimam a distância do fluxo de pólen efetivo, que corresponde ao movimento do pólen entre os parentais paterno e materno antes do estabelecimento da semente. Contudo, o movimento de genes pode ser estudado em maiores detalhes usando plântulas estabelecidas *in situ* que, por sua vez, representam o fluxo gênico realizado e permitem estudar os padrões e distâncias de dispersão de sementes e pólen simultaneamente (Sebbenn et al., 2011).

Ambas as metodologias, análises de parentesco e de autocorrelação espacial, são abordagens complementares que podem ser utilizadas conjuntamente para fornecer informações sobre a escala da dispersão de genes em populações de plantas. Assim, neste estudo objetivou-se investigar a estrutura genética espacial, as distâncias de dispersão de sementes e os padrões do fluxo de pólen entre dois eventos reprodutivos de uma pequena população de *Cariniana estrellensis* isolada geograficamente. Estes padrões foram avaliados através de análises de parentesco e de autocorrelação espacial usando nove locos microssatélites altamente polimórficos.

6.3. MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1. Local de estudo e amostragem

Para esse estudo foram amostrados indivíduos de uma pequena população de *Cariniana estrellensis* isolada geograficamente, localizada em um fragmento de 8 ha de Floresta Estacional Semidecidual na Fazenda Águas Claras, em Cravinhos, estado de São Paulo, a 21º17'S; 47º40'W (Figura 18A). A população de *C. estrellensis* remanescente no fragmento florestal está geograficamente delimitada por rodovia, pastagem e cultura de cana-de-açúcar, sendo constituída por indivíduos regenerantes até indivíduos com grandes dimensões, atingindo próximo a 5 m de circunferência à altura do peito (CAP). Também se constatou a presença de árvores adultas de *C. estrellensis* em outros pequenos fragmentos florestais presentes nas redondezas desta população, sendo que a árvore da mesma espécie mais próxima está a 1 km de distância da área de estudo.

Durante o ano de 2007 foi realizado um censo da referida população de *C. estrellensis*, sendo que todas as árvores adultas identificadas (30) foram mapeadas (Figura 18B; Anexo 3) usando um GPS III® (Garmin USA) e tiveram tecidos foliares coletados para as análises genéticas. Dentro do fragmento, também foram encontrados e georreferenciados 39 indivíduos de *C. estrellensis* (Figura 18C; Anexo 4) em fase não reprodutiva, denominados de "regenerantes", com altura variando de 0,15 a 2 m, dos quais também se amostraram tecidos foliares. Além disso, coletaram-se sementes de polinização natural de árvores matrizes do fragmento florestal ao longo dos meses de julho e agosto dos anos de 2007 e 2008. As sementes de ambos os anos foram semeadas em tubetes no viveiro da USP/RP e apresentaram grande variação na taxa de germinação entre as famílias plantadas. Assim, a amostragem total desse trabalho consistiu de 644 progênies procedentes de polinização natural (399 progênies produzidas em 2007 + 245 progênies produzidas em 2008). As folhas das 644 progênies foram coletadas manualmente, sendo em seguida, identificadas e embrulhadas em papel alumínio, acondicionadas em caixas de isopor com gelo e transportadas até o Laboratório de Genética Vegetal da USP/RP, onde foram armazenadas em *freezer* -20°C até o momento da extração do DNA. Maiores detalhes sobre a coleta de material biológico e os procedimentos de obtenção de sementes e produção de mudas estão descritos nos subitens 5.3.2 e 5.3.3 do Capítulo II.

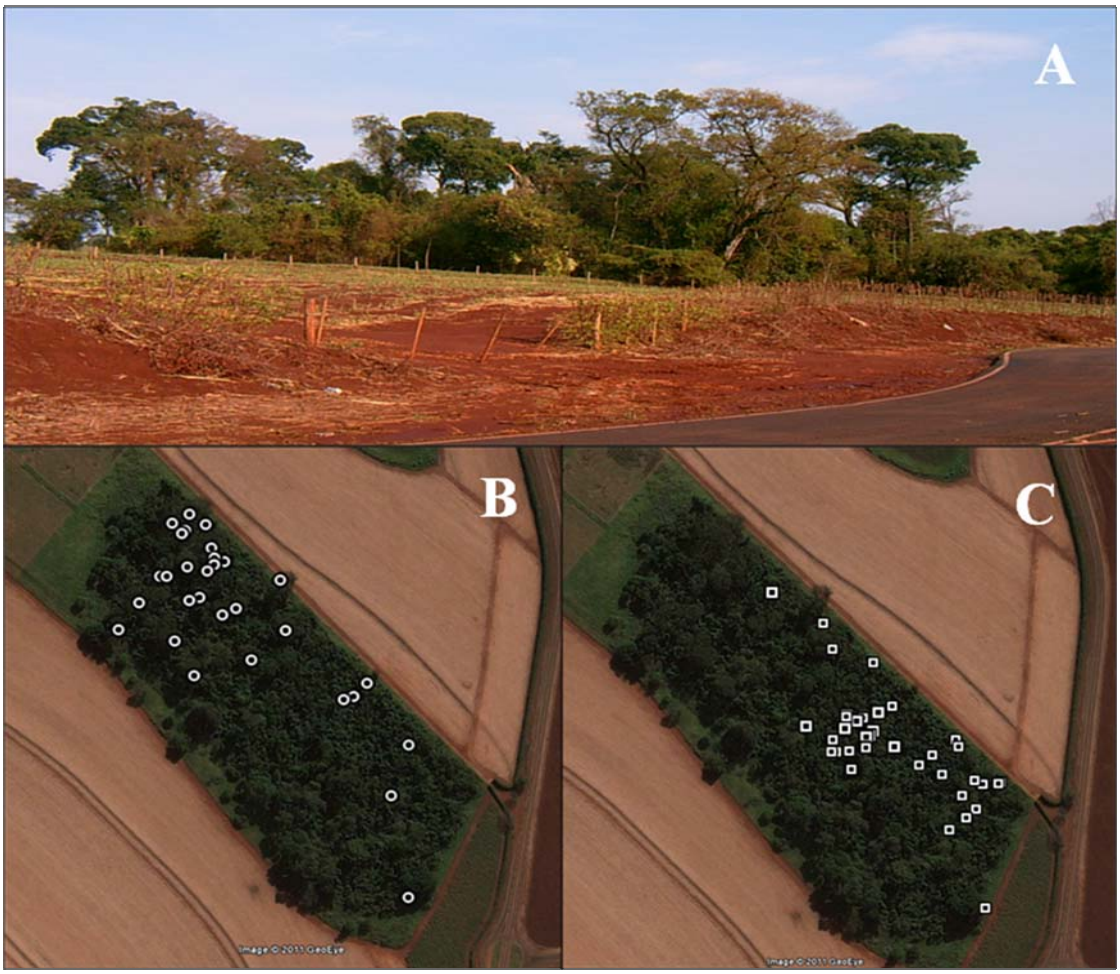

Figura 18. A) Vista lateral do fragmento florestal onde estão localizadas as árvores de *Cariniana estrellensis* amostradas para a realização deste estudo (Fonte: Arquivo Pessoal). Fotos de satélite mostrando a posição geográfica de indivíduos adultos (B) e regenerantes (C) de *C. estrellensis* dentro do referido fragmento (Fonte: *Google Earth,* acessado em maio de 2011).

6.3.2. Análise do DNA

A extração de DNA do material vegetal foi efetuada com base na metodologia de Alzate-Marin et al. (2009). Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro (Spectronic Genesys 5) e procedeu-se a amplificação de regiões microssatélites (SSR) através de reações em cadeia da polimerase (PCR) utilizando nove pares de iniciadores (Ces01, Ces02, Ces04, Ces09, Ces10, Ces11, Ces13, Ces14 e Ces18) previamente desenvolvidos para *C. estrellensis* por Guidugli et al. (2009) (Anexo 1). Os procedimentos de genotipagem (PCR, eletroforese e leitura de perfis SSR) seguiram as mesmas condições descritas anteriormente nos subitens 5.3.5 e 5.3.6 do Capítulo II. De modo geral, as reações de amplificação de 10 µL foram realizadas utilizando-se 2,5 ng de DNA genômico, 250 µM de cada dNTP, 1,5 mM de

$MgCl_2$, 0,6 µM de cada par de iniciador microssatélite, 1x tampão de reação livre de $MgCl_2$ [75 mM Tris-HCl pH 9.0; 50mM KCl; 20 mM $(NH_4)_2SO_4$], 1 U de *Taq* DNA polimerase e água MiliQ estéril até completar o volume total da reação. Os locos amplificados foram separados sob condições desnaturantes em géis de poliacrilamida 10 % e corados, posteriormente, com nitrato de prata de acordo com Sanguinetti et al. (1994). Fragmentos de diferentes mobilidades foram considerados alelos diferentes.

6.3.3. Análises estatísticas

6.3.3.1. Análise da distribuição espacial dos genótipos

A distribuição espacial dos genótipos foi analisada para árvores adultas e regenerantes. Estas análises foram realizadas utilizando-se a estimativa do coeficiente de coancestria (θ_{xy}) proposto por Loiselle et al. (1995), entre pares de árvores dentro de dez classes de distância. O coeficiente θ_{xy} mede a extensão da similaridade entre os indivíduos X e Y, relativo à similaridade genética média entre dois indivíduos aleatórios da amostra (Hardy & Vekemans, 2002). 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. O tamanho das classes foi determinado em função do número igual de pares de árvores comparadas dentro de cada classe. Isto gera classes de distâncias de diferentes tamanhos, mas permite obter maior precisão nas comparações das estimativas de coancestrias entre diferentes classes, pois os valores médios comparados entre classes são estimados com a mesma precisão (mesmo número de pares). Para testar se há estrutura genética espacial, o intervalo de confiança a 95 % de probabilidade foi calculado para cada valor observado em cada classe de distância, usando permutação de indivíduos (1.000) entre diferentes classes de distância. As análises foram conduzidas utilizando o programa SPAGeDi versão 1.2 (Hardy & Vekemans, 2002).

6.3.3.2. Fluxo gênico contemporâneo via pólen e sementes

As estimativas do fluxo gênico contemporâneo a partir do pólen e de sementes foram realizadas por análises de parentesco com uso do programa CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2007). Os genótipos dos 39 regenerantes e das 644 progênies, oriundas de sementes coletadas nos anos de 2007 e 2008, foram analisados para o estudo da dispersão de pólen, utilizando todas as 30 árvores adultas reprodutivas como candidatos paternos. Já para o estudo da dispersão de sementes, foram analisados apenas os genótipos dos 39 regenerantes e de todas as árvores adultas (30), as quais foram consideradas como possíveis candidatos maternos e paternos.

As análises de parentesco foram determinadas pela estatística Δ, que corresponde à diferença entre o LOD (*logarithm of the likelihood ratio* = logaritmo da razão de verossimilhança) do candidato a parental mais provável, menos o LOD do segundo candidato a parental mais provável. Para obter os valores críticos de Δ foram conduzidas simulações com todas as árvores adultas reprodutivas (n=30) como candidatos a parental, usando 10.000 repetições e 1 % como a proporção de locos com erro. Foram utilizados os níveis de confiabilidade de 95 % como restrito e de 80 % como relaxado, conforme sugestão de Marshall et al. (1998). Foi considerado o verdadeiro parental, o candidato com um valor de Δ maior que o valor crítico de Δ, calculado das simulações.

Como todas as árvores da população tinham o seu genótipo determinado e sua posição espacial conhecida, as progênies que tiveram o pai determinado dentro da população foram utilizadas para determinar as distâncias mínima, máxima e média e o desvio padrão de dispersão de pólen em dois anos consecutivos. Por outro lado, quando um regenerante 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 regenerante foi usada para inferir a distância de dispersão de sementes. Quando um genótipo regenerante tinha dois candidatos determinados dentro da população, o candidato localizado mais próximo ao regenerante 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 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). Assim, foram extraídas as informações referentes à distância entre o regenerante 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 no fragmento (m) foi calculada como a proporção de indivíduos que não tiveram um candidato a pai ou mãe determinado dentro da população ($n_{\text{imigrante}}$) em relação ao número total de indivíduos amostrados (n_{total}), $m = n_{imigrante}/n_{total}$ (Burczyk et al., 1996, Burczyk et al., 2004, Smouse & Sork, 2004). O fluxo gênico crítico (erro tipo I) ou, em outros termos, a probabilidade de determinar erroneamente um pai de um indivíduo dentro da população, quando o verdadeiro parental encontra-se fora da população (falso-positivo) foi calculada como descrito em Dow & Ashley (1996): $F_{GC}=1-(1-P)^n$, onde P corresponde à probabilidade de não exclusão do segundo parental e n ao número de árvores parentais encontradas no interior da população.

As distribuições das frequências de distância de dispersão de pólen estimadas para os anos de 2007 e 2008 foram comparadas usando o teste de Kolmogorov–Smirnov (Sokal & Rohlf, 1995). Para verificar se o sucesso da polinização para os dois eventos reprodutivos estava relacionado com a distância física entre as árvores adultas da população, nós também comparamos as curvas de frequências das distâncias de dispersão de pólen com a distribuição de frequências das distâncias entre todas as árvores adultas da população usando o mesmo teste de Kolmogorov–Smirnov (Sokal & Rohlf, 1995).

Usando a variância da distância do fluxo de pólen (σ_p^2), a área de vizinhança efetiva de polinização foi também estimada usando a seguinte equação $A_{ep} = 2\Pi\sigma_p^2$ (Levin, 1988). Dos resultados da análise de paternidade também foi calculado o número efetivo de doadores de pólen para cada árvore matriz, como definido por Burczyk et al. (1996): $N_{ep} = 1/\sum pi^2$, onde *pi* corresponde a proporção de progênies atribuídas ao doador de pólen *i*.

6.4. RESULTADOS

6.4.1. Estrutura genética espacial intrapopulacional

A Figura 19 é o demonstrativo gráfico dos coeficientes de coancestria por classes de distância para indivíduos adultos e regenerantes de *Cariniana estrellensis*. Observa-se que para ambas as gerações (adultos e regenerantes), a análise da distribuição espacial dos genótipos revelou ausência de correlação entre a posição geográfica e a distância genética dos indivíduos. Em outros termos, uma distribuição aleatória dos genótipos de *C. estrellensis* dentro do fragmento em estudo foi observada (Figura 19).

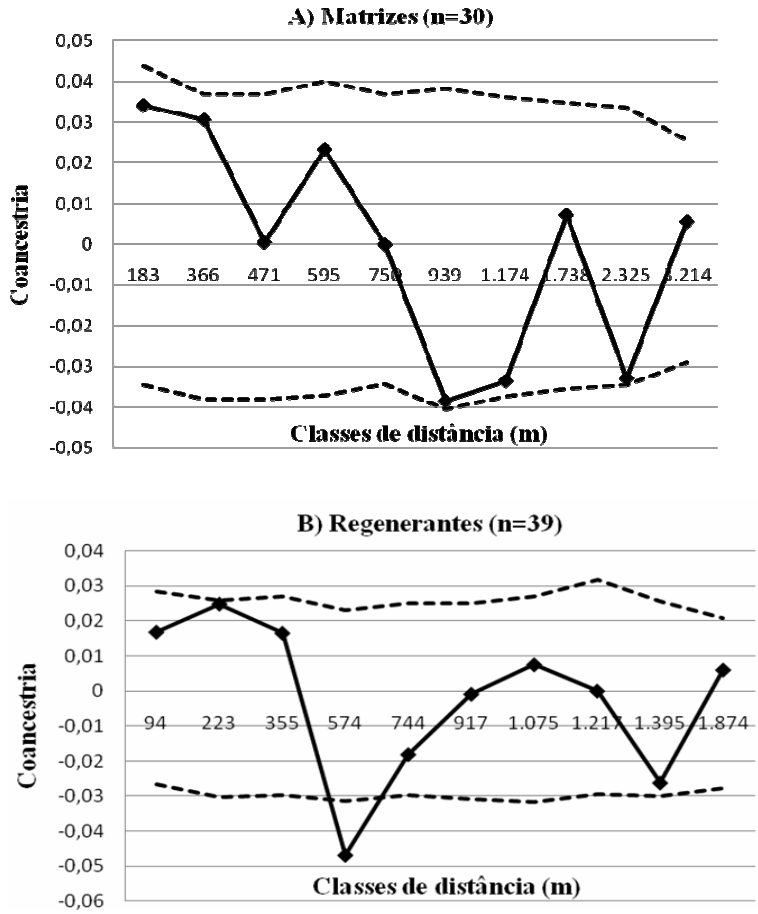

Figura 19. Estrutura genética espacial nas gerações de adultos (A) e regenerantes (B) de *Cariniana estrellensis* na fazenda Águas Claras de Cravinhos - SP. A linha contínua refere-se à estimativa do coeficiente de coancestria médio e as linhas pontilhadas referem-se ao intervalo de confiança a 95 % do erro padrão da média das estimativas para a hipótese de ausência de estrutura genética espacial (H_0: θ_{xy} =0).

6.4.2. Fluxo gênico contemporâneo

6.4.2.1. Análise do fluxo de pólen para as progênies

Baseando-se nas análises de paternidade, foi possível identificar o parental para 305 das 399 progênies de polinização natural amostradas em 2007 (Tabela 16). Para 237 progênies (77,7 %) o parental foi identificado com uma confiança de 95 % (de cada 20 progênies um pai pode ser atribuído erroneamente), enquanto 68 progênies (22,3 %) tiveram paternidade atribuída com 80 % de confiança (de cada 5 progênies um pai pode ser atribuído erroneamente). Os resultados também mostraram que estas 305 progênies foram geradas por 26 (86,6 %) das 30 árvores adultas reprodutivas da população. Sete destas 26 árvores (M2, M3, M5, M7, M10, M15 e M16) foram responsáveis pela produção de 63,9 % das progênies.

Das 245 progênies amostradas no fragmento florestal em 2008, por sua vez, um putativo doador de pólen foi atribuído a 185 progênies, das quais 151 (81,6 %) tiveram o pai determinado com uma confiança de 95 % de probabilidade e as demais 34 (18, 4 %) com 80 % de confiança (Tabela 16). Estas progênies parecem ter sido polinizadas por 23 (76,6 %) das 30 árvores candidatas a doadora de pólen dentro do fragmento. Cada um destes putativos parentes foi pai de pelo menos uma progênie (variando de 1-31 progênies), sendo que cinco árvores (M5, M10, M15, M16 e M21) foram aparentemente os pais de 57,8 % das progênies.

Os resultados das análises de paternidade apresentados acima indicaram taxas relativamente altas de imigração de pólen (23,5 % em 2007 e de 24,5 % em 2008; Tabela 16) para o fragmento em estudo, podendo-se afirmar que a população de *C. estrellensis* não está reprodutivamente isolada. Provavelmente, as progênies cujos pais não foram encontrados dentro da população receberam grãos de pólen provenientes de árvores localizadas fora do fragmento florestal.

O poder de exclusão teórico do segundo parente, calculado com base nos genótipos dos adultos, variou de 0,313 a 0,875, com valor combinado entre os locos de 0,9946. As probabilidades de fluxo gênico crítico teórico foram moderadamente altas e estimadas em 0,1313 ($=1-0{,}9946^{26}$) e 0,1170 ($=1-0{,}9946^{23}$) para os anos de 2007 e 2008, respectivamente. Consequentemente, cerca de 13 % [(305x0,1313)/305] e de 12 % [(185x0,1168)/185] das progênies podem ter o parental paterno determinado erroneamente, indicando que os níveis de fluxo gênico crítico podem afetar substancialmente as taxas de imigração de pólen estimadas pela análise de paternidade.

Contudo, a análise de paternidade em progênies de *C. estrellensis* indicou que pelo menos 23,5 % do pólen veio de árvores localizadas fora do fragmento estudado. Mas, relativamente à estimativa de fluxo gênico crítico, esta taxa de imigração de pólen pode ser maior, cerca de 37 % nos anos de 2007 (23,5 % + 13 %) e de 2008 (24,5 % + 12 %). Portanto,

as estimativas das taxas de fluxo gênico via pólen real para a população de *C. estrellensis* estariam entre 23,5 % e 37 % durante os eventos reprodutivos analisados nos anos de 2007 e 2008. Estes resultados reforçam a idéia de que este fragmento espacialmente isolado não está geneticamente isolado, sendo observada quantidade de imigração de pólen substancial durante diferentes eventos reprodutivos desta espécie arbórea tropical.

Tabela 16. Fluxo de pólen contemporâneo para matrizes de uma população de *Cariniana estrellensis* determinado por análises de paternidade para os anos de 2007 e 2008.

Matrizes	***n***	**Fluxo de Pólen**		**N_{ep}**	**Dentro do Fragmento**	
		Dentro Fragmento	**Fora do Fragmento**		**δ (m)**	**A_{ep} (ha)**
ANO_2007						
M1	65	55	10	3,83	29,89±40	1,0
M2	50	41	9	11,01	62,41±46	1,3
M4	24	20	4	11,57	74,25±77	3,8
M10	65	59	6	8,78	80,84±65	2,6
M12	65	42	23	19,6	108,16±84	4,4
M13	65	42	23	24,63	62,60±51	1,6
M16	65	46	19	11,29	80,54±22	3,1
Total	**399**	**305 (76,5 %)**	**94 (23,5 %)**	**12,95±6,9**	**69,95±60**	**2,3**
ANO_2008						
M2	50	34	16	16,89	82,38±91	5,3
M3	13	10	3	8,46	99,80±111	7,8
M4	32	25	7	5,42	132,92±130	10,7
M10	50	39	11	6,26	94,51±68	2,9
M12	50	35	15	7,28	167,8±113	8,1
M15	50	42	8	10,50	96,28±36	8,5
Total	**245**	**185 (75,5 %)**	**60 (24,5 %)**	**9,13±4,2**	**112,02±94**	**5,6**

n, número de progênies; N_{ep}, número de doadores de pólen; δ é a distância média de polinização dentro do fragmento (média ± desvio padrão); A_{ep}, área de vizinhança efetiva de polinização.

Através das análises de paternidade, também foi possível observar que em ambos os eventos reprodutivos, nenhuma das progênies teve a própria árvore materna determinada como parental paterno, indicando ausência de plantas advindas de autofecundação, o que corrobora as estimativas de autofecundação nulas observadas nas análises do sistema reprodutivo (Capítulo II).

Dentro do fragmento, o pólen foi disperso a distâncias relativamente curtas (Tabela 16; Figuras 20A e B). Em 2007, as distâncias do movimento do pólen medidas entre as árvores maternas e paternas determinadas pelas análises de paternidade variaram entre 4 e 355 m, com média de 69,95 m (Tabela 16). Já para as progênies que tiveram o pai encontrado dentro do fragmento florestal no evento reprodutivo de 2008, a distância de dispersão de pólen variou de 13 a 399 m, com média de 112,02 m (Tabela 16). Entretanto, verifica-se que as distâncias médias de dispersão de pólen foram significativamente maiores (Kolmogorov-Sminorv, D=0,288, P<0,05; Tabela 16) para o ano de 2008.

Durante os eventos reprodutivos de 2007 e 2008, 50 % dos eventos de polinização ocorreram até as distâncias de 72 m e 108 m, respectivamente (Figuras 20A e B). A comparação da curva de frequência efetiva de dispersão de pólen e a curva de frequência de distâncias entre todas as árvores do fragmento estudado foi significativamente diferente (Kolmogorov-Smirnov, D=0,391, P<0,01; Figura 20A), o que indica que a distância entre as árvores, para o ano de 2007, não explica o padrão de dispersão de pólen observado. Já para o ano de 2008, não se verificou diferença significativa entre as curvas (Kolmogorov-Smirnov, D=0,213, P=0,26; Figura 20B), sugerindo que a distância entre as árvores pode explicar o padrão de dispersão de pólen observado.

Em adição, as análises de paternidade revelaram que a área de atuação dos polinizadores (área de vizinhança efetiva de polinização) é grande e foram menores do que a área da população (8 ha) para ambos os eventos reprodutivos, variando de 1,0 a 3,8 ha, com média de 2,3 ha no ano de 2007 e, entre 2,9 a 10,7 ha, com média de 5,6 ha em 2008 (Tabela 16).

Ampla variação no número de doadores de pólen por árvore materna foi encontrada, oscilando entre 3,83 e 24,63, com média de 12,95 para o ano de 2007 e, entre 5,42 e 16,89, com um valor médio de 9,13 em 2008 (Tabela 16). Estes resultados indicam que um número relativamente alto de árvores polinizou cada uma das árvores matrizes. No entanto, estes resultados são mais conservadores do que os estimados diretamente via modelo de cruzamentos correlacionados ($1/r_p$ = 8,2 em 2007 e $1/r_p$ = 6,9 em 2008; ver subitem 5.4.5. do Capítulo II).

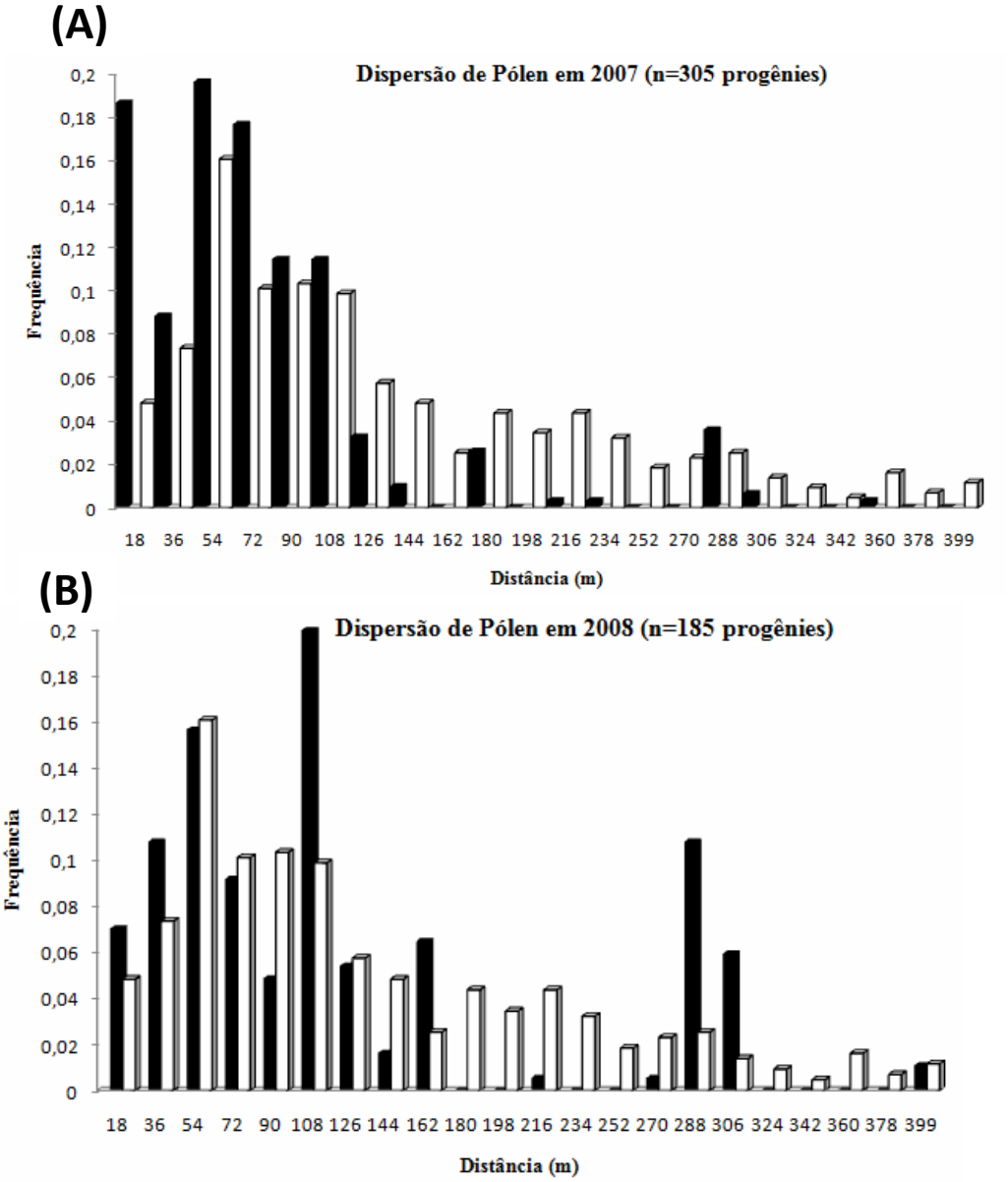

Figura 20. Distância de dispersão de pólen efetiva (barras pretas) durante os eventos reprodutivos de 2007 (A) e 2008 (B) e distância entre todas as árvores reprodutivas de *Cariniana estrellensis* (barras brancas) amostradas dentro do fragmento florestal estudado.

6.4.2.2. Análise do fluxo de pólen e sementes para os regenerantes

Dos 39 regenerantes amostrados dentro do fragmento florestal, 12 tiveram os parentais materno e paterno determinados com uma confiança de 95 % de probabilidade e 6 com 80 % (Tabela 17). Estas 18 plantas regenerantes foram geradas por 18 (60 %) das 30 árvores adultas da população e, em concordância com resultados anteriores, também se observou uma taxa de autofecundação nula para essa geração. A probabilidade de fluxo gênico crítico teórico foi estimada em 0,093 (=1-$0{,}9946^{18}$), indicando que cerca de 9 % [(18x0,093)/18] das progênies

podem ter o parental paterno determinado erroneamente. Contudo, a análise de parentesco nos regenerantes de *C. estrellensis* indicou que a taxa de imigração de pólen realizado, variando entre 53 % e 62 %, foi maior que as taxas de imigração de pólen efetivo para os anos de 2007 e 2008.

Os demais 21 indivíduos regenerantes tiveram apenas um dos parentais determinado dentro do fragmento que, no presente trabalho, foram assumidos como sendo os putativos parentais materno. Assim, o conjunto de resultados sugere uma ausência de imigração de sementes na população (Tabela 17).

Tabela 17. Dispersão realizada de sementes e pólen em população de *Cariniana estrellensis* no fragmento florestal de Cravinhos-SP.

		Fluxo Gênico		
	Regenerantes (*n*)	**Dentro do fragmento**	**Imigração**	**Distância média de dispersão (m)**
Sementes	39	39 (100 %)	0 (0 %)	119,64±78,2
Pólen	39	18 (46,2 %)	21(53,8 %)	146,94±98,1

Para os 39 regenerantes que tiveram pelo menos um suposto parental determinado dentro da população, a distância de dispersão de sementes variou de 13 a 345 m, com média de 119,64 m (Tabela 17; Figura 21A). Aproximadamente 51 % das sementes foram dispersas até 100 m, embora uma alta taxa também (13 %) tenha sido dispersa na distância de 180 m da putativa árvore materna (Figura 21A).

Por sua vez, a distância de dispersão de pólen medida nos regenerantes pela distância entre as árvores matrizes determinadas como maternas e as determinadas como paternas, variou entre 36 e 301 m, com média de 146,94 m, e 50 % do pólen sendo disperso até 85 m (mediana) e 72,2 % até 221 m (Tabela 17; Figura 21B). Observa-se que a distância média de dispersão de pólen realizada para a regeneração dentro do fragmento (146,94 m) foi maior do que as médias de dispersão de pólen efetivo estimadas em 2007 (69,95 m) e 2008 (112,02 m) para progênies de polinização natural. Em adição, a comparação dos padrões de dispersão de pólen efetivo e realizado também mostrou diferenças. Cinquenta por cento dos eventos de polinização ocorreram até as distâncias de 72 m (2007) e 108 m (2008) para as progênies, enquanto que, 50 % dos eventos de dispersão de pólen realizada na regeneração ocorreram até 85 m.

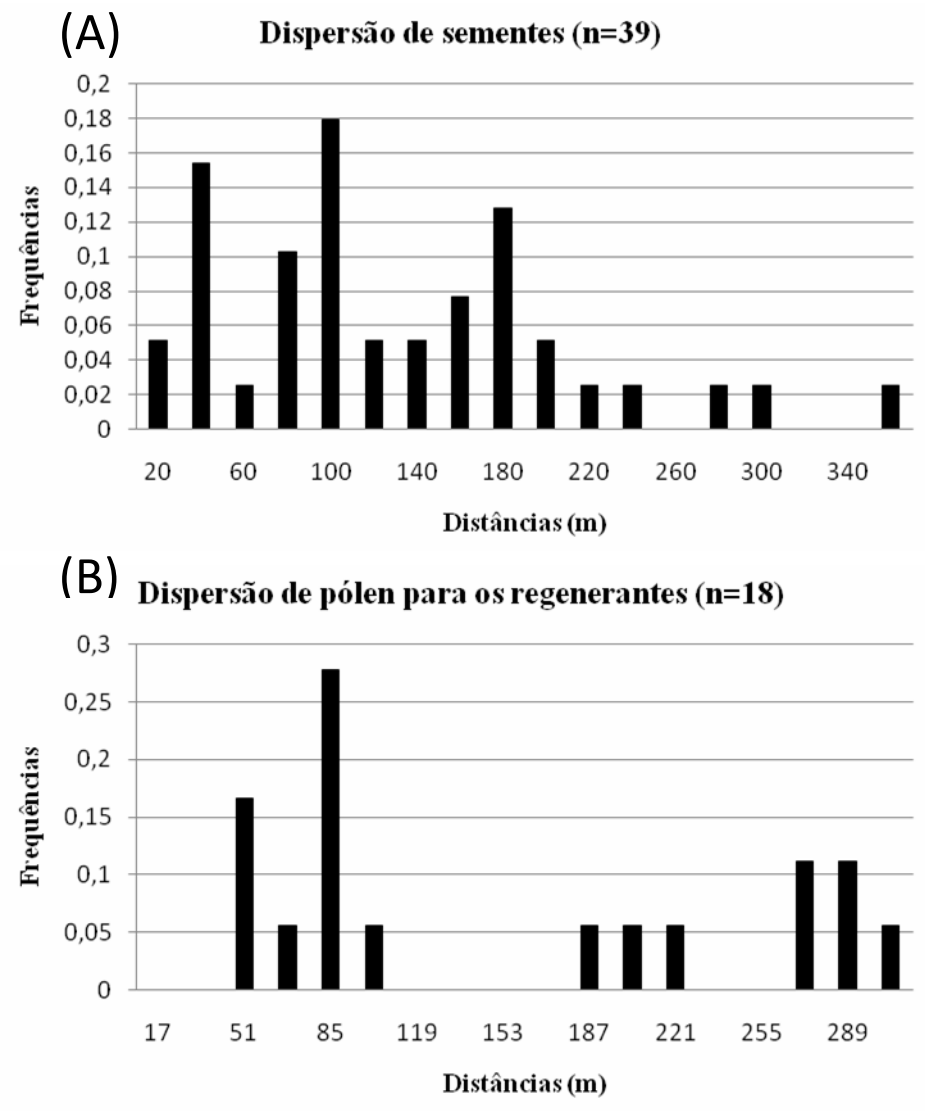

Figura 21. Distribuição das frequências das distâncias de dispersão de sementes (A) e pólen (B) em *Cariniana estrellensis* determinada por análises de parentesco nos regenerantes.

6.5. DISCUSSÃO

6.5.1. Estrutura genética espacial intrapopulacional

A estrutura genética espacial em populações naturais de plantas é definida como a distribuição não aleatória da variação genética entre indivíduos e pode acarretar efeitos drásticos, visto que agrupamentos familiares intrapopulacionais favorecem acasalamentos entre aparentados gerando endogamia biparental (Sato et al., 2006). Contudo, no presente trabalho, a análise de autocorrelação espacial rejeitou a pressuposição de estruturação genética espacial, mostrando que os genótipos dos indivíduos adultos e regenerantes de *C. estrellensis* estão aleatoriamente distribuídos dentro da população em estudo. É importante ressaltar que a inexistência de estruturação familiar não significa que não existam indivíduos aparentados na população; provavelmente esses existam, porém, não se encontram agrupados.

De acordo com Loiselle et al. (1995), os diferentes padrões de distribuição da estrutura genética espacial encontrada nos habitats podem ser determinados pela interação de vários fatores, tais como, fluxo gênico, deriva genética e seleção natural. Em uma escala espacial local, entretanto, a causa mais prevalente para o arranjo espacial dos genótipos em estruturação de famílias seria a dispersão limitada de genes (Vekemans & Hardy, 2004).

Como os indivíduos de *C. estrellensis* são de ciclo de vida longa, a distribuição espacial dos genótipos de adultos remanescentes no fragmento reflete o fluxo histórico de genes, enquanto a análise da regeneração pode retratar o movimento de genes em um passado remoto (<15 anos). Sendo assim, a não estruturação espacial dos genótipos de indivíduos adultos e regenerantes de *C. estrellensis* sugerida pelos resultados, pode ser um indicativo de que a maioria dos eventos de dispersão do pólen e sementes dentro da referida população tenha ocorrido de forma não restrita às vizinhanças da matriz.

A dispersão de sementes, processo pelo qual as sementes são removidas das imediações da planta-mãe para distâncias "seguras", onde a predação e competição são mais baixas (Howe & Miriti, 2004), tem sido considerada como a principal causa da estrutura genética espacial em diversos estudos realizados em espécies arbóreas (Barreira et al., 2006; Bittencourt & Sebbenn, 2007; Carneiro et al., 2007; Lacerda et al., 2008; Nakanishi et al., 2009). Contudo, a distância máxima de dispersão de sementes depende do agente dispersor, quer seja ele gravidade, vento, água ou animal (Augspurger, 1983; Augspurger & Hogan, 1983; Guariguata & Pinard, 1998). Via de regra, espécies arbóreas tropicais que possuem síndrome de dispersão de sementes predominantemente anemocórica, como é para *Cariniana estrellensis*, têm maior probabilidade de se regenerarem a consideráveis distâncias (>100 m)

dos progenitores (Augspurger & Hogan, 1983; Silva et al., 2004) e, portanto, menor possibilidade de apresentarem uma estruturação genética espacial.

De fato, no presente estudo, as análises de parentesco realizadas com os indivíduos regenerantes de *C. estrellensis* demonstraram que, em geral, as sementes desta espécie estabeleceram-se distantes da planta-mãe (média de 119,64 m) dentro do fragmento em estudo. Além disso, as altas taxas de imigração de pólen inferidas pelas referidas análises de parentesco, demonstraram que o fluxo de pólen em *C. estrellensis* alcançou distâncias superiores a 399 m (e talvez a alguns quilômetros) sendo, portanto, considerado suficientemente amplo para prevenir a formação de agregados de indivíduos genotipicamente semelhantes (aparentados) na população estudada.

Em adição, a avaliação do sistema reprodutivo de *C. estrellensis* entre diferentes eventos reprodutivos dentro da área de estudo tem revelado altas taxas de cruzamentos com fortes indícios de mecanismos de auto-incompatibilidade, como discutido anteriormente no Capítulo II desta tese. Sendo assim, o sistema reprodutivo da espécie associado à alta taxa de imigração de pólen podem ter favorecido o aumento dos níveis de diversidade genética em função das altas taxas de cruzamentos, evitando a divergência aleatória das frequências gênicas na população em questão. Além disso, é importante ressaltar que a não-estruturação espacial observada na geração adulta se manteve na regeneração, sugerindo que a população não esteja sofrendo os efeitos da deriva genética devido à fragmentação.

É possível ainda que a distribuição aleatória dos genótipos de C. *estrellensis* esteja relacionada com o tamanho do fragmento em estudo, o qual abrange pequenas distâncias (< 400 m) entre as árvores de *C. estrellensis* amostradas. Provavelmente, os vetores de polinização de *C. estrellensis* (em especial as abelhas) são suficientemente eficientes para promover o transporte de pólen entre plantas dentro desta pequena área fragmentada, favorecendo a distribuição aleatória dos genótipos na população. Além disso, é importante levar em consideração a interação envolvendo a área restrita do fragmento e a dispersão secundária de sementes por zoocoria.

Embora as sementes aladas de *C. estrellensis* sejam adaptadas para dispersão pelo vento, macacos da espécie *Alouatta caraya* (bugios pretos) são considerados importantes consumidores das sementes desta espécie durante a época seca (Oliveira-Filho & Galetti, 1996; Lepsch-Cunha & Mori, 1999), e têm o potencial de transportar as sementes que consumiram longe das árvores-mães (média de 200 m), reduzindo as limitações de uma dispersão sob as fontes alimentares (Lázaro-Júnior, 2009). Portanto, dentro de uma área de vida não superior a 8 hectares como a do fragmento em estudo, é possível que a dispersão secundária das sementes de *C. estrellensis* por esses primatas possa ter contribuído de forma

relevante para a distribuição não agregada dos genótipos da referida espécie. Contudo, outros estudos são requeridos para confirmar a ocorrência e o papel dos bugios pretos na dispersão e predação de sementes de *C. estrellensis* dentro da área estudada.

Adicionalmente, é importante considerar a disponibilidade e distribuição de manchas de recursos que podem favorecer o estabelecimento e/ou desenvolvimento dos indivíduos de diferentes fases do desenvolvimento (Harper, 1977; Bustamante & Canals, 1995). Em pequenas áreas fragmentadas, variações na luminosidade, por exemplo, podem propiciar a formação de microhábitats mais ou menos favoráveis à colonização de espécies nativas (Pinheiro & Ganade, 2009). No presente estudo, pouco pode ser inferido sobre o sucesso de estabelecimento da regeneração de jequitibá branco dentro do fragmento, mas por apresentar uma baixa densidade (< 5 regenerantes.ha^{-1}) e se tratar de uma espécie tolerante ao sombreamento, é provável que áreas do fragmento com maior abertura de dossel e incidência de luminosidade, tenham reduzido as chances de estabelecimento das sementes desta espécie na população. Todos esses fatores aliados ao fato de que as sementes aladas de *C. estrellensis* são espalhadas pelo vento de modo aleatório, a partir da planta parental, podem ter contribuído para que a distribuição das sementes de *C. estrellensis* ocorresse em locais distantes das vizinhanças da árvore materna, enfraquecendo agregações de indivíduos aparentados dentro da área estudada.

Por último, a baixa densidade de adultos (< 4 indivíduos.ha^{-1}) na população de *C. estrellensis* também pode estar associada à maneira como ocorre a dispersão de pólen e de sementes dentro da população, sendo, portanto, outra possível explicação para os padrões de estruturação observados. De fato, Loveless & Hamrick (1984) esclareceram que a dispersão do pólen por animais é mais suscetível à densidade populacional, ou seja, em populações com alta densidade, o fluxo do pólen é restrito, o que aumenta a subdivisão. Diante destas considerações, levanta-se a hipótese de que alterações na densidade de planta-polinizador, em decorrência do processo de fragmentação, possam ter favorecido os padrões de alcance de vôo dos polinizadores a ponto de promover uma ausência de estruturação familiar entre os indivíduos de *C. estrellensis* remanescentes no fragmento em estudo.

Em suma, os processos de dispersão dos grãos de pólen e sementes a longas distâncias (zoocoria e anemocoria) para *C. estrellensis*, aliados ao pequeno tamanho do fragmento e à baixa densidade populacional são consistentes com a ausência de estruturação genética espacial observada para ambas as gerações analisadas (adultos e regenerantes). No entanto, vale ressaltar que para o melhor entendimento da estruturação genética espacial da espécie, torna-se desejável a amostragem de populações maiores de *C. estrellensis*, o que permitiria

que um número maior de indivíduos fosse avaliado no estudo da distribuição espacial dos genótipos.

De certa forma, os resultados apresentados para *C. estrellensis*, assemelham-se aos obtidos por outros estudos realizados em algumas populações naturais de espécies arbóreas tropicais (*Genipa americana*, Sebbenn et al., 1998; *Machaerium villosum*, Neto & Kageyama, 2000; *Myracrodruon urundeuva*, Lacerda & Kageyama, 2003) que também não apresentaram indícios de estruturação genética espacial.

Finalmente, vale ressaltar que esta ausência de estruturação genética na população de *C. estrellensis* aliada às outras características biológicas da espécie (tais como modo de reprodução e padrões de dispersão), devem ser levados em consideração no momento de se delinear estratégias de coleta de material genético da espécie, para fins de conservação da variabilidade genética de *C. estrellensis* nesta região.

6.5.2. Análise do movimento de genes dentro e entre a área de estudo

A partir da análise dos regenerantes, inferiu-se que a taxa de imigração de sementes para a população de *C. estrellensis* foi nula (0 %). Em adição, o padrão de dispersão de sementes em *C. estrellensis* foi mais limitado do que o movimento de pólen realizado dentro da área de estudo, similar ao descrito para outras espécies arbóreas (Nakanishi et al., 2009; Gaino et al., 2010; Sebbenn et al., 2011).

Contudo, a distância média de dispersão de sementes na população de *C. estrellensis* foi maior do que as observadas para outras espécies florestais, cujas sementes são primariamente dispersas por autocoria (*Araucaria angustifolia*, Bittencourt & Sebbenn, 2007), barocoria (*Quercus salicina*, Nakanishi et al. 2009) e zoocoria (*Copaifera langsdorffii*, Sebbenn et al., 2011).

Embora o período de florescimento para *Cariniana estrellensis* possa variar de acordo com a sua localidade de ocorrência, um padrão geral de floração durante a estação chuvosa e frutificação na estação seca tem sido apontado para a espécie por diversos autores (Rizzini, 1978; Barbosa, 1984; Lorenzi, 2002; Leite, 2007). No presente estudo, este padrão foi confirmado na população de *C. estrellensis* analisada, sendo similar ao observado por Lepsch-Cunha & Mori (1999) para *Couratari multiflora*, outra espécie pertencente à família Lecythidaceae e cujas sementes também são aladas e dispersas pelo vento.

Segundo esses mesmos autores, essa notável diferença entre os períodos de frutificação e floração pode ser uma adaptação da espécie às condições mais favoráveis para a dispersão de suas sementes pelo vento durante a estação seca do que na estação chuvosa.

Contudo, vale ressaltar que embora a espécie apresente síndrome de dispersão de sementes por anemocoria, as sementes de *Cariniana* são comestíveis, ricas em proteínas e, procuradas/predadas pelos primatas (Lepsch-Cunha & Mori, 1999) como os bugios-pretos (*Alouatta caraya*) (Oliveira-Filho & Galetti, 1996), os quais têm sido observado em alguns fragmentos da região de Ribeirão Preto (Cabral et al., 2005; Tognon et al., 2005).

Com base nessas informações, é possível que a ocorrência da frutificação durante a estação seca torne as sementes de *C. estrellensis* mais suscetíveis a predação por esses animais, devido à escassa disponibilidade de recursos geralmente observada para a maioria das espécies vegetais durante este período (Peres, 1994; Oliveira-Filho & Galetti, 1996). Em adição, o isolamento físico do fragmento em estudo por rodovias, pastagens e plantações de cana-de-açúcar devido à fragmentação, provavelmente limita o movimento destes dispersores secundários entre os poucos remanescentes florestais existentes nas proximidades da área de estudo. Portanto, a interação de todos esses fatores poderia explicar a ausência de imigração de sementes para a população estudada.

Por outro lado, as estimativas do fluxo de pólen sugerem que a população de *C. estrellensis* não está geneticamente isolada, haja vista as altas taxas de imigração de pólen reveladas pelas análises baseadas nos regenerantes (entre 53 % e 62 %) e em progênies de polinização natural (entre 23,5 % e 37 %) que, por sua vez, representam o fluxo gênico contemporâneo.

Desta forma, pode-se inferir que atualmente eventos de polinização estejam ocorrendo a distâncias superiores a 399 m para a população de *C. estrellensis*, visto que as distâncias mínima e máxima entre duas árvores adultas amostradas dentro do fragmento estão entre 4 e 399 m. Contudo, a presença de árvores adultas de *C. estrellensis* em pequenos fragmentos florestais, distantes em pelo menos 1 km da área de estudo, indica que a polinização da espécie esteja ocorrendo a distâncias ainda maiores e que, portanto, a fragmentação não isolou reprodutivamente as árvores da população de *C. estrellensis*.

Sendo assim, o conjunto de resultados revelou que a extensão da dispersão de pólen foi maior do que a dispersão de sementes, sugerindo que a conexão entre populações de *C. estrellensis* nesta paisagem altamente antropizada seja decorrente principalmente do fluxo de pólen. Diversos estudos também têm detectado fluxo de pólen a longa distância em populações naturais isoladas de outras espécies arbóreas, tais como, *Quercus macrocarpa* (Dow & Ashley, 1998), *Pinus flexilis* (Schuster & Mitton, 2000), *Cecidiphyllum japonica* (Sato et al., 2006), *Araucaria angustifolia* (Bittencourt & Sebbenn, 2007) e *Quercus robur* (Buschbom et al., 2011).

Segundo Young et al. (1993), é possível que o processo de fragmentação do habitat possa favorecer o fluxo de pólen mediado pelo vento através da paisagem, mantendo assim altos níveis de diversidade em pequenos fragmentos isolados. Para a população de *C. estrellensis* em estudo, no entanto, a explicação mais provável para o extenso movimento de pólen deve estar relacionada à capacidade de vôo do seu principal agente polinizador, as abelhas. Aliado a isso, a menor densidade e o maior espaçamento entre os adultos reprodutores de *C. estrellensi*s neste ambiente alterado, podem ter afetado o comportamento de forrageamento do polinizador, favorecendo a busca de recurso por longas distâncias e, consequentemente, assegurando a proporção das distâncias de dispersão de pólen a longas distâncias.

Embora o movimento de pólen a longa distância possa ocorrer com uma frequência moderadamente alta, distâncias médias curtas de fluxo de pólen efetivo foram estimadas dentro da parcela por análise de paternidade em ambos os eventos reprodutivos analisados (69,95±60 m em 2007; 112,02±94 m em 2008). A avaliação dos padrões de dispersão de pólen dentro do fragmento também mostrou variação entre os eventos reprodutivos, indicando que a distância entre as árvores adultas não poderia explicar o padrão de dispersão de pólen para o ano de 2007, ao contrário do que foi observado para o ano de 2008.

De acordo com Carneiro et al. (2009), padrões e distâncias de dispersão de pólen, assim como sistemas de acasalamento, podem mudar entre eventos reprodutivos como um resultado de mudanças na fenologia de florescimento, alterações nas condições ambientais afetando o comportamento do polinizador, ou processos antropogênicos tais como corte seletivo e fragmentação florestal.

No presente estudo, as diferenças observadas entre anos poderiam ser atribuídas à variação de árvores amostradas em cada ano. Durante as coletas de material biológico para realização deste estudo, observou-se que nem todas as árvores adultas de *C. estrellensis* haviam frutificado dentro do fragmento, sugerindo que o florescimento pode não ter ocorrido de forma sincronizada entre os indivíduos da população em cada evento reprodutivo. Entretanto, para uma melhor compreensão dos mecanismos que possam ter contribuído para a alteração dos padrões e distâncias de dispersão de pólen, um estudo sobre a fenologia reprodutiva da espécie dentro da área de estudo é requerido.

Contudo, as distâncias relativamente curtas de dispersão de pólen detectadas dentro do fragmento indicaram que parte do pólen recebido pelas árvores matrizes de *C. estrellensis* é oriunda de distâncias limitadas. Isso, por sua vez, nos sugere que indivíduos localizados espacialmente distantes entre si dentro da população podem receber diferentes conjuntos de

pólen e, portanto, sementes oriundas de árvores amplamente espaçadas podem reter maior diversidade genética.

Portanto, considerando que as distâncias médias de dispersão de pólen dentro do fragmento variaram cerca de 30 a 168 m para os dois eventos reprodutivos analisados conjuntamente, sugere-se que a coleta de sementes dentro da população seja realizada entre árvores distantes a pelo menos 170 m em relação à outra planta. Esta medida poderia aumentar a variabilidade genética no conjunto amostral das sementes a serem coletadas, seja para futuros trabalhos de recuperação ou para o plantio em novas áreas.

Em adição, a variação na distância de dispersão de pólen entre os eventos reprodutivos propiciou uma alta variação temporal na área de polinização de vizinhança efetiva (A_{ep}=2,3 ha em 2007 e A_{ep}=5,6 ha em 2008). Entretanto, a área de atuação dos polinizadores, no caso as abelhas, foi grande dentro do fragmento o que é altamente favorável à recombinação da diversidade genética da população estudada.

Além disso, os valores médios de doadores de pólen estimados em *C. estrellensis* através das análises de paternidade (N_{ep}=12,95 em 2007 e N_{ep}=9,13 em 2008) foram considerados altos e dentro do padrão observado em outras espécies arbóreas tropicais (*Araucaria angustifolia* N_{ep}=12,60, Bittencourt & Sebbenn, 2007; *Caryocar brasiliense* N_{ep}=10,99, Collevatti et al., 2010; *Myracrodruon urundeuva* N_{ep}=10,83, Gaino et al., 2010). Dyer & Sork (2001) pontuam a importância de estudos voltados para a compreensão dos fatores que possam influenciar o movimento do pólen dentro das populações, pois se o movimento de pólen é restrito, árvores reprodutivamente ativas podem ser altamente representadas nas gerações subsequentes.

De modo geral, a presente população de *C. estrellensis* apresentou dois níveis de dispersão de pólen, um componente a curta distância dentro do fragmento e outro a longa distância entre o fragmento e árvores de outras localidades que não foram amostradas para esse estudo. Este segundo nível de dispersão de pólen indica que a população de *C. estrellensis* não está isolada geneticamente, o que por sua vez, pode ser essencial para prevenir perdas de diversidade genética na espécie, garantindo sua sobrevivência em longo prazo.

Levando em consideração que eventos de polinização possam ocorrer através de longas distâncias, fragmentos florestais que nós consideramos estar isolados, de fato, podem apresentar certa conectividade genética para algumas das espécies arbóreas. Por outro lado, o oposto pode ser também observado: algumas espécies podem estar fragmentadas dentro de uma floresta "contínua" se a espécie for suficientemente rara ou se o habitat disponível esteja muito desigualmente distribuído. Dentro desse contexto, Smulders et al. (2009) pontuam a

necessidade de determinar o fator que realmente delinearia uma "população" para as espécies em estudo.

As análises de parentesco também revelaram ausência de plantas advindas de autofecundação, reforçando as altas taxas de cruzamentos e, consequentemente, as estimativas do fluxo de pólen a longas distâncias em *C. estrellensis*. Adicionalmente, o movimento contemporâneo de genes a longas distâncias é congruente com a ausência de estruturação genética espacial na população e, combinados ajudam a explicar os valores não significativos dos índices de fixação nas gerações de *C. estrellensis* estimados previamente neste estudo.

Em suma, o conjunto de dados obtidos sugere que a alta taxa de imigração de pólen no fragmento pode estar contribuindo de forma significativa para a promoção da variabilidade genética, redução da coancestria, e aumento do tamanho populacional efetivo na população de *C. estrellensis*. Além disso, evidenciou-se que a presença de pequenos fragmentos é importante na paisagem antropizada, podendo desempenhar papel fundamental para o fluxo gênico entre as populações de plantas remanescentes, o que contribui para o aumento da variabilidade genética dentro das espécies e, consequentemente, para sua persistência ao longo das gerações.

Finalmente, considerando-se a grande dificuldade atual para obtenção de sementes de espécies arbóreas tropicais com níveis adequados de variabilidade genética e, dado os resultados aqui observados, como reprodução exclusiva por cruzamentos, o número relativamente alto de doadores de pólen visitando as árvores matrizes do fragmento, as altas taxas de fluxo gênico favorecendo a heterozigosidade e a ausência de estruturação genética espacial, é possível considerar esta população de *C. estrellensis* como adequada para a coleta de sementes para conservação genética, testes de progênies e reflorestamentos.

6.6. CONCLUSÕES

1. Não existe estruturação genética espacial dentro da população de *C. estrellensis*;

2. A extensão da dispersão de sementes foi mais limitada do que a dispersão realizada de pólen, ocorrendo ausência de imigração de sementes na população de *C. estrellensis*;

3. Dentro do fragmento os eventos de polinização em *C. estrellensis* tenderam a ocorrer entre árvores próximas e mostraram variação entre os eventos reprodutivos;

4. Em adição, as análises de paternidade revelaram que o pólen também tende a ser disperso a longas distâncias através da paisagem fragmentada, sugerindo que a população de *C. estrellensis* não está isolada reprodutivamente;

5. Os altos níveis de imigração de pólen detectados no fragmento em estudo podem ser essenciais para prevenir perdas de diversidade genética na espécie devido à ocorrência de deriva genética aleatória;

6. Por último, concluiu-se que a área de atuação dos polinizadores e o número de árvores doadores de pólen foram altos, o que favorece a recombinação gênica podendo ampliar a diversidade genética dentro da população de *C. estrellensis* estudada.

6.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZATE-MARIN, A. L.; GUIDUGLI, M. C.; SORIANI, H. H.; MARTINEZ, C. A. H.; MESTRINER, M. A. A DNA minipreparation procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1217-1224, 2009.

ASHLEY, M. V. Plant parentage, pollination, and dispersal: how DNA microsatellites have altered the landscape. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, p. 148-161, 2010.

AUGSPURGER, C. K. Seed dispersal of the tropical tree, *Platypodium elegans*, and the escape of its seedlings from fungal pathogens. **Journal of Ecology**, v. 71, p. 759-771, 1983.

AUGSPURGER, C. K.; HOGAN, K. P. Wind dispersal of fruits with variable seed number in a tropical tree (*Lonchocarpus pentaphyllus*: Leguminosae). **American Journal of Botany**, v. 70, p. 1031-1037, 1983.

BARBOSA, M. R. V. ***Cariniana* (Casar.) of the Tijuca masif**. M.Sc. Tese-Universidade Rural do Rio de Janeiro, 1984, 88p.

BARREIRA, S.; SEBBENN, A. M.; SCOLFORO, J. R. S.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic diversity and mating system of *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish populations under forest logging. **Scientia Forestalis**, v. 71, p. 119-130, 2006.

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

BORN, C.; HARDY, O. J.; CHEVALLIER, M. H.; OSSARI, S.; ATTÉKÉ, C.; WICKINGS, E. J.; HOSSAERT-MCKEY, M. Small-scale spatial genetic structure in the Central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation **Molecular Ecology**, v. 17, p. 2041–2050, 2008.

BURCZYK, J.; ADAMS, W. T.; SHIMIZU, J. Y. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon) stand. **Heredity**, 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 Genetics**, v. 11, p. 1-14, 2004.

BUSCHBOM, J.; YANBAEV, Y.; DEGEN, B. Efficient Long-Distance Gene Flow into an Isolated Relict Oak Stand. **Journal of Heredity**, Doi:10.1093/jhered/esr023, 2011.

BUSTAMANTE, R. O.; CANALS, L. M. Dispersal quality in plant: how to measure efficiency and effectiveness of a seed disperser. **Oikos**, v. 73, p. 133-136, 1995.

CABRAL, A.; FERMOSELI, A. F. O.; PEREIRA, T.; SANTOS, W. F. Fissão de um bando de bugio-pretos (*Alouatta caraya*) em mata urbana de Ribeirão Preto-SP. XI Congresso Brasileiro de Primatologia - Porto Alegre, 2005. **Livro de Resumos**-PUCRS, p. 81, 2005.

CARNEIRO, F. S.; SEBBENN, A. M.; KANASHIRO, B.; DEGEN, B. Low Interannual Variation of Mating System and Gene Flow of *Symphonia globulifera* in the Brazilian Amazon. **Biotropica**, v. 39, p. 628-636, 2007.

CARNEIRO, F. S.; DEGEN, B.; KANASHIRO, M.; LACERDA, A. E. B.; SEBBENN, A. M. High levels of pollen dispersal detected through paternity analysis from a continuous *Symphonia globulifera* population in the Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management,** v. 258, p. 1260–1266, 2009.

COLLEVATTI, R. G.; ESTOLANO, R.; GARCIA, S. F.; HAY, J. D. Short-distance pollen dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated neotropical tree. **Tree Genetics & Genomes**, v. 6, p. 555-564, 2010.

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

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

DYER, R. J.; SORK, V. L. Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* (Mill). **Molecular Ecology**, v. 10, p. 859–866, 2001.

GAINO, A. P. S. C.; SILVA, A. M.; MORAES, M. A.; ALVES, P. F.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree species *Myracrodruon urundeuva*. **Conservation Genetics**, v. 11, p. 1631–1643, 2010.

GUARIGUATA, M. R.; PINARD. M. A. Ecological knowledge of regeneration from seed in neotropical Forest trees: Implication for natural Forest management. **Forest Ecology Management**, v. 112, p. 87-99, 1998.

GUIDUGLI, M. C.; CAMPOS T.; SOUSA A. C. B.; FERES J. M.; SEBBENN A. M.; MESTRINER M. A.; CONTEL E. P. B.; ALZATE-MARIN A. L. Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. **Conservation Genetics**, v. 10, p. 1001-1004, 2009.

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

HAMRICK, J. L.; BLANTON, H. M.; HAMRICK, K. J. Genetic structure of geographically marginal populations of ponderosa pine. **American Journal of Botany**, v. 76, p. 1559-1568, 1989.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDi 1. 2: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 618-620, 2002.

HARPER, J. L. **Population biology of plants**. Academic Press, New York, 1977.

HOWE, H. F.; MIRITI, M. N. When Seed Dispersal Matters. **BioScience**, v. 54, p. 651-660, 2004.

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

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**, v. 16, p. 1099–1106, 2007.

LACERDA, C. M. B.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética espacial de duas populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* M. Alemão na região semi-árida, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, p. 145-150, 2003.

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

LÁZARO-JÚNIOR, A. E. **Predação e dispersão de sementes por bugios pretos (*Alouatta caraya*, primates, atelidae) em fragmento florestal na margem esquerda do rio Aquidauana, Anastácio, Mato Grosso do Sul.** Monografia-Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Aquidauana, 2009.

LEITE, E. D. State-of-knowledge on *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae) for Genetic Conservation in Brazil. **Research Journal of Botany**, v. 2, p. 138-160, 2007.

LEPSCH-CUNHA, N.; MORI, S. A. Reproductive phenology and mating potential in a low density tree population of *Couratari multiflora* (Lecythidaceae) in central Amazonia. **Journal of Tropical Ecology**, v. 15, p. 97-121, 1999.

LEVIN, D. A. The paternity pool plants. **The American Naturalist**, v. 132, p. 309–317, 1988.

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**, v. 82, p. 1420-1425, 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 4° ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 352p.

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

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

MURREN, C. J. Spatial and demographic population genetic structure in *Catasetum viridiflavum* across a human-disturbed habitat. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 16, p. 333–342, 2003.

NAKANISHI, A.; TOMARU, N.; YOSHIMARU, H.; MANABE, T.; YAMAMOTO, S. Effects of seed- and pollen-mediated gene dispersal on genetic structure among *Quercus salicina* saplings. **Heredity**, v. 102, p. 182–189, 2009.

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

NETO, J. D. G.; KAGEYAMA, P. Y Estrutura genética espacial em populações naturais de *Machaerium villosum* Vog. (Leguminosae) na região de Mogi-Guaçu, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23, p. 207-215, 2000.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; GALETTI, M. Seed predation of *Cariniana estrellensis* (Lecythidaceae) by black howler monkeys, *Alouatta caraya*. **Primates**, v. 37, p. 87-90, 1996.

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

PERES, C. A. Primate responses to phenological changes in an Amazonian terra firme forest. **Biotropica**, v. 26, p. 98-112, 1994.

PINHEIRO, C. C.; GANADE, G. Influence of microhabitat on the process of seed predation in a degraded area. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 4, p. 20-27, 2009.

RIZZINI, C. T. **Useful Trees and Timber of Brazil Brazilian Dendrology Manual Plants of Brazil**. 2° ed. Edgard Blucher Publishing Ltd., São Paulo, 1978, 304p.

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

SATO, T.; ISAGI, Y.; SAKIO, H.; OSUMI, K.; GOTO, S. Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. **Heredity**, v. 96, p. 79–84, 2006.

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**, v. 15, p. 3231-3243, 2006.

SCHUSTER, W. S.; MITTON, J. B. Paternity and gene dispersal in limber pine (*Pinus flexilis* James). **Heredity**, v. 84, p. 348-361, 2000.

SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffi* Desf. **Heredity**, v. 106, p. 134-145, 2011.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOSVKY, R. Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética espacial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. **Scientia Florestalis**, v. 53, p. 15-30, 1998.

SILVA, J. A.; LEITE, E. J.; SILVEIRA, M.; NASSIF, A. A.; REZENDE, S. J. M. Phytosociological and Floristic Characterization and Natural Regeneration of the undergrowth at Tamandua Forest Genetic Reserve, Brazil. **Ciência Florestal**, v. 14, p. 121-132, 2004.

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

SMULDERS, M. J. M.; COBBEN, M. M. P.; ARENS, P.; VERBOOM, J. Landscape genetics of fragmented forests: anticipating climate change by facilitating migration. **iForest-Biogeosciences and Forestry**, v. 2, p. 128-132, 2009.

SOKAL, R. R; ROHLF, F. J. **Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research**, 3rd ed. WH Freeman, and Company: New York, 1995, 887p.

TOGNON, F. R.; FERMOSELI, A. F. O.; PEREIRA, T. S.; CABRAL, A.; MINEI, C. C.; MARNE, O. G.; HIRANO, Z. M. B.; SANTOS, W. F. Alguns aspectos do comportamento alimentar de um grupo de bugios pretos (*Alouatta caraya*, Humboldt, 1812) em um fragmento de mata no município de Jardinópolis – SP. XI Congresso Brasileiro de Primatologia - Porto Alegre, 2005. **Livro de Resumos**-PUCRS, p. 170, 2005.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 921-935, 2004.

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**, v. 9, p. 559-567, 2008.

YOUNG, A. G.; MERRIAN, H. G.; WARWICK, S. I. The effects of forest fragmentation on genetic variation in Acer saccharum Marsh. (sugar maple) populations. **Heredity,** v. 71, p. 277-289, 1993.

7. ANEXO I

Conserv Genet (2009) 10:1001–1004
DOI 10.1007/s10592-008-9672-4

TECHNICAL NOTE

Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species

Marcela Corbo Guidugli · Tatiana de Campos · Adna Cristina Barbosa de Sousa · Juliana Massimino Feres · Alexandre Magno Sebbenn · Moacyr Antonio Mestriner · Eucleia Primo Betioli Contel · Ana Lilia Alzate-Marin

Received: 1 July 2008 / Accepted: 12 August 2008 / Published online: 29 August 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract From a genomic library enriched for GA/CA repeats, 15 highly polymorphic microsatellite markers were developed for *Cariniana estrellensis*, a tropical forest tree. The microsatellite loci were screened in 49 mature trees found between Pardo river and Mogi-Guaçu river basins, in the state of São Paulo, Brazil. A total of 140 alleles were detected with an average of 9.33 alleles per locus. The expected heterozygosity ranged from 0.37 to 0.88. These loci showed a high probability of paternity exclusion. Additionally, 12 loci were effectively transferred to *Cariniana legalis*. High levels of polymorphism make the present SSR markers useful for population genetic studies.

Keywords Conservation genetics · Forest · Genetic diversity · Jequitibá branco · Molecular marker · SSR

The deforestation and concomitant large-scale fragmentation of the tropical forest have been rapid and extensive in recent decades. For management and conservation of tree populations in such heterogeneous habitats, it is important to know the reproductive patterns and the distances of effective gene flow mediated by pollen and seeds. Microsatellite markers have been used as a very effective tool to generate useful information for the endangered species conservation (Ferreira-Ramos et al. 2007). *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae), commonly known as jequitibá branco, is a wide-ranging tropical tree species occurring in Brazil, Bolivia, Paraguay and Peru. This hermaphroditic species is pollinated by bees and dispersed by wind (Leite 2007). Its wood is widely used in Brazil for general construction purposes and carpentry. Due to high deforestation rates in its native range, *C. estrellensis* is considered an endangered species. We developed microsatellite (SSR) loci for *C. estrellensis* in order to facilitate detailed studies of genetic structure, gene flow and mating system in this species. Besides, we investigated the transferability of these loci to *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze a close relative of *C. estrellensis*.

A $(GA)_n$ and $(CA)_n$ microsatellite-enriched library was constructed according to the method employed by Billotte et al. (1999), using a biotin-labeled microsatellite oligoprobe and streptavidin-coated magnetic beads. Total genomic DNA was extracted from leaf tissue according to Doyle and Doyle (1990) and was digested with *Rsa*I restriction enzyme. The fragments were then linked to adapters (Rsa21 5′-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3′ and Rsa25 5′-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3′). The library was enriched for dinucleotide sequences, using biotinylated $(CT)_8$ and $(GT)_8$. Streptavidin-coated paramagnetic beads and a magnetic rack were employed for recovering the fragments containing microsatellites. Selected fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR), using the Rsa21 adapter as a primer, and were then linked to the pGEM-T vector (Promega). Plasmids were introduced into

M. C. Guidugli · J. M. Feres · M. A. Mestriner · E. P. B. Contel · A. L. Alzate-Marin (✉)
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Genética, Laboratório de Genética Vegetal, Universidade de São Paulo (USP), Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto 14049-900, SP, Brazil
e-mail: anaalzate@rge.fmrp.usp.br

T. de Campos · A. C. B. de Sousa
Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas 13083-970, SP, Brazil

A. M. Sebbenn
Instituto Florestal de São Paulo, Estação Experimental de Tupi, P.O. Box 122, São Paulo 01059-970, SP, Brazil

Table 1 Characteristics of 15 microsatellite loci isolated from *Cariniana estrellensis*

Primer name Accession no.	Primer sequence 5′–3′	Repeat motif	Expected fragment size and observed range (bp)	*Ta* (°C)	*A*	H_O	H_E	*Pr*(*Ex*1)	*Pr*(*Ex*2)	Deviation from HWE
Ces01	F:CCTTTTAATACCTTTTATTGC	$(CA)_9$	154	48	10	0.46	0.80	0.553	0.377	ND
EU735165	R:CCATCTCATCCTAATATATTTTC		146–170							
Ces02	F:GGACATGGGTTGTTATCCG	$(ATAC)_4(AC)_{15}$	183	57	9	0.47	0.83	0.522	0.349	ND
EU735166	R:TCTCAACCTCAAAATGTAATAGC		177–203							
Ce03	F:GGTGTATCCTAAGGTAGAGC	$(AC)_{10}$	209	50	7	0.37	0.70	0.707	0.525	ND
EU735167	R:CCTTTGGAAGATATGGAAG		201–215							
Ces04	F:AGCATCCTTTGAATTGG	$(TC)_{16}$	187	48	18	0.81	0.86	0.436	0.277	NS
EU735168	R:CTTCAAAGTAAAGATATAAAAC		183–219							
Ce05	F:CCAGATTGATAAGCTACTCC	$(AC)_{11}$	149	53	10	0.23	0.88	0.415	0.259	ND
EU735169	R:CATTCAAGCAAGTCAAACC		145–165							
Ces06	F:GGGGCATATGTTTATTATTC	$(AC)_6AG(AC)_3$	199	53	9	0.45	0.85	0.478	0.311	ND
EU735170	R:GTGGTAAATCACAAATGTGC	$AGG(AC)_{12}$	197–217							
Ces07	F:TTGTAAAAACGGCATGTCC	$(GA)_{16}$	192	53	10	0.43	0.82	0.533	0.360	ND
EU735171	R:GTTCGGAACAGACAAAGAGG		184–208							
Ces09	F:CAGAGTTTTTCAATAGCGG	$(TG)_2CG(TG)_9$	187	48	6	0.33	0.38	0.919	0.773	NS
EU735172	R:TTTCATTGCAATCATAGGC		185–197							
Ces10	F:GGGCAGACCAAATCAAGAG	$(CA)_8$	200	49	7	0.46	0.70	0.710	0.536	ND
EU735173	R:GCCATTCATAAACCATTCAAG		196–214							
Ces11	F:AAGTAATTTCATTCTCAAGTGG	$(CT)_{25}$	232	48	12	0.77	0.85	0.455	0.292	NS
EU735174	R:GTTCTGATATGGGCTTTCC		220–244							
Ces12	F:ACGCACTTTCTCAATTCC	$(TG)_{12}C(GT)_{11}$	287	48	6	0.31	0.76	0.639	0.461	ND
EU735175	R:TGTAGACTTGTAGGATAAATGG		279–293							
Ces13	F:CTGAAGGGACTGAGGGG	$(CA)_{16}$	156	48	5	0.45	0.69	0.743	0.583	ND
EU735176	R:ATATCAGGAGGTTAAGGGC		152–164							
Ces14	F:CTGGTAAGCTCTTGGTTGTG	$(TG)_{13}$	188	51	6	0.08	0.37	0.929	0.794	ND
EU735177	R:CCATGGGTTTTCTGTTTCC		176–196							
Ces16	F:GGACATACCTGCCAAAAC	$(CA)_{11}$	202	51	12	0.60	0.82	0.539	0.363	ND
EU735178	R:AGAGTTAGTTGCTGTTATATGG		196–226							
Ces18	F:ATAATCATGACCTGTGCC	$(GT)_6$	160	51	13	0.66	0.70	0.696	0.522	NS
EU735179	R:GTCCCTGATCAAGTATGC		156–184							
					9.33[a]	0.46[a]	0.73[a]	0.9996[b]	0.9999[b]	

Ta°C, annealing temperature; *A*, total number of alleles per locus; H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity; *Pr*(*Ex*1) and *Pr*(*Ex*2), paternity exclusion probabilities; HWE, Hardy–Weinberg equilibrium; NS, not significant ($P > 0.05$); ND, significant ($P < 0.05$)

[a] Average

[b] Cumulative probability of exclusion

Escherichia coli XL-1 Blue strains. Transformed cells were grown on Petri dishes with Luria–Bertani (LB) agar medium containing ampicilin (100 μg ml^{-1}) and X-galactosidase (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactoside) (50 μg ml^{-1}). A total of 54 positive clones were sequenced using an ABI 377 and the Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems), and 37 presented microsatellite sequences. Only 19 SSR were selected for primers design because their sequences presented more than five tandem repeats. Primers were designed with the software PRIMER3 (Rozen and Skaletsky 2000).

Microsatellite loci were amplified by PCR in a final volume of 10 μl containing 0.3 μM of each primer, 1 U *Taq* DNA polymerase, 0.25 mM of each dNTP, 1× $MgCl_2$-free reaction buffer [75 mM Tris–HCl pH 9.0, 50 mM KCl and 20 mM $(NH_4)_2SO_4$], 1.5 mM $MgCl_2$ and 2.5 ng of template DNA. The PCR profile used to amplify the microsatellites was 96°C for 5 min; 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at *T*a°C (Table 1) for 1 min, 72°C for 1 min, and a final elongation step at 72°C for 7 min. Amplifications were performed with a MasterCycler Eppendorf. PCR products were denatured and separated on 10% denaturing polyacrylamide gels stained with silver nitrate. Allele sizes were estimated by comparison to a 10 bp DNA ladder standard (Invitrogen).

Mendelian analyses were confirmed for each locus, based on analysis of two mother trees and their open-pollinated family. For the polymorphism evaluation, we sampled 49 mature trees of *C. estrellensis* from quite a wide area, located at Ribeirão Preto region, between Pardo river and Mogi-Guaçu river basins, in the state of São Paulo, Brazil. Genetic diversity parameters and probabilities of paternity exclusion were estimated using CERVUS version 3.0 (Kalinowski et al. 2007). FSTAT software package version 2.9.3 (Goudet 2002) was used to test all loci for linkage disequilibrium, applying Bonferroni correction for multiple comparisons.

Nineteen primer pairs were tested in a minimum of 10 individuals. From these 19, 15 amplified the expected size fragment while the others showed no amplification, multibanding patterns or pronounced stutters. Mendelian inheritance was confirmed for all 15 microsatellite loci, based on the analysis of two mother trees and their open-pollinated family (15 individuals per family). All sibs displayed at least one of the maternal alleles. The 15 microsatellite loci were selected to screen the 49 mature trees from the Ribeirão Preto region. For this group, 140 alleles were identified and the number of alleles per locus ranged from 5 to 18, with an average of 9.33. The observed and expected heterozygosities ranged from 0.08 to 0.81 and from 0.37 to 0.88, respectively (Table 1).

For all loci, except Ces04, Ces09, Ces11 and Ces18, the genotypic frequencies showed significant departures from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE). The observed departure from HWE is likely due to Wahlund effect (scattered trees sampled across a large area). Only one significant linkage disequilibrium was found between loci Ces04 and Ces07. The paternity exclusion probability, corresponding to the power with which a locus excludes a tree of being the parent of an offspring, reached 0.9996 for the first parent and 0.9999 for the second parent over all 15 loci (Table 1). Nevertheless, the microsatellite markers developed will allow detailed parentage studies in natural populations even in situations where both maternity and paternity are unknown.

Additionally, transferability of the 15 primer pairs was tested in *C. legalis* using the same PCR and polymorphism detection protocol described above. Twelve markers (80%) amplified for *C. legalis* (Table 2). The results indicated that there is a high potential for transferring microsatellite markers between species of the same genus in the Lecythidaceae family.

The battery of microsatellite markers developed are highly variable and sufficiently informative to investigate refined questions of mating system, gene flow, family structure and population dynamics of the tropical tree species *C. estrellensis*. Future studies with this set of microsatellite markers will also allow their use to genetic analysis in related taxa. We plan to use these markers to estimate mating system and conduct paternity analyses of *C. estrellensis* in southeast Brazil.

Table 2 Transferability of 15 microsatellite loci developed for *Cariniana estrellensis* to *Cariniana legalis*. Allele size range (bp) based on seven individuals of *C. legalis*

Loci	Allele size range (bp)	*T*a°C
Ces01	Na	48
Ces02	179	57
Ces03	207–225	50
Ces04	Na	48
Ces05	149–161	53
Ces06	159	53
Ces07	184–198	53
Ces09	185	48
Ces10	196–228	49
Ces11	Na	48
Ces12	279–283	48
Ces13	152–154	48
Ces14	150–174	51
Ces16	204–208	51
Ces18	170–182	51

Na, no amplification; *T*a°C, annealing temperature

Acknowledgements This work was financed by a grant from São Paulo State Government to Ana Lilia Alzate-Marin: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 03/04199-4. We also acknowledge the support of Pró-Reitoria de Pesquisa and Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) of São Paulo University. This study is part of the postgraduate work of first author. Ana Lilia Alzate-Marin was supported by Researcher assistantship from FAPESP. Marcela Corbo Guidugli was supported by a doctoral fellowship of FAPESP (07/04787-4). The authors would like to thank to Dr. Anete Pereira de Souza for scientific support and Ronai Ferreira Ramos for technical support in primers design.

References

Billotte N, Lagoda PJL, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. Fruits 54:277–288

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13–15

Ferreira-Ramos R, Laborda PR, Santos MO, Mayor MS, Mestriner MA, Souza AP, Alzate-Marin AL (2007) Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. Conserv Genet. doi: 10.1007/s10592-007-9458-0

Goudet J (2002) FSTAT version 2.9.3.2. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Available at: http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm. Accessed 20 May 2008

Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Mol Ecol 16:1099–1106. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x

Leite EJ (2007) State-of-knowledge on *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae) for genetic conservation in Brazil. Res J Bot 2:138–160

Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, pp 365–386. Available at: http://www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi. Accessed 05 June 2008

8. ANEXO II

Genetics and Molecular Biology, 33, 1, 131-134 (2010)
Copyright © 2009, Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil
www.sbg.org.br

Short Communication

Genetic characterization of 12 heterologous microsatellite markers for the giant tropical tree *Cariniana legalis* (Lecythidaceae)

Marcela Corbo Guidugli[1], Klaus Alvaro Guerrieri Accoroni[1], Moacyr Antonio Mestriner[1], Eucleia Primo Betioli Contel[1], Carlos Alberto Martinez[2] and Ana Lilia Alzate-Marin[1]

[1]*Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.*
[2]*Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.*

Abstract

Twelve microsatellite loci previously developed in the tropical tree *Cariniana estrellensis* were genetically characterized in *Cariniana legalis*. Polymorphisms were assessed in 28 *C. legalis* individuals found between the Pardo and Mogi-Guaçu River basins in the state of São Paulo, Brazil. Of the 12 loci, 10 were polymorphic and exhibited Mendelian inheritance. The allelic richness at each locus ranged from 2-11, with an average of 7 alleles per locus, and the expected heterozygosity ranged from 0.07-0.88. These loci showed a high probability of paternity exclusion. The characteristics of these heterologous microsatellite markers indicate that they are suitable tools for investigating questions concerning population genetics in *C. legalis*.

Key words: conservation, jequitibá rosa, population genetics, SSR markers, transferability.

Received: March 18, 2009; Accepted: July 1, 2009.

Cariniana legalis (Mart.) Kuntze, commonly known as jequitibá rosa, is a woody tree species of the Lecythidaceae family with late successional characteristics (Lorenzi, 2002). Its flowers are hermaphroditic and are pollinated by bees; dispersion is anemochorous (Sebbenn *et al.*, 2000). Jequitibá rosa is known as one of the giant trees of the Atlantic Rain Forest, reaching 60 m in height and 4 m in diameter (Kageyama *et al.*, 2003). In Brazil, *C. legalis* wood is widely used for general construction purposes and carpentry (Lorenzi, 2002). Unfortunately, the *C. legalis* population has been dramatically reduced by habitat destruction and exploitation of its timber (Sebbenn *et al.*, 2000). To develop strategies for the sustainable management and conservation of this species, an understanding of the effects of spatial isolation on genetic diversity and gene flow is crucial. Although allozymes have been surveyed in *C. legalis* for purposes such as assessing its mating system (Sebbenn *et al.*, 2000), very little is known about the fine-scale population structure of this species.

Simple sequence repeat (SSR) markers have become the marker class of choice for population genetic studies because they are (mostly) co-dominant, abundant in genomes, highly reproducible, and some have high rates of transferability across species (Saha *et al.*, 2006). The widespread use of microsatellites has been limited by the fact that the initial identification of the marker is expensive. Consequently, researchers have tried to use microsatellite markers developed for one species in other species by means of transferability analysis (Roa *et al.*, 2000). Recently, Guidugli *et al.* (2008) developed 15 polymorphic microsatellite markers for *Cariniana estrellensis* and demonstrated the transferability of 12 of these primer pairs to *C. legalis* based on amplification of just seven individuals. Therefore, in this study, characteristics of 12 heterologous loci were investigated using 28 *C. legalis* individuals in order to confirm the general applicability of these markers for genetic studies of this species.

For the genetic analysis, we collected leaves from 28 reproductive *C. legalis* adults located between the Pardo and Mogi-Guaçu River basins in the state of São Paulo in southeastern Brazil. This large area, the Ribeirão Preto region, is highly impacted by agricultural practices (Figure 1). The collection of leaves from the tall trees was a very laborious task, requiring the employment of specialized tree climbers. The geographic coordinates of all sampled individuals were recorded using GPS (GARMIN eTrex® Vista Cx), and the plant tissues were stored at -20 °C until DNA extraction. Total genomic DNA was extracted from frozen leaf tissues based on the protocol described by

Send correspondence to Ana Lilia Alzate-Marin. Laboratório de Genética Vegetal, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. E-mail: anaalzate@rge.fmrp.usp.br.

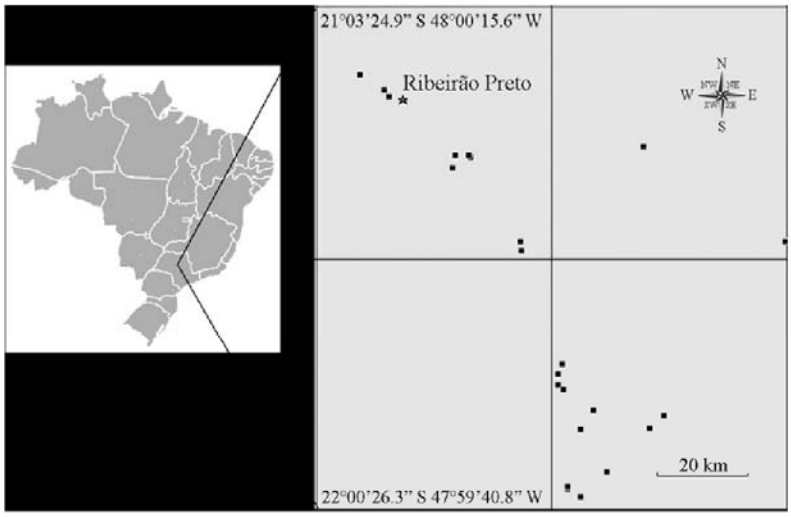

Figure 1 - Geographic location of the *Cariniana legalis* individuals sampled in southeastern Brazil for assessment by SSR loci.

Doyle and Doyle (1990), with minor modifications. Purity and concentration of the genomic DNA were determined with a spectrophotometer (Spectronic Genesys 5).

Each primer pair previously transferred to *C. legalis* from *C. estrellensis* (Guidugli *et al.*, 2008) was screened with polymerase chain reactions (PCR) at 13 annealing temperatures (between 46-58 °C) in 10 *C. legalis* individuals in order to optimize heterologous amplification. PCR amplifications were carried out in a final reaction volume of 10 µL containing 0.3 µM of each primer, 1 U *Taq* DNA polymerase, 0.25 mM of each dNTP, 1 x $MgCl_2$-free reaction buffer [75 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl and 20 mM $(NH_4)_2SO_4$], 1.5 mM $MgCl_2$ and 2.5 ng of template DNA. Amplifications were performed in a MasterCycler (Eppendorf) according to the following protocol: 5 min at 96 °C followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C; 1 min at the annealing temperature defined for each primer (Table 1); 1 min at 72 °C; and a final elongation step of 7 min at 72 °C. PCR products were denatured and separated on 10% denaturing polyacrylamide gels stained with silver nitrate. Allele sizes were estimated using a DNA ladder (10 bp - Invitrogen) and the original DNA clone from which the SSR locus was developed.

Mendelian inheritance was investigated for each locus based on analysis of one mother tree and 20 open-pollinated offspring. Polymorphic loci were characterized with regard to the number of alleles per locus (A), as well as expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosities for each locus and averaged over all loci, using the GDA software (Lewis and Zaykin, 2002). Hardy-Weinberg equilibrium was tested by Fisher's exact test. FSTAT software package version 2.9.3.2 (Goudet, 2002) was used to test linkage disequilibrium for all loci, applying the Bonferroni correction for multiple comparisons (Rice, 1989). Probabilities of paternity exclusion were estimated using CERVUS version 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007). We also checked the presence of null alleles using the MICRO-CHECKER 2.2.3 program (van Oosterhout *et al.*, 2004).

Our results confirmed the amplification efficiency of the 12 heterologous microsatellite markers for *C. legalis.* Of these, two (16.7%) were monomorphic in the sample of 28 individuals, and the other 10 were polymorphic, showing clear allele size variation (Table 1). Satisfactory amplification products were obtained using eight annealing temperatures ranging from 46-57 °C (Table 1). Mendelian inheritance was verified for all 10 SSR loci in the open-pollinated family. All siblings displayed at least one of the maternal alleles, confirming Mendelian inheritance.

A total of 70 alleles were found at the ten polymorphic microsatellite loci in the 28 reproductive adults. The number of alleles detected in this species ranged from 2 (Ces02) to 11 (Ces03) (Table 1). Most of the successful loci exhibited less allelic variation than was found in the species from which they were developed (average = 8.5; Guidugli *et al.*, 2008). The patterns described above are consistent with earlier studies showing reduced polymorphism in target species as compared to source species in cross-species amplification studies (Ciampi *et al.*, 2008; Feres *et al.*, 2009). According to Peakall *et al.* (1998), related products amplified in different species might include mutations, rearrangements and duplications in the flanking region, causing changes in the number of repeats, which could cause the reduction in polymorphism.

The average observed heterozygosity was 0.32, and expected heterozygosities ranged from 0.07 to 0.88 across loci, with an average of 0.64 (Table 1). This value for average expected heterozygosity in *C. legalis* is higher than that in other tropical trees: *Carapa guianensis* (H_E = 0.61, Dayanandan *et al.*, 1999), *Swietenia humilis* (H_E = 0.53, White *et al.*, 1999) and *Solanum lycocarpum* (H_E = 0.33,

Table 1 - Characteristics of 12 heterologous microsatellite markers for *Cariniana legalis*.

Primer name	Accession number	Primer sequence 5'-3'	Observed fragment size range (bp)	*Ta* (°C)	*A*	H_O	H_E	*Pr*(*Ex*1)	*Pr*(*Ex*2)	Dev. HWE
Ces02	EU735166	F:GGACATGGGTTGTTATCCG R:TCTCAACCTCAAAATGTAATAGC	163-165	57	2	0	0.07	0.998	0.967	0.021
Ces03	EU735167	F:GGTGTATCCTAAGGTAGAGC R:CCTTTGGAAGATATGGAAG	207-235	50	11	0.50	0.86	0.460	0.297	< 0.001
Ces05	EU735169	F:CCAGATTGATAAGCTACTCC R:CATTCAAGCAAGTCAAACC	149-163	53	6	0.43	0.73	0.680	0.501	< 0.001
Ces06	EU735170	F:GGGGCATATGTTTATTATTC R:GTGGTAAATCACAAATGTGC	159	51	1	-	-	-	-	-
Ces07	EU735171	F:TTGTAAAAACGGCATGTCC R:GTTCGGAACAGACAAAGAGG	178-202	51	10	0.74	0.87	0.451	0.289	0.009
Ces09	EU735172	F:CAGAGTTTTTCAATAGCGG R:TTTCATTGCAATCATAGGC	185	48	1	-	-	-	-	-
Ces10	EU735173	F:GGGCAGACCAAATCAAGAG R:GCCATTCATAAACCATTCAAG	196-228	49	6	0.44	0.59	0.799	0.621	0.013
Ces12	EU735175	F:ACGCACTTTCTCAATTCC R:TGTAGACTTGTAGGATAAATGG	265-287	46	10	0.26	0.88	0.417	0.261	< 0.001
Ces13	EU735176	F:CTGAAGGGACTGAGGGG R:ATATCAGGAGGTTAAGGGC	142-156	47	5	0.16	0.59	0.817	0.680	< 0.001
Ces14	EU735177	F:CTGGTAAGCTCTTGGTTGTG R:CCATGGGTTTTCTGTTTCC	180-186	51	4	0.24	0.29	0.958	0.846	0.254
Ces16	EU735178	F:GGACATACCTGCCAAAAC R:AGAGTTAGTTGCTGTTATATGG	204-214	51	6	0.07	0.71	0.695	0.514	< 0.001
Ces18	EU735179	F:ATAATCATGACCTGTGCC R:GTCCCTGATCAAGTATGC	166-186	51	10	0.40	0.84	0.499	0.330	< 0.001
Average[1]/Cumulative probability of exclusion[2]						0.32[1]	0.64[1]	0.872[2]	0.999[2]	

Ta °C, annealing temperature; *A*, total number of alleles per locus; H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity; *Pr*(*Ex*1) and *Pr*(*Ex*2), paternity exclusion probabilities; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium; Significance ($p < 0.05$).
Dev. HWE: deviation from HWE.

Martins *et al.*, 2006). A heterozygote deficiency was observed for the majority of loci, most likely due to the sampling of individuals used for locus characterization (the Wahlund effect) or the presence of null alleles. In fact, the null allele test (MICRO-CHECKER, van Oosterhout *et al.*, 2004) revealed that several loci (Ces02, Ces03, Ces05, Ces12, Ces13, Ces16 and Ces18) showed evidence of null alleles. Furthermore, because the results were obtained using microsatellites developed in a different species, the probability of occurrence of a null allele is much higher than in the case of testing the species from which they were isolated (Kim *et al.*, 2004).

For all loci except Ces14, the genotypic frequencies showed significant departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). None of the loci showed significant linkage disequilibrium after a sequential Bonferroni correction for multiple tests, indicating that these markers are appropriate for population genetics studies. The SSR profiles generated by the ten heterologous primer pairs were able to distinguish all 28 *C. legalis* individuals sampled in southeastern Brazil. The first estimate of paternity exclusion probability *Pr*(*Ex*1), when the offspring was sampled but the mother was not, was 0.872 for the combined loci. The second estimate, *Pr*(*Ex*2), when both the mother and the offspring were sampled, was 0.999 over all 10 loci (Table 1). The combined probabilities of paternity exclusion were very high, demonstrating that these markers represent an important tool that will permit more refined and challenging questions regarding gene flow and parentage in natural populations of *C. legalis* to be addressed.

In conclusion, this study characterized a novel set of heterologous microsatellite markers for *C. legalis*. These markers provide a new approach for generating fundamental data important for devising sound conservation procedures for this species.

Acknowledgments

This study was supported by FAPESP (A.L.A.M. #03/04199-4), Research Pro-Rectory of São Paulo University (A.L.A.M.) and FAEPA (M.A.M.) grants. This study is part of the graduate work of first author. A.L.A.M. was supported by a researcher assistantship from CNPq (PD Senior 150277/2009-1). C.A.M. is a fellow researcher of CNPq. M.C.G. and K.A.G.A. were supported by FAPESP fellowships. A.L.A.M., M.A.M. and C.A.M. are CEEFLORUSP members.

References

Ciampi AY, Azevedo VCR, Gaiotto FA, Ramos ACS and Lovato MB (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. Mol Ecol Res 8:1074-1077.

Dayanandan S, Dole J, Bawa K and Kesseli R (1999) Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). Mol Ecol 8:1585-1592.

Doyle JJ and Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Feres JM, Martinez MLL, Martinez CA, Mestriner MA and Alzate-Marin AL (2009) Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*. Mol Ecol Res 9:434-437.

Guidugli MC, Campos T, Sousa ACB, Feres JM, Sebbenn AM, Mestriner MA, Contel EPB and Alzate-Marin AL (2008) Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. Conserv Genet 10:1001-1004.

Kageyama PY, Sebbenn AM, Ribas LA, Gandara FB, Castellen M, Perecim MB and Vencovsky R (2003) Genetic diversity in tropical tree species from different successional stages determined with genetic markers. Sci For 64:93-107.

Kalinowski ST, Taper ML and Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Mol Ecol 16:1099-1106.

Kim KS, Min MS, An JH and Lee H (2004) Cross-species amplification of Bovidae microsatellites and low diversity of the endangered Korean Goral. J Hered 95:521-525.

Lorenzi H (2002) Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo das Plantas Arbóreas do Brasil. 4th edition. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 368 pp.

Martins K, Chaves LJ, Buso GSC and Kageyama PY (2006) Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. Conserv Genet 7:957-969.

Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M and Rafalski A (1998) Cross species amplification of soybean (*Glycine max*) simple-sequence-repeats (SSRs) within the genera and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. Mol Biol Evol 15:1275-1287.

Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. Evolution 43:223-225.

Roa AC, Chavarriaga-Aguirre P, Duque MC, Maya MM, Bonierbale MW, Iglesias C and Tohme J (2000) Cross-species amplification of Cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: Allelis polymorphism and degree of relationship. Am J Bot 87:1647-1655.

Saha MC, Cooper JD, Mian MAR, Chekhovskiy K and May GD (2006) Tall fescue genomic SSR markers: Development and transferability across multiple grass species. Theor Appl Genet 113:1449-1458.

Sebbenn AM, Kageyama PY, Siqueira ACMF and Zanatto ACS (2000) Mating system in populations of *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze: Implications for genetics conservation and improvement. Sci For 58:25-40.

van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP and Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol Ecol Notes 4:535-538.

White GM, Boshier DH and Powell W (1999) Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis*. Zucc. Mol Ecol 8:1899-1909.

Internet Resources

Lewis PO and Zaykin D (2002) Genetic data analysis: Computer program for the analysis of allelic data, v. 1.1. http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php (January 20, 2009).

Goudet J (2002) FSTAT Software, v. 2.9.3.2. http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm (February 17, 2009).

Associate Editor: Márcio de Castro Silva Filho

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

9. ANEXO III

Anexo 3. Descrição das árvores adultas de *C. estrellensis* remanescentes no fragmento florestal em estudo: posição geográfica (GPS) e circunferência a altura do peito (CAP).

Indivíduos Adultos	GPS		CAP
Matriz 1	S21°17’47.8”	W47°40’29.3”	2,95 m
Matriz 2	S21°17’47.5”	W47°40’28.8”	3,00 m
Matriz 3	S21°17’48.1”	W47°40’29.0”	2,91 m
Matriz 4	S21°17’48.0”	W47°40’28.9”	2,23 m
Matriz 5	S21°17’48.8”	W47°40’28.0”	3,72 m
Matriz 6	S21°17’48.9”	W47°40’27.7”	2,36 m
Matriz 7	S21°17’49.2”	W47°40’28.2”	1,77 m
Matriz 8	S21°17’50.3”	W47°40’27.3”	1,62 m
Matriz 9	S21°17’49.1”	W47°40’28.8”	2,47 m
Matriz 10	S21°17’49.4”	W47°40’29.6”	2,20 m
Matriz 11	S21°17’49.4”	W47°40’29.4”	0,98 m
Matriz 12	S21°17’50.2”	W47°40’30.2”	1,20 m
Matriz 13	S21°17’50.1”	W47°40’28.7”	1,95 m
Matriz 14	S21°17’51.0”	W47°40’30.8”	2,80 m
Matriz 15	S21°17’52.3”	W47°40’28.5”	2,80 m
Matriz 16	S21°17’51.3”	W47°40’29.1”	5,00 m
Matriz 17	S21°17’51.8”	W47°40’26.8”	1,80 m
Matriz 18	S21°17’52.9”	W47°40’24.0”	1,50 m
Matriz 19	S21°17’52.8”	W47°40’23.7”	1,20 m
Matriz 20	S21°17’47.8”	W47°40’28.3”	0,94 m
Matriz 21	S21°17’55.7”	W47°40’22.5”	5,00 m
Matriz 22	S21°17’58.7”	W47°40’21.9”	1,80 m
Matriz 23	S 21°17’48.5”	W 47°40’28.1”	1,20 m
Matriz 24	S 21°17’49.4”	W 47°40’26.0”	5,00 m
Matriz 25	S 21°17’52.4”	W 47°40’23.3”	2,00m
Matriz 26	S 21°17’50.5”	W 47°40’27.7”	2,26 m
Matriz 27	S21°17’50.0”	W47°40’28.4”	1,11 m
Matriz 28	S21°17’49.0”	W47°40’28.0”	2,60 m
Matriz 29	S21°17’50.9”	W47°40’25.8”	3,10 m
Matriz 30	S21°17’54.2”	W47°40’22.0”	2,00 m

10. ANEXO IV

Anexo 4. Posição geográfica (GPS) dos indivíduos regenerantes de *C. estrellensis* amostrados nesta pesquisa.

Indivíduos Regenerantes	GPS	
Regenerante 1	S21°17' 53.0"	W47°40' 24.6"
Regenerante 2	S21°17' 53.8"	W47°40' 22.2"
Regenerante 3	S21°17' 53.6"	W47°40' 22.1"
Regenerante 4	S21°17' 54.5"	W47°40' 21.0"
Regenerante 5	S21°17' 54.0"	W47°40' 21.0"
Regenerante 6	S21°17' 58.7"	W47°40' 21.9"
Regenerante 7	S21°17' 57.0"	W47°40' 23.0"
Regenerante 8	S21°17' 56.5"	W47°40' 23.0"
Regenerante 9	S21°17' 50.7"	W47°40' 28.5"
Regenerante 10	S21°17' 51.6"	W47°40' 27.0"
Regenerante 11	S21°17' 52.3"	W47°40' 26.8"
Regenerante 12	S21°17' 52.7"	W47°40' 25.5"
Regenerante 13	S21°17' 56.1"	W47°40' 22.6"
Regenerante 14	S21°17' 56.2"	W47°40' 22.3"
Regenerante 15	S21°17' 55.9"	W47°40' 23.6"
Regenerante 16	S21°17' 54.9"	W47°40' 25.7"
Regenerante 17	S21°17' 55.1"	W47°40' 24.9"
Regenerante 18	S21°17' 54.9"	W47°40' 25.8"
Regenerante 19	S21°17' 54.7"	W47°40' 25.6"
Regenerante 20	S21°17' 55.0"	W47°40' 26.8"
Regenerante 21	S21°17' 54.6"	W47°40' 26.4"
Regenerante 22	S21°17' 54.2"	W47°40' 25.4"
Regenerante 23	S21°17' 54.0"	W47°40' 25.0"
Regenerante 24	S21°17' 54.0"	W47°40' 25.0"
Regenerante 25	S21°17' 54.8"	W47°40' 25.8"
Regenerante 26	S21°17' 55.0"	W47°40' 26.0"
Regenerante 27	S21°17' 54.3"	W47°40' 26.4"
Regenerante 28	S21°17' 54.0"	W47°40' 26.0"
Regenerante 29	S21°17' 54.2"	W47°40' 26.2"
Regenerante 30	S21°17' 54.3"	W47°40' 26.3"
Regenerante 31	S21°17' 54.0"	W47°40' 26.0"
Regenerante 32	S21°17' 54.6"	W47°40' 27.5"
Regenerante 33	S21°17' 57.2"	W47°40' 22.9"
Regenerante 34	S21°17' 56.9"	W47°40' 22.6"
Regenerante 35	S21°17' 55.7"	W47°40' 24.2"
Regenerante 36	S21°17' 55.4"	W47°40' 23.8"
Regenerante 37	S21°17' 54.3"	W47°40' 25.9"
Regenerante 38	S21°17' 54.0"	W47°40' 26.0"
Regenerante 39	S21°17' 54.4"	W47°40' 26.1"

11. ANEXO V

Anexo 5. Frequências alélicas para 9 locos microssatélites em quatro gerações de uma pequena população de *Cariniana estrellensis* localizada no interior do Estado de São Paulo.

Locos	Alelos (pb)	Matrizes	Progênies 2007	Progênies 2008	Regenerantes
Ces01	148	0,482143	0,437831	0,461538	0,578947
	150	----	0,002646	0,002137	----
	152	0,017857	0,021164	0,012821	0,039474
	154	0,178571	0,230159	0,279915	0,171053
	156	0,071429	0,033069	0,023504	0,026316
	158	0,017857	----	----	0,026316
	168	0,053571	0,014550	0,002137	0,144737
	172	0,017857	0,050265	0,059829	----
	174	0,160714	0,210317	0,158120	0,013158
Ces02	179	0,071429	0,113281	0,059211	0,058824
	181	0,285714	0,274740	0,236842	0,323529
	183	0,196429	0,152344	0,146930	0,250000
	187	0,160714	0,139323	0,149123	0,294118
	189	0,035714	0,006510	----	0,044118
	199	0,125000	0,160156	0,184211	----
	201	0,125000	0,153646	0,223684	0,029412
Ces04	181	0,259259	0,109848	0,146694	0,289474
	183	0,166667	0,220960	0,225207	0,131579
	185	0,166667	0,292929	0,214876	0,092105
	187	0,166667	0,078283	0,066116	0,039474
	189	0,018519	0,073232	0,051653	0,013158
	191	----	0,001263*	----	----
	193	----	----	----	0,013158*
	197	0,037037	0,011364	0,047521	0,131579
	199	0,037037	0,030303	0,006198	0,078947
	201	0,018519	0,015152	0,066116	0,013158
	203	----	0,001263	----	0,013158
	205	0,018519	0,049242	0,055785	0,026316
	207	0,037037	0,018939	0,012397	0,118421
	208	0,018519	----	0,002066	0,026316
	213	0,055556	0,097222	0,105372	0,013158
Ces09	185	0,034483*	----	----	----
	187	0,810345	0,927027	0,925764	0,796875
	189	0,034483	0,043243	0,019651	0,046875
	191	0,017241	----	----	0,031250
	193	0,103448	0,029730	0,054585	0,125000

Continuação Anexo 5.

Locos	Alelos (pb)	Matrizes	Progênies 2007	Progênies 2008	Regenerantes
Ces10	196	0,517241	0,554124	0,413717	0,564103
	200	0,017241	0,009021	0,033186	0,089744
	208	0,017241*	----	----	----
	212	0,051724	0,001289	----	0,012821
	216	0,396552	0,435567	0,553097	0,333333
Ces11	216	0,017857	0,001319	----	----
	218	0,125000	0,212401	0,250000	0,197368
	222	0,017857	0,007916	----	0,065789
	224	0,071429	0,081794	0,164352	0,078947
	226	0,017857	----	0,002315	0,013158
	228	0,107143	0,211082	0,087963	0,013158
	230	0,214286	0,162269	0,222222	0,276316
	232	0,267857	0,141161	0,104167	0,144737
	240	0,142857	0,180739	0,138889	0,197368
	242	----	----	0,030093*	----
	246	0,017857	0,001319	----	0,013158
Ces13	152	0,178571	0,034483	0,089744	0,128571
	154	0,589286	0,700265	0,651709	0,685714
	156	----	----	0,014957	0,014286
	160	0,232143	0,265252	0,243590	0,171429
Ces14	188	0,035714	0,014550	0,099526	----
	190	0,875000	0,904762	0,793839	0,971429
	192	0,017857	0,002646	----	----
	194	0,017857	0,002646	----	----
	196	0,053571	0,075397	0,106635	0,028571
Ces18	160	----	----	----	0,012821*
	164	0,016667*	----	----	----
	168	0,566667	0,534005	0,410314	0,500000
	170	0,300000	0,400504	0,434978	0,294872
	178	0,033333*	----	----	----
	180	0,016667*	----	----	----
	182	0,050000	0,061713	0,087444	0,153846
	186	0,016667	0,003778	0,067265	0,038462

* alelos exclusivos; -- ausência do alelo no loco.