

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação do estado de conservação de populações naturais de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por meio de análises de estrutura genética e autocorrelação espacial**

**Milene da Silva Castellen**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor  
em Ecologia de Agroecossistemas. Área de  
concentração: Ecologia de Agroecossistemas

**Piracicaba**  
**2005**

Milene da Silva Castellen

Ecóloga

**Avaliação do estado de conservação de populações naturais de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por meio de análises de estrutura genética e autocorrelação espacial**

Orientador:

Prof. Dr. **WEBER ANTONIO NEVES DO AMARAL**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ecologia de Agroecossistemas. Área de concentração: Ecologia de Agroecossistemas

**Piracicaba  
2005**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Castellen, Milene da Silva

Avaliação do estado de conservação de populações naturais de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por meio de análises de estrutura genética e autocorrelação espacial / Milene da Silva Castellen. - - Piracicaba, 2005.  
104 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.  
Bibliografia.

1. Espécie florestal nativa 2. Jatobá 3. Marcador molecular 4. Populações vegetais 5. Variação genética em plantas I. Título

CDD 634.973323

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

Aos meus pais,

Ayrton e Marlene

e a todos os heróis que me auxiliaram em cada etapa dessa odisséia,

dedico

***"What does not destroy me, makes me stronger."***

*Beyond Good and Evil, Friedrich Nietzsche.*

Elaborar uma tese é uma odisséia na qual existem diversos heróis. Numa comunhão de esforços para sua realização, tive a oportunidade de aprender grandes lições. Essas lições vão muito além dos aspectos técnico-científicos... São lições de vida, de solidariedade, de carinho, de respeito, mas sobre tudo de amizade. Todas as pessoas citadas aqui foram grandes professores, para as quais tenho uma eterna dívida de gratidão. Agradeço, de maneira especial:

A Deus, onipresente e onipotente.

Aos meus pais presentes em todos os momentos, sempre me incentivando a prosseguir...

Ao Prof. Weber Antonio Neves do Amaral pelas oportunidades e pela orientação.

Ao Prof. Paulo Kageyama por novamente me acolher no LARGEA dando-me as condições de que necessitava em um dos momentos mais difícil dessa odisséia.

À Elza Ferraz e à Andréia Moreno, grandes heroínas dessa história, cuja altíssima capacidade profissional e amizade me ajudaram a “matar um leão por dia” durante a guerra para obtenção dos dados, me fazendo acreditar no “impossível”.

Ao Dr. Alexandre Magno Sebben, outro grande herói, que me ajudou a vencer a “última grande batalha”, sendo um dos co-autores desse trabalho.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” palco de grandes batalhas e berço de grandes guerreiros.

Ao Dr. Christopher Dick e Elderedge Bermingham pela acolhida no Smithsonian Tropical Research Institute, ao WWF pela concessão da bolsa e ao IPGRI pelo apoio financeiro.

Às lições de amizade e incentivo de Luciana DiCiero, Claudia Rocha, Elsie Burbano, Karina Martins, Silvana Bortoleto, Gabriela, Sybelle Barreiras, Adriana Accioly e Gelson Dias Fernandez.

À Dra. Ana Ciampi por ter gentilmente cedido a seqüência dos primers, a Gelson Dias Fernandez pelo auxílio nos trabalhos de campo, e aos doutores Vanderlei da Silva Santos e Claudia Fortes pelas valiosas sugestões e incentivo.

À Chefia da Embrapa Mandioca e Fruticultura por permitir a realização desse trabalho, proporcionando toda infra-estrutura necessária para sua finalização.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 DESENVOLVIMENTO.....	16
2.1 Conservação genética de espécies florestais.....	16
2.2 Variabilidade e estrutura genética em populações naturais.....	19
2.3 Marcadores microssatélites.....	22
2.4 Considerações sobre o gênero <i>Hymenaea</i> .....	25
2.5 Aspectos ecológicos de <i>Hymenaea courbaril</i> .....	28
2.6 Materiais e métodos.....	33
2.6.1 Seleção da espécie-alvo.....	33
2.6.2 Identificação das populações e coleta do material vegetal.....	33
2.6.3 Extração e quantificação do DNA genômico.....	34
2.6.4 Iniciadores microssatélite.....	36
2.6.5 Reações de amplificação.....	37
2.6.6 Eletroforese dos fragmentos amplificados, coloração e interpretação do gel.....	37
2.6.7 Análises estatísticas.....	38
2.6.7.1 Desequilíbrio gamético entre pares de loci.....	38
2.6.7.2 Estimativas de freqüência de alelos nulos e poder de exclusão de cada loco.....	38
2.6.7.3 Diversidade genética e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).....	39
2.6.7.4 Estrutura genética espacial (correlação espacial dos genótipos).....	40
2.6.7.5 Tamanho efetivo da variância.....	41
2.6.7.6 Estrutura genética populacional.....	42

2.6.7.7	Fluxo gênico aparente.....	43
2.6.7.8	Distância genética de Nei.....	43
2.6.7.9	Análise de “bottleneck”.....	44
2.7	Resultados.....	45
2.7.1	Análises dos loci microsatélite .....	45
2.7.2	Índices de diversidade genética .....	50
2.7.3	Índice de fixação, coancestria e tamanho efetivo.....	52
2.7.4	Estrutura genética populacional.....	55
2.7.5	Fluxo gênico aparente.....	58
2.7.6	Distância genética de Nei .....	59
2.7.7	Estrutura genética espacial.....	60
2.7.8	Análise de “bottleneck”.....	64
2.8	Discussão.....	67
2.8.1	Loci microsatélite.....	67
2.8.2	Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	68
2.8.3	Índices de diversidade genética.....	68
2.8.4	Coeficientes de endogamia e coancestria.....	69
2.8.5	Estrutura genética populacional.....	70
2.8.6	Estrutura genética espacial.....	71
2.8.7	“Bottleneck”.....	72
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
	REFERÊNCIAS.....	75
	ANEXOS.....	90

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição geográfica de <i>H. courbaril</i> var. <i>courbaril</i> no território brasileiro, baseado em Lee e Langenheim (1975).....	30
Figura 2 -	Distribuição geográfica de <i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> , baseado em Lee e Langenheim (1975).....	30
Figura 3 -	Inflorescência em panículas terminais de <i>H. courbaril</i> .....	32
Figura 4 -	Vagem e sementes de <i>H. courbaril</i> .....	32
Figura 5 -	Número de alelos encontrados em cada um dos loci microssatélites analisados.....	45
Figura 6 -	Distribuição de alelos privados encontrados nas cinco populações de <i>H. courbaril</i> analisadas.....	47
Figura 7 -	Porção de alelos amostrados em cada uma das populações analisadas em relação ao total encontrado.....	50
Figura 8 -	Dendrograma das distâncias genéticas de Nei (1978), obtido pelo método de médias aritméticas (UPGMA) para as cinco populações de <i>H. courbaril</i> .....	60
Figura 9 -	Correlograma plotando o coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) em quatro classes de distância entre árvores de <i>H. courbaril</i> na população de Ártemis (Linhas tracejadas indicam os limites superior e inferior do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade e a linha contínua representa a estimativa do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle et al., 1995).....	61
Figura 10 -	Correlograma plotando o coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) em quatro classes de distância entre árvores de <i>H. courbaril</i> na população de Santa Genebra (Linhas tracejadas indicam os limites superior e inferior do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade e a linha contínua representa a estimativa do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle et al., 1995).....	62



- Figura 11 - Correlograma plotando o coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) em quatro classes de distância entre árvores de *H. courbaril* na população de São José (Linhas tracejadas indicam os limites superior e inferior do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade e a linha contínua representa a estimativa do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle et al., 1995)..... 62
- Figura 12 - Correlograma plotando o coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) em quatro classes de distância entre árvores de *H. courbaril* na população de Coclé (Linhas tracejadas indicam os limites superior e inferior do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade e a linha contínua representa a estimativa do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle et al., 1995)..... 63
- Figura 13 - Correlograma plotando o coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) em quatro classes de distância entre árvores de *H. courbaril* na população de Canal do Panamá (Linhas tracejadas indicam os limites superior e inferior do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade e a linha contínua representa a estimativa do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle et al., 1995)..... 63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade obtidos a partir de estudos em populações de espécies arbóreas nativas, sendo $\bar{H}_e$ : heterozigosidade esperada; $\bar{H}_o$ heterozigosidade observada e $\bar{f}$ : índice de fixação. Piracicaba – SP, 2005.....	21
Tabela 2 -	Descrição dos fragmentos e número de indivíduos adultos que tiveram suas folhas coletadas em cada uma das localidades amostradas. Piracicaba – SP, 2005.....	35
Tabela 3 -	Seqüência de iniciadores microssatélites desenvolvidos para <i>Hymenaea spp.</i> com os respectivos números de repetições, amplitudes alélicas e temperaturas de anelamento ( $T_a$ ) dos produtos analisados em 93 indivíduos adultos dos biomas Cerrado, Mata Atlântica e Floresta Amazônica. Piracicaba – SP, 2005.....	36
Tabela 4 -	Número de classes de distância e intervalos utilizados nas análises de estrutura espacial em cada uma das populações. Piracicaba – SP, 2005.....	41
Tabela 5 -	Estimativas de parâmetros genéticos em cinco populações de <i>H. courbaril</i> obtidos a partir de nove loci microssatélites. Piracicaba – SP, 2005.....	48
Tabela 6 -	Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade em cinco populações de <i>H. courbaril</i> obtidos a partir de nove loci microssatélites. Piracicaba – SP, 2005.....	51
Tabela 7 -	Índices de diversidade de <i>Hymenaea</i> obtidos por vários autores em diferentes locais e populações. Piracicaba – SP, 2005.....	54
Tabela 8 -	Estimativas das estatísticas $F$ segundo o modelo de Weir e Cockerham (1984) e da estatística $R_{ST}$ (Slatkin, 1995). Piracicaba – SP, 2005.....	56
Tabela 9 -	Parâmetros genéticos obtidos por diversos trabalhos em diferentes populações do gênero <i>Hymenaea</i> . Piracicaba – SP, 2005.....	57

- Tabela 10 - Número de alelos amostrados em cada lócus ( $A$ ), variação total considerando todas as populações ( $\sigma_e^2$ ), variação dentro de cada população ( $\sigma_d^2$ ) e variação entre as populações ( $R_{ho}$ ). Piracicaba – SP, 2005..... 59
- Tabela 11 - Matriz de distâncias genéticas de Nei (1978) para cinco populações amostradas de *H. courbaril*. Piracicaba – SP, 2005..... 60
- Tabela 12 - Valores de  $k_o$  (número médio de alelos por locus);  $H_e$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg);  $H_{eq}$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de mutação – deriva);  $P$  (probabilidade de ocorrência de “bottleneck”) para cada locus na população de Ártemis, sob o modelo mutacional de duas fases, com número censo = 10. Piracicaba – SP, 2005..... 65
- Tabela 13 - Valores de  $k_o$  (número médio de alelos por locus);  $H_e$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg);  $H_{eq}$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de mutação – deriva);  $P$  (probabilidade de ocorrência de “bottleneck”) para cada locus na população de Santa Genebra sob o modelo mutacional de duas fases,  $N = 14$ . Piracicaba – SP, 2005..... 65
- Tabela 14 - Valores de  $k_o$  (número médio de alelos por locus);  $H_e$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg);  $H_{eq}$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de mutação – deriva);  $P$  (probabilidade de ocorrência de “bottleneck”) para cada locus na população de Mata São José, sob o modelo mutacional de duas fases com  $N = 17$ . Piracicaba – SP, 2005..... 66
- Tabela 15 - Valores de  $k_o$  (número médio de alelos por locus);  $H_e$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg);  $H_{eq}$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de mutação – deriva);  $P$  (probabilidade de ocorrência de “bottleneck”) para cada locus na

	população de Coclé sob o modelo mutacional de duas fases com $N = 29$ . Piracicaba – SP, 2005.....	66
Tabela 16 -	Valores de $k_o$ (número médio de alelos por locus); $H_e$ (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg); $H_{eq}$ (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de mutação – deriva); $P$ (probabilidade de ocorrência de “bottleneck”) para cada locus na população do Canal do Panamá sob o modelo mutacional de duas fases, com $N = 31$ . Piracicaba – SP, 2005.....	67

## RESUMO

### **Avaliação do estado de conservação de populações naturais de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por meio de análises de estrutura genética e autocorrelação espacial**

*Hymenaea courbaril* (Caesalpinaceae) é uma espécie tropical madeireira que apresenta grande plasticidade fenotípica observada taxonomicamente na forma de seis variedades. Nove loci microssatélites foram utilizados para estudar a estrutura espacial e a distribuição da estrutura genética dentro e entre populações de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* e *Hymenaea courbaril* var. *courbaril*, no Brasil e no Panamá, respectivamente. Os níveis de diversidade genética obtidos nas cinco populações estudadas foram elevados, em média  $\bar{H}_e = 0,744$ . Observou-se que a maior parte da variabilidade está contida dentro das populações e não entre as variedades estudadas. Desse modo, a diferenciação foi maior dentro de populações pertencentes a uma mesma região ( $\theta_{p/R} = 0,084$ ) que entre regiões ( $\theta_R = 0,034$ ). Adicionalmente, foram detectados significantes déficits de heterozigotos e elevados coeficientes de coancestria, associadas a um baixo tamanho efetivo em todas as populações estudadas. As análises moleculares indicaram diferenciação significativa, porém baixa, entre as variedades, tendo em vista a distância geográfica entre as mesmas e a plasticidade fenotípica observada. As análises de autocorrelação espacial revelaram a existência de uma forte estruturação entre os genótipos. Considerando o atual estágio de conservação da espécie e o grau de degradação na escala da paisagem, foram detectados efeitos “bottlenecks” e elevados níveis de endogamia nas populações. Desta forma, recomenda-se que estratégias para conservação genética dessas variedades levem em consideração a distribuição espacial combinando metodologias complementares de conservação “in situ” e “ex situ”.

Palavras-chave: marcadores moleculares, variabilidade genética, conservação

## ABSTRACT

### **Assessment of the conservation status of natural populations of jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) using a genetic structure and spatial autocorrelation approaches**

*Hymenaea courbaril* (Caesalpinaceae) is a tropical timber species, having substantial phenotypic plasticity expressed morphologically into six varieties. Nine microsatellite loci were used for the assessment of the spatial structure and patterns of genetic structure within and among populations of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* and *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* in Brazil and Panamá respectively. Levels of genetic diversity, found in the five populations studied, were high, in average  $\bar{H}_e = 0,744$ . Most of the variation was found within populations and not between the two varieties. The genetic differentiation was also larger within populations belonging to the same region ( $\theta_{p/R} = 0,084$ ) that between regions ( $\theta_R = 0,034$ ). Significant deficit of heterozygotes and high levels of coancestry due to small effective population size in all study populations were also found. Spatial autocorrelational analysis had shown a strong degree of genetic structure among the genotypes. Molecular analysis had detected a significant, but small, differentiation between varieties, even considering the geographic distance and the phenotypic plasticity observed. Considering all the results found, the current conservation status of this species and the degree of degradation at landscape level, it is more likely that the combination of these factors had contributed for the manifestation of the bottleneck effect detected and the high levels of endogamy. Therefore it is highly recommended that strategies for genetic conservation of this species take into account its patterns of spatial distribution and combine in-situ and ex-situ efforts for conservation complementary conservation strategies.

Key-words: molecular markers, variability, genetic conservation

## 1 INTRODUÇÃO

A variabilidade é uma das características primordiais da vida. Desde Aristóteles até Eldredge, passando por Lineu, Darwin, Mendel, Haldane, Mayr, Kimura e Maynard Smith; vários autores procuraram entender a organização, as causas e os processos envolvidos na manutenção da variabilidade dos organismos. Essa variabilidade tem sido estudada sob vários níveis hierárquicos, com abordagens macro e microevolutivas.

Num cenário de intensas pressões antrópicas afetando as populações naturais, tem-se observado uma preocupação mundial em relação à conservação do potencial evolucionário das espécies e populações. Nesse contexto, a Convenção da Diversidade Biológica realizada em 1992, e ratificada por diversos países, englobou pela primeira vez, a diversidade em diversos níveis hierárquicos (de genes a ecossistemas) e delegou aos governos a responsabilidade pela conservação de sua diversidade biológica, bem como o uso sustentável de seus recursos biológicos.

Em populações naturais de espécies arbóreas, a crescente fragmentação florestal aliada à exploração madeireira têm sido as principais ameaças à sustentabilidade dos ecossistemas florestais, aumentando as possibilidades de erosão genética, decorrente da drástica redução do tamanho populacional. Esse fato, aliado ao isolamento das populações numa matriz pouco permeável, gera condições propícias para a intensificação dos efeitos da deriva, diminuição do fluxo gênico entre populações e aumento da endogamia.

Análises da estrutura genética das populações têm sido realizadas, buscando caracterizar os níveis de diversidade, a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações isoladas e entender os padrões de autocorrelação espacial dos genótipos, a fim de subsidiar o delineamento de estratégias conservacionistas tanto “in situ” quanto “ex situ”.

Nesse cenário, *Hymenaea courbaril* representa uma espécie típica de estágios finais de sucessão ecológica de ampla distribuição geográfica e alvo da exploração madeireira que apresenta grande plasticidade fenotípica e variedades adaptadas à ambientes distintos, principalmente em sua distribuição pela América do Sul.

Na bacia do Piracicaba, *H. courbaril* encontra-se representada pela variedade *stilbocarpa*, que constitui uma variedade típica da floresta estacional, alvo do extrativismo seletivo, atualmente restrita aos reduzidos e esparsos fragmentos florestais presentes na bacia; sob pressões antrópicas semelhantes, a variedade *courbaril* apresenta uma área de distribuição geográfica mais ampla, estando presente em diversas formações vegetais da América Latina.

Buscando avaliar o atual estado de conservação de 3 populações naturais na bacia do Piracicaba e 2 populações naturais no Panamá, da espécie *H. courbaril*, pertencentes às variedades *stilbocarpa* e *courbaril*, esse trabalho teve como objetivos específicos: 1) caracterizar a diversidade genética intra e interpopulacional da espécie por meio de marcadores microssatélites; 2) comparar a diversidade e a estrutura genética em populações de *H. courbaril* var. *stilbocarpa* e *H. courbaril* var. *courbaril*, amostradas no Brasil e Panamá, respectivamente; 3) avaliar a distribuição espacial dos genótipos e verificar a ocorrência de estruturação nas populações; 4) verificar o parentesco médio entre os indivíduos dentro de cada população; 5) gerar subsídios para estratégias conservacionistas, baseadas em critérios genéticos.



## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Conservação genética de espécies florestais

Até a metade do século XX, muitos cientistas consideravam o isolamento geográfico como um dos principais fatores envolvidos no processo de especiação. Nesse contexto, a floresta tropical destacava-se, formando uma extensa faixa contínua com altíssima riqueza de espécies, que segundo Krapp e Mallet (2003), parecia contradizer a especiação alopátrica defendida.

No final da década de 1960, a teoria de refúgios neotropicais foi proposta inicialmente por Haffer (1969) e quase que simultaneamente por Vanzolini e Williams (1970). Segundo essa teoria, durante o Pleistoceno, diversas mudanças climáticas, caracterizadas pela alternância de períodos frios e secos (glaciais) e períodos amenos (interglaciais), trouxeram como consequência para os trópicos a redução da vegetação florestal e a expansão das savanas durante os períodos glaciais, seguida da expansão das formações florestais, durante períodos interglaciais. A chegada do Holoceno caracterizou-se pela expansão das manchas florestais devido ao aumento da umidade. Diversos setores da floresta passaram a apresentar maiores índices de diversidade e endemismo, evidenciando as regiões de refúgios que ocorreram durante o Pleistoceno (Viadana, 2002).

Diversos autores buscaram reafirmar a existência de refúgios, como Simpson e Haffer (1978), Vanzolini e Williams (1981), Brown Jr. (1987), Prance (1987), Van den Berg (1996) e Carlini (1996). Por outro lado, severas críticas foram realizadas por Colinvaux et al. (2001) e Hooghiemstra (2001). Outras teorias buscando explicar a alta biodiversidade da floresta tropical foram sendo propostas, como a do soerguimento dos Andes (Fjeldsa, 1994; Fjeldsa e Lovett, 1997) e o da intensa especiação simpátrica anterior ao Pleistoceno (Wilf et al., 2003; Krapp e Mallet, 2003).

Em meio às controvérsias, a teoria dos refúgios continua sendo amplamente aplicada na seleção de locais para o estabelecimento de unidades de conservação nos trópicos.

Apesar da utilização da diversidade de espécies e ecossistemas para a seleção de áreas de conservação ser um aspecto da Biologia da Conservação extremamente importante, a variabilidade genética das populações também deve ser considerada como alvo fundamental, a fim de garantir o potencial evolutivo das populações.

A afirmação de que a conservação “in situ” deve basear-se em informações a respeito da variabilidade, estrutura genética e sistema reprodutivo das espécies, tem sido enfatizada, durante décadas, por diversos autores como Frankel e Soulé (1981) e Kageyama (1988).

Seguindo essa linha de estudos, Kageyama et al. (2003) sugerem a aplicação do conceito de espécie-modelo visando à conservação “in situ” de um grupo específico. O autor considera que estudos conservacionistas, conduzidos num ecossistema com ampla riqueza de espécies como a floresta tropical, deveriam fundamentar-se em espécie-modelo que atuariam como representantes de um grupo com características ecológicas comuns e padrões genéticos extrapoláveis.

Outro conceito estreitamente relacionado à conservação genética, mas com uma abordagem distinta do das espécies-modelo, é o de “Evolutionary Significant Unit” (ESU) ou unidades evolutivamente significativas. Desenvolvido inicialmente por Ryder (1986), esse conceito busca preencher uma lacuna existente nos casos em que a classificação taxonômica não reflete adequadamente a diversidade genética observada (Avice, 1989).

Ryder (1986) define ESUs como conjuntos de organismos de uma mesma espécie que possuem atributos genéticos significativos para as presentes e futuras gerações. A análise das ESUs permite discernir entre diferentes populações as que seriam prioritárias para conservação. Desse modo, uma ESU pode consistir-se de uma ou várias subpopulações de uma espécie que possuam alta variabilidade genética e que sejam capazes de garantir a manutenção de parte da herança evolutiva.

Diversos autores como Avice (1994) e Waples (1998) têm discutido o conceito de ESU buscando aprimorá-lo e propondo métodos de identificação de ESU baseados em características ecológicas, biogeográficas e fenotípicas. Embora esses caracteres gerem importantes informações a respeito da divergência, segundo Moritz (1994), o diagnóstico de ESU's deve se ater a dois aspectos fundamentais: a existência de

reciprocidade monofilética no mtDNA e de diferenças significativas nas frequências alélicas em locos nucleares.

Visando atender a uma categoria conservacionista menos restritiva do ponto de vista filogenético, Moritz (1994) define o conceito de unidades de manejo (MU). Esse conceito se refere às populações com divergências significativas nas frequências alélicas em locos nucleares ou mitocondriais, independente de qualquer distinção filogenética dos alelos.

Segundo o mesmo autor, a diferença principal entre ESU e MU seria a forma de obtenção e interpretação da informação genética, considerando que ESUs são obtidas por meio de análises filogenéticas, numa interpretação histórica populacional, enquanto MUs são baseadas na análise de frequências alélicas obtidas a partir da estrutura atual da população.

O conceito de MU é atualmente usado para diagnosticar populações subdivididas, nas quais o tempo de divergência não foi suficiente para o acúmulo de caracteres evolucionários distintos, ou em casos em que o fluxo gênico restrito tem mantido as populações geneticamente isoladas (Moritz, 1994).

Outra aplicação conservacionista recente dos estudos de diversidade e estrutura genética de populações é o monitoramento das populações sob condições de estresse, causada pela exploração madeireira e fragmentação florestal, por meio de indicadores genéticos. Seguindo essa linha, Stork et al. (1997) e Namkoong (2000) propõem uma série de critérios e indicadores de sustentabilidade dos sistemas florestais, baseados em uma rede conceitual que reconhece indicadores de pressões, estados e respostas. Segundo Boyle (2000), esses indicadores proporcionam diferentes tipos de informação, equivalentes aos diferentes componentes de um sistema que englobam, desde intervenções humanas, processos mediadores, até processos que conservam a diversidade e a resposta genética propriamente dita, constituindo, dessa forma, uma ferramenta de análise importante para conservação.

## 2.2 Variabilidade e estrutura genética em populações naturais

Os trabalhos de Fisher (1930), Dobzhansky (1939) e Wright (1949), na primeira metade do século XX, foram responsáveis pelo estabelecimento da relação entre genética e evolução. Estudos microevolutivos emergiram nesse contexto, buscando entender as causas e o comportamento da variação genética dentro das populações e determinando a importância de forças determinísticas e estocásticas no comportamento de genes e alelos no "pool gênico" das populações (Futuyma, 1997).

Como exposto no item anterior, o delineamento de estratégias de conservação "in situ" depende principalmente da localização de populações distintas e do conhecimento das estimativas relacionadas à variabilidade intraespecífica. Essa variabilidade tem origem no processo mutacional, sendo rearranjado pelas recombinações alélicas, por meio da formação de quiasmas e as recombinações gênicas, por meio de segregação, ao acaso, de pares de cromossomos durante a anáfase I (Murray et al., 2000).

Quantificar a variabilidade existente e buscar explicá-la em termos de origem, organização e manutenção, é o foco principal da genética de populações. A compreensão de como a variabilidade encontra-se distribuída dentro de populações é dada a partir da interpretação de índices de diversidade como: porcentagem de locos polimórficos ( $P$ ); o número médio de alelos observados ( $A$ ); diversidade gênica ( $\bar{H}_e$ ) e a heterozigosidade média observada ( $\bar{H}_o$ ).

Na Tabela 1, são apresentados os índices de diversidade obtidos em diversos trabalhos com espécies arbóreas, em que uma ampla variação de valores pode ser observada entre as diversas espécies citadas. Essa heterogeneidade fato deve-se às distintas características ecológicas, demográficas, ao histórico de perturbações antrópicas das populações e às técnicas utilizadas para avaliar a diversidade intrapopulacional.

A organização dos níveis de diversidade entre e dentro de populações é decorrente de fatores que afetam o comportamento dos alelos na população como seleção natural, migração, deriva genética e mutação, estando fortemente associada aos aspectos autoecológicos e demográficos das populações (Hamrick, 1983; Loveless

e Hamrick, 1984). Para caracterizar a estrutura genética das populações naturais diversas abordagens têm sido utilizadas como a análise da diversidade em populações subdivididas, segundo Nei (1973), a estatística  $F$  (Wright, 1965) e os coeficientes de coancestralidade (Cockerham, 1969).

Tradicionalmente, os marcadores aloenzimáticos foram usados para descrever a estrutura genética de populações de mais de 700 táxons de plantas (Hamrick e Godt, 1989). Essas informações contribuíram para o entendimento das relações entre diversidade aloenzimática e características da espécie, permitindo a Loveless e Hamrick (1984) concluir que espécies com ciclo de vida longo, preferencialmente alógamas, com distribuições geográficas ampla e pertencentes a estágios sucessionais avançados, tendem a apresentar maior variabilidade intrapopulacional do que interpopulacional.

Com o advento da técnica de PCR ("Polymerase Chain Reaction") e consequentemente de marcadores como RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") e microssatélites, a variabilidade genética pôde ser estudada diretamente em nível molecular, com uma amostragem ampla do genoma. No Brasil, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos pelo Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas - ESALQ/USP, buscando entender a variabilidade e a estrutura genética das populações de espécies arbóreas nativas. Muitos desses trabalhos têm comprovado o padrão proposto por Loveless e Hamrick (1984) a partir de resultados obtidos por meio de marcadores bioquímicos e moleculares.

Tabela 1 - Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade obtidos a partir de estudos em populações de espécies arbóreas nativas, sendo  $\bar{H}_e$  : heterozigosidade esperada;  $\bar{H}_o$  heterozigosidade observada e  $\bar{F}$ : índice de fixação. Piracicaba – SP, 2005

Espécie / Nome vulgar	$\bar{H}_e$	$\bar{H}_o$	$\bar{F}$
<i>Genipa americana</i> / Jenipapo <sup>1</sup>	0,185	0,195	-0,054
<i>Chorisia speciosa</i> / Paineira <sup>2</sup>	0,284	0,245	0,13
<i>Calophyllum brasiliense</i> / Guanandi <sup>3</sup>	0,223	0,141	0,372
<i>Myracrodouon urundeuva</i> / Aroeira <sup>4</sup>	0,057	0,076	-0,333
<i>Couratari multiflora</i> / Tauari <sup>5</sup>	0,431	0,359	0,176
<i>Couratari guianensis</i> <sup>5</sup>	0,420	0,203	0,518
<i>Miconia cinnamomifolia</i> / Jaracatião <sup>6</sup>	0,381	0,406	-0,067
<i>Bertholetia excelsa</i> / Castanha do Brasil <sup>7</sup>	0,133	0,160	-0,141
<i>Myrciaria floribunda</i> / Cambuí <sup>8</sup>	0,385	0,386	-0,002
<i>Peltophorum dubium</i> / Canafístula <sup>9</sup>	0,274	0,237	0,135
<i>Machaerium villosum</i> / Jacarandá paulista <sup>10</sup>	0,342	0,264	0,228
<i>Cryptocarya aschersoniana</i> / Canela fogo <sup>11</sup>	0,536	0,325	0,395
<i>Cariniana legalis</i> / Jequitibá rosa <sup>12</sup>	0,358	0,273	0,239
<i>Aspidosperma polyneuron</i> / Peroba <sup>13</sup>	0,241	0,236	0,020
<i>Cedrella fissilis</i> / Cedro <sup>14</sup>	0,243	0,222	0,086
<i>Copaifera langsdorffii</i> / Copaíba <sup>15</sup>	0,435	0,421	0,063
<i>Cryptocarya moschata</i> / Noz-moscada-do Brasil <sup>16</sup>	0,351	0,323	0,079
<i>Euterpe edulis</i> / Palmito <sup>17</sup>	0,452	0,476	-0,053
<i>Hevea brasiliensis</i> / Seringueira <sup>18</sup>	0,319	0,252	0,210
<i>Syagrus romanzoffiana</i> / Jerivá <sup>29</sup>	0,034	0,361	-0,076
<i>Esenbeckia leiocarpa</i> / Guarantã <sup>20</sup>	0,440	0,433	0,015

Fontes: <sup>1</sup> Sebbenn, 1997; <sup>2</sup> Souza, 1997; <sup>3</sup> Kawaguici, 1999; <sup>4</sup> Lacerda, 2002; <sup>5</sup> Lepsh-Cunha, 1996; <sup>6</sup> Pereira, 2002; <sup>7</sup> Pardo, 2001; <sup>8</sup> Vasconcelos, 2001; <sup>9</sup> Mori, 2000; <sup>10</sup> Del Guidice Neto, 1999; <sup>11</sup> Moraes e Derbyshire, 2003; <sup>12</sup> Sebbenn, 2001; <sup>13</sup> Maltez, 1997; <sup>14</sup> Gandara, 1997; <sup>15</sup> Oliveira, 2000; <sup>16</sup> Moraes, 1997; <sup>17</sup> Reis, 1996; <sup>18</sup> Paiva, 1996; <sup>19</sup> Negrão, 1999; <sup>20</sup> Castellen, 2000.

### 2.3 Marcadores microssatélites

A partir da técnica de PCR, inúmeros marcadores foram desenvolvidos, possibilitando a realização de estudos para detecção do polimorfismo genético ao nível do DNA com grande praticidade e robustez.

Segundo Rafalski et al. (1996), dentre os diversos marcadores baseados em PCR, os microssatélites são os que mais se aproximam do marcador ideal; tendo uma ampla aplicabilidade em estudos de parentesco, fluxo gênico e estrutura genética de populações naturais, devido ao fato de apresentarem um padrão de herança mendeliana aliado às elevadas taxas de polimorfismo, capazes de gerar um alto conteúdo informativo.

Conhecidos também como STR (“Short Tandem Repeat”) ou SSR (“Simple Sequence Repeats”), os marcadores microssatélites baseiam-se na detecção de variações em loci de seqüências repetitivas, que apresentam geralmente de dois a seis pares de bases (Hancock, 1999). Essas variações no número de repetições resultam em última análise, em variações no comprimento dos segmentos detectados, que são amplificados via PCR e separados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, corados com nitrato de prata ou em fluorescência.

O conteúdo genético informativo de um loco microssatélite é geralmente bastante alto, devido às altas taxas de mutação das seqüências. Dentre as prováveis origens dessa instabilidade são citados o crossing over desigual e a replicação “slippage”. As altas taxas de mutação em decorrência do crossing over desigual seriam causadas pela existência de repetições que aumentariam a probabilidade de perda de pareamento cromossômico. Diversos trabalhos têm buscado estudar as altas taxas mutacionais em replicações “slippage”, seguidas de eventuais falhas ocorridas no sistema de reparo “mismatch” que resultariam em deleções ou duplicações (Li et al., 2004).

Devido à peculiar natureza mutacional dos microssatélites é necessária a aplicação de modelos de evolução molecular adequados à interpretação dos dados obtidos. Dentre os modelos usualmente empregados em análises populacionais encontram-se o modelo de alelos infinitos (Kimura e Crow, 1964) e o modelo de mutação aos passos ou “stepwise” (Kimura e Otah, 1978).

O modelo de alelos infinitos assume a existência de um número extremamente grande de alelos, de modo que qualquer modificação daria origem a um alelo inédito; desse modo, a diferença entre os alelos, independente do grau em que ocorra, seria resultado de apenas um evento mutacional. Outro pressuposto importante é o de que mutações resultariam em efeitos que variam de drásticos a neutros, resultando em três sistemas de alelos: alelos seletivamente neutros, cujas freqüências nas populações são determinadas por taxas de mutação e deriva, alelos mutualmente heteróticos e uma mistura de alelos heteróticos e mutantes deletérios (Kimura e Crow, 1964).

O modelo de alelos infinitos tem sido utilizado na maioria das análises aloenzimáticas, tendo em vista a dificuldade de prever o estado da mutação das diferentes formas alélicas nessa técnica, a partir do seu estado ancestral. Segundo Nei (1973), as principais falhas desse modelo consistem no pressuposto de que todas as mutações seriam inéditas e de que todos os loci apresentariam a mesma taxa de mutação.

O modelo "stepwise" (Kimura e Otah, 1978) assume que um alelo de determinado tamanho apresenta, como seu estado ancestral, o alelo com uma repetição imediatamente superior ou inferior, sendo possível inferir relações de parentesco entre os diversos alelos. O ponto falho desse modelo consiste em não considerar a possibilidade de ocorrência de homoplasia de tamanho e comprimento, na qual dois alelos seriam iguais em estado, mas não por descendência.

Valdes (1993) reuniu dados de freqüências alélicas, obtidas em humanos, a partir de microssatélites, e comparou a distância apresentada pelos resultados com uma simulação de distribuição do modelo "stepwise". O autor observou que a distribuição das freqüências nos 108 loci era consistente com a apresentada pelo modelo em uma população de tamanho constante.

Segundo Rosenbaum e Deinard (1998), as análises de estrutura populacional, baseadas em marcadores moleculares tradicionalmente têm sido realizadas a partir da estatística F (Wright, 1951), sob a pressuposição do modelo de alelos infinitos; no entanto, devido à natureza mutacional dos microssatélites faz-se necessário o uso de estatísticas F modificadas, considerando os padrões de evolução molecular do modelo "stepwise", como sugerido por Slatkin (1995).



Hoshino et al. (2002) enumera diversas vantagens ligadas ao uso deste marcador em estudos populacionais. Dentre as principais estão a codominância, que permite a detecção de todos os alelos em um dado loco, possibilitando o cálculo das suas frequências; o multialelismo, que torna os loci informativos em populações diferentes, e a praticidade na integração e comparação dos dados obtidos.

Dentre os aspectos positivos deste marcador, Ciampi (1999) destaca, ainda, a transferibilidade dos loci entre espécies. A transferibilidade de loci, também conhecida como amplificação heteróloga, deve-se principalmente à natureza homóloga das seqüências de nucleotídeos que se apresentam nas regiões flangeadoras. Diversos casos de transferibilidade de loci entre espécies e até entre gêneros, dentro da mesma família, têm sido relatados em espécies arbóreas.

Gaiotto (2001) testou a transferibilidade de 18 loci microssatélites desenvolvidos para *Euterpe edulis* na espécie *Euterpe oleracea*; desses, sete apresentaram produtos de amplificação polimórficos e claramente interpretáveis. Do mesmo modo, Zucchi (2003) verificou a transferibilidade de 10 primers de *Eucalyptus* para *Eugenia dysenterica*, apresentando uma média de 10,4 alelos por loco. Martins (2005) também obteve sucesso na amplificação heteróloga de primers desenvolvidos para *Capsicum* em *Solanum lycocarpum*.

Dentre as desvantagens dos marcadores microssatélites, Hoshino et al. (2002) citam as seguintes: ocorrência de erros de genotipagem, devidos a pequenas inserções e/ou deleções que podem ocorrer nas regiões adjacentes às seqüências e que não necessariamente alteram o número de repetições, mas são capazes de alterar o comprimento do fragmento gerado; a variação da abundância de seqüências repetitivas entre espécies e a possibilidade de amplificação de artefatos de PCR.

Outra limitação importante dos marcadores microssatélites seria a ocorrência de alelos nulos. Esses ocorrem devido a mutações de ponto, inserções ou deleções no sítio de anelamento do iniciador que podem impedir a amplificação de uma parte dos alelos. Esses alelos não amplificados foram denominados por Pemberton et al. (1995) como "alelos nulos" podendo provocar uma estimativa errônea do número de genótipos homocigotos presentes na população.

Uma questão polêmica em relação aos marcadores microssatélites diz respeito à sua neutralidade. Esses marcadores foram considerados durante anos, como seletivamente neutros, no entanto, recentemente, diversos trabalhos têm relatado a existência de seqüências repetitivas em regiões codantes do genoma. Apesar de apresentarem-se com menos freqüência nessas regiões, as seqüências microssatélites em genes parecem ter um efeito importante sobre a atividade gênica, devido ao fato de suas expansões e contrações afetarem diretamente os produtos gênicos, podendo ocasionar flutuações na expressão gênica, inativação da atividade gênica, mudanças de função e, eventualmente, mudanças fenotípicas (Li et al., 2004).

Zoghbi e Orr (2000) relatam que a produção de proteínas mutantes altamente tóxicas, causadoras de doenças neurológicas em seres humanos, estariam relacionadas à expansão de repetições CAG. Li et al. (2004) salienta que a distribuição das seqüências repetitivas nas regiões codantes não ocorre de maneira aleatória. Segundo os autores, a baixa freqüência de repetições de dinucleotídeos e tetranucleotídeos associada ao aumento da freqüência de repetições triplas, em diversos organismos, gera indícios de possíveis efeitos de seleção. Essa pressão de seleção seria bastante superior nas regiões codantes, devido à significância funcional na regulação da expressão gênica e sua função.

#### **2.4 Considerações sobre o gênero *Hymenaea***

O gênero *Hymenaea* compreende 14 espécies, 13 das quais encontram-se distribuídas pela América Central, América do Sul, oeste das Índias e uma espécie de ocorrência no leste da África (Lee e Langenheim, 1975).

No Brasil, as espécies de *Hymenaea* mais freqüentemente encontradas são *Hymenaea stignocarpa*, de ocorrência mais restrita, com predominância na Caatinga e no Cerrado e *Hymenaea courbaril*, de distribuição ampla, ocorrendo desde a floresta amazônica até a floresta estacional semidecidual no sudeste do país, sob a forma de diversas variedades.

Segundo Rizzini (1971), as espécies pertencentes a este gênero fornecem boa madeira, frutos comestíveis e cascas taníferas. Muitas espécies do gênero *Hymenaea*

produzem resinas úteis, tanto para a fabricação de vernizes quanto para fins medicinais. A resina é extraída por meio do processo de “sangria” do tronco ou por escavação do solo onde se acumulam certas quantidades provenientes da árvore. A resina produzida pelo gênero pode converter-se em âmbar, após uma série de processos químicos sofridos ao longo dos anos. Resinas fósseis datadas do Terciário foram encontradas no México, Colômbia e Brasil.

Estudos da variação geográfica de resinas foliares mostraram que a proporção relativa de alguns dos principais compostos componentes das resinas pode variar muito dentro de uma mesma população. Segundo Stubblebine et al. (1980), a composição da resina foliar de um indivíduo não varia com a mudança de fatores ambientais ou com o desenvolvimento da planta sendo, portanto, uma característica geneticamente determinada.

Diferenças qualitativas na composição da resina foliar foram correlacionadas com estratégias da planta contra o ataque de herbívoros. Segundo (Rocha, 1988), a ação intensa de herbívoros favoreceria a evolução de tipos diferentes de resina. Stubblebine et al. (1980) verificaram que herbívoros, que atacam as folhas da árvore-mãe, atacam preferencialmente plântulas com o mesmo tipo de composição de resina que o adulto. Desse modo, foi analisada a composição de resina de diversas plântulas sendo que, após alguns anos transcorridos, foram encontrados apenas jovens que apresentavam composição de resina diferentes da composição da árvore-mãe. Praticamente todos os indivíduos, que apresentavam a mesma composição de resina foliar que a árvore-mãe, desapareceram; possivelmente devido ao ataque de herbívoros (Langenheim et al, 1983).

Qualquer mutação, que permitisse o aparecimento de uma plântula com composição de resina foliar diferente da composição da árvore mãe e que fosse tóxica aos herbívoros, seria rapidamente selecionada e fixada na população (Langenheim et al., 1977). Desta forma, a ação de herbívoros, nas áreas tropicais, desempenharia uma pressão de seleção alta o suficiente para determinar a evolução deste sistema de defesa, bem como o padrão de distribuição dos indivíduos de espécies vegetais (Janzen, 1970). Acredita-se que esta imprevisibilidade quanto ao tipo de composição de

resina foliar de árvores adultas, plântulas e jovens, evite a evolução de herbívoros especialistas (Langenheim et al, 1977).

Apesar dos inúmeros estudos envolvendo o gênero, a delimitação dos taxa nem sempre é simples. Algumas espécies apresentam uma grande variação morfológica, sobretudo em certas áreas de suas distribuições. Algumas dessas variações foram consideradas suficientemente estáveis para criação de variedades dentro de uma espécie. Em outros casos, certos taxa (anteriormente considerados como espécies) passaram à categoria de variedades de uma espécie mais ampla.

Esse é o caso de *H. stilbocarpa*, *H. altissima* e *H. longifolia*, que foram incluídas como variedades de *H. courbaril* (Lee e Langenheim, 1975). Essa mudança de critério deve-se, principalmente, ao fato de a variação morfológica de forma e tamanho de folíolos e frutos, bem como as características florais, se sobreporem em certas áreas, assim como a ocorrência de indivíduos com caracteres morfológicos intermediários aos descritos para dois ou mais táxons (Lee e Langenheim, 1975). Essas situações dificultam ou mesmo impossibilitam uma delimitação clara dos táxons. Desta forma, muitas vezes a localização geográfica ou a descrição do habitat fornece mais informações sobre a identidade de uma planta do que as características morfológicas observadas em um material de herbário (Rocha, 1988).

As relações evolutivas sugeridas para as espécies do gênero foram baseadas em caracteres morfológicos e da anatomia das folhas (Lee e Langenheim 1975; Langenheim et al 1982). Outros caracteres, mesmo os químicos, sobre resinas, não foram utilizados no estabelecimento das relações de parentesco entre as espécies.

As espécies da seção *Trachilobium*, devido às características morfológicas, são consideradas as mais primitivas do gênero. A espécie *H. verrucosa*, única espécie africana do gênero, pertence a essa seção, e encontra-se restrita à costa leste do continente Africano e à ilha de Madagascar. Segundo Lee e Langenheim, (1975), o centro de origem do gênero teria sido a África e o de diversidade seria a região Amazônica. Do grupo africano primitivo teriam se originado *H. verrucosa* e *H. oblongifolia*; *H. courbaril* teria se originado de *H. oblongifolia*.

Buscando esclarecer a taxonomia e relações evolutivas do gênero, Rocha (1988) analisou as proteínas de reserva de 10 taxa de *Hymenaea* (7 espécies e 3 variedades),

constatando a existência de uma variação muito grande de padrões protéicos dentro das espécies e dentro e entre indivíduos de uma mesma população, da mesma forma, padrões idênticos foram encontrados entre sementes de populações distintas e mesmo de espécies diferentes. Deste modo, as análises de agrupamentos de sementes individuais usando o coeficiente de Jaccard, não evidenciaram a separação de grupos por esse método.

## 2.5 Aspectos ecológicos de *Hymenaea courbaril*

Popularmente conhecida como jatobá ou jataí, *H. courbaril* L. é considerada uma árvore de grande porte, podendo alcançar até 40 m de altura. A espécie possui folhas compostas, inflorescência em panículas terminais e frutos em forma de vagens indeiscentes, duros e pardo-escuros, apresentando de 2 a 6 sementes (Prance e Silva, 1975). O fruto do jatobá é comestível, levemente adocicado e farinhento, sendo fonte de alimento de diversas aves e mamíferos (Rizzini, 1971).

*H. courbaril* é típica de estágios sucessionais avançados (Barbosa, 1996) apresentando uma ampla distribuição geográfica, abrangendo desde a costa ocidental do México até a Bolívia e centro-sul do Brasil, passando pelo Caribe.

A espécie possui uma ampla plasticidade fenotípica caracterizada por seis variedades: *H. courbaril* var. *altissima*; *H. courbaril* var. *longifolia*; *H. courbaril* var. *stilbocarpa*; *H. courbaril* var. *subsessilis*; *H. courbaril* var. *villosa*; *H. courbaril* var. *courbaril*.

A variedade *courbaril*, abordada no presente estudo, apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocupando a maioria dos ambientes tropicais, desde a floresta tropical úmida até a Caatinga (Figura 1). Segundo Lee e Langenheim, (1975) a variedade ocorre com maior frequência em ambientes secos nas proximidades da bacia amazônica, podendo alcançar até 40 m de altura. Essa variedade diferencia-se morfológicamente de *H. courbaril* var. *stilbocarpa* pela presença de lóbulos do cálice tomentosos de ambos os lados com coloração ocre.

A variedade *stilbocarpa* apresenta uma distribuição mais restrita (Figura 2) e altura reduzida (de 12 a 20 m) quando comparada à variedade *courbaril*. Ocorre predominantemente na floresta estacional e no cerrado, podendo ser encontrada nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Distrito Federal e sudoeste de Goiás.

Segundo Lee e Langenheim (1975), essa variedade caracteriza-se pela presença de folíolos subfalcados, lóbulos do cálice de coloração marrom-escuro na face externa e dourada na face interna, flores de dimensões menores às encontradas em *H. courbaril* var. *courbaril* e *H. courbaril* var. *subsessilis* e maiores do que as encontradas em *H. courbaril* var. *altissima* com frutos de coloração marrom-escuro.

A síndrome de quiropterofilia foi proposta por Lee e Langenheim (1975) para 11 espécies do gênero *Hymenaea* e por Crestana et al. (1985) para *H. courbaril* var. *stilbocarpa*. Esses autores basearam suas conclusões em observações e características morfológicas da flor, como a coloração esbranquiçada (Figura 1), tamanho grande das anteras, projeção da flor para fora da copa e disponibilidade noturna de pólen. Produtora de néctar, a espécie também é visitada por beija-flores, himenópteros e dípteros (Crestana et al., 1985).

As vagens e sementes de *H. courbaril* (Figura 2) constituem um importante recurso alimentar para a mastofauna (Hallwachs, 1986; Asquith et al., 1999; Santos, 2002), sendo relatada nesses trabalhos a ocorrência de predação principalmente por antas (*Tapirus terrestris*), veados (*Mazana spp.*), macacos prego (*Cebus apella*), queixadas (*Tayassu pecari*) e até cavalos (*Equus caballus*). Hallwachs (1986) considera as cotias (*Dasyprocta azarae*) e pacas (*Agouti paca*) como os mamíferos mais eficientes na dispersão secundária de sementes, visto que esses organismos costumam enterrar vagens e sementes no solo, tornando-as mais protegidas da predação. Jansen (1975) e Asquith et al. (1999) também salientam a importância desses dois animais para a germinação de sementes e recrutamento de plântulas de jatobá. A distância da dispersão de sementes de jatobá por pacas pode chegar a 6 m e por cotias a até 225 m (Asquith et al., 1999; Hallwachs, 1986).

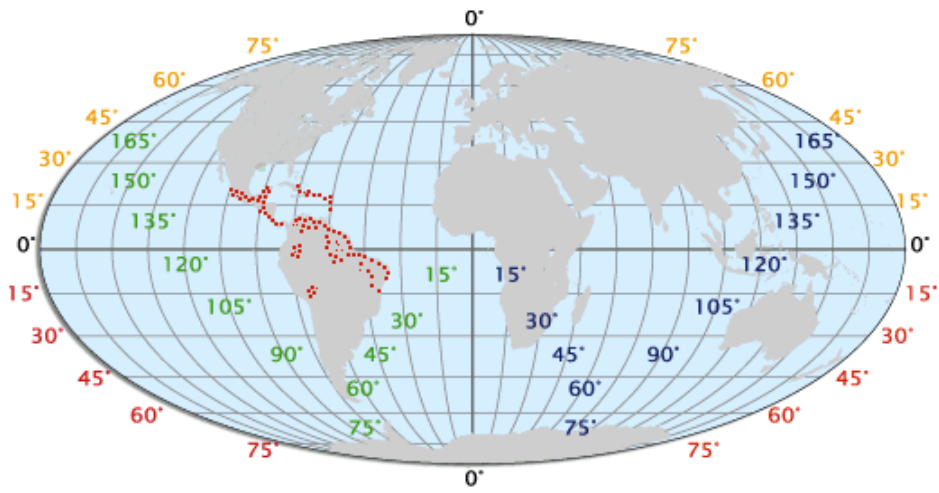


Figura 1 - Distribuição geográfica de *H. courbaril* var. *courbaril* baseada em Lee e Langenheim (1975)

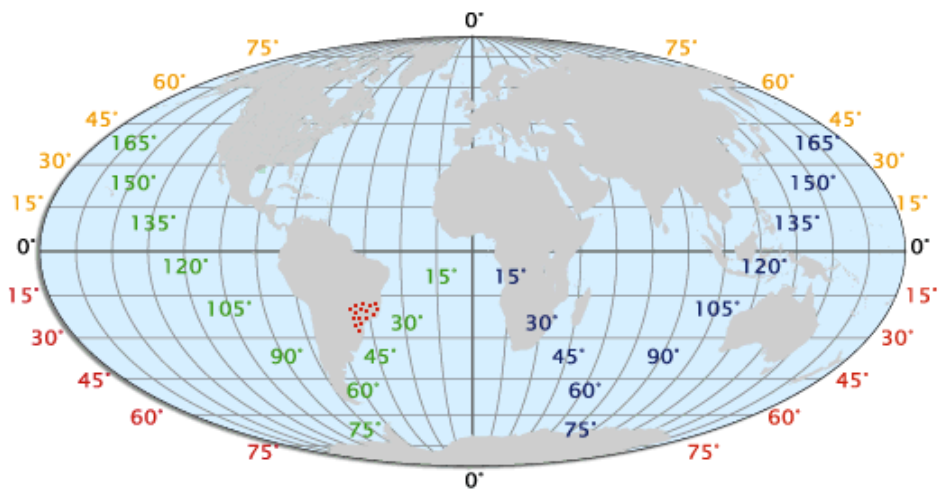


Figura 2 - Distribuição geográfica de *H. coubaril* var. *stilbocarpa* baseada em Lee e Langenheim (1975)

A espécie é alógama (Sampaio e Venturini, 1990; Santos, 2002), com indícios de auto-incompatibilidade relatados por Bawa (1974) e Jansen (1983). Estudos posteriores mostraram que a aparente auto-incompatibilidade deve-se provavelmente ao processo de rejeição pós-zigótica (Gibbs et al., 1999). O número cromossômico de *H. courbaril* é  $2n = 24$ , o mesmo de todo o gênero *Hymenaea* (Lee e Langenheim, 1975).

A espécie possui um amplo histórico de utilização pelos indígenas da floresta tropical. Sua resina, conhecida como “jutaicaica” pelos índios ou “copal da América”, possui tanto utilização medicinal nos casos de problemas cardio-pulmonares quanto também é usada como incenso em rituais.

Os primeiros estudos a respeito da variabilidade genética da espécie foram realizados por Sampaio e Venturini (1990) que verificaram altos coeficientes de variação genética entre progênies de acessos pertencentes a bancos de germoplasma. Estudos posteriores de diversidade e estrutura genética foram realizados, utilizando marcadores moleculares, por Santos (2002), Toledo (2005) e Kageyama et al. (2004) indicando uma alta diversidade genética na espécie.

Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (1995) a espécie *H. courbaril* enquadra-se em duas categorias de recursos genéticos florestais importantes para conservação “in situ”: o de espécies arbóreas de interesse econômico e espécies de importância para sustentabilidade do ecossistema.

Pelo exposto acima, verifica-se a importância de realizar uma avaliação do atual estado de conservação em populações isoladas da espécie, buscando verificar sua sustentabilidade em termos genéticos, e delinear estratégias que minimizem os possíveis impactos negativos que estejam sendo causados pela fragmentação florestal e exploração indevida.





Figura 3 - Inflorescência em panículas terminais de *H. courbaril*  
Foto: F. Croat, Missouri Botanical Gardens



Figura 4 – Vagem e sementes de *H. courbaril*

Foto: Environmental Sciences Program, Smithsonian Tropical Research Institute

## 2.6 Materiais e métodos

### 2.6.1 Seleção da espécie-alvo

Buscando atender aos critérios de seleção de espécies prioritárias para conservação genética propostos por Namkoong (2000), a espécie *H. courbaril* foi selecionada como espécie-alvo para realização desse estudo.

Na seleção foram considerados critérios semelhantes aos utilizados por Santos (2005) como a existência de conhecimentos básicos a respeito da biologia da espécie e protocolos de análise a partir de marcadores microssatélites bem definidos; o fato de ser típica de estágios sucessionais avançados e de possuir “representatividade” ecológica; e o elevado valor econômico que a torna alvo do extrativismo seletivo. Outro aspecto importante considerado na seleção da espécie-alvo foi a existência de uma ampla variação morfológica na espécie, possibilitando a comparação da diversidade existente entre duas variedades botânicas: *H. courbaril* var. *stilbocarpa* e *H. courbaril* var. *courbaril*.

### 2.6.2 Identificação das populações e coleta do material vegetal

A identificação das populações nos fragmentos florestais presentes na Bacia do Rio Piracicaba e no Panamá foi realizada a partir de viagens ao campo, análise de imagens de satélite da região, consulta em materiais depositados em herbários, estudos florísticos e fitossociológicos prévios, todos indicando a presença de populações da espécie em diversos locais.

A baixa densidade populacional apresentada pela espécie nas populações brasileiras da bacia do Piracicaba levou à necessidade de realização de um censo, visando coletar folhas de todos os indivíduos presentes nos fragmentos selecionados.

O mesmo procedimento não foi necessário nas populações do Panamá, devido à maior densidade populacional existente nas áreas. Folhas de indivíduos adultos, identificados no campo, foram coletadas e acondicionadas em sacos de papel dentro de

recipientes contendo sílica gel, onde permaneceram armazenados até o procedimento de extração do DNA. Uma breve descrição dos fragmentos e o número de indivíduos adultos coletados em cada uma das localidades são apresentados na Tabela 2.

### **2.6.3 Extração e quantificação do DNA genômico**

A extração do DNA proveniente das amostras brasileiras foi realizada no Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas – LARGEA (ESALQ/USP). O protocolo utilizado na extração foi baseado no método CTAB (Doyle e Doyle, 1990), com algumas modificações necessárias para espécie.

A extração do DNA proveniente das amostras panamenhas foi realizada no Smithsonian Tropical Research Institute, Panamá, com o auxílio do DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen Inc., Valencia, CA, EUA).

Após a extração, realizou-se a quantificação do DNA presente nas amostras com o auxílio de espectrofotômetro e por meio de comparação com amostras de DNA de quantidades previamente conhecidas (DNA  $\lambda$ ), submetidos à eletroforese em gel de agarose, durante 45 min (sob 80 V e 120 mA), corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

Tabela 2 - Descrição dos fragmentos e número de indivíduos adultos que tiveram suas folhas coletadas em cada uma das localidades amostradas. Piracicaba – SP, 2005

Local de Coleta	Área aproximada (ha)	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Densidade Populacional	Estratégia de coleta	Número de indivíduos
Canal do Panamá – Panamá	7.000	08°56'N	79°65' O	10	Média	Amostragem	31
Coclé – Panamá	5.000	08°34'N	80°33' O	160	Média	Amostragem	30
Reserva Florestal Mata de Santa Genebra – Brasil	252	22°49' S	47° 06' O	680	Baixa	Censo	14
Fazenda São José – Brasil	230	22°21'S	47°29'O	613	Baixa	Censo	17
Ártemis – Brasil	3	22° 42'S	47° 38' O	540	Baixa	Censo	10
Total							102

### 2.6.1.4 Iniciadores microssatélites

As seqüências dos iniciadores utilizados neste trabalho (Tabela 3) foram obtidas pela Dra. Ana Ciampi, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, com base na análise de 93 amostras de indivíduos adultos de *Hymenaea spp.* coletadas nos biomas Cerrado, Mata Atlântica e Floresta Amazônica (Ciampi e Suganuma, 2001).

A Tabela 2 mostra os respectivos números de repetições, amplitudes alélicas e temperaturas de anelamento dos iniciadores obtidos por Ciampi (comunicação pessoal).

Tabela 3 - Seqüência de iniciadores microssatélites desenvolvidos para *Hymenaea spp.* com os respectivos números de repetições, amplitudes alélicas e temperaturas de anelamento ( $T_a$ ) obtidos por Ciampi (comunicação pessoal). Piracicaba – SP, 2005

Locus	Nº de repetições	Amplitude alélica (pb)	$T_a$ (°C)
HC6	(CT) <sub>28</sub>	80-130	60°C
HC12	(TC) <sub>21</sub>	164-214	60°C
HC14	(TC) <sub>17</sub>	129-177	58°C
HC17	(TC) <sub>13</sub>	120-150	58°C
HC25	(TC) <sub>26</sub>	130-244	58°C
HC33	(AG) <sub>16</sub>	124-160	58°C
HC34	(TG) <sub>9</sub>	118-224	58°C
HC40	(AG) <sub>12</sub> (AG) <sub>26</sub>	169-215	60°C
HC42	(CA T) <sub>5</sub> (AG) <sub>19</sub>	111-175	60°C

### 2.6.1.5 Reações de amplificação

Nas reações de amplificação, utilizou-se um volume total de 12,74  $\mu$ l por reação, contendo: 3  $\mu$ l de DNA genômico (10 ng/ $\mu$ l); 1,30  $\mu$ l de dNTPs (2,5 mM); 4,30  $\mu$ l dos iniciadores “reverse” e “forward” (1 $\mu$ M); 1,30  $\mu$ l de tampão para PCR 10X contendo MgCl<sub>2</sub>; 0,2  $\mu$ l de Taq polimerase (5 U/ $\mu$ l); 1,30  $\mu$ l de BSA (2,5  $\mu$ g/ml) e 1,34  $\mu$ l de água milique.

A amplificação foi conduzida em termociclador MJ Research, modelo PTC-100 (MJ Research, Waltham, MA, EUA), sob as seguintes condições: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridação específica para cada par de *primers* por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e finalizando com 72°C por 7 minutos.

### 2.6.1.6 Eletroforese dos fragmentos amplificados, coloração e interpretação do gel

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida a 5%, em cuba vertical (Hoefer SQ3 sequencer, Amersham Pharmacia Biotech, São Francisco, CA, EUA) contendo tampão TBE 1X sob 1600 v e 40 mA, por 2 horas.

Após a corrida, foi realizada a coloração com nitrato de prata, utilizando o protocolo desenvolvido por Creste et al. (2001). A interpretação dos fragmentos amplificados foi realizada visualmente por meio de comparação com marcador de peso molecular padrão (ladder 100 pb), de maneira que, fragmentos apresentando diferentes pesos moleculares foram considerados como alelos diferentes.

## **2.6.1.7 Análises Estatísticas**

### **2.6.1.7.1 Desequilíbrio gamético entre pares de loci**

A grande maioria dos métodos e modelos utilizados em análise genético-populacionais, como a análise do sistema de reprodução, as análises de paternidade e de estrutura genética, requerem a suposição de equilíbrio de ligação entre os loci. Assim, os loci foram submetidos ao teste de desequilíbrio de ligação, a fim de determinar a presença ou ausência de desequilíbrio de ligação entre os nove loci SSR utilizados.

O teste de ligação foi analisado utilizando-se a medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (Weir, 1979). Esse teste é o mais indicado em situações em que a união dos gametas pode não ter sido aleatória. A hipótese nula de equilíbrio de ligação foi testada com o teste de qui-quadrado, descrito em Weir (1979). As estimativas de desequilíbrio foram obtidas com o auxílio do programa GDA (Lewis e Zaykin, 2002).

### **2.6.1.7.2 Estimativas de frequência de alelos nulos e poder de exclusão de cada loco**

As frequências dos alelos nulos, e o poder de exclusão do genótipo de um dos parentais (pai ou mãe) de um determinado indivíduo quando nenhum dos parentais é conhecido [Excl(1)] e quando um é conhecido [Excl(2)] foram estimados por meio do programa CERVUS, versão 2.0 (Marshall et al., 1998). Essa análise permite verificar o potencial dos loci revelados para estudos de paternidade.

### 2.6.1.7.3 Diversidade genética e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

A partir da interpretação dos géis foram obtidos os genótipos dos indivíduos, os quais foram utilizados para calcular as frequências alélicas e genotípicas em cada loco e população, utilizando o programa GDA (Lewis e Zaykin, 2002).

A diversidade genética foi caracterizada a partir dos seguintes índices: riqueza alélica ou número médio de alelos por loco ( $A$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), heterozigosidade esperada segundo as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ). O número efetivo de alelos por loco ( $A_e$ ) foi estimado por meio da eq. (1):

$$\hat{A}_e = 1/(1 - \hat{H}_e) \quad (1)$$

O índice de fixação ( $f$ ) foi estimado segundo Weir (1996) como mostra a eq. (2):

$$\hat{f} = \frac{(\hat{H}_e - \hat{H}_o) + \frac{1}{2n} \hat{H}_o}{\hat{H}_e - \frac{1}{2n} \hat{H}_o} \quad (2)$$

em que,  $n$  corresponde ao tamanho da amostra.

A máxima diversidade possível em cada loco foi calculada a partir do número de alelos observado, segundo a eq. (3):

$$\hat{H}_{\max} = (\hat{A} - 1) / \hat{A} \quad (3)$$

A significância estatística dos valores uniloco do índice  $f$  foi testada a partir da aderência das frequências genotípicas ao modelo de EHW, usando-se o teste exato de Fisher, por meio do método convencional de Monte Carlo. A significância estatística do índice  $f$  médio entre loci foi calculada por 10.000 "bootstraps".



Os índices de diversidade, o índice de fixação, o teste exato de Fisher para o EHW e os “bootstraps” foram calculados usando o programa GDA (Lewis e Zaykin, 2002).

#### 2.6.1.7.4 Estrutura genética espacial (correlação espacial dos genótipos)

A distribuição genética espacial dos genótipos foi analisada por meio da estimativa do coeficiente médio de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) entre pares de árvores dentro de classes de distância com intervalos constantes.

As populações apresentaram diferentes densidades populacionais e, portanto, distintos tamanhos amostrais, o que tornou necessária a determinação de diferentes classes de distâncias para diferentes populações na Tabela 4.

O coeficiente de coancestria para cada classe de distância e para a média das populações foi calculado conforme Loiselle et al. (1995), definido para cada alelo  $k$  em cada par de indivíduos,  $x$  e  $y$ , como mostra a eq.(4):

(4)

$$\hat{\theta}_{xy} = \frac{(p_x - \bar{p}_k)(p_y - \bar{p}_k)}{\bar{p}_k(1 - \bar{p}_k)} + \frac{1}{2n-1},$$

em que,  $p_x$  e  $p_y$  são as freqüências do alelo  $k$  nos indivíduos  $x$  e  $y$  (assumindo valores de 0, 0,5 e 1 em indivíduos homocigotos para o alelo alternativo, heterocigotos e homocigotos para o alelo considerado, respectivamente) e  $\bar{p}_k$  é a média da freqüência do alelo  $k$  na subpopulação com tamanho amostral  $n$ .

Tabela 4 - Número de classes de distância e intervalos utilizados nas análises de estrutura espacial em cada uma das populações. Piracicaba – SP, 2005

População	Número de classes de distância	Intervalos (m)
Ártemis	4	400
Santa Genebra	5	1.000
Mata São João	5	2000
Coclé	8	1.500
Canal do Panamá	8	1.500

As estimativas multiloci foram calculadas por meio da ponderação de  $\theta_{xy}$  em função do índice de polimorfismo de cada alelo, conforme Hardy e Vekemans (2003). O erro padrão ( $EP$ ) do coeficiente médio de coancestria foi obtido por reamostragem “jackknifed” entre loci. O coeficiente de coancestria e o erro padrão foram estimados usando o programa SPAGeDi versão 1.1 (Hardy e Vekemans, 2003). O erro padrão foi usado para calcular o intervalo de confiança do coeficiente médio de coancestria a 95% de probabilidade ( $IC_{95\%} = 1,96EP$ ) para cada classe de distância e construir o correlograma.

#### 2.6.1.7.5 Tamanho efetivo de variância

O tamanho efetivo de variância corresponde ao número de indivíduos de uma população idealizada (infinita, de cruzamentos aleatórios, sem seleção, mutação e migração) que poderia gerar a mesma variação nas frequências alélicas que a observada na população sob consideração.

O tamanho efetivo de variância para cada população foi estimado conforme a eq.(5), usando a metodologia proposta por Sebbenn e Seoane (2005):

$$\hat{N}_e = \frac{0,5n^2}{(1 + \hat{F}) \left( 0,5n + \sum_{x=1}^n \sum_{y \neq 1}^n \hat{\theta}_{xy} \right)}$$

em que:

$n$  é tamanho amostral ou número de indivíduos da população;

$F$  é o coeficiente de endogamia (utilizou-se o índice de fixação como medida de endogamia, considerando valores negativos como zero);

$\theta_{xy}$  é o coeficiente médio de coancestria entre plantas dentro da população.

#### 2.6.1.7.6 Estrutura genética

A estrutura genética das populações de *H. courbaril* foi caracterizada pelas estatísticas  $F$ , estimadas de acordo com o método de Weir e Cockerham (1984), com o auxílio do programa GDA (Lewis e Zaykin, 2002). Os parâmetros estimados foram:  $\theta_p$  = divergência genética entre populações;  $F$  = índice de fixação para o conjunto das populações e;  $f$  = índice de fixação para a média das populações.

Adicionalmente, as populações do Panamá e Brasil foram consideradas como regiões diferentes. Nesse caso, os parâmetros estimados foram:  $\theta_R$  = divergência genética entre regiões;  $\theta_p$  = divergência genética entre populações dentro de regiões;  $F$  = índice de fixação para o conjunto das populações e;  $f$  = índice de fixação para a média das populações. Para verificar se as estimativas médias de  $\theta_R$ ,  $\theta_p$ ,  $F$  e  $f$  eram estatisticamente diferentes de zero, estimaram-se os intervalos de confiança a 95% de probabilidade, pelo método de reamostragem “bootstrap”, usando o programa GDA (Lewis e Zaykin, 2002). Foram utilizadas 10.000 repetições sobre os loci.

Alternativamente, foram utilizadas as estatísticas  $R_{ho}$  e  $R_{ST}$  (Slatkin, 1995), obtidas a partir do programa R<sub>ST</sub>Calc 2.2 (Goodman, 1997). Considerando que nos loci microssatélites, o processo mutacional não corresponde ao modelo de alelos infinitos

com baixa taxa mutacional, as estatísticas  $R_{ho}$  e  $R_{ST}$  são as mais indicadas nesses casos, pois aderem ao modelo mutacional “stepwise”.

#### 2.6.1.7.7 Fluxo gênico aparente

O fluxo gênico aparente ( $Nm$ ) entre populações foi estimado de forma indireta conforme a eq. (6), segundo o modelo de ilhas proposto por Crow e Aoki (1984), que corrige a análise para pequeno número de populações:

(6)

$$\hat{Nm} = \frac{1}{4\alpha} \left( \frac{1}{\hat{F}_{ST}} - 1 \right),$$

em que:

$N$  : corresponde ao tamanho efetivo;

$m$  : número de migrantes por geração;

$F_{ST}$  : divergência genética entre populações e

$\alpha$ : correção para o número finito de populações ( $n$ ), como mostrado na eq.(7):

(7)

$$\alpha = [n / (n - 1)]^2$$

A estatística  $F_{ST}$  foi substituída por  $\theta_p$ ; como sugerem Cockerham e Weir (1993), para uma estimação de fluxo gênico não viesada.

#### 2.6.1.7.8 Distância genética de Nei (1978)

Para avaliar a relação genética entre as populações foi calculada a distância genética de Nei (1978) entre todos os pares de populações. Essas distâncias genéticas foram usadas para construir o dendrograma a partir do método de agrupamento de

médias aritméticas entre todos os pares de distâncias. A obtenção das estimativas de distância genética de Nei (1978) e do dendrograma, utilizando o critério de agrupamento UPGMA, foi realizada por meio do programa TFPGA 1.3 (Miller, 1997). A estabilidade dos agrupamentos foi testada a partir de reamostragens por 10.000 “bootstraps”.

#### **2.6.1.7.9 Análise de “bottleneck”**

As análises foram realizadas com o auxílio do programa Bottleneck (Piry et al., 1999). A análise “bottleneck” (ou de gargalo genético) apresenta três modelos para explicar o polimorfismo em loci: o modelo de alelos infinitos (MAI); modelo de mutações de ponto (MMP) e modelo de mutação de duas fases (MMDF). Tendo em vista que loci microssatélites ajustam-se melhor ao modelo MMDF (Di Rienzo et al., 1994), esse modelo foi selecionado para realização das análises.

Populações que experimentaram uma redução no seu tamanho efetivo normalmente exibem uma redução no número de alelos ( $A$ ) e na diversidade gênica esperada em EHW ( $H_e$ ), nos loci polimórficos. Contudo, o número de alelos é reduzido mais rapidamente do que a diversidade genética, de modo que, se a população sofreu um gargalo genético, a diversidade gênica observada é maior que a diversidade genética esperada em equilíbrio ( $H_{eq}$ ), calculada a partir do número observado de alelos ( $A$ ), sob a suposição de um tamanho populacional constante em equilíbrio (Luikart et al. 1998).

Para um significativo número de loci com excesso de diversidade gênica, foi usado o teste de Wilcoxon, que apresenta um poder estatístico relativamente alto, podendo ser usado em casos de poucos loci e qualquer tamanho amostral. Para cada loco, de cada população, foi computada a distribuição da diversidade gênica esperada para o número observado de alelos ( $A$ ), sob a suposição de equilíbrio de mutação e deriva. A distribuição foi obtida por simulação de processos coalescentes de  $A$  alelos sob o modelo MMDF. A diversidade gênica esperada do número de alelos foi

comparada com a diversidade gênica (esperada em EHW), buscando identificar excessos ou déficits de diversidade gênica.

Foi calculado o desvio padrão da distribuição do equilíbrio de mutação e deriva da diversidade gênica buscando obter diferenças para cada loco e os P valores para a diversidade gênica observada. A distribuição das freqüências alélicas foi determinada, buscando identificar distribuições próximas à forma de “L” (como esperado em um modelo de equilíbrio e deriva) ou distantes dessa forma (gargalo genético).

## 2.7 Resultados

### 2.7.1 Análises dos loci microssatélites

A maioria dos nove loci microssatélites utilizados nas análises detectou níveis elevados de diversidade alélica, tanto nas populações brasileiras de *H. courbaril var. stilbocarpa* quanto nas panamenhas de *H. courbaril var. courbaril*. No total, foram genotipados 102 indivíduos em cinco populações naturais da espécie, nas quais foram encontrados 86 alelos, com uma média de 9,56 alelos/locus.

A Figura 5 mostra a distribuição do número de alelos em cada locus. Os loci HC06 e HC14 apresentaram o maior número de alelos/locus (13 alelos), enquanto o locus HC34 caracterizou-se como sendo o menos informativo, com apenas cinco alelos.

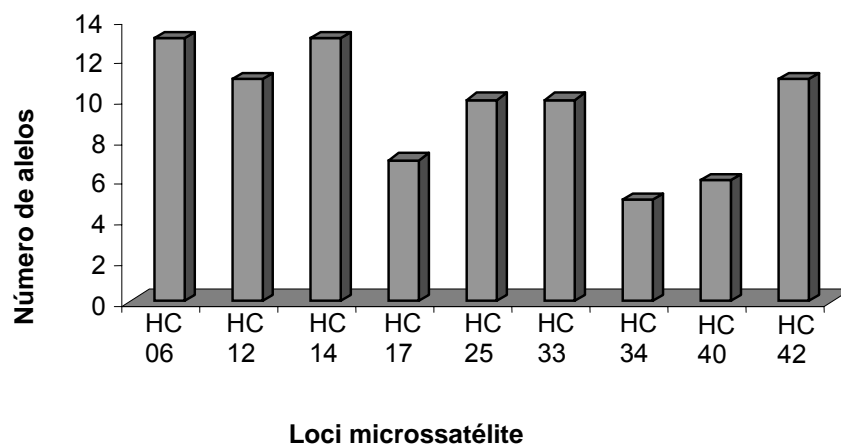


Figura 5 - Número de alelos encontrados em cada um dos loci microssatélite analisados

O número de alelos nos loci variou de 5 (HC34) a 13 (HC06 e HC14), com média de 9,5 alelos por locus. O número efetivo médio de alelos por locus foi menor, variando de 3,12 (HC17 e HC34) a 7,81 (HC12), indicando que embora os loci tenham sido altamente polimórficos, a maioria dos alelos apresentou uma baixa frequência.

Os valores de heterozigosidade esperada e observada para cada locus encontram-se na Tabela 5. Os menores valores em relação à heterozigosidade esperada ( $\bar{H}_e=0,679$ ) e observada ( $\bar{H}_o=0,505$ ) foram observados no locus HC17. O locus HC25 apresentou o maior valor em relação à heterozigosidade esperada ( $\bar{H}_e=0,817$ ), enquanto HC14 apresentou a maior heterozigosidade observada ( $\bar{H}_o=0,763$ ).

Os nove loci marcadores apresentaram altos níveis de diversidade genética e mostraram-se eficientes nas estimativas de diversidade, sendo capazes de detectar 87,26 % da diversidade máxima possível; os loci HC40 e HC12 apresentaram as melhores performances na detecção da diversidade potencial.

A maioria dos loci apresentou alto poder de exclusão, com a estimativa multilocus em torno de 0,999, o que evidencia o grande poder deste conjunto de marcadores para análises de paternidade e parentesco.

A análise da associação entre alelos de diferentes loci mostra que a maioria dos valores de  $\chi^2$  obtidos não foi significativa (Anexo B). Alguns loci apresentaram indícios de desequilíbrio gamético como, por exemplo, o par HC12/HC25, significativo a 5% de probabilidade, nas populações Ártemis e Canal do Panamá e os pares HC14/HC42 e HC34/HC42, significativos a 1% de probabilidade.

O desequilíbrio gamético pode ocorrer devido à redução da frequência de recombinação entre genes situados em regiões próximas, ao longo de determinado cromossomo. A magnitude da medida de desequilíbrio ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ) variou entre 0,096 e 0,210, a qual, em conjunto com os valores não significativos de  $\chi^2$  na maioria dos loci, permite afirmar que a maioria dos alelos dos diferentes loci analisados não estão associados e portanto segregam independentemente.

Em relação aos pares HC12/HC25, HC14/HC42 e HC34/HC42, aparentemente em desequilíbrio de ligação, esse desequilíbrio não foi verificado em várias populações,

de modo que a manutenção desses exerceu uma baixa influência nas estimativas de índices de diversidade e estrutura genética, sem necessidade de excluir esses loci das análises.

O teste exato de Fisher indicou que os loci HC6, HC25 e HC33 não se ajustaram às proporções de EHW, provavelmente devido à presença de endogamia e/ou efeito de Wahlund. As maiores frequências de alelos nulos, considerando-se o conjunto dos loci analisados, foram observadas nos loci HC25 e HC33 (Tabela 5), porém não houve evidência de que esses valores seriam capazes de influenciar as estimativas de parâmetros genéticos.

As frequências dos alelos privados nas cinco populações de *H. courbaril* são apresentadas no Anexo A. A Figura 6 mostra a distribuição desses alelos por população. Foram encontrados 16 alelos privados, dos quais oito pertenciam à população do Canal do Panamá. O número de alelos privados na população do Canal do Panamá, em conjunto com suas frequências alélicas, mostra que, embora as populações compartilhem a maior parte dos alelos, a caracterização desses alelos privados seria capaz de permitir a rastreabilidade de materiais (como madeira e sementes) originários dessa área.

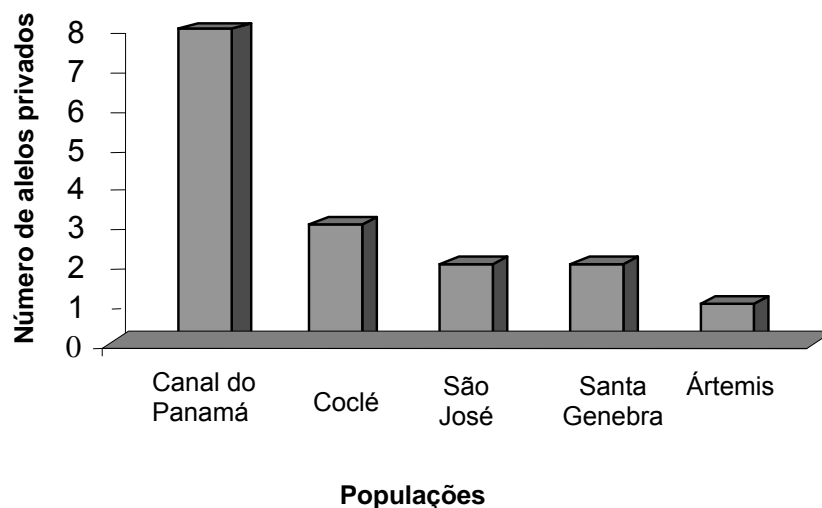


Figura 6 - Distribuição de alelos privados encontrados nas cinco populações de *H. courbaril* analisadas



Tabela 5 - Estimativas de parâmetros genéticos em cinco populações de *H. courbaril* obtidas a partir de nove loci microssatélites. Piracicaba – SP, 2005

Locus	<i>N</i>	$\hat{A}$	$\hat{A}_e$	$\bar{H}_o$	$\bar{H}_e$	$H_{\max}$	$(\hat{H}_e / H_{\max})100$	Excl (1)	Excl (2)	HW	Freq. alelos nulos
HC06	101	13	4,85	0,653	0,794	0,923	86,0%	0,428	0,604	**	0,103
HC12	101	11	7,81	0,723	0,872	0,909	95,9%	0,580	0,736	ns	0,089
HC14	97	13	4,74	0,763	0,789	0,923	85,4%	0,430	0,610	ns	0,015
HC17	101	7	3,12	0,505	0,679	0,857	79,2%	0,263	0,436	ns	0,144
HC25	101	10	5,46	0,554	0,817	0,900	90,7%	0,463	0,638	**	0,190
HC33	101	10	5,08	0,584	0,803	0,900	89,2%	0,440	0,617	**	0,153
HC34	101	5	3,12	0,574	0,679	0,800	84,8%	0,253	0,414	ns	0,085
HC40	101	6	5,13	0,693	0,805	0,833	96,6%	0,426	0,604	ns	0,073
HC42	101	11	4,98	0,762	0,799	0,909	87,9%	0,439	0,617	ns	0,014
Média		9,5	4,92	0,645	0,781	0,895	87,3%	0,9927	0,9997		

(sendo *N*: número médio de indivíduos amostrados;  $\hat{A}$ : número médio de alelos por locus;  $\hat{A}_e$ : número efetivo de alelos por locus;  $\bar{H}_e$ : heterozigosidade esperada em EHW;  $\bar{H}_o$ : heterozigosidade observada; Excl (1) probabilidade de excluir um candidato a pai quando este não é o verdadeiros pai e quando nenhuma dos parentais é conhecido; Excl (2) probabilidade de excluir um candidato a pai quando este não é o verdadeiros pai e quando um dos parentais é conhecido; HW: adequação às proporções de EHW). \*\*:  $P < 0,01$ ; ns: não significativo.

### 2.7.2 Índices de diversidade genética

O número de alelos nas populações analisadas variou de 49 a 66 alelos, correspondentes a São José e ao Canal do Panamá, respectivamente (Figura 7).

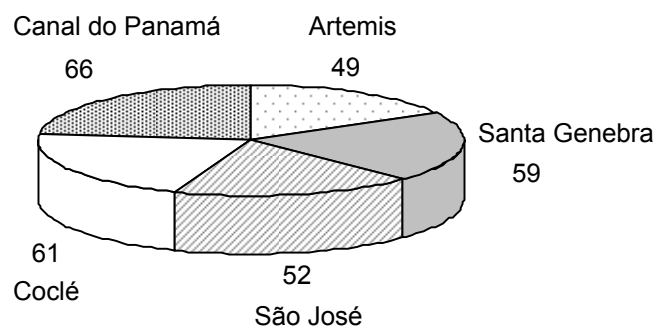


Figura 7 - Porção de alelos amostrados em cada uma das populações analisadas em relação ao total encontrado

Na Tabela 6, são apresentadas as estimativas de parâmetros genéticos de diversidade em cinco populações de *H. courbaril*. O número médio de alelos por locus ( $A$ ) variou entre as populações de 5,44 (Ártemis) a 7,33 (Canal do Panamá), com média geral de 6,44. Os valores obtidos nas três populações brasileiras foram bastante similares; o mesmo foi observado em relação às duas populações panamenhas analisadas. O maior número de alelos, observado nas populações panamenhas deve-se, provavelmente, ao maior tamanho amostral (30). O número efetivo de alelos por locus variou entre populações de 3,39 (Canal do Panamá) a 4,52 (Santa Genebra), com média de 3,91.

Tabela 6 - Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade obtidas em cinco populações de *H. courbaril* a partir de nove loci microssatélites

População	$N$	$\hat{A}$	$\hat{A}_e$	$\bar{H}_e$	$\bar{H}_o$	$\hat{f}$	IC (95%)	$\theta$	$\hat{N}_e$	$\hat{N}_e / n$
Ártemis	10	5,44	4,35	0,770	0,689	0,111	0,033 a 0,194	0,090	5,5	0,55
Santa Genebra	14	5,78	4,52	0,779	0,704	0,101	0,023 a 0,176	0,071	7,1	0,51
Mata São José	17	5,78	3,62	0,724	0,614	0,155	0,074 a 0,220	0,067	7,4	0,44
Média		5,67	4,16	0,758	0,669	0,122		0,072	6,9	0,52
Coclé	30	7,11	3,89	0,743	0,632	0,151	0,055 a 0,235	0,060	8,3	0,28
Canal do Panamá	31	7,33	3,39	0,705	0,638	0,100	-0,025 a 0,213	0,054	9,2	0,30
Média		7,22	3,64	0,724	0,635	0,125		0,056	8,9	0,30
Média geral		6,44	3,91	0,744	0,655	0,123				

sendo  $N$ : número médio de indivíduos amostrados;  $\hat{A}$ : número médio de alelos por locus;  $\hat{A}_e$ : número efetivo de alelos por locus;  $\bar{H}_e$ : heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg;  $\bar{H}_o$ : heterozigosidade observada;  $\hat{f}$ : índice de fixação; IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade;  $\theta$ : coeficiente médio de coancestria;  $N_e$ : tamanho efetivo de variância.

Os valores de heterozigosidade esperada apresentaram pequenas variações entre as populações. A menor heterozigosidade esperada (0,705) foi observada na população do Canal do Panamá, enquanto o maior valor (0,779) foi observado na população de Santa Genebra. Em relação a heterozigosidade observada, a variação entre populações foi de 0,614 (Mata São José) a 0,704 (Santa Genebra). Em todas as populações os valores de  $H_o$  foram inferiores aos de  $H_e$ , indicando um excesso de homozigose nas populações, provavelmente relacionado à endogamia.

Comparando a média das populações brasileiras da variedade *stilbocarpa* com a das panamenhas da variedade *courbaril*, observa-se que as populações brasileiras apresentaram maiores níveis de diversidade genética em termos de número efetivo de alelos por locus e heterozigosidades.

A Tabela 7 sintetiza as estimativas de parâmetros genéticos obtidas no presente trabalho e por outros autores para a espécie *H. courbaril*.

### 2.7.3 Índice de fixação, coancestria e tamanho efetivo

Os índices de fixação, coancestria e tamanho efetivo obtidos nas cinco populações, encontram-se na Tabela 6.

Todas as populações analisadas apresentaram índices de fixação positivos, variando de 0,1 (Canal do Panamá) a 0,155 (Mata São José), com uma média geral de 0,123. Considerando o intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade, apenas a população Canal do Panamá não apresentou um índice de fixação significativo.

O coeficiente de coancestria foi alto nas populações, variando entre 0,054 a 0,090 (Ártemis), indicando um forte potencial para geração de endogamia na descendência do cruzamento aleatório dos indivíduos avaliados.

As estimativas de tamanho efetivo de variância apresentaram-se extremamente reduzida em todas as populações, especialmente nas populações de Coclé e Panamá, indicando um elevado grau de parentesco, confirmado pelo coeficiente médio de coancestria. O tamanho efetivo de variância foi menor que o número censo ( $N$ ) nas populações brasileiras e o tamanho amostral nas populações panamenhas. A relação

entre o tamanho efetivo/ tamanho amostral e tamanho efetivo/número censo variou de 0,28 (Coclé) a 0,55 (Ártemis).

Comparando a média das populações brasileiras (*H. courbaril* var. *stilbocarpa*) com a média apresentada pelas populações panamenhas (*H. courbaril* var. *courbaril*) observa-se que as populações da variedade *stilbocarpa* apresentaram maiores coeficientes de coancestria e da relação tamanho efetivo/número censo.

Tabela 7 – Estimativas de  $N$ : número médio de indivíduos amostrados;;  $A$  : número médio de alelos por locus;  $A_e$  : número efetivo de alelos por locus;  $H_e$  : heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg e  $H_o$  : heterozigosidade observada em *Hymenaea*, obtidas por vários autores em diferentes populações. Piracicaba – SP, 2005

Autor	Espécie / variedade	Local	Técnica	$N$	$\bar{H}_e$	$\bar{H}_o$	$f$
O presente trabalho	<i>H. courbaril</i> var. <i>courbaril</i>	Panamá	SSR (9 loci)	101	0,74	0,65	0,123
	<i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>	Bacia do Rio Piracicaba -SP					
Toledo (2005)	<i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>	Pontal do Paranapanema -SP	SSR (3 loci nucleares e 1 cp)	358	0,62	0,53	0,145
Lovato (2005)	<i>H. courbaril</i>	Bacia do Rio Doce – MG	Seqüenciamento CpDNA	78	0,78	NC	NC
Dunphy et al. (2004)	<i>H. courbaril</i>	Porto Rico	Isoenzimas	237	0,10	0,10	NC
Kageyama et al. (2004)	<i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>	Pontal do Paranapanema –SP	SSR (9 loci)	87	0,76	0,62	0,184
Santos (2002)	<i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>	Pontal do Paranapanema –SP	SSR (5 loci)	83	0,85	0,83	-0,018
Ciampi e Suganuma (2001)	<i>Hymenaea</i> spp.	Distrito Federal	SSR (9 loci)	48	0,74	0,90	-0,220

NC: a informação não consta na publicação

### 2.7.4 Estrutura genética populacional

As estimativas da estatística  $F$  segundo o modelo de Weir e Cockerham (1984) e da estatística  $R_{ST}$  (Slatkin, 1995) são apresentadas na Tabela 8.

O índice de fixação médio das populações ( $\hat{f}$ ) indica redução da heterozigosidade devido ao sistema de reprodução (autofecundações e cruzamentos endogâmicos), e o índice de fixação para o conjunto das populações ( $\hat{F}$ ) indica endogamia devido aos efeitos combinados da deriva genética com desvios de cruzamentos aleatórios.

Os resultados obtidos indicaram a presença de endogamia, tanto na média quanto no conjunto das populações analisadas. O índice de fixação médio das populações ( $\hat{f}$ ) variou entre loci de 0,015 (HC14) a 0,237 (HC25), com média de 0,125; enquanto o índice de fixação obtido para o conjunto das populações ( $\hat{F}$ ) variou de 0,038 (HC14) a 0,343 (HC25), com média de 0,188. Considerando o intervalo de confiança do erro a 99% de probabilidade, ambas as estimativas foram significativamente diferentes de zero, evidenciando a ocorrência de endogamia nas populações analisadas de *H. courbaril*. A Tabela 9 mostra a comparação dos resultados obtidos pelo presente estudo e por outros autores em estudos populacionais com *H. courbaril* a qual é devidamente analisada na discussão.

As estimativas da divergência genética entre todas as populações a partir das estatísticas  $\theta_p$  e  $R_{ST}$  foram similares e significativas ( $\theta_p = 0,072$  e  $R_{ST} = 0,077$ ), indicando a existência de diferenciação entre populações. As diferenças observadas entre as estimativas de  $\theta_p$  e  $R_{ST}$  foram pequenas e ocorreram devido ao modelo mutacional utilizado no cálculo das estimativas. Enquanto  $\theta_p$  baseia-se no modelo de alelos infinitos, a estatística  $R_{ST}$  utiliza o modelo “stepwise”.

A estimativa da divergência genética considerando a metodologia e amostragem utilizadas, indicou a existência de 3,4% de divergência genética entre as duas regiões ( $\theta_R$ ) e 8,4% de divergência genética entre populações dentro de regiões ( $\theta_{p/R}$ ).

Tabela 8 - Estimativas das estatísticas  $F$  segundo o modelo de Weir e Cockerham (1984) e da estatística  $R_{ST}$  (Slatkin, 1995). Piracicaba – SP, 2005

Locus	$\hat{f}$	$\hat{F}$	$\hat{\theta}_p$	$\hat{\theta}_{p/R}$	$\hat{\theta}_R$	$\hat{R}_{ST}$
HC06	0,107	0,196	0,100	0,143	0,130	0,082
HC12	0,090	0,193	0,113	0,125	0,036	0,244
HC14	0,015	0,038	0,022	0,024	0,005	0,031
HC17	0,178	0,277	0,120	0,126	0,018	0,069
HC25	0,237	0,343	0,138	0,157	0,058	0,113
HC33	0,269	0,274	0,007	0,006	-0,001	0,051
HC34	0,101	0,169	0,076	0,093	0,051	0
HC40	0,114	0,146	0,036	0,027	-0,024	0,058
HC42	0,017	0,053	0,037	0,046	0,027	0,042
Média	0,125	0,188	0,072	0,084	0,034	0,077
Limite superior (99%)	0,201	0,271	0,109	0,074	0,128	0,092
Limite inferior (99%)	0,056	0,105	0,033	0,002	0,037	0,078



Tabela 9 - Parâmetros genéticos por vários trabalhos em diferentes populações do gênero *Hymenaea*. Piracicaba – SP, 2005

Autor	Espécie / variedade	Local	$f$	$F$	$\theta_p$	$N_m$	$N$	$N_e$
O presente trabalho	<i>H. courbaril</i> var. <i>courbaril</i> e <i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>	Panamá e bacia do Rio Piracicaba – SP	0,125	0,188	0,072	2,09	101	38,5
Toledo (2005)	<i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>	Pontal do Paranapanema	0,158	0,182	0,028	NC	49,28	42,96
Dunphy et al. (2004)	<i>H. courbaril</i>	Porto Rico	-0,051	0,032	0,079	2,91	237	NC
Kageyama et al. (2004)	<i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>	Pontal do Paranapanema	0,207	0,288	0,102	2,199	81,26	16,52
Santos (2002)	<i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>	Pontal do Paranapanema	0,023	0,088	0,066	3,51	83	81,47

A julgar pelo intervalo de confiança do erro a 99% de probabilidade, essas estimativas são significativas, indicando maior divergência genética entre populações da mesma região do que entre regiões. A Tabela 09 mostra uma comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com o de outros autores em estudos populacionais com *H. courbaril*.

Os valores obtidos para a variância entre e dentro de populações e pela medida  $\hat{R}_{ho}$  de divergência genética entre populações são apresentados na Tabela 10 e confirmam as evidências sugeridas pelas estatísticas  $F$  de Weir e Cockerham (1984). A estatística  $\hat{R}_{ho}$  proposta por Slatkin (1985) tem sido bastante utilizada para dados obtidos por meio de marcadores microssatélites. No caso sob estudo, as estimativas de  $\hat{R}_{ho}$  foram baixas na maioria dos loci, indicando baixa diferenciação entre as populações, sendo que apenas 9,3% da variabilidade genética encontra-se entre populações e 90,7% da variabilidade encontra-se dentro da população. Esse dado vem somar-se aos obtidos por outros trabalhos com espécies arbóreas que indicam geralmente uma maior variabilidade intrapopulacional.

### 2.7.5 Fluxo gênico aparente

A estimativa da média do número de migrantes entre populações locais foi obtida a partir da análise das frequências dos alelos privados, baseada em Slatkin (1985). As análises indicaram que, considerando todas as populações,  $Nm = 2,06$  e entre regiões,  $Nm = 1,78$ . Esses valores superiores a 1 indicaram que nas populações consideradas não existem indícios de fortes processos de diferenciação entre as populações de diferentes regiões, como também nas populações analisadas em conjunto.

Essa medida refere-se ao fluxo gênico histórico, baseada na medida de divergência genética entre populações e regiões. Desse modo, esse resultado deve ser interpretado com cautela, indicando que as populações de diferentes regiões apesar de geograficamente isoladas, apresentam alelos e frequências similares.

Tabela 10 - Número de alelos amostrado em cada locus (A), variação total considerando todas as populações ( $\sigma_e^2$ ), variação dentro de cada população ( $\sigma_d^2$ ) e variação entre as populações ( $R_{ho}$ ). Piracicaba – SP, 2005

Loci	A	$\hat{\sigma}_e^2$	$\hat{\sigma}_d^2$	$\hat{R}_{ho}$
HC06	13	12,786	146,844	0,080
HC12	11	6,651	16,232	0,291
HC14	12	0,345	8,764	0,038
HC17	7	0,388	4,812	0,075
HC25	10	8,444	74,864	0,101
HC33	10	0,598	10,290	0,055
HC34	5	-0,014	8,228	-0,002
HC40	6	0,264	4,269	0,058
HC42	11	0,852	20,180	0,040
Média				0,093
	Superior IC 95%		0,195	
	Inferior IC 95%		0,069	

### 2.7.6 Distância genética de Nei

As distâncias genéticas de Nei, apresentadas na Tabela 11, variaram entre 0,028 (Mata São José e Ártemis) e 0,364 (Ártemis e Canal do Panamá). Do mesmo modo, o dendrograma obtido pelo método UPGMA (Figura 8), mostra a população do Canal do Panamá inserida num agrupamento à parte. O dendrograma obtido é suportado por grande número de permutações.

O primeiro e o terceiro nós foram suportados por 76% das permutações, enquanto o segundo e quarto nós suportaram 58% e 100% das permutações, respectivamente.

Tabela 11 - Matriz de distâncias genéticas de Nei (1978) para cinco populações amostradas de *H. courbaril*. Piracicaba – SP, 2005

População	Santa Genebra	Mata São José	Coclé	Canal do Panamá
Ártemis	0,075	0,028	0,242	0,364
Santa Genebra	0	0,165	0,135	0,289
Mata São José		0	0,191	0,328
Coclé			0	0,208

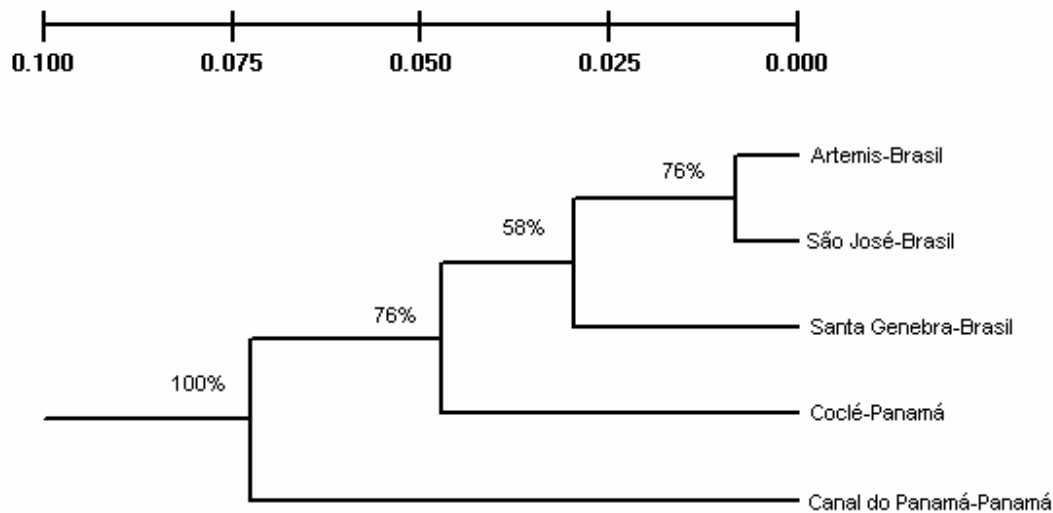


Figura 8 - Dendrograma das distâncias genéticas de Nei (1978), obtido pelo método de médias aritméticas (UPGMA) para as cinco populações de *H. courbaril*

### 2.7.7 Estrutura genética espacial

Os correlogramas demonstrando a distribuição espacial dos genótipos dentro das populações são apresentados nas Figuras 9 a 13. Todos os correlogramas mostram o mesmo padrão, com a tendência de árvores localizadas espacialmente próximas

apresentarem maior grau de coancestria, do que árvores localizadas espacialmente distantes (Anexos C, D, E , F e G).

O correlograma mostrou valores positivos e significativos de coancestria entre pares de árvores até a distância de aproximadamente 400 m, na população Ártemis, até 1.000 m na Santa Genebra, até 3.000 m na Mata São José e até 2.100 m em Coclé.

Nessas populações o coeficiente de coancestria, na primeira classe de distância variou de 0,119 (Figura 9) a 0,155 (Figura 11), sugerindo que árvores próximas são parentes entre o grau de meios-irmãos e irmãos-completos. Na população do Canal do Panamá, embora o coeficiente de coancestria tenha sido positivo (0,99;  $P > 0,05$ ), não foi significativamente diferente de zero.

Essa forte estruturação espacial observada em todas as populações analisadas, com uma intensidade um pouco menor na população do Canal do Panamá, parece ser característica da espécie, provavelmente, devido a um processo dispersivo primário restrito (via sementes por barocoria).

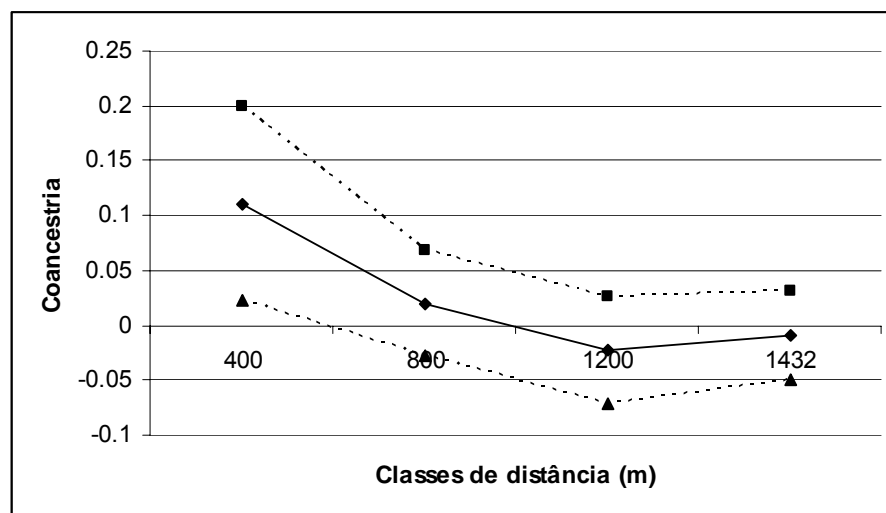


Figura 9 - Correlograma do coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) em quatro classes de distâncias entre árvores de *H. courbaril* na população Ártemis (Linhas tracejadas indicam os limites inferior e superior do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade e a linha contínua representa a estimativa do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle et al., 1995)

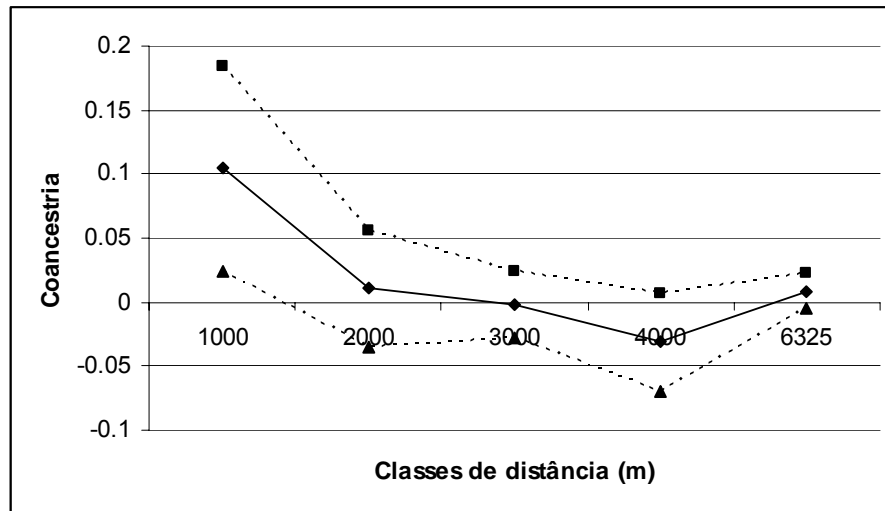


Figura 10 - Correlograma do coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) em quatro classes de distâncias entre árvores de *H. courbaril* na população Santa Genebra (Linhas tracejadas indicam os limites inferior e superior do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade e a linha contínua representa a estimativa do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle et al., 1995)

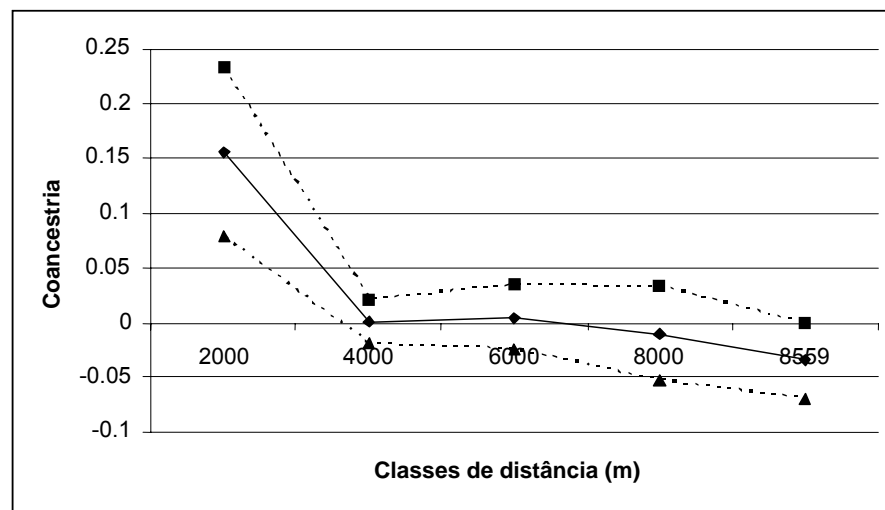


Figura 11 - Correlograma do coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) em quatro classes de distâncias entre árvores de *H. courbaril* na população Mata São José. (Linhas tracejadas indicam o limite inferior e superior do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade e a linha contínua representa a estimativa do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle et al., 1995)

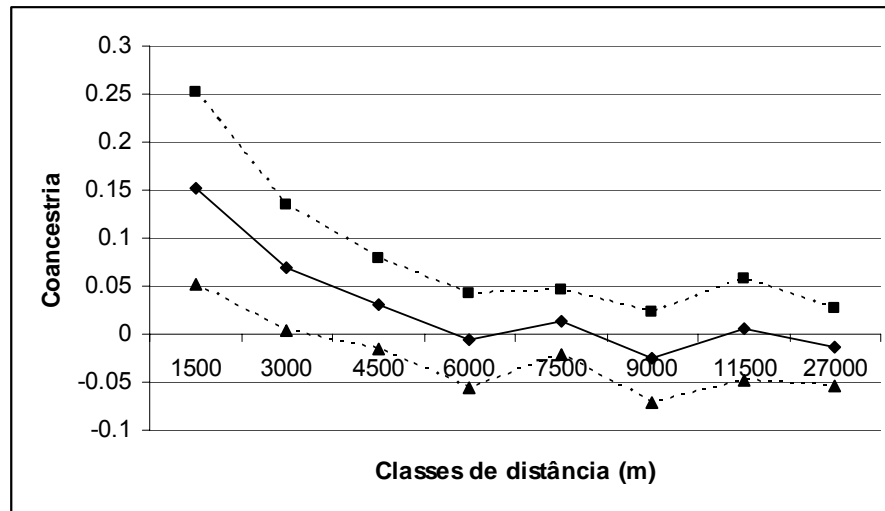


Figura 12 - Correlograma do coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) em sete classes de distâncias entre árvores de *H. courbaril* na população de Coclé (Linhas tracejadas indicam os limites inferior e superior do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade e a linha contínua representa a estimativa do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle et al., 1995)

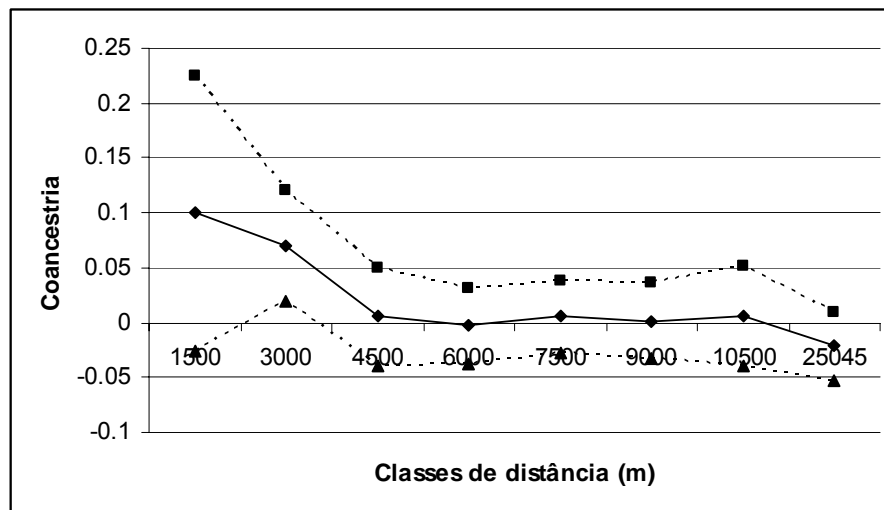


Figura 13 - Correlograma do coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) em sete classes de distâncias entre árvores de *H. courbaril* na população Canal do Panamá (Linhas tracejadas indicam os limites inferior e superior do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade e a linha contínua representa a estimativa do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle et al., 1995)

### 2.7.8 Análise de “bottleneck”

Foram detectados indícios da ocorrência de “bottleneck” ou gargalo genético em loci de todas as populações analisadas.

Na população de Ártemis (Tabela 12) a maioria dos loci apresentou  $H_e > H_{eq}$ , com exceção do locus HC06. Contudo, o excesso de heterozigotos foi significativo apenas nos loci HC12, HC17 e HC42. A probabilidade do teste Wilcoxon (bilateral para excesso ou deficiência de  $H_e$ ) foi igualmente significativa a 95% de probabilidade ( $P = 0,0273$ ), confirmando a ocorrência de um gargalo genético na população.

Na população de Santa Genebra (Tabela 13) foi observado  $H_e > H_{eq}$  nos loci HC12, HC17, HC25, HC33, HC34, HC40 e HC42. Contudo, a superioridade de  $H_e$  sobre  $H_{eq}$  foi significativa apenas no locus HC33. A probabilidade do teste Wilcoxon não foi significativa nessa população ( $P = 0,164$ ).

Na população Mata São José (Tabela 14) foi observado  $H_e > H_{eq}$  nos loci HC06, HC12, HC14, HC17, HC25, HC33, HC34, HC40 e HC42, mas, o excesso de heterozigotos foi significativo apenas no locus HC42. A probabilidade do teste Wilcoxon não foi significativa a 0,19% de probabilidade.

Na população de Coclé (Tabela 15), foi observado  $H_e > H_{eq}$  nos loci HC12, HC14, HC17, HC25, HC33, HC40 e HC42 embora esse excesso de heterozigotos não tenha sido significativo em nenhum deles. A probabilidade do teste Wilcoxon foi significativa a 1% de probabilidade ( $P = 0,0019$ ).

Na população Canal do Panamá, foi observado  $H_e > H_{eq}$  nos loci HC12, HC25, HC33, HC34, HC40 e HC42 (Tabela 16), embora apenas o locus HC17 apresentou excesso de heterozigotos significativos. A probabilidade do teste Wilcoxon não foi significativa ( $P = 0,652$ ).



Tabela 12 - Valores de  $k_o$  (número médio de alelos por locus),  $H_e$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg),  $H_{eq}$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de mutação – deriva),  $P$  (probabilidade de ocorrência de “bottleneck”) para cada locus na população de Ártemis, sob o modelo mutacional de duas fases, com número censo = 10. Piracicaba – SP, 2005

Locus	$k_o$	$H_e$	$H_{eq}$	$P$
HC06	7	0,732	0,801	0,1240
HC12	6	0,768	0,752	0,5132
HC14	6	0,811	0,752	0,2510
HC17	3	0,679	0,470	0,0414
HC25	5	0,742	0,687	0,3526
HC33	6	0,826	0,750	0,1220
HC34	4	0,737	0,597	0,0852
HC40	6	0,789	0,752	0,3958
HC42	6	0,847	0,753	0,0344

Probabilidade do teste Wilcoxon (bilateral para excesso ou deficiência de  $H_e$ ),  $P = 0,0273$ .

Tabela 13 - Valores de  $k_o$  (número médio de alelos por locus);  $H_e$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg);  $H_{eq}$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de mutação – deriva);  $P$  (probabilidade de ocorrência de “bottleneck”) para cada locus na população de Santa genebra sob o modelo mutacional de duas fases, N = 14. Piracicaba – SP, 2005

Locus	$k_o$	$H_e$	$H_{eq}$	$P$
HC06	9	0,765	0,834	0,102
HC12	8	0,868	0,801	0,0768
HC14	8	0,808	0,819	0,3364
HC17	4	0,632	0,556	0,3558
HC25	7	0,817	0,761	0,2486
HC33	6	0,833	0,711	0,0168
HC34	4	0,669	0,557	0,2238
HC40	6	0,802	0,712	0,1352
HC42	7	0,82	0,762	0,2244

Probabilidade do teste Wilcoxon (bilateral para excesso ou deficiência de  $H_e$ ),  $P = 0,164$

Tabela 14 - Valores de  $k_o$  (número médio de alelos por locus);  $H_e$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg);  $H_{eq}$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de mutação – deriva);  $P$  (probabilidade de ocorrência de “bottleneck”) para cada locus na população de Mata São José, sob o modelo mutacional de duas fases, com  $N = 17$ . Piracicaba – SP, 2005

Locus	$K_o$	$H_e$	$H_{eq}$	$P$
HC06	5	0,643	0,622	0,481
HC12	9	0,841	0,814	0,379
HC14	5	0,636	0,623	0,454
HC17	4	0,711	0,534	0,064
HC25	7	0,759	0,741	0,507
HC33	6	0,722	0,688	0,458
HC34	4	0,629	0,537	0,323
HC40	6	0,756	0,692	0,299
HC42	6	0,815	0,689	0,040

Probabilidade do teste Wilcoxon,. (bilateral para excesso ou deficiência de  $H_e$ ),  $P = 0,0019$ .

Tabela 15 - Valores de  $k_o$  (número médio de alelos por locus);  $H_e$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg);  $H_{eq}$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de mutação – deriva);  $P$  (probabilidade de ocorrência de “bottleneck”) para cada um dos locus na população de Coclé sob o modelo mutacional de duas fases, com  $N = 29$ . Piracicaba – SP, 2005

Locus	$K_o$	$H_e$	$H_{eq}$	$P$
HC06	9	0,770	0,770	0,4034
HC12	8	0,754	0,734	0,5068
HC14	9	0,788	0,770	0,5082
HC17	5	0,704	0,575	0,1674
HC25	6	0,699	0,641	0,38
HC33	8	0,797	0,735	0,2562
HC34	4	0,600	0,491	0,2878
HC40	6	0,777	0,637	0,0726
HC42	9	0,795	0,769	0,451

Probabilidade do teste Wilcoxon, (bilateral para excesso ou deficiência de  $H_e$ ),  $P = 0,0019$ .

Tabela 16 - Valores de  $k_o$  (número médio de alelos por locus);  $H_e$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg);  $H_{eq}$  (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de mutação – deriva);  $P$  (probabilidade de ocorrência de “bottleneck”) para cada locus na população do Canal do Panamá sob o modelo mutacional de duas fases, com  $N = 31$ . Piracicaba – SP, 2005.

Locus	$k_o$	$H_e$	$H_{eq}$	$P$
HC06	11	0,722	0,815	0,0738
HC12	7	0,776	0,687	0,1864
HC14	11	0,817	0,82	0,3688
HC17	7	0,442	0,691	0,0352
HC25	4	0,677	0,487	0,081
HC33	8	0,802	0,731	0,2066
HC34	5	0,631	0,57	0,4116
HC40	6	0,784	0,634	0,052
HC42	7	0,694	0,685	0,4394

Probabilidade do teste Wilcoxon (bilateral para excesso ou deficiência de  $H_e$ ),  $P = 0,652$ .

## 2.8 Discussão

### 2.8.1 Loci microssatélites

Os nove loci microssatélite utilizados nas análises mostraram-se eficientes na avaliação da diversidade genética da espécie e úteis para estudos do sistema de reprodução e fluxo gênico contemporâneo, baseados em análises de paternidade, visto que não foram detectados fortes indícios de desequilíbrio de ligação entre esses loci. O número encontrado de alelos por locus foi superior ao obtido a partir de marcadores microssatélites por Toledo (2005) em populações de *H. courbaril* no Pontal do Paranapanema e por Ciampi e Suganuma (2001) em populações de *Hymenaea spp.* no Distrito Federal, que obtiveram uma média de 6,38 e 7,74 alelos por locus, respectivamente

### 2.8.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Três loci avaliados (HC06, HC25 e HC33) não se ajustaram às proporções de EHW. Desvios do EHW são causados geralmente por fatores evolutivos, como deriva genética e seleção, sistema de reprodução a partir de autofecundações e cruzamentos entre parentes, efeito de Wahlund e a presença de alelos nulos. Os três loci apresentaram menos heterozigotos do que o esperado sob as pressuposições de EHW (Tabela 5), indicando provavelmente que os desvios foram causados pelo sistema de reprodução e/ou efeito Wahlund.

### 2.8.3 Índices de diversidade genética

O presente trabalho verificou uma elevada diversidade genética na espécie *H. courbaril*. Considerando que a variabilidade genética é uma das condições necessárias para adaptabilidade a ambientes específicos, pode-se levantar a hipótese de que essa diversidade aliada a uma área de distribuição da espécie com grande heterogeneidade ambiental e pressões seletivas diferenciais, poderiam ter induzido o surgimento das variedades conhecidas de *H. courbaril*.

A diversidade gênica encontrada no presente trabalho está em consonância com os valores encontrados por Ciampi e Suganuma (2001) em populações de *Hymenaea spp* ( $\bar{H}_e$  média = 0,74) e por Kageyama et al. (2004), em populações de *H. courbaril* no Pontal do Paranapanema ( $\bar{H}_e$  média = 0,76). Toledo (2005) obteve valores levemente inferiores em sete populações de *H. courbaril*, cuja estimativa de  $\bar{H}_e$  variou de 0,51 a 0,74, com  $\bar{H}_e$  média=0,62 (Tabela 7).

Os maiores valores de heterozigosidade esperada em populações da espécie foram detectados nos trabalhos de Santos (2002), em populações no Pontal do Paranapanema, com  $\bar{H}_e$  variando entre 0,821 e 0,872. Entretanto, como foram usados diferentes números de loci nesses estudos, a tentativa de comparação encontra-se prejudicada, devido ao número de variáveis envolvidas.

#### 2.8.4 Coeficientes de endogamia e coancestria

O índice de fixação dentro das populações foi significativo na maioria das populações, com exceção da população do Canal do Panamá. Esse índice apresentou um valor médio de 0,123, com variação de 0,100 a 0,155, evidenciando a ocorrência de endogamia nas populações.

O índice de fixação médio das populações, estimado por meio das estatísticas  $F$ , confirmam os altos níveis de endogamia observados dentro das populações e indicam que o sistema de reprodução seria a provável causa do fato. Os níveis de endogamia observados podem ter sido gerados pelo cruzamento entre indivíduos aparentados como primos de primeiro grau (0,0625), irmãos completos ou pais e filhos (0,25).

A coancestria nas populações variou de 0,054 (Canal do Panamá) a 0,90 (Ártemis). Assim, o próprio parentesco interno dessas populações poderia explicar parte da endogamia detectada, tendo em vista que a possibilidade de geração de endogamia por autofecundação em *H. courbaril* é remota.

Bawa et al. (1974) e Gibbs et al. (1999) relatam a ocorrência de auto-incompatibilidade em *H. courbaril* e *H. stignocarpa*, respectivamente. Esse fato pôde ser confirmado, de maneira indireta, pelos resultados obtidos por Santos (2002) em relação ao fluxo gênico e sistema de reprodução de *H. courbaril*, no qual, o autor observou que a taxa de cruzamento multilocus não diferia estatisticamente da unidade ( $t_m = 0,991 \pm 0,02$ ), ou seja, com fecundação cruzada quase que obrigatória.

Desse modo, a hipótese mais adequada para explicar a elevada coancestria seria a da existência de um tamanho reduzido de indivíduos reprodutivos contribuindo com pólen na geração anterior devido à existência de assincronismo no florescimento ou à utilização restrita desse recurso por alguns polinizadores. Dunphy (2004) analisando o movimento de pólen em populações de *H. courbaril* da Costa Rica, observou um número bastante reduzido de indivíduos contribuindo com pólen nas populações. Esse processo aliado à forte estrutura espacial observada poderiam estar contribuindo para o aumento da endogamia nas populações.

### 2.8.5 Estrutura genética populacional

Segundo Yeh (1989), a organização espacial de populações locais e seus padrões concomitantes de fluxo gênico são fatores importantes para que uma espécie torne-se geneticamente diferenciada ao longo de sua distribuição geográfica. A divergência genética detectada entre populações nesse trabalho ( $\theta_p = 0,072$ ) foi moderada e significativa, podendo, entretanto, ser considerada inferior ao esperado em populações isoladas geograficamente.

Tendo em vista que o processo de fragmentação é relativamente recente para uma espécie caracterizada pelo ciclo de vida longo, o isolamento das populações não foi capaz de gerar uma elevada divergência genética entre as populações num número de restrito de gerações. Porém, efeitos iniciais, como o aumento da endogamia e coancestria, puderam ser observados nas populações estudadas. Esse fato pode ser um indício de que o processo de fragmentação esteja afetando inicialmente a estrutura genética das populações da espécie, em especial das populações brasileiras, que possuem um reduzido tamanho populacional.

Os resultados obtidos nas populações da Bacia do Rio Piracicaba (Ártemis, Mata São José e Santa Genebra) e do Panamá (Canal do Panamá e Coclé) foram semelhantes aos obtidos por Toledo (2005) e Kageyama et al. (2004) em populações do Pontal do Paranapanema, que também observaram excesso de homozigose e diferenciação moderada entre populações.

Os dados obtidos indicaram que a diferenciação foi maior dentro de populações pertencentes a uma mesma região ( $\theta_{p/R} = 0,084$ ) do que entre regiões ( $\theta_R = 0,034$ ), no caso, Brasil e Panamá. Esse resultado permite concluir que a maior parte da variabilidade genética não se encontra entre as duas variedades analisadas: *H. courbaril var. stilbocarpa* e *H. courbaril var. courbaril*, amostradas nas populações do Brasil e Panamá respectivamente, mas dentro das populações das espécies.

As estimativas de  $\sigma_e^2$ ,  $\sigma_d^2$  e  $R_{ho}$  confirmam as evidências sugeridas pelo índice de fixação e pelas estimativas de Weir e Cockerham (1984), indicando que a maior parte da variação genética encontra-se dentro de populações (90,7 %). Esses níveis

podem ser considerados bastantes altos e dentro do padrão observado em outras espécies arbóreas, segundo Loveless e Hamrick (1984).

Resultados similares foram obtidos por Rocha (1988), em um estudo de variabilidade da composição de proteínas de reserva do gênero *Hymenaea*, não detectou padrões de diferenciação condizentes com as divisões entre espécies do gênero *Hymenaea*, tampouco entre variedades de *H. courbaril*. O método empregado na separação de proteínas foi o de eletroforese com acrilamida, SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol, constatando a presença de uma variação muito grande de padrões protéicos dentro da espécie e dentro e entre indivíduos de uma mesma população.

Adicionalmente, Lovato (2005) analisou populações de duas espécies vicariantes de *Hymenaea*: *H. courbaril* e *H. stignocarpa*, por meio do seqüenciamento de regiões do cpDNA. Os resultados obtidos não detectaram diferenciação considerável entre as duas espécies. A análise de variância molecular realizada por Lovato (2005), mostrou um valor baixo e não significativo para variação entre espécies (1,34%), demonstrando que a maior parte da variação genética amostrada não se encontra entre espécies, mas, especificamente, entre indivíduos dentro de populações (63,09%) e entre populações dentro de espécies (35,56%).

### **2.8.6 Estrutura genética espacial**

A estruturação genética espacial tem sido detectada em diversas espécies arbóreas tropicais, como *Rhus trichocarpa* (Chung et al., 1999), *Eurya japonica* (Chung e Epperson, 2000), *Machaerium villosum* (Giudice Neto e Kageyama, 2000), *Myracrodruon urundeuva* (Moraes et al., 2005) e *Simarouba amara* (Hardesty et al., 2005).

Considerando-se que a maior parte dos trabalhos de estrutura genética de populações tem verificado maior variação genética dentro do que entre populações. Esse fato torna o conhecimento da distribuição espacial dos genótipos de extrema importância para o delineamento de estratégias para a coleta de germoplasma visando a conservação genética de populações dessas espécies.

Os resultados das análises de correlação genética espacial entre os genótipos mostraram uma forte estruturação espacial na maioria das populações, com exceção da população Canal do Panamá. A coancestria entre plantas dentro da primeira classe de distância de cada população foi alta e significativa, variando de 0,101 a 0,155. Os resultados obtidos no presente trabalho, em relação à estrutura genética e coeficientes de parentesco foram capazes de detectar as conseqüências da estruturação genética espacial observada, como a ocorrência de cruzamentos entre parentes, aumento da coancestria e endogamia nas populações.

### **2.8.7 “Bottleneck”**

“Bottlenecks” populacionais são eventos estocásticos que reduzem o tamanho populacional provocando uma redução da variabilidade genética pelo efeito fundador. Segundo Moraes e Derbyshire (2003), desvios significativos do equilíbrio de mutação e deriva, como o efeito gargalo, são importantes na biologia da conservação, porque podem aumentar o risco de extinção de populações.

Foram detectados indícios de “bottleneck” nas populações de Ártemis, Mata São João e Santa Genebra, evidenciando a ocorrência de deriva genética nas freqüências alélicas da presente população em relação à população original. O efeito “bottleneck” foi provavelmente, historicamente provocado pela redução dos ecossistemas florestais, que aliada à exploração madeireira, causaram uma drástica redução do tamanho populacional. Esse fato, aliado ao alto grau de parentesco e ao reduzido tamanho efetivo observado nas populações, permite concluir que o potencial evolutivo dessas populações será provavelmente comprometido no futuro, evidenciando a necessidade do estabelecimento de estratégias conservacionistas “ex situ” e “in situ”.



### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta variabilidade genética intrapopulacional observada na espécie *H. courbaril* é condizente com a hipótese de que as variedades teriam surgido pelo favorecimento de genótipos adaptados a habitats específicos por seleção natural. A variação ambiental principalmente relacionada aos fatores climáticos e do solo exerce uma importante influência sobre a plasticidade fenotípica. Considerando-se os aspectos ambientais, numa ampla escala geográfica, a seleção natural poderia estar promovendo uma estruturação espacial, evidenciada pela variabilidade morfológica observada nas variedades do gênero; do mesmo modo o fluxo gênico restrito via sementes (barocoria), poderia estar contribuindo para estruturação espacial numa micro-escala populacional. Nesse contexto, a dispersão secundária de sementes por mamíferos atuaria sobre a estrutura populacional, gerando um fluxo gênico entre demes caracterizando um possível efeito de Walhund.

Apesar das evidentes diferenças morfológicas entre as variedades, o marcador utilizado não mostrou uma elevada diferenciação entre as duas variedades; uma possibilidade que explicaria esse fato seria a de que as regiões amostradas no genoma não corresponderiam às partes do genoma sob pressão de seleção ambiental. Outra possibilidade seria o surgimento recente, em termos evolutivos, das duas variedades estudadas que estariam num processo inicial de especiação por divergência adaptativa.

Dentre as populações analisadas de *H. courbaril*, a população do Canal do Panamá apresenta o melhor estado de conservação com baixa estruturação espacial e aderência às proporções de EHW. Essa população apresenta maior densidade populacional, ocorrendo de maneira contínua numa área de cerca de 7.000 hectares. Apesar disso, como em outras populações da espécie, seu tamanho efetivo encontra-se bastante reduzido devido aos altos níveis de coancestria.

De modo geral, as populações apresentam-se altamente fragmentadas com tamanho efetivo extremamente reduzido. Esse fato, aliado a um processo dispersivo pouco eficiente, explicaria os altos coeficientes de parentesco e a forte correlação espacial observada.

A forte estruturação espacial, aliada à ampla variabilidade intrapopulacional observada, mostra a importância de priorizar ao máximo as coletas dentro das populações, tendo em vista que dentro dessas reside a maior parte da variabilidade genética, com a identificação de MUs em toda a distribuição da espécie.

Considerando-se os dados de parentesco e o reduzido tamanho efetivo de variância, pode-se recomendar como estratégia de coleta no estabelecimento de um banco de germoplasma "ex situ", a realização de coletas de sementes de indivíduos distantes mais de 2.000 m, a fim de evitar a coleta de sementes de árvores com elevado parentesco.

No presente trabalho foram detectadas algumas lacunas em relação ao conhecimento da espécie que poderiam direcionar trabalhos futuros. Dentre elas podemos citar a necessidade de estudos filogenéticos dentro do gênero *Hymenaea* que auxiliem a esclarecer questões relativas à taxonomia do gênero. A realização de testes de cruzamento entre espécies e variedades *Hymenaea* poderiam gerar informações adicionais importantes a respeito do isolamento reprodutivo. Rocha (1988) levanta a possibilidade de que o isolamento reprodutivo não seja completo no gênero, de modo que os limites entre as espécies poderiam ser razoavelmente tênues, num grupo em fase recente de diferenciação. Os estudos de Lovato (2005), indicando pouca diferenciação entre espécies, contribuem adicionalmente com essa hipótese.

Outra linha interessante seria a realização de pesquisas numa abordagem filogeográfica que poderiam gerar resultados importantes a respeito do histórico de colonização da espécie nos diversos biomas.

Em relação aos fragmentos estudados, principalmente os que fazem parte da bacia do Piracicaba, recomenda-se a realização de avaliações da estrutura genética de outras espécies pertencentes a outros estádios sucessionais, a fim de verificar o grau de resposta dessas espécies às pressões da fragmentação florestal. Pelo exposto no trabalho, torna-se fundamental o monitoramento dessas populações, recomendando-se a realização de uma nova avaliação da diversidade e estrutura genética das populações nos próximos 10 ou 20 anos, a fim de verificar possíveis mudanças em sua estrutura.

## REFERÊNCIAS

ASQUITH, N.M.; TERBORGH, J.; ARNOLD, E.A. MAILÉN RIVEROS, C. The fruits the agouti ate: *Hymenaea courbaril* seeds fate when its disperser is absent. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v.15, p.229-235, 1999.

AVISE, J. C. A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 4, p. 279-281, 1989.

AVISE, J. C.; W. S. NELSON. Molecular genetic relationship of the extinct Dusky Seaside Sparrow. **Science**, Washington, v. 243, p. 646- 648, 1989.

AVISE J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman and Hall, 1994, 511 p.

BALESTER, M.V. Relatório técnico do projeto Piracena.  
Disponível em <http://www.cena.usp.br/piracena/html/localp.htm> (14 jun. 2002.)

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

BOYLE, T.J. Criteria and indicators for the conservartion of genetic diversity In: YOUNG, A., BOSHIER, D.; BOYLE, T.J. (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Collingwood: CSIRO Publishing and CABI Publishing, 2002. p. 239-250.

BROWN JÚNIOR., K. S. Biogeography and evolution of neotropical butterflies. In: WHITMORE, T.C.; PRANCE, G.T. (Ed.). **Biogeography and quaternary history in tropical America**. Oxford: Clarendon Press, 1987. p. 66-105.

CARLINI, L.A. **Estudo dos padrões de variabilidade intra e interespecífica em *Miltonia Ldl.* (Orchidaceae)**. 1996. 125p. - Dissertação (Mestrado em Genética) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

CASTELLEN, M.S. **Uso de marcadores RAPD e isoenzimáticos na quantificação de diversidade genética em populações naturais de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Piracicaba.** 2000. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

CHUNG, M.G.; CHUNG, J.M.; EPPERSON, B.K. Spatial structure of allozyme polymorphisms within populations of *Rhus trichocarpa* (Anacardiaceae). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.48, p.223-227, 1999.

CHUNG, M.G.; EPPERSON, B.K. Spatial structure of allozyme polymorphisms in a population of *Eurya japonica* (Theaceae). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.49, p.1-4, 2000.

CIAMPI, A. Y 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 do Cerrado. 1999 204p. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 1999.

CIAMPI, A. Y.; SUGANUMA, E. **Análise Genética Populacional de Jatobá (*Hymenaea spp Leguminosaea*) utilizando Microssatélites.** S.L: Redbio, 2001.148p.

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

COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Estimation of Gene Flow From F-Statistics. **Evolution**, Lancaster, v.47, p.855-863, 1993.

COLINVAUX, P.A.; IRION, G.; RÄSÄNEN, M.E.; BUSH, M.B.; MELLO, NUNES; J.A.S. A paradigm to be discarded: geological and paleontological data falsify the Haffer & Prance refuge hypothesis of Amazonian speciation. **Amazoniana**, Manaus, v.16, p. 609-646, 2001.

CORNUET J.M.; LUIKART G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Bethesda, v.144, p.2001-2014, 1997.

CRANDALL, K. A. et al. Considering evolutionary process in conservation biology. **Trends in Ecology & Evolution**, Cambridge, v.15, n. 7, p. 290-295, 2000.

CRESTANA, C. S. M.; MARIANO, I. S. Ecologia de polinização de *Hymenaea stilbocarpa* Hayne, o jatobá. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v. 17/19, p.31-37, 1985.

CRESTE S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v.19, p.299-306, 2001.

CROW, J.F.; AOKI, K. Group selection for polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 81, p.6073-6077, 1984.

DEL GIUDICE NETO, J. **Estrutura genética por isoenzimas em populações naturais de Jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.)**. 1999. 128p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

DI RIENZO A.; PETERSON, A.C.; GARZA, J.C.; VALDES, A.M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N.B. Mutation processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 91, p. 3166-3170, 1994.

DOBZHANSKY, T. Microgeographic Variation in *Drosophila pseudoobscura* **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v.25, p.311-314, 1939.

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

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

EDWARDS, A.; HAMMOND H. A.; JIN, L.; GASKEY, C.T.; CHAKRABORTY, R. Genetic variation at 5 trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human populationsgroup. **Genomics**, Orlando, v.12, p. 241-253, 1992.

FISHER, R. A. **The genetical theory of natural selection**. Oxford: Clarendon Press, 1930.151p.

FJELDSA, J.; LOVETT, J. C. Geographical patterns of old and young species in African forest biota: the significance of specific montane areas as evolutionary centres. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 6, p. 323–244, 1997.

FJELDSA, J. Geographical patterns for relict and young species of birds in Africa and South America and implications for conservation priorities. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 3, p.207-226, 1994.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO **Conservacion de los recursos genéticos en la ordenacion de los bosques tropicales: principios y conceptos**. Montes: FAO,1995. 106 p.(Estudios FAO, 107).

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

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

GAIOTTO, F. A. **Inferências sobre herança quantitativa e estrutura genética em populações naturais de *Euterpe edulis* Mart. Utilizando marcadores microssatélites**. 2001. 122p. Tese (Doutorado em Genética) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2001.

GANDARA, F.B. **Estrutura genética familiar em uma população de uma espécie aborea tropical (*Cedrela fissilis* Vell) em floresta secundária**. 1997. 87p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

GIBBS, P.E.; OLIVEIRA, P.E.; BIANCHI, M.B. Postzygotic control of selfing in *Hymenaea stigocarpa* (Leguminosae-Caesalpinioideae) a bat pollinated tree of the brazilian cerrados. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v.160, p.72, 1999.

GIUDICE-NETO, J.D.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética especial em populações naturais de *Machaerium villosum* Vog. (Leguminosae) na região de Mogi-Guaçú, SP – Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.23, p.207-215, 2000.

GOODMAN, S.J. RstCalc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and a determining their significance. **Molecular Ecology**, Laughborough, v.6, p.881-885, 1997.

HAFFER J. Speciation in Amazon forest birds. **Science**, Washington, v.165 p.131-137, 1969

HAFFER, J. Distribution of Amazon forest birds. **Bonner Zoologische**, Beiträge, v.29, p. 38 - 78, 1978.

HALLWACHS, W. Agoutis (*Dasyprocta punctata*): the inheritors of guapinol (*Hymenaea courbaril*: Leguminosae) In: ESTRADA, A.; FLEMING, T.H. (Ed.). **Frugivores and seed dispersal**. Dordrecht : W. Junk Publishers, 1986. p. 285-304.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: CHAMBERS, B.; SCHONEWALD-COX, S.M. (Ed.). **Genetics and wild population management**. New York: Addison-Wesley, 1983. p. 335-348

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

HAMRICK, J.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D. (Ed.) **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p.43-63.

HANCOOK, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: D.B. GOLDSTEIN AND SCHLOTTERER, C. (Ed.) **Microsatellite: evolution and applications**. Oxford: Oxford University Press, 1999. p.1-9.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. **SPAGeDI 1.0**: a program for spatial pattern analysis of genetic diversity. Version for Windows 95. 2002.

HOOGHIEMSTRA, H. The continuing debate on the history of the Amazonian rain forest. **Amazoniana**, Manaus, v. 16, p. 653 - 656, 2001.

HOSHINO, A. A.; PALMIERI, D. A.; BRAVO J. P.; PEREIRA, T. E. B.; LOPES, C. R. Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.29, p.145 - 150, 2002.

JANZEN, D. H. Herbivores and the number of tree species in Tropical forest. **American Naturalist**, Chicago, v.104, n.940, p.501-528, 1970.

JANSEN, D. H. Behavior of *Hymenaea courbaril* when its predispersal agent is absent. **Science**, Washington, v.189, p. 145-147, 1975.

JANSEN, D. H. **Costa rican natural history**. Chicago: University of Chicago Press, 1983. 253p.

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

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

KAGEYAMA, P.Y.; CARON, D.; GANDARA, F.; SANTOS, J. D. Conservation of Mata Atlântica forest fragments in the State of São Paulo, Brazil In: VINCETI, B.; AMARAL, W.A.; MEILLEUR, B. (eds) **Challenges in managing forest genetic resources for livelihoods: examples from Argentina and Brazil**. Roma: International Plant Genetic Resources Institute, 2004. p. 167-185.

KAWAGUICI, C. B. **Variação genética de três grupos de indivíduos (adultos, jovens e plântulas de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) em mata galeria**. 1999. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

KIMURA, M.; CROW, J. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, Bethesda, v.49, p. 725-738, 1964.



KIMURA, M.; OTAH, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population . **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, Washington, v.75, p.2868-2872, 1978.

KRAPP, S.; MALLET, J. Refuting refugia? **Science**, Washington, v.300, p.71-72, 2003.

LACERDA, C. M. B. **Estrutura genética espacial de duas populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* M. Allemão na região semi-árida, Brasil.** 2002. 109p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002.

LANGENHEIM J. H.; STUBBLEBINE, W. H. Variation in leaf resin composition between parent tree and progeny in *Hymenaea*: implications for herbivory in humid tropics. **Biochemical Systematics and Ecology**, Elmsford, v.11, n.2, p.97-106, 1983.

LANGENHEIM J. H.; STUBBLEBINE, W. H., FOSTER, C.; NASCIMENTO, J. C. Estudos comparativos da variabilidade na composição da resina da folha entre árvore parental e progênie de espécies selecionadas de *Hymenaea*. **Acta Amazonica**, Manaus, v.7, n.3, p.335-354, 1977.

LANGENHEIM, L. H.; LINCOLN, D. E.; STUBBLEBINE, W. H.; GABRIELLI, A. C. Evolutionary implications of leaf resin pocket patterns in tropical tree *Hymenaea* (Caesalpinioideae: Leguminosae). **American Journal of Botany**, New York, v. 69, n.4, p.595-607, 1982.

LEE, Y. T.; LANGENHEIN, J. H. Additional new taxa and new combinations in *Hymenaea* (Leguminosae - Caesalpineoideae). **Journal of Arnold Arboretum**, Boston, v. 55, n 3, p. 441-452, 1974. 29p.

LEE, Y. T.; LANGENHEIN, J. H. **Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioidea, Detarieae).** Berkeley: University of California Press, 1975. 105p.

LEITE, E. Spatial distribution patterns of riverine forest taxa in Brasília, Brazil. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 15, p.257-264, 2001.

LEPSCH-CUNHA, N. **Estrutura genética e fenologia de espécies raras de *couratari* spp. (Lecythidaceae) na amazônia central.** 1996.142p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1996.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: version 1.1 to Windows 95/NT. 2002. Disponível em: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>.(12 jan. de 2005)

LI, Y.C., KOROL, A.B., FAHIMA, T., NEVO, E. Microsatellites within genes: structure, function and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.21 n.6, p. 991-1007, 2004.

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**, New York, v. 82, p.1420-1425, 1995.

LOVATO, M.B. **Genética Populacional e Evolutiva da Fauna Endêmica e em Extinção da Mata Atlântica na Bacia do Rio Doce através do Estudo de Polimorfismos de DNA**. Uberlândia: UFMG, 2005. 354 p. Relatório técnico-científico das atividades de janeiro a dezembro 2004 do projeto dinâmica biológica e a conservação da biodiversidade da mata atlântica do médio Rio Doce.

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

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

MALTEZ, H.M. **Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. Apocynaceae (peroba rosa) em uma floresta estacional semidecidual do Estado de São Paulo.**, 1997. 132p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

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

MARTINS, F. R.; SANTOS, F. A. M. Técnicas usuais de estimativa da biodiversidade. **Holos Environment**, Rio Claro, edição especial, p. 236 - 267, 2002.

MARTINS, K. **Diversidade genética e fluxo genico via pólen e semente em populações de *Solanum lycocarpum* St. Hil Solanaceae no sudeste de Goiás.** 2005. 143p. - Tese (Doutorado em Genética) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MILLER M.P. **Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3:** A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by the author. 1997.

MORAES, P.L.R. **Estrutura genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees & Martius ex Nees.**1997. 190 p. - Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 1997.

MORAES, P.L.R.; DERBYSHIRE, M.T.V.C. Diferenciação genética e diversidade em populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). **Biota Neotropica**, Campinas, v.3, n.1, p. 1-10, 2003a.

MORAES, P.L.R.; DERBYSHIRE, M.T.V.C. Estrutura genética de populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae) através de marcadores isoenzimáticos. **Biota Neotropica**, Campinas, v.2, n°2, 2003b.  
Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br>.(1 set. 2005)

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

MORI, E. S. **Estrutura genética de populações naturais de Canafístula (*Pelthoforum dubium*).** 2000. 120p. Tese (Livre-Docência) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2000.

MORITZ, C. Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, Cambridge, v.9, n.10, p. 373-375, 1994.

NAMKOONG, G. Decision making strategies for conservation and use of forest genetic resources. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SCIENCE AND TECHNOLOGY FOR MANAGING PLANT GENETIC DIVERSITY IN THE 21<sup>ST</sup> CENTURY. **Paper:** Rome, 2000. Palm Oil Research Institute of Malaysia (PORIM) e IPGRI, 16 p.

NAMKOONG, G.; BOYLE, T.; GREGORIUS, H. R.; JOLY, H.; SAVLAINEN, O. RATNAM, W.; YOUNG, A. Testing criteria and indicators for assessing the sustainability of forest management: genetic criteria and indicators. In: **CIFOR WORKING GROUP** S.L:1996.p.10.

NEGRÃO M.O. **Estrutura genética de populações naturais de *Syagrus romanzoffiana* (Arecaceae) do continente (Serra do Mar, SP.) e da Ilha dos Alcatrazes.** Piracicaba, 1999. 89p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, Washington, v. 70, p.3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Bethesda, v.89, p.583-590, 1978.

NELSON, G.; PLATNICK, N. **Systematics and biogeography: cladistics and vicariance.** New York: Columbia University Press, 1981.567 p.

OLIVEIRA, A. F. **Estrutura genética de populações naturais de *Copaifera langsdorffii* Desf. a partir de isoenzimas.** 2000. 114p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

PAIVA, J.R. **Variabilidade enzimática em população naturais de seringueira (*Hevea brasiliensis* (willd. Ex. ADR. De Juss.) Muell. Arg.).** 1996. 145p. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

PARDO, M. **Estrutura genética de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) em floresta e em pastagens no leste do Estado do Acre.** 2001. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

PEREIRA, V.A.A.C. **Diversidade genética de *Miconia cinnamomifolia* (D.C.) Naudin em áreas sob interferência antrópica na mata atlântica.** 2002. 102p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, Washington, v. 90, p.502-503, 1999.

PRANCE, G.T. Biogeography of neotropical plants. In: WHITMORE, T.C.; PRANCE, G.T. (Ed.). **Biogeography and quaternary history in tropical America**. New York: Oxford University Press, 1987. p.46-65.

PRANCE, G.T.; SILVA, M.F. **Árvores de Manaus**. Manaus: CNPq/INPA. 1975. 312p.

RAFALSKI, J. A.; VOGEL, J.M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. (Ed.). **Nonmammalian genome analysis: a practical guide**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 75-134.

RAMÍREZ, C.A. **Estado de la diversidad biológica de los árboles y bosques en Panamá. Taller Regional sobre los Recursos Genéticos Forestales de Centroamérica, Cuba y México**. Turrialba, Costa Rica: CATIE, 2002, 60p.

REIS, M.S. **Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmiteiro (*Euterpe edulis* Martius)**. Piracicaba, 1996, 210p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

RIZZINI, C.T. **Plantas do Brasil - árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 296p.

ROCHA, D.M.S. **Estudo filogenético de *Hymenaea* L. baseado em proteínas de semente**. 1988. 212p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.

ROSENBAUM, H.C.; DEINARD, A.S. Caution before claim: An overview of microsatellite analysis in ecology and evolutionary biology. In: DESALLE, R. SCHIERWATER, B.; BIRKHAUSER, B. **Molecular approaches to ecology and evolution**. Boston: BirkhauserVerlag, 1998. 365 p.

RYDER, O. A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v, 1, p. 9-10, 1986.

SAMPAIO, P.T.B., VENTURINI, G.A. Variação genética entre e dentro de progênie de quatro espécies de leguminosa: *Copaifera multijuga*, *Hymenaea coubaril*; *Apuleia leiocarpa* e *Hymenolobium* In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO,6; Campos do Jordão, 1990. **Anais**. São Paulo: SBS/SBEF, 1990. v.3, p.633-635.

SANTOS, J. D. **Ecologia e genética numa paisagem fragmentada vsandio sua conectividade no Pontal do Paranapanema. 2002.** 101p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SEBBENN, A.M. **Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) a partir de isoenzimas.** 1997. 107p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

SEBBENN, A. M. ; SEOANE, C. E. S. . Estimativa de tamanho efetivo de variância por marcadores genéticos. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 1-7, 2005.

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

SIMPSON, B.; HAFFER, J. Speciation patterns in the Amazon forest biota. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 9, p. 497-518, 1978.

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

SLATKIN M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Bethesda, v.139, p. 457-462, 1995.

SOUZA, L.I. **Estrutura genética de *Chorisia speciosa* St. Hil em diferentes populações. Fase i - protocolo para eletroforese de isoenzimas.** 1996. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

SOUZA, P.C.A. **Aspectos ecológicos e genéticos de uma população natural de *Euterpe oleracea* Mart. no estuário Amazônico**. 2002. 60p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

STORK, N.E.; BOYLE, T. J. B.; DALE, V.; EELEY, H.; FINEGAN, B.; LAWES, M. MANOKARAN, N.; PRABHU, R.; SOBERON, J. Criteria and Indicators for Assessing the Sustainability of Forest Management: Conservation of Biodiversity. **CIFOR Working Paper No 17 structure**, 1997.

STUBBLEBINE, W.H., LANGENHEIM, J.H.; LINCON, D. Vegetative growth and leaf resin composition in *Hymenaea courbaril* under photoperiodic extremes. **Biochemical Systematics and Ecology**, Elmsford, v. 3, p.219-228, 1975.

STUBBLEBINE, W.H.; LANGENHEIM, J.H.; LINCON, D. Vegetative response to photoperiod in tropical leguminous tree *Hymenaea courbaril* L. **Biotropica**, Washington, v.10, n.1, p. 18-29, 1978.

STUBBLEBINE, W.H.; LANGENHEIM, J.H. Estudos comparativos da variabilidade na composição da resina da folha entre árvore parental e progênie de espécies selecionadas de *Hymenaea*: comparação de populações Amazônicas com uma população do sudeste brasileiro. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 10, n.2, p. 293-309, 1980.

TOLEDO, R.M. **Modelagem espacial do fluxo de sementes de Jatobá (*Hymenaea courbaril*), através de marcadores moleculares, na paisagem fragmentada do Pontal do Paranapanema, SP**. 2005. 73p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

VALDES, A.M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N.B. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. **Genetics**, Bethesda, v.133, n.3, p.737-749, 1993.

VAN DEN BERG, C. **Estudo dos padrões de variabilidade intra e interespecífica em espécies brasileiras de *Cattleya* L. (Orchidaceae-Laeliinae)**. 1996. 154p. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Estadual de Campinas Campinas, 1996.

VANZOLINI, P. E.; WILLIAMS, E. E.. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). **Arquivos do Museu de Zoologia de São Paulo**, São Paulo, v.19, n.1/4, p.1-298, 1970.

VANZOLINI, P. E.; WILLIAMS E. E. The vanishing refuge: a mechanism for ecogeographic speciation. **Papéis Avulsos de Zoologia.**, São Paulo, v.34, n.23, p.251-255, 1981.

VASCONCELOS, G.M.P. **Diversidade genética de *Myrciaria floribunda* (West ex Willdenow) Berg (Cambuí) em paisagem fragmentada da Serra da Mantiqueira.** 2002. 72p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

VELOSO, H.P.; RANGEL FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal.** Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1991. 124p.

VIADANA, A. G. **A teoria dos refúgios florestais aplicada ao estado de São Paulo.** 2002. 72 p. Tese (Livre Docência). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2002.

WAPLES, R. Evolutionary Significant Units, distinct population segments, and the Endangered Species Act: Reply to Pennok and Dimmick. **Conservation Biology**, Cambridge, v.12, n.3, p.718-721, 1998.

WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, Washington, v. 35, p.235-254, 1979.

WEIR, B. S. **Genetic Data Analysis.** Sunderland: Sinauer Associates, 1990. 214p.

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

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

WEIR, B. S. **Genetic data analysis.** 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 447p.



WILF, P., N.R. CÚNEO, K.R. JOHNSON, J.F. HICKS, S.L. WING, J. D. OBRADOVICH. High plant diversity in Eocene South America: Evidence from Patagonia. **Science**, London, v. 300, p. 122-125, 2003.

WRIGHT, S. Adaptation and selection. In: JEPSON, G. L. SIMPSON, G. G.; MAYR, E.(Ed.) **Genetics, palaeontology, and evolution**. Princeton: Princeton University Press, 1949. p. 365–389.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations . **Annals of Eugenetics**, London, v.15, p.323-354, 1951.

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

YEH, F. C.; YANG, R. **POPGENE version 1.32**: population genetics analysis. Alberta: University of Alberta, 1999.

YEH, F.C.H. Isozyme analysis for revealing population structure for use in breeding strategies. In: GIBSON, G. I. GRIFFIN, A. R.; MATHESON, A. C. (Ed.) **Proceedings of the conference on breeding tropical trees: population structure and genetic improvement strategies in clonal and seedling forestry**. Oxford: Oxford Forestry Institute, 1989. p.119-131.

YOUNG, A. G.; BOYLE, T. Forest fragmentation. In: YOUNG, A.G.; BOSCHER, D.; BOYLE, T. (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**, Collingwood: CSIRO Publishing and CABI Publishing, 2000. p. 123-134.

ZOGHBI, H. Y.; ORR, H.T. Glutamine repeats and neurodegeneration. **Annual Reviews of Neuroscience**, Palo Alto, v.23, p.217-237, 2000.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores**. Tese (Doutorado em genética e melhoramento de plantas). Piracicaba, 2003 - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003.

**ANEXOS**

ANEXO A - Frequência dos alelos privados encontrados a partir de nove loci microssatélite em indivíduos de *H. courbaril*

População	Locus	Alelo	Frequência
Canal do Panamá	HC06	182	0,0323
Canal do Panamá	HC06	184	0,0323
Canal do Panamá	HC14	134	0,0172
Canal do Panamá	HC34	154	0,0323
Canal do Panamá	HC17	132	0,0645
Canal do Panamá	HC17	140	0,0161
Canal do Panamá	HC33	150	0,0484
Canal do Panamá	HC33	152	0,0645
Coclé	HC25	166	0,0690
Coclé	HC42	166	0,0345
Coclé	HC33	134	0,0345
Mata São José	HC25	136	0,0588
Mata São José	HC12	166	0,0294
Santa Genebra	HC14	155	0,0417
Santa Genebra	HC42	125	0,0357
Ártemis	HC14	136	0,1000

ANEXO B - Valores estimados para a medida composta de Burrows para o desequilíbrio gamético ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ), resultados do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para pares de loci microssatélites usados nas análises das populações brasileiras de *H. courbaril*.

Pares de Loci	Santa Genebra		Mata São José		Ártemis		Canal do Panamá		Coclé	
	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$
HC06/HC12	-0,035	0,32	0,017	0,08	-0,205	3,85*	0,042	0,84	0,073	2,41
HC06/HC14	0,083	2,42	-0,143	3,79	-0,065	1,64	0,014	0,21	0,061	1,02
HC06/HC17	0	0	0,081	1,31	-0,005	0,01	0,023	0,34	0,030	0,29
HC06/HC25	0,045	1,68	0,024	0,08	0,095	1,50	0,032	0,30	0,030	0,30
HC06/HC33	0,005	0,01	0,057	1,02	0,08	0,81	0,124	5,49*	0,113	3,37
HC06/HC34	-0,117	2,72	-0,084	1,66	0,04	0,23	0,015	0,13	0,046	0,66
HC06/HC40	0,010	0,14	-0,034	0,24	-0,165	2,99	0,027	0,37	-0,007	0,02
HC06/HC42	0,016	0,15	0,017	0,06	0,03	0,16	-0,082	2,75	-0,003	0,02
HC12/HC14	0	0	-0,005	0,01	0,035	0,26	0,010	0,10	-0,010	0,04
HC12/HC17	0	0	0,128	5,81*	0,045	0,20	0,021	0,30	-0,026	0,29
HC12/HC25	-0,053	0,58	0,022	0,13	-0,205	3,85*	-0,112	4,19*	0,015	0,11
HC12/HC33	0,035	0,34	-0,041	0,61	-0,07	0,34	-0,029	0,34	-0,035	0,51
HC12/HC34	0,178	4,80*	-0,005	0,01	-0,16	2,05	-0,021	0,29	0,022	0,21
HC12/HC40	0,053	0,80	-0,124	5,88*	0,085	0,53	-0,019	0,20	-0,017	0,23
HC12/HC42	0	0	0,003	0,01	0,087	0,50	-0,022	0,25	-0,060	3,47
HC14/HC17	-0,083	1,71	-0,074	1,22	-0,015	0,08	0,033	1,41	0,068	1,21
HC14/HC25	0,027	0,52	0,010	0,02	0,035	0,47	-0,013	0,11	0,082	1,89
HC14/HC33	0,097	2,84	-0,114	2,83	-0,010	0,09	-0,028	0,60	-0,018	0,08
HC14/HC34	-0,083	1,28	-0,036	0,34	-0,030	0,30	0,010	0,15	-0,023	0,14
HC14/HC40	-0,013	0,06	0,098	2,31	0,105	5,25*	-0,024	0,69	0,016	0,10
HC14/HC42	0,069	2,67	-0,093	2,16	-0,010	0,04	0,025	0,53	-0,104	6,74**
HC17/HC25	0,035	0,24	0,038	0,25	-0,005	0,01	0,096	3,96*	0,014	0,06

ANEXO B - Valores estimados para a medida composta de Burrows para o desequilíbrio gamético ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ), resultados do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para pares de loci microssatélites usados nas análises das populações brasileiras de *H. courbaril* (\*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ )

Pares de Loci	Santa Genebra		Mata São José		Ártemis		Canal do Panamá		(conclusão) Coclé	
	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$
HC17/HC33	-0,035	0,32	-0,006	0,01	-0,007	0,62	0,014	0,10	0,125	3,99*
HC17/HC34	0,035	0,18	-0,015	0,04	0,040	0,23	-0,040	1,28	0,008	0,02
HC17/HC40	-0,071	1,34	-0,050	0,64	0,035	0,16	0,070	3,48	-0,010	0,08
HC17/HC42	-0,035	0,61	0,069	1,28	0,030	0,18	0,031	0,56	-0,102	5,15*
HC25/HC33	0,030	0,20	0,053	0,50	0,030	0,11	0,048	0,58	0,045	0,65
HC25/HC34	-0,130	2,75	0,039	0,32	0,140	2,85	-0,064	1,59	0,105	3,55
HC25/HC40	-0,028	0,31	0,013	0,05	0,035	0,17	0,064	1,43	-0,092	4,53*
HC25/HC42	0,056	1,67	-0,153	4,60*	0,130	3,13	-0,016	0,07	0,014	0,14
HC33/HC34	0,040	0,34	0,003	0,01	0,060	0,31	0,044	1,37	0,052	0,80
HC33/HC40	-0,005	0,01	-0,064	1,06	0,110	1,23	-0,005	0,01	-0,128	8,21**
HC33/HC42	0,081	2,63	-0,070	1,36	0,670	0,69	-0,032	0,36	0,056	2,06
HC34/HC40	0,045	0,45	-0,048	0,70	-0,030	0,10	-0,036	0,87	0,050	1,54
HC34/HC42	-0,020	0,16	0,024	0,18	0,210	7,15**	0,046	1,12	-0,025	0,42
HC40/HC42	0,020	0,30	0,022	0,14	0,040	0,23	0,029	0,41	-0,012	0,17

ANEXO C - Estimativa do coeficiente de endogamia individual (diagonal), distância física (diagonal superior, em metros) e do coeficiente de coancestria entre pares de árvores (diagonal inferior) de *H. courbaril* na população Ártemis

	Indivíduos									
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
A1	<b>0,047</b>	58	108	225	538	707	1082	1044	1221	1432
A2	-0,044	<b>0,169</b>	51	165	493	651	1023	987.6	1162	1374
A3	0,051	-0,040	<b>0,055</b>	117	471	610	976	936.8	1116	1324
A4	-0,048	0,013	0,222	<b>0,085</b>	400	500	860	825	1000	1208
A5	0,081	-0,123	0,009	-0,127	<b>0,343</b>	300	707	825	825	1104
A6	0,021	-0,032	0,024	-0,036	0,093	<b>-0,234</b>	412	538	538	806
A7	-0,120	0,131	0,036	0,013	-0,123	-0,032	<b>-0,135</b>	316	141	400
A8	-0,112	0,062	0,119	0,173	-0,154	0,013	0,138	<b>0,032</b>	400	424
A9	-0,036	-0,013	-0,298	-0,131	0,150	0,089	-0,013	-0,120	<b>0,032</b>	424
A10	0,229	-0,051	-0,108	-0,169	0,074	-0,063	0,024	-0,158	0,108	<b>0,260</b>

ANEXO D - Estimativa do coeficiente de endogamia individual (diagonal, em negrito), distância física (diagonal superior, em metros) e do coeficiente de coancestria entre pares de árvores (diagonal inferior) de *H. courbaril* na população de Santa Genebra

	Indivíduos													
	SG1	SG2	SG3	SG4	SG5	SG6	SG7	SG8	SG9	SG10	SG11	SG12	SG13	SG14
SG1	<b>0,309</b>	1,000	3,000	3,002	3,081	4,123	3,162	5,025	6,139	6,000	6,325	4,123	4,176	4,386
SG2	0,168	<b>-0,119</b>	2,001	2,003	2,119	3,162	2,236	4,031	5,166	5,000	5,385	3,162	3,231	3,499
SG3	-0,115	-0,070	<b>0,128</b>	50	650	1,379	950	2,050	3,250	3,000	3,578	1,379	1,524	2,016
SG4	0,120	0,046	0,022	<b>0,332</b>	600	1,345	900	2,040	3,231	3,000	3,551	1,345	1,487	1,972
SG5	0,058	-0,119	-0,107	0,046	<b>0,250</b>	1,044	300	2,010	3,059	3,070	3,270	1,044	1,118	1,487
SG6	-0,075	-0,067	0,204	-0,056	-0,178	<b>0,280</b>	1,000	1,118	2,022	2,214	2,236	-	200	800
SG7	-0,167	-0,011	0,039	-0,229	0,026	0,005	<b>0,023</b>	2,062	3,015	3,147	3,162	1,000	1,020	1,281
SG8	-0,146	0,047	0,023	-0,163	-0,101	0,210	0,229	<b>-0,009</b>	1,281	1,097	1,803	1,118	1,221	1,640
SG9	-0,057	0,062	0,001	-0,101	0,099	-0,071	0,208	0,081	<b>0,022</b>	1,250	700	2,022	2,003	2,062
SG10	0,120	0,017	-0,044	0,141	0,091	-0,004	-0,059	-0,075	-0,133	<b>0,080</b>	1,950	2,214	2,307	2,658
SG11	0,001	0,051	-0,098	-0,038	0,093	0,034	-0,014	-0,032	0,031	0,063	<b>0,010</b>	2,236	2,154	2,010
SG12	-0,077	0,005	0,018	-0,047	-0,069	0,020	0,002	0,061	-0,072	-0,080	-0,041	<b>-0,092</b>	200	800
SG13	0,034	-0,069	0,018	-0,068	-0,032	0,020	0,002	-0,013	-0,146	0,031	-0,062	0,204	<b>0,056</b>	600
SG14	0,062	0,070	-0,028	0,180	0,033	-0,174	-0,080	-0,133	0,067	-0,126	0,019	0,084	0,010	<b>0,186</b>

ANEXO E - Estimativa do coeficiente de endogamia individual (diagonal, em negrito), distância física (diagonal superior, em metros) e do coeficiente de coancestria entre pares de árvores (diagonal inferior) de *H. courbaril* na população Mata São José

	Indivíduos																
	MJ1	MJ2	MJ3	MJ4	MJ5	MJ6	MJ7	MJ8	MJ9	MJ10	MJ11	MJ12	MJ13	MJ14	MJ15	MJ16	MJ17
MJ1	<b>0,281</b>	2,000	2,001	3,606	3,041	3,536	3,640	5,142	8,000	8,515	8,559	8,246	6,185	7,280	7,071	7,649	7,762
MJ2	0,145	<b>0,245</b>	40	2,990	1,114	1,578	1,797	3,227	6,000	6,518	6,575	6,321	4,269	5,381	5,097	5,698	5,849
MJ3	0,079	-0,018	<b>0,035</b>	2,950	1,097	1,566	1,776	3,213	6,000	6,516	6,569	6,309	4,255	5,367	5,089	5,688	5,835
MJ4	0,042	0,103	0,038	<b>0,119</b>	2,693	2,915	2,500	3,499	6,699	6,964	6,801	6,083	4,272	5,099	5,385	5,701	5,590
MJ5	-0,051	-0,069	-0,055	0,105	<b>0,091</b>	500	707	2,119	5,023	5,500	5,523	5,220	3,162	4,272	4,031	4,610	4,743
MJ6	-0,195	0,103	-0,121	0,079	0,026	<b>-0,039</b>	500	1,655	4,526	5,000	5,025	4,743	2,693	3,808	3,536	4,123	4,272
MJ7	-0,002	-0,060	-0,086	-0,044	-0,018	-0,004	<b>0,347</b>	1,513	4,605	5,025	5,000	4,610	2,550	3,640	3,500	4,031	4,123
MJ8	0,056	0,156	0,012	-0,262	-0,118	-0,025	0,089	<b>0,068</b>	3,224	3,569	3,506	3,105	1,044	2,154	2,010	2,518	2,625
MJ9	-0,030	-0,128	-0,035	-0,111	-0,046	0,047	0,003	0,061	<b>0,212</b>	693	1,100	1,980	2,488	2,218	1,400	1,562	2,042
MJ10	0,161	-0,016	0,314	0,040	0,026	-0,197	-0,044	0,014	0,007	<b>-0,039</b>	500	1,581	2,693	2,121	1,581	1,414	1,803
MJ11	0,019	-0,079	0,054	-0,142	0,003	-0,062	0,051	0,031	0,103	0,056	<b>-0,007</b>	1,118	2,550	1,803	1,500	1,118	1,414
MJ12	-0,023	-0,200	0,012	0,054	0,119	-0,065	0,089	-0,051	0,140	0,014	-0,009	<b>0,226</b>	2,062	1,000	1,414	707	500
MJ13	0,012	0,112	-0,032	-0,069	0,075	0,089	-0,074	0,063	-0,221	0,010	0,105	-0,135	<b>0,296</b>	1,118	1,118	1,500	1,581
MJ14	-0,190	-0,011	-0,116	0,005	0,031	0,124	0,158	-0,060	-0,028	-0,153	-0,018	-0,021	0,054	<b>0,128</b>	1,000	707	500
MJ15	-0,116	0,063	-0,002	0,000	0,145	0,158	-0,162	-0,025	-0,111	0,079	-0,062	-0,183	0,128	0,084	<b>0,435</b>	707	1,118
MJ16	-0,009	-0,067	-0,053	-0,011	-0,104	0,028	-0,095	0,082	0,035	-0,130	-0,034	0,003	-0,002	0,032	-0,011	<b>-0,062</b>	500
MJ17	-0,060	-0,158	0,014	0,096	-0,116	-0,062	0,051	-0,048	0,142	-0,102	-0,046	0,149	-0,290	0,100	-0,141	0,360	<b>0,309</b>



ANEXO F - Estimativas do coeficiente de endogamia individual, da distância física e do coeficiente de coancestria entre pares de árvores de *H. courbaril* na população de Coclé. Considerar o valor associado à letra na linha como “i” e o da coluna como “j”. Se  $i = j$ , o valor refere-se ao coeficiente de endogamia individual; se  $i < j$ , o valor refere-se ao coeficiente de coancestria entre pares de árvores e se  $i > j$  o valor refere-se a distância física (em m) entre árvores

(continua)

	Indivíduos													
	C1	C2	C3	C4	C5	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15
C1	<b>-0,219</b>	1044	2062	3000	3000	4500	5099	6700	7000	7801	8000	9000	10200	12526
C2	0,049	<b>0,165</b>	1020	2016	2018	3509	4061	5707	6005	6803	7004	8005	9203	11511
C3	0,094	0,133	<b>0,406</b>	1097	1105	2540	3041	4724	5020	5814	6017	7016	8212	10504
C4	0,081	0,044	0,241	<b>0,228</b>	20	1500	2214	3700	4000	4800	5000	6000	7200	9530
C5	-0,040	0,113	0,234	0,107	<b>0,443</b>	1500	2223	3700	4000	4801	5000	6000	7200	9531
C7	0,129	0,054	0,099	0,124	0,079	<b>0,172</b>	1074	2200	2500	3300	3500	4500	5700	8035
C8	0,133	0,287	-0,049	-0,177	0,007	0,024	<b>0,333</b>	1962	2214	2941	3147	4118	5286	7503
C9	0,040	0,003	0,124	-0,042	0,066	-0,069	0,201	<b>0,146</b>	301	1103	1300	2300	3500	5852
C10	0,075	-0,038	-0,107	0,032	-0,203	-0,034	0,008	-0,085	<b>0,065</b>	802	1000	2000	3200	5551
C11	-0,034	-0,070	-0,178	-0,039	0,031	-0,143	-0,139	-0,080	0,070	<b>0,228</b>	206	1203	2401	4752
C12	-0,093	-0,091	0,067	-0,098	0,162	-0,087	-0,084	0,052	-0,065	0,207	<b>0,186</b>	1000	2200	4562
C13	-0,006	-0,043	-0,036	0,027	-0,018	0,037	-0,035	0,062	-0,017	0,027	0,120	<b>-0,022</b>	1200	3586
C14	0,043	0,006	0,203	0,151	0,031	0,086	-0,101	-0,080	-0,120	-0,077	-0,136	-0,126	<b>0,380</b>	2419
C15	-0,105	0,125	-0,059	-0,072	0,074	-0,137	0,133	-0,036	0,037	0,004	0,022	-0,006	-0,034	<b>0,086</b>

ANEXO F - Estimativas do coeficiente de endogamia individual, da distância física e do coeficiente de coancestria entre pares de árvores de *H. courbaril* na população de Coclé. Considerar o valor associado à letra na linha como “i” e o da coluna como “j”. Se  $i = j$ , o valor refere-se ao coeficiente de endogamia individual; se  $i < j$ , o valor refere-se ao coeficiente de coancestria entre pares de árvores e se  $i > j$  o valor refere-se a distância física (em m) entre árvores

(continuação)

	Indivíduos													
	C1	C2	C3	C4	C5	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15
C16	0,151	-0,114	-0,031	0,070	-0,051	-0,072	-0,144	0,029	-0,011	0,070	-0,065	-0,017	0,146	-0,039
C17	-0,026	-0,215	-0,132	0,121	0,039	-0,021	-0,131	-0,034	0,078	0,121	0,062	0,035	0,045	0,012
C18	-0,089	-0,202	-0,043	0,058	0,090	-0,007	-0,194	0,170	-0,061	0,096	0,075	0,124	-0,018	-0,013
C19	-0,018	-0,017	-0,162	0,015	-0,068	-0,089	-0,009	0,088	0,124	0,053	0,032	0,004	-0,175	0,058
C20	-0,102	-0,025	-0,094	-0,183	0,039	0,132	0,136	0,043	-0,150	-0,183	0,062	-0,004	-0,069	0,165
C21	0,099	-0,052	0,031	-0,021	-0,179	-0,124	-0,044	-0,023	0,241	0,056	-0,004	0,045	-0,059	0,099
C22	0,016	-0,249	-0,166	-0,141	-0,300	-0,017	-0,051	-0,068	0,158	-0,027	-0,086	0,039	0,049	-0,060
C23	-0,060	-0,097	-0,204	-0,179	-0,148	-0,131	-0,051	0,085	0,044	0,125	-0,048	0,077	-0,065	-0,022
C24	0,002	0,003	-0,257	-0,194	-0,162	0,007	0,087	0,032	-0,009	0,035	-0,025	0,024	-0,156	-0,112
C25	-0,139	-0,099	-0,093	-0,106	-0,036	0,019	-0,053	-0,108	0,041	-0,030	0,102	-0,078	-0,030	0,014
C26	-0,087	-0,048	-0,042	-0,093	-0,061	0,070	-0,078	-0,171	-0,022	-0,055	-0,038	-0,103	0,136	-0,011
C27	-0,006	0,186	-0,112	0,027	-0,018	-0,001	0,117	-0,128	0,136	0,065	-0,185	0,016	-0,087	0,070
C28	0,018	-0,019	0,102	0,088	-0,070	-0,091	-0,164	-0,105	0,083	0,127	0,067	-0,074	0,050	-0,097
C29	0,032	0,033	0,154	0,065	-0,094	0,075	0,003	-0,090	-0,131	-0,126	-0,147	-0,098	0,255	-0,158
C30	-0,039	0,305	0,159	-0,006	0,216	0,043	0,237	0,029	-0,164	-0,082	0,087	-0,055	-0,044	0,113

ANEXO F - Estimativas do coeficiente de endogamia individual, da distância física e do coeficiente de coancestria entre pares de árvores de *H. courbaril* na população de Coclé. Considerar o valor associado à letra na linha como “i” e o da coluna como “j”. Se  $i = j$ , o valor refere-se ao coeficiente de endogamia individual; se  $i < j$ , o valor refere-se ao coeficiente de coancestria entre pares de árvores e se  $i > j$  o valor refere-se a distância física (em m) entre árvores

(continuação)

	Indivíduos														
	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30
C1	1304	16000	16500	18000	19000	19500	20000	20025	20002	22006	23000	23000	23004	25000	27000
C2	361	15001	15502	17001	18001	18502	19002	19013	19000	21001	22001	22001	22000	24001	26002
C3	806	14006	14507	16005	17005	17506	18006	18007	18001	20000	21005	21004	21000	23004	25005
C4	1701	13000	13500	15000	16000	16500	17000	17027	17002	19005	20000	20000	20003	22000	24000
C5	1701	13000	13500	15000	16000	16500	17000	17028	17002	19006	20000	20000	20003	22000	24000
C7	3200	11500	12000	13500	14500	15000	15500	15529	15502	17506	18500	18500	18503	20500	22500
C8	3808	11037	11539	13031	14029	14531	15030	15000	15016	17007	18025	18023	18010	20023	22022
C9	5401	9300	9800	11300	12300	12800	13300	13336	13303	15308	16300	16300	16304	18300	20300
C10	5700	9000	9500	11000	12000	12500	13000	13035	13002	15007	16000	16000	16004	18000	20000
C11	6500	8200	8700	10200	11200	11700	12200	12233	12202	14206	15200	15200	15203	17200	19200
C12	6700	8000	8500	10000	11000	11500	12000	12038	12003	14007	15000	15000	15004	17000	19000
C13	7700	7000	7500	9000	10000	10500	11000	11044	11004	13009	14000	14000	14005	16000	18000
C14	8900	5800	6300	7800	8800	9300	9800	9846	9803	11809	12800	12800	12805	14800	16800
C15	11222	3569	4070	5544	6538	7040	7537	7503	7517	9505	10527	10523	10508	12523	14521

ANEXO F - Estimativas do coeficiente de endogamia individual, da distância física e do coeficiente de coancestria entre pares de árvores de *H. courbaril* na população de Coclé. Considerar o valor associado à letra na linha como “i” e o da coluna como “j”. Se  $i = j$ , o valor refere-se ao coeficiente de endogamia individual; se  $i < j$ , o valor refere-se ao coeficiente de coancestria entre pares de árvores e se  $i > j$  o valor refere-se a distância física (em m) entre árvores

(conclusão)

	Indivíduos														
	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30
C16	<b>-0,011</b>	14700	15200	16700	17700	18200	18700	18722	18701	20704	21700	21700	21702	23700	25700
C17	0,116	<b>0,243</b>	502	2000	3000	3500	4000	4100	4005	6013	7000	7000	7006	9000	11000
C18	0,129	0,142	<b>0,041</b>	1501	2501	3000	3500	3627	3509	5518	6500	6500	6509	8500	10500
C19	0,124	0,137	0,074	<b>-0,198</b>	1000	1501	2001	2193	2010	4020	5000	5000	5009	7000	9000
C20	-0,112	-0,061	0,028	0,023	<b>0,167</b>	502	1001	1345	1020	3027	4000	4000	4011	6000	8000
C21	0,088	0,064	-0,076	0,071	-0,051	<b>-0,116</b>	500	1074	559	2540	3500	3500	3517	5500	7500
C22	0,120	-0,019	0,032	-0,087	0,095	0,144	<b>0,479</b>	950	250	2050	3000	3000	3020	5000	7000
C23	0,158	0,019	0,032	0,065	-0,019	0,144	0,251	<b>-0,129</b>	700	2062	3147	3132	3059	5089	7068
C24	0,029	-0,034	-0,059	0,088	0,081	-0,023	0,199	0,237	<b>-0,006</b>	2010	3010	3007	3002	5006	7006
C25	-0,149	-0,022	0,029	-0,014	0,283	-0,049	0,134	-0,018	0,082	<b>0,170</b>	1097	1077	1005	3034	5023
C26	-0,022	-0,085	-0,034	-0,077	0,067	-0,112	0,109	0,071	0,133	0,145	<b>0,120</b>	50	350	2000	4000
C27	-0,093	-0,080	-0,066	0,081	-0,042	-0,031	-0,038	-0,076	0,062	0,036	0,011	<b>-0,022</b>	300	2001	4001
C28	0,007	0,020	-0,081	0,066	-0,132	0,069	-0,090	0,062	-0,105	0,022	0,035	0,040	<b>0,102</b>	2030	4018
C29	-0,055	-0,118	-0,066	-0,186	-0,080	-0,145	0,039	-0,114	0,100	-0,002	0,315	0,054	0,078	<b>0,587</b>	2000
C30	-0,278	-0,227	-0,137	-0,105	0,116	-0,140	-0,261	-0,185	-0,085	0,079	-0,022	0,136	0,045	0,174	<b>0,369</b>

ANEXO G - Estimativas do coeficiente de endogamia individual, da distância física e do coeficiente de coancestria entre pares de árvores de *H. courbaril* na população do Canal do Panamá. Considerar o valor associado à letra na linha como “i” e o da coluna como “j”. Se  $i = j$ , o valor refere-se ao coeficiente de endogamia individual; se  $i < j$ , o valor refere-se ao coeficiente de coancestria entre pares de árvores e se  $i > j$  o valor refere-se a distância física (em m) entre árvores

(continua)

	Indivíduos														
	P1	P2	P3	P4	P5	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16
P1	<b>0,207</b>	502	1720	2236	2000	2502	3041	4000	4000	5501	6000	7001	7000	7018	8599
P2	0,058	<b>0,150</b>	1440	1776	1500	2001	2540	3500	3500	5000	5500	6500	6500	6516	8097
P3	-0,039	-0,027	<b>-0,044</b>	1077	1704	1985	2193	3302	3290	4684	5179	6139	6150	6067	7501
P4	-0,004	0,008	0,031	<b>-0,135</b>	980	1030	1118	2227	2214	3614	4111	5080	5089	5025	6507
P5	-0,044	-0,032	0,111	0,025	<b>-0,135</b>	506	1109	2000	2000	3501	4000	5001	5000	5023	6625
P7	-0,018	0,034	0,097	0,292	0,091	<b>0,318</b>	640	1502	1501	3000	3500	4500	4500	4518	6119
P8	-0,041	-0,150	0,154	0,068	0,148	0,054	<b>0,191</b>	1109	1097	2532	3034	4020	4025	4000	5558
P9	0,138	-0,010	0,053	0,168	0,048	0,274	0,130	<b>-0,010</b>	30	1502	2000	3001	3000	3038	4679
P10	-0,063	-0,052	0,132	0,006	0,046	0,112	0,169	-0,012	<b>-0,173</b>	1501	2000	3000	3000	3034	4670
P11	0,275	0,127	-0,051	-0,016	0,024	-0,150	-0,133	-0,074	-0,115	<b>0,263</b>	502	1500	1501	1552	3231
P12	0,004	-0,104	-0,041	-0,007	-0,007	-0,061	-0,004	-0,065	-0,026	-0,008	<b>-0,199</b>	1001	1000	1097	2795
P13	0,141	0,032	-0,105	0,010	-0,030	-0,204	0,013	-0,168	-0,010	0,249	0,058	<b>0,154</b>	50	400	1921
P14	0,027	0,039	0,062	-0,144	-0,024	-0,238	0,099	-0,081	0,077	-0,025	-0,056	0,121	<b>0,328</b>	450	1953
P15	-0,143	-0,156	-0,103	0,081	-0,035	-0,079	0,079	0,008	0,008	-0,109	0,084	0,017	0,019	<b>0,051</b>	1700
P16	-0,104	-0,172	0,052	0,046	0,086	0,192	0,049	0,068	0,027	-0,155	0,054	-0,050	-0,163	0,079	<b>0,147</b>

ANEXO G - Estimativas do coeficiente de endogamia individual, da distância física e do coeficiente de coancestria entre pares de árvores de *H. courbaril* na população do Canal do Panamá. Considerar o valor associado à letra na linha como “i” e o da coluna como “j”. Se  $i = j$ , o valor refere-se ao coeficiente de endogamia individual; se  $i < j$ , o valor refere-se ao coeficiente de coancestria entre pares de árvores e se  $i > j$  o valor refere-se a distância física (em m) entre árvores

(continuação)

	Indivíduos														
	P1	P2	P3	P4	P5	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16
P17	-0,053	-0,121	-0,018	0,017	0,057	-0,037	0,019	0,039	0,077	-0,105	0,065	0,001	0,048	0,110	0,037
P18	0,073	-0,032	0,205	0,022	0,136	0,091	0,158	0,133	-0,005	-0,168	-0,159	-0,180	0,051	0,038	0,158
P19	-0,027	-0,135	-0,032	-0,038	0,002	-0,052	0,165	0,145	0,063	-0,119	0,050	-0,053	0,114	0,186	-0,057
P20	-0,204	-0,032	-0,009	-0,055	0,105	-0,069	0,108	-0,033	0,046	0,024	-0,007	0,010	-0,064	0,173	-0,034
P21	-0,008	0,164	-0,133	-0,018	-0,139	-0,072	-0,136	-0,036	-0,078	-0,060	-0,050	0,046	0,013	0,070	-0,078
P22	0,053	0,025	-0,032	0,002	-0,078	-0,052	-0,155	-0,016	-0,057	0,001	0,090	-0,053	-0,006	-0,090	-0,057
P23	0,047	-0,022	0,041	0,116	-0,084	0,142	-0,082	0,058	-0,104	-0,005	0,084	-0,220	-0,093	-0,028	-0,064
P24	-0,005	0,007	-0,010	-0,176	-0,136	-0,070	-0,133	-0,114	0,005	-0,057	-0,008	0,049	0,056	0,027	0,005
P25	-0,074	0,018	-0,079	-0,124	-0,164	-0,138	-0,082	-0,142	0,177	-0,005	0,004	-0,020	-0,053	0,019	-0,104
P26	-0,111	-0,059	-0,036	-0,082	-0,002	-0,016	-0,039	0,061	-0,021	0,037	-0,034	-0,097	-0,090	0,090	0,099
P27	-0,014	0,158	0,061	-0,105	0,095	0,001	-0,102	-0,003	-0,084	0,134	-0,057	-0,081	0,006	-0,097	-0,004
P28	-0,187	0,065	-0,032	-0,118	-0,038	-0,132	-0,035	-0,176	-0,017	-0,079	0,090	-0,053	0,034	0,140	-0,097
P29	0,143	0,035	-0,223	0,092	-0,148	-0,162	-0,185	-0,126	-0,007	0,171	0,020	0,237	0,124	-0,096	-0,087
P30	0,017	-0,051	-0,069	0,046	0,086	-0,088	0,089	0,028	-0,093	-0,035	0,014	0,111	0,158	0,053	0,067
P31	0,142	0,074	-0,023	0,051	-0,029	-0,003	-0,106	-0,047	-0,128	0,130	0,140	0,116	-0,037	-0,171	0,032

ANEXO G - Estimativas do coeficiente de endogamia individual, da distância física e do coeficiente de coancestria entre pares de árvores de *H. courbaril* na população do Canal do Panamá. Considerar o valor associado à letra na linha como “i” e o da coluna como “j”. Se  $i = j$ , o valor refere-se ao coeficiente de endogamia individual; se  $i < j$ , o valor refere-se ao coeficiente de coancestria entre pares de árvores e se  $i > j$  o valor refere-se a distância física (em m) entre árvores

(continuação)

	Indivíduos														
	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	P28	P29	P30	P31
P1	8515	9014	10523	11065	12000	13500	14009	14509	17000	19000	20000	20001	21040	23000	25000
P2	8013	8512	10021	10563	11500	13000	13508	14007	16500	18500	19500	19501	20538	22500	24500
P3	7554	8050	9526	10002	11083	12567	13031	13530	16057	18051	19044	19038	20000	22041	24040
P4	6519	7018	8505	9002	10045	11535	12010	12510	15030	17027	18023	18018	19002	21022	23021
P5	6518	7016	8527	9077	10000	11500	12010	12509	15000	17000	18000	18001	19043	21000	23000
P7	6013	6512	8022	8571	9500	11000	11507	12007	14500	16500	17500	17500	18539	20500	22500
P8	5500	6000	7503	8031	9011	10508	11000	11500	14007	16006	17005	17003	18018	20005	22005
P9	4526	5023	6535	7099	8000	9500	10012	10511	13000	15000	16000	16001	17048	19000	21000
P10	4522	5020	6532	7094	8000	9500	10010	10510	13000	15000	16000	16001	17046	19000	21000
P11	3027	3523	5036	5609	6500	8000	8509	9009	11500	13500	14500	14500	15546	17500	19500
P12	2540	3034	4547	5131	6000	7500	8013	8512	11000	13000	14000	14001	15052	17000	19000
P13	1552	2040	3551	4148	5000	6500	7011	7511	10000	12000	13000	13000	14051	16000	18000
P14	1566	2050	3560	4162	5000	6500	7014	7513	10000	12000	13000	13001	14056	16000	18000
P15	1500	2000	3506	4061	5020	6512	7000	7500	10010	12008	13006	13004	14023	16006	18006
P16	800	943	2088	2502	3717	5142	5558	6053	8591	10574	11562	11553	12500	14554	16550

ANEXO G - Estimativas do coeficiente de endogamia individual, da distância física e do coeficiente de coancestria entre pares de árvores de *H. courbaril* na população do Canal do Panamá. Considerar o valor associado à letra na linha como “i” e o da coluna como “j”. Se  $i = j$ , o valor refere-se ao coeficiente de endogamia individual; se  $i < j$ , o valor refere-se ao coeficiente de coancestria entre pares de árvores e se  $i > j$  o valor refere-se a distância física (em m) entre árvores

(conclusão)

	Indivíduos														
	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	P28	P29	P30	P31
P17	<b>-0,152</b>	500	2010	2596	3529	5016	5500	6000	8512	10510	11507	11504	12526	14507	16507
P18	-0,041	<b>0,116</b>	1513	2119	3034	4518	5000	5500	8013	10010	11007	11004	12027	14007	16007
P19	0,034	0,035	<b>-0,021</b>	707	1635	3059	3506	4005	6532	8525	9519	9513	10517	12517	14516
P20	-0,024	0,022	0,162	<b>0,105</b>	1524	2731	3081	3569	6109	8082	9067	9055	10001	12055	14050
P21	0,053	-0,081	-0,001	-0,099	<b>0,178</b>	1501	2050	2540	5000	7000	8000	8001	9086	11000	13000
P22	0,074	-0,149	-0,101	-0,158	0,079	<b>0,059</b>	640	1077	3500	5500	6500	6501	7595	9500	11500
P23	-0,093	0,005	-0,027	-0,044	0,032	0,133	<b>0,207</b>	500	3034	5020	6013	6008	7046	9011	11011
P24	0,016	-0,032	0,041	0,104	0,061	0,081	-0,005	<b>0,103</b>	2540	4522	5515	5508	6549	8512	10511
P25	0,067	-0,179	0,053	0,156	0,152	0,013	0,046	0,195	<b>0,287</b>	2000	3000	3004	4191	6000	8000
P26	-0,010	0,030	0,136	0,239	-0,005	-0,025	-0,031	0,118	0,089	<b>-0,028</b>	1001	1011	2359	4000	6000
P27	-0,074	0,073	-0,048	0,015	0,052	-0,008	0,026	-0,066	-0,094	0,068	<b>-0,155</b>	100	1562	3000	5001
P28	-0,006	-0,011	0,100	0,122	0,159	-0,061	0,013	0,121	0,213	0,096	0,032	<b>-0,021</b>	1487	3004	5003
P29	-0,037	-0,247	-0,131	-0,188	0,089	0,190	0,063	-0,149	0,183	-0,135	0,002	-0,091	<b>0,560</b>	2359	4200
P30	0,038	0,131	0,023	-0,074	-0,078	0,023	-0,063	-0,195	-0,224	-0,061	0,036	-0,017	0,194	<b>0,067</b>	2000
P31	-0,037	-0,093	-0,212	-0,189	-0,072	0,229	0,102	0,050	-0,218	-0,176	0,001	-0,172	0,239	0,112	<b>0,398</b>