

ARTHUR TAVARES DE OLIVEIRA MELO

**FLUXO GÊNICO E ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL
DE *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (MELIACEAE) EM
FRAGMENTOS FLORESTAIS DE MATA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:
Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho

Goiânia, GO – Brasil
2012

“Toda nossa ciência comparada com a realidade é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein

“A ciência é uma ferramenta absolutamente essencial para qualquer sociedade que tenha a esperança de sobreviver bem, neste e nos próximos séculos.”

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer as instituições que financiaram a execução deste trabalho. A *Conservation International* pela disponibilidade de recursos financeiros, a CAPES pela bolsa concedida e a Universidade Federal de Goiás (UFG) pela infra-estrutura e apoio no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas (PGMP) da UFG, em especial à coordenadora do programa Dra Patrícia dos Santos Melo. A todos os professores do programa que estão envolvidos no crescimento e na excelente qualidade das atividades científico-acadêmicas do Programa, meu muito obrigado.

Aos membros da banca examinadora, Dra Edivani Villaron Franceschinelli, Dra Tereza Cristina de Oliveira Borba e em especial meu orientador Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho pelas valiosas contribuições para a finalização deste trabalho.

Um agradecimento especial à minha família e mais especial ainda aos meus pais, Marinei Jane de Melo e Newton Tavares de Oliveira por acreditarem no meu potencial, pela confiança, pela condição e pelo exemplo de dedicação no trabalho. Não há palavras que descreve o quanto sou grato a vocês dois!

Ao meu orientador Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho eu quero agradecer imensamente pelo exemplo de profissional acadêmico e pelos inúmeros ensinamentos científicos ao longo da graduação e da pós-graduação. Agradeço também por todas as correções feitas a este trabalho.

Ao pessoal que realizou a coleta do material vegetal e desenhou os iniciadores, Edivani Franceschinelli, Marlei Pereira, Angel Blanco, Ludmila Ferreira e Alexandre Siqueira e a todos que participaram direta ou indiretamente das coletas e da confecção dos primers microssatélites, um muito obrigado.

A todos os amigos, professores (em especial a Dra Rita Devós Ganga pelas suas contribuições) e companheiros do Setor de Melhoramento de Plantas da EA/UFG, um muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 A MATA ATLÂNTICA	11
2.2 FRAGMENTAÇÃO DE HABITAT E REDUÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA	13
2.3 O GÊNERO <i>CABRALEA</i>	15
2.4 USO DE FERRAMENTAS GENÉTICAS NO MANEJO E CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES AMEAÇADAS	20
2.4.1 O fluxo gênico e a diversidade genética	22
2.4.2 Estimativas tradicionais e indiretas do fluxo gênico	29
2.4.3 A metodologia TwoGener	33
2.4.4 Estrutura Genética Espacial	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 LOCAIS DE COLETA	41
3.2 EXTRAÇÃO DO DNA E AMPLIFICAÇÃO DOS LOCOS	42
3.3 ANÁLISES GENÉTICO-ESTATÍSTICAS	44
3.3.1 Análise de diversidade e da estrutura genética populacional	44
3.3.2 Estimativas da dispersão atual de polens via TwoGener	45
3.3.3 A estrutura genética espacial	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL	49
4.2 FLUXO GÊNICO E ANÁLISE DA DISPERSÃO DE POLENS	59
4.3 ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL	67
5 CONCLUSÕES	73
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXO	86

RESUMO

MELO, A. T. O. **Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica.** 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.¹

A fragmentação ambiental é a principal ação antrópica em habitats naturais. O Brasil possui uma posição de destaque no cenário mundial devido a elevada concentração de diversidade biológica existente em seus biomas. Entre os biomas brasileiros, três são considerados pela comunidade acadêmica como áreas prioritárias para conservação da natureza. Dentre estes, a Mata Atlântica merece destaque por ser o ecossistema brasileiro mais severamente afetado pela fragmentação ambiental. Parâmetros populacionais inferidos a partir de dados genéticos são úteis na caracterização de populações naturais e importantes na determinação de áreas prioritárias para conservação. *Cabralea canjerana* possui características biológicas e ecológicas que permitem que esta espécie seja considerada uma espécie modelo para Mata Atlântica, além de possuir uma madeira com elevado valor econômica. Neste sentido, utilizamos dados genéticos para fornecer subsídios para o estabelecimento de estratégias eficientes de conservação de populações de *Cabralea canjerana* ssp. *canjerana* em oito fragmentos florestais de uma Área de Proteção Ambiental (APA) de Mata Atlântica. Foi encontrado uma média de 24,5 alelos por loco e alta diversidade genética (H_E média = 0,724) para os oito fragmentos florestais. Houve uma relação positiva e significativa entre o tamanho do fragmento e a altitude em que estes fragmentos estão situados com as medidas de diversidade genética, mostrando que Áreas de Preservação Permanente (APPs) acima de 1800 metros de altitude são importantes na manutenção da diversidade genética. Os valores de $\theta = 0,131$ e de $R_{ST} = 0,189$ indicam uma moderada estruturação genética entre estas oito populações de *C. canjerana*. Análise Bayesiana indicam que estas oito populações formam dois subgrupos, grupo **A** (fragmentos 01, 02, 03 e 04) e grupo **B** (fragmentos 05, 06, 07 e 08). Há mais fluxo gênico aparente dentro destes dois grupos do que entre eles. Porém, com as análises do TwoGener e um valor de $\Phi_{FT} = 0,150$, há indício de uma elevada estruturação do pool de polens que fecundam as matrizes, percebendo que a dispersão de polens está restrita aos fragmentos, devido ao vôo limitado dos agentes de dispersão, que é realizada por mariposas da ordem Lepidoptera. O alcance médio de dispersão dos polens (δ) foi de 130 metros e o tamanho efetivo da população de doadores de polens é de aproximadamente três indivíduos. O padrão de variabilidade genética que existe entre as populações está estruturado na paisagem geográfica, no entanto, quando avaliado os fragmentos individualmente percebe-se que não há uma estruturação genética espacial para os indivíduos adultos dentro dos fragmentos. O fluxo gênico ainda é uma importante força evolutiva atuante entre estas populações e a sua manutenção depende efetivamente da manutenção da Área de Preservação Ambiental (APA).

Palavras-chave: Mata Atlântica, Genética da Conservação, *C. canjerana*, Marcadores SSR.

¹ Orientador: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho

ABSTRACT

MELO, A. T. O. **Gene flow and spatial genetic structure of *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) in Atlantic forest fragments.** 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.²

The environment fragmentation is most man action in natural habits. Brazil has highlights position in world scenario due a high concentration of biological diversity exists in Brazilian biomes. Between these biomes, three are considered by international academic community as priority areas for nature conservation. Among them, the Atlantic Forest deserves attention to be the Brazilian biome more severely affected by habitat fragmentation. Population parameters inferred by genetic data are useful in characterization of natural population and important to determination of conservation priority areas. *Cabralea canjerana* has biological and ecological characteristics that will be considered an Atlantic Forest model species, beyond have high economic wood value. In this sense, was used genetic data to provide subsidies for the establishment of efficient strategies for the conservation of *C. canjerana* ssp. *canjerana* populations in Environment Protection Area (EPA) of Atlantic Forest. Was found an average of 24,5 alleles by locus and high genetic diversity (H_E média = 0,724) to eight forest fragmentation. There was a positive and significant relationship between height at which these fragments are located with the measures of genetic diversity, showing that the Permanent Preservation Areas (PPAs) above 1800 meters altitude are important in maintaining genetic diversity. θ = 0,131 and R_{ST} = 0,189, indicates a moderated genetic structure between this eight *C. canjerana* populations. Bayesian analyses show that this eight populations form two clusters, group **A** (fragments 01, 02, 03 and 04) and group **B** (fragments 05, 06, 07 and 08). There is more apparent gene flow within these groups than between them. However, with value of Φ_{FT} = 0,150, indicating a high pollen pool structure that fertilize the female, it is clear that pollen dispersal is restricted to the fragment due to the limited flight dispersal agent, performed by moths of Lepidoptera order. The average of the pollen scope (δ) was 130 meters and the effective population size of pollen donors was approximately three individuals. The pattern of genetic variability exist between populations are structure in geographical landscape, however, when study fragments individually, perceives that there is no genetic spatial structure to adults individuals within fragments, in other words, there isn't relation between physical distance in adult tree and the degree of kinship between them. Gene flow yet is an important evolution source active in these populations and its maintenance depends on the effective maintenance of an Environmental Preservation Area (APA).

Key-words: Atlantic forest, conservation genetics, *C. canjerana*, SSR markers.

² Adviser: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado pela comunidade acadêmica internacional como o país que detêm a maior diversidade biológica do planeta, considerando ecossistemas, espécies, populações, indivíduos e genes. Com quase 1/3 das florestas tropicais do mundo, o Brasil é reconhecidamente um dos mais importantes repositórios dessa diversidade biológica mundial. Mesmo com tanta importância, muito pouco tem sido feito para preservar essa riqueza natural. Os mecanismos apropriados (políticas públicas eficientes) para a efetiva conservação desses recursos ainda são escassos. A destruição de ecossistemas em grande escala, conforme ocorre em praticamente todos os biomas brasileiros acarreta em perdas incalculáveis e irreversíveis de diversidade biológica. Diante deste cenário, muitas populações de espécies nativas sofrem do fenômeno conhecido como erosão genética.

A Mata Atlântica é o bioma brasileiro mais severamente afetado pela fragmentação do ambiente natural, restando, atualmente, apenas uma pequena parte de sua área original³. O processo global de fragmentação de habitat é, possivelmente, a mais profunda alteração causada pelo homem ao meio ambiente. Este processo possui uma influência direta na composição genética de uma população, atuando na redução dos níveis de variabilidade genética dentro das populações e consequentemente na perda do seu valor adaptativo. Uma população submetida a estas condições sofre ação de uma série de fatores genéticos e estocásticos, os quais, em poucas gerações, a levam a uma extinção local (Caballero et al., 2010). Biólogos da conservação não possuem dúvidas sobre o quanto o declínio da diversidade genética limita o potencial evolutivo de uma população e/ou espécie, inibindo a viabilidade de um organismo a se adaptar às mudanças ambientais.

Cabralea canjerana é uma espécie da família das Meliaceae formada por três subespécies: *Cabralea canjerana* ssp. *canjerana* (porte arbóreo), *Cabralea canjerana* ssp. *polytricha* (porte arbustivo) e *Cabralea canjerana* ssp. *selloi* (porte arbustivo). A espécie possui ampla área de ocorrência, principalmente nas regiões tropicais, embora não seja endêmica desta região. *Cabralea canjerana* ssp. *canjerana* é uma planta de porte arbóreo

³ Informação disponível em: www.sosmatlantica.org.br

(até 40 m de altura) e ocorre em toda a região neotropical. Sua madeira é moderadamente pesada e fácil de trabalhar. Possui boa aparência e textura média, sendo indicada para uso na construção civil e no paisagismo (Lorenzi, 1992). Fournet et al. (1996) relatam o sucesso do uso de compostos químicos extraídos dos frutos de canjerana no combate ao *Trypanossoma cruzi*, causador da doença de Chagas.

Espécies que possuem características de importância econômica precisam ser estudadas e caracterizadas geneticamente. O extrativismo inadequado pode reduzir a variabilidade genética de suas populações a níveis críticos, extinguindo-as em curto prazo. Devido a isso, os níveis de variabilidade genética foram incluídos pela IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza) como parâmetros populacionais importantes a serem utilizados na classificação de espécies ameaçadas. Baixos níveis de variabilidade genética associados a outros fatores, como a estruturação genética, a história de vida da espécie e o modo reprodutivo, representam o passo inicial para a extinção de espécies, subespécies ou grupos populacionais. O conhecimento a respeito de como a diversidade genética está estruturada no espaço geográfico, bem como das relações filogenéticas entre diferentes táxons e dos níveis atuais de fluxo gênico, contribuem de maneira importante para nosso entendimento sobre a história evolutiva e sobre a dinâmica populacional de diversas espécies (Caballero et al., 2010). Os parâmetros inferidos através das análises genéticas de populações são de grande importância para a determinação de estratégias adequadas à conservação da biodiversidade (Avise, 2010).

Os dados genéticos são uma ferramenta poderosa de auxílio aos biólogos conservacionistas. Não há dúvidas do quanto às ferramentas genético-moleculares fornecem informações úteis para os planos de conservação da biodiversidade em longo prazo (O'Brien, 1994). Neste contexto, os marcadores moleculares, especialmente os microssatélites (SSRs), podem ser úteis por permitir a obtenção de estimativas das diferenças genéticas (polimorfismos) existentes entre indivíduos de uma mesma população, entre populações e até mesmo entre espécies. Os microssatélites são marcadores moleculares codominantes, que apresentam geralmente um alto grau de polimorfismo, os quais permitem a realização de inferências mais precisas sobre os parâmetros genéticos populacionais. Este polimorfismo, resultante da atuação de diversos fatores microevolutivos, pode ser avaliado através de um diagnóstico das frequências alélicas e/ou genotípicas dos locos analisados.

No contexto do auxílio dos dados genéticos aos trabalhos de preservação da natureza, a avaliação da magnitude do fluxo gênico e a compreensão dos seus efeitos na manutenção das populações como unidades relacionadas e não distintas, fazem deste o fator evolutivo de maior interesse em estudos de conservação da biodiversidade (Storfer, 1999). Slaktin (1987) relatou que o fluxo de genes possui a capacidade de combater as consequências genéticas negativas (deriva genética e depressão por endogamia) do processo de fragmentação ambiental.

Além do fluxo de genes, a diversidade genética é outro parâmetro populacional indispensável aos estudos sobre conservação da natureza. Como componente da diversidade genética, a riqueza alélica identifica, principalmente, o número de alelos diferentes segregando em uma população. Indivíduos portadores de alelos exclusivos possuem uma importância singular por atuarem na manutenção dos níveis de heterozigosidade, quando através de fluxo gênico estes alelos são disseminados para outras subpopulações.

A distribuição aleatória dos genótipos de uma população no espaço geográfico (paisagem) é uma hipótese nula que pode ser rejeitada se existir algum fator evolutivo que favoreça a ocorrência de uma estruturação genética espacial (SGS, do inglês *Spatial Genetic Structure*). Ou seja, a estrutura genética espacial (SGS) é caracterizada, de acordo com Vekemans & Hardy (2004), como a distribuição não aleatória dos genótipos no espaço geográfico. A determinação da SGS, juntamente com outros parâmetros genéticos e ecológicos, como o tamanho efetivo populacional, o modelo de dispersão de sementes, o fluxo atual de polens e o número efetivo de doadores de polens são fundamentais para a definição de estratégias adequadas de conservação.

Neste sentido, o presente trabalho objetiva, pela utilização de dados obtidos a partir da análise de marcadores moleculares microssatélites, mostrar a magnitude e o padrão de fluxo gênico e a quantidade de diversidade genética existente dentro e entre populações de *C. canjerana* spp. *canjerana* amostradas em oito fragmentos florestais de Mata Atlântica. Objetiva-se também, avaliar o grau de estruturação genética espacial, bem como os níveis de fluxo gênico atual via dispersão de polens, considerando a ocorrência da fragmentação ambiental. Assim, espera-se, com este trabalho, fornecer dados populacionais de uma espécie modelo de Mata Atlântica e de grande importância econômica, para que ações eficientes de manejo, coleta e conservação das espécies deste bioma possam ser elaboradas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A MATA ATLÂNTICA

Mata Atlântica é o nome dado ao bioma brasileiro formado por florestas tropicais com um importante papel na história do país. Considerado o bioma mais rico em diversidade biológica do planeta, com aproximadamente um milhão e trezentos mil quilômetros quadrados, a Mata Atlântica originalmente ocupava 15% do território nacional, englobando 17 Estados brasileiros. Entretanto, 93% da sua área original já foram devastadas e mesmo apresentando elevados índices de biodiversidade e endemismo, sua conservação é uma questão delicada, já que o bioma se encontra em situação crítica de alteração antrópica. Os 15% de ocupação original do território nacional correspondem justamente às regiões mais povoadas do país, ou seja, nos domínios da floresta Atlântica vivem mais de 70% dos brasileiros (cerca de 110 milhões de pessoas). Nestas áreas estão localizadas as maiores cidades e os mais importantes pólos industriais do Brasil (Ministério de Meio Ambiente, 2010). O resultado dessa concentração pode ser evidenciado pelo fato de a Mata Atlântica estar reduzida a 7% de sua cobertura original e figurar entre os 25 *hotspots* mundiais de diversidade⁴.

A riqueza de biodiversidade da Mata Atlântica é tão expressiva que os dois maiores recordes mundiais de diversidade de árvores foram registrados neste bioma: encontradas 476 espécies em um único hectare numa região serrana no Espírito Santo e 454 espécies em um único hectare do sul da Bahia. As estimativas indicam ainda que o bioma possua cerca de 20.000 espécies vegetais, metade das quais seriam endêmicas. Além disso, mais de 2/3 dos primatas que ali vivem são espécies endêmicas e ameaçadas de extinção⁵.

Devido à grande extensão que a Mata Atlântica ocupa do território brasileiro, vários ecossistemas com processos ecológicos interligados fazem parte deste bioma. As

⁴ Informação disponível em: www.sosmatatlantica.org.br

⁵ Informação disponível em: www.conservation.org.br

formações deste bioma incluem as florestas Ombrófila Densa, Ombrófila Mista (Mata de Araucárias), Estacional Semidecidual e Estacional Decidual, além de ecossistemas associados como manguezais, restingas, brejos interioranos, campos de altitude e ilhas costeiras e oceânicas. A conexão entre diferentes ecossistemas pode ser exemplificada pela ligação entre a restinga e a floresta, permitindo o trânsito de animais e o fluxo de genes da fauna e flora, bem como pelas áreas onde os ambientes se encontram e vão gradativamente se transformando – a chamada transição ecológica.

Num documento disponibilizado pelo Ministério do Meio Ambiente (2010), conservar o restante da Mata Atlântica existente é também conservar os processos hidrológicos, uma vez que há, neste bioma, sete das nove maiores bacias hidrográficas do Brasil, composta por rios como o São Francisco, Paraná, Paraíba do Sul, Tietê e outros. Portanto, esta conservação é uma questão de estratégia nacional, pois estas sete bacias hidrográficas são responsáveis pela quantidade e qualidade de água potável disponível para cerca de 3,4 mil municípios e para os mais diversos setores da economia nacional, como a agricultura, a pesca, a indústria, o turismo e a geração de energia.

Atualmente, dentre os pontos mais relevantes a serem considerados para a efetiva conservação da Mata Atlântica destaca-se sua caracterização. Conforme consta neste documento (Ministério do Meio Ambiente, 2010), a falta de conhecimento sobre a biologia das espécies é uma barreira para a conservação. Em uma ação resultante de uma parceria do INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais), da Fundação Mata Atlântica e do Ministério da Ciência e Tecnologia, nos últimos 25 anos foram mapeadas as fitofisionomias dos principais biomas brasileiros, com enfoque na Mata Atlântica, permitindo se visualizar a eficiência dos projetos de conservação e manutenção de áreas preservadas. Com relação às Áreas de Preservação Ambiental (APAs) e Áreas de Preservação Permanente (APPs), sendo estas em propriedades particulares (RPPNs) ou não, sabe-se que as Unidades de Conservação (UCs) são uma das mais importantes estratégias para a conservação da diversidade biológica. É nas áreas protegidas que pode-se garantir a permanência de espécies sensíveis a habitats modificados, além do desdobramento dos diversos processos ecológicos e evolutivos dos ecossistemas e das comunidades biológicas neles inseridas (Oliveira et al., 2010). Portanto, o desenvolvimento dos projetos de conservação e preservação da Mata Atlântica passa pelo conhecimento dos processos teóricos e práticos da abordagem de conservação feita *in situ*.

2.2 FRAGMENTAÇÃO DE HABITAT E REDUÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA

A fragmentação de habitat reduz o tamanho efetivo de suas populações e aumenta o isolamento espacial entre elas (Yong et al., 2001). Sabe-se que estes processos de alteração ambiental causam erosão da variabilidade genética e aumento da divergência interpopulacional devido ao aumento da deriva, das taxas de endogamia e da redução do fluxo gênico.

Young et al. (2001) definem fragmentação ambiental como a redução de um habitat contínuo a vários fragmentos pequenos, isolados espacialmente. Fahrig (2003) destaca que alguns autores usam o tamanho do fragmento remanescente como medida do grau de fragmentação ambiental, enquanto outros autores defendem que o tamanho do fragmento não é uma medida da quantidade de fragmentação ocorrida. Fahrig (2003) numa ótima revisão das consequências da fragmentação sob a biodiversidade, alerta para as diferentes maneiras em que a fragmentação é conceituada e mensurada. Ewers & Didham (2006) caracterizam a fragmentação como um processo de redução do tamanho populacional e a formação de um novo arranjo para a estrutura genética espacial das populações (*Spatial Genetic Structure – SGS*). Eles afirmam que a fragmentação só ocorre quando a perda de habitat chega a um ponto em que a sua continuidade é quebrada. Ao caracterizarem as causas desta alteração ambiental, os autores chamam a atenção para o fato de que as ações causadoras da fragmentação não são exclusivamente antropogênicas. Porém, é claro que as ações de alteração ambiental de maior magnitude e de maior importância estão relacionadas com atividades humanas (Fahrig, 2003). Saunders et al. (1991) defendem que desde o desenvolvimento da agricultura – com ciclos de exploração da terra – todas as coberturas vegetais em todos os continentes, com exceção da antártica, têm sido extensivamente perturbadas.

Os efeitos da fragmentação foram inicialmente detectados em estudos de ecologia de populações, através da percepção da acentuada diminuição da riqueza das espécies. Com aprimoramento das técnicas moleculares, é possível perceber o efeito da fragmentação na composição genética das populações. Os parâmetros genéticos são considerados de extrema importância para caracterização de populações naturais por retratarem, de forma clara, o quanto as alterações ambientais influenciam a diminuição da variabilidade genética populacional. Segundo Young et al. (2001), as consequências

genéticas da fragmentação ambiental incluem a erosão da variabilidade genética e o aumento da divergência interpopulacional através do (a) aumento da deriva genética, (b) do aumento dos níveis de endogamia intrapopulacional, (c) da redução do fluxo gênico entre as populações e (d) do aumento da probabilidade de extinção de fragmentos locais. Conforme Ewers & Didham (2006) estes quatro fatores são consequências inevitáveis da redução do tamanho original dos habitats, tendo sérias implicações na persistência das espécies.

Em se tratando de espécies de plantas, os efeitos genéticos negativos causados pela fragmentação ambiental são mais perceptíveis, uma vez que são indivíduos de hábito séssil e possuem grandes diferenças de longevidade e tempo de geração. As plantas possuem grande diversidade de sistemas reprodutivos, com possibilidade de fluxo gênico através da dispersão de pólen e semente, ambos suscetíveis aos efeitos da fragmentação. O mesmo ocorre com os agentes de polinização, que também podem ser afetados pela fragmentação (Young et al., 2001).

Alguns parâmetros genéticos populacionais podem ser utilizados na quantificação do grau de fragmentação e na caracterização da estrutura genética espacial de uma população. Dentre estes parâmetros, a diversidade genética, os níveis de endogamia e as medidas diretas e indiretas de fluxo gênico fornecem as melhores estimativas sobre o quanto à fragmentação atua estruturando a composição genotípica das populações. Com a fragmentação de habitat, a população sofre uma redução do seu tamanho efetivo (efeito conhecido como *bottleneck* = redução do tamanho efetivo populacional) em que mesmo indivíduos portadores de composição alélica favorável podem ser eliminados. Com o passar das gerações, os poucos indivíduos sobreviventes nos fragmentos remanescentes começam a acumular alelos idênticos por descendência, devido à elevação dos níveis de endogamia. A combinação de alelos idênticos por descendência é caracterizada pela redução do valor adaptativo do indivíduo portador.

A estrutura genética espacial (SGS) é diretamente influenciada por características históricas, por processos ecológicos, genéticos e demográficos sofridos pelas populações. Born et al. (2008) retratam que processos ecológicos como eventos de colonização recente, densidades sexuais diferentes e características históricas, como a variação no sistema de cruzamento e no modo de dispersão de semente, também afetam a SGS. Ewers & Didham (2006) esclarecem que a fragmentação altera a SGS de uma população devido às modificações dos processos ecológicos, tais como as competições

com espécies invasoras e o sistema reprodutivo das plantas. O sucesso reprodutivo pode diminuir em populações fragmentadas porque as plantas podem receber menos visitantes florais, devido à diminuição da riqueza e abundância dos polinizadores (Ashworth et al 2004; Collevatti et al., 2010). A fragmentação também pode afetar a dispersão de sementes, alterando a abundância, a riqueza e/ou o comportamento dos animais dispersores (Ghazoul, 2005). Do ponto de vista conservacionista, o monitoramento dos parâmetros genéticos pode fornecer informações de extrema importância para a tomada de decisões nos programas de manejo de espécies ameaçadas.

Devido à elevada alteração ambiental existente em todos os biomas nacionais é extremamente importante caracterizar os fragmentos remanescentes com o objetivo de determinar áreas prioritárias para a aplicação da conservação *in situ*, através de Áreas de Proteção Permanente (APPs) e/ou Áreas de Proteção Ambiental (APAs). A conservação *in situ* se destaca por ser considerada a forma mais efetiva de conservação de recursos genéticos, por preservar não só a espécie alvo, mas toda a funcionalidade dos ecossistemas, permitindo a ocorrência dos processos ecológicos e evolutivos. Pérez-Figueroa et al. (2009) propuseram um método, implementado no software METAPOP, que permite o uso dos parâmetros genéticos, estimados com o uso de marcadores moleculares e de informações genealógicas, para a tomada de decisões conservacionistas, como sugerido por Schwartz et al. (2006).

2.3 O GÊNERO *CABRALEA*

O gênero *Cabralea* apresenta somente uma única espécie. O gênero é pertencente à família Meliaceae (APG II, 2003) que compreende cerca de 50 gêneros com aproximadamente 1.400 espécies distribuídas, principalmente entre os trópicos (Gouvêa, 2005). Esta família se divide em quatro subfamílias, cada uma delas subdivididas em diversas tribos. No Brasil ocorrem espécies das subfamílias *Melioideae* e *Swietenioideae*, sendo o gênero *Cabralea* pertencente à primeira. Além das subfamílias, há seis gêneros nativos do Brasil: *Cabralea* (canjerana), *Carapa* (andiroba), *Cedrela* (cedro), *Guarea* (catiguá), *Trichilia* (pau-ervilha) e *Swietenia* (mogno) (Pennington et al., 1981; Lorenzi, 1992; APG II, 2003).

Cabralea canjerana (Vellozo) Martius possui porte arbóreo e arbustivo, de ocorrência Neotropical. No Brasil, ocorrem três subespécies: *Cabralea canjerana* ssp. *canjerana* (Figura 1), que apresenta porte arbóreo (até 40 m de altura) e ocorre em matas de galeria e florestas do norte ao sul do Brasil; *Cabralea canjerana* ssp. *polytricha* (Adr. Juss.) Penn., que apresenta porte arbustivo (de 3 a 6m de altura) e parece estar restrita às áreas de cerrado e campos dos estados de Minas Gerais e Goiás; e *Cabralea canjerana* ssp. *selloi* (C.D.C.) Barr., também com porte arbustivo (de 3 a 6m de altura) estando restritas às regiões continentais de solos pobres em climas quentes e secos (Barreiros & Souza 1986). As subespécies *C. canjerana* ssp. *canjerana* e *C. canjerana* ssp. *polytricha* são as mais estudadas e de maior importância devido à sua ampla distribuição (Figura 2).

A espécie possui uma variedade de nomes populares, dependendo do local de ocorrência. Os principais são: canjerana, canjarana, caiarana, canjarana-do-litoral, canjerana-de-prego, canharana (Santa Catarina), cedro-canjerana, pau-de-santo, pindaiborana, cayarana, cancharana (Argentina) e cedrora (Paraguai). Na língua indígena tupi-guarani, os silvícolas a nomeiam de acaírana, onde acaíá = cajá e rana = falso. O nome da espécie foi dado em homenagem a Pedro Álvares Cabral. *Cabralea canjerana* significou aos colonizadores portugueses, já no século XVI, uma espécie de grande valor econômico, sendo reconhecida como madeira de lei (Schussler, 2006).



Figura 1. Aspecto geral da *Cabralea cajerana* ssp. *canjerana* numa região de depressão central no Rio Grande do Sul. Foto: Paulo Backes, Agudo – RS, fevereiro de 2002.

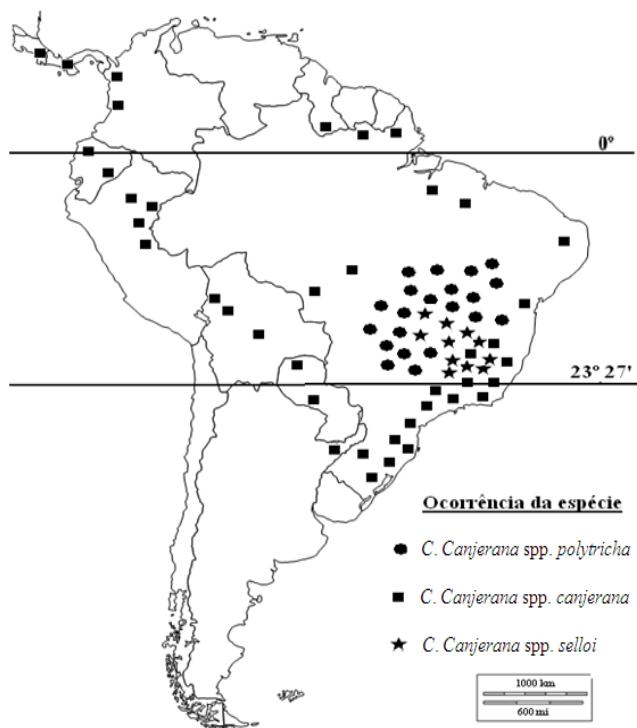


Figura 2. Mapa com registro de ocorrência das três subespécies de *Cabralea canjerana* na América Latina.
Fonte: Barreiros & Souza (1986); Pennington et al. (1981).

A madeira de canjerana é de boa aparência, moderadamente pesada e resistente à umidade e ao ataque de insetos. É indicada para confecção de estruturas de móveis, caixas, embalagens, obras de entalhe, em construção civil, como acabamentos internos, molduras, rodapés, venezianas, esquadrias, cabos de vassoura e outros. A árvore também pode ser empregada no paisagismo (Lorenzi, 1992).

A árvore pode chegar aos 30 metros de altura, com 70 a 120 cm de diâmetro à altura do peito. As folhas são compostas, paripenadas, com aproximadamente 50 cm de diâmetro, com uns 15-20 folíolos alternos; apresentam a face superior brilhante e glabra e a face inferior opaca com tufos de pêlos nas axilas e nas nervuras secundárias (Lorenzi, 1992). Apresentam inflorescências de tamanhos variados e flores com pedicelos curto-bracteados, corolas e tubos estaminais brancas e amarelos, respectivamente. As flores podem ser bissexuais ou unisexuais. Carmo (2005) esclarece que o sistema sexual da *C. canjerana* spp. *canjerana* é dióico. Moscheta et al. (2002) discutem se é possível identificar a diocia com base na morfologia floral, porém confirmam que em estudos anatômicos e principalmente sobre a função da flor, a diocia desta espécie é confirmada. Fuzeto et al. (2001) também confirmam que *C. canjerana* spp. *polytricha* é definitivamente

dióica, mostrando algumas diferenças morfológicas e anatômicas entre as flores femininas e masculinas. O fruto é globóide, levemente carnoso de cor vermelha (Figura 3). As sementes, normalmente duas por lóculo, são envoltas por um arilo, carnoso e riquíssimo em lipídios (70,8%) (Pizo & Oliveira, 2001).



Figura 3. Características dos frutos de *Cabralea canjerana* ssp. *canjerana*. Fotos: Miriam Prochnow e Anestor Mezzomo, Pinhais – PR, 2005.

Segundo Schussler (2006), *C. canjerana* ssp. *canjerana* é uma espécie que necessita de muita luz para seu desenvolvimento e é adaptada a locais de abundância de água, embora possa ser encontrada em diversas condições físicas de solo. Ocorre mais frequentemente em terrenos planos e em chapadas, onde o escoamento da água se processa de forma mais lenta. Diferentemente do encontrado por Schussler (2006), as populações estudadas neste trabalho estão localizadas em encostas topo de morros. O autor relata ainda a facilidade de regeneração da espécie, tanto em matas densas quanto em clareiras e capoeirões. Foram encontrados valores elevados de plasticidade fenotípica para diversos caracteres avaliados em *C. canjerana* ssp. *polytricha* (Fuzeto & Lomônaco, 2000) e *C. canjerana* ssp. *canjerana* (Schussler, 2006).

O consenso sobre a fenologia da espécie é o de que a floração acontece no período de setembro a novembro, com pico no mês de outubro. O processo de frutificação dura cerca de um ano. A antese acontece no final da tarde, com a abertura das anteras depois da abertura das flores (Fuzeto et al., 2001). A fauna associada à polinização e dispersão é variada. A polinização acontece principalmente por mariposas da ordem Lepidoptera de diversas famílias (Carmo, 2005). A dispersão é realizada principalmente por aves, morcegos, pequenos mamíferos e formigas. Pizo & Oliveira (1998) e Carmo

(2005), identificaram como predadores de sementes de canjerana, aves da espécie *Phyrrura frontalis*, os roedores *Akodon cursos*, *Delomys dorsalis* e o macaco *Cebus apella*. Estes autores ainda perceberam uma rápida germinação das sementes de canjerana no habitat natural e concluíram que a remoção do arilo, por formigas, aumenta significativamente a velocidade e o sucesso da germinação.

A canjerana também possui propriedades oleoquímicas interessantes com inúmeros efeitos medicinais, sendo, por isso, utilizada em pesquisas contra o câncer e a AIDS (Soares et al., 2004). Compostos químicos dos frutos também estão sendo testados por Fournet et al. (1996), com sucesso, no combate ao *Trypanossoma cruzi*, protozoário responsável pela doença de Chagas. Carneiro (2009) tem relatado que os caules desta espécie são utilizados pelas populações tradicionais no tratamento a distúrbios causados na pele e no tecido subcutâneo.

Cabralea canjerana é uma espécie que possui muitas características de importância econômica e seu extrativismo inadequado pode reduzir a variabilidade genética de suas populações a níveis críticos. Portanto, estudos que visam caracterizar geneticamente suas populações são importantes, porém ainda escassos. A obtenção de informações que revelem os níveis de diversidade genética, bem como os processos que a mantém, torna-se necessária quando se deseja praticar medidas conservacionistas. É inviável, entretanto, buscar tais informações efetuando-se estudos genéticos populacionais em todas as espécies que compõem um ecossistema (Young & Boyle, 2000). Uma possível solução para contornar esse problema pode ser a escolha de uma ou mais espécies-modelo, que sirvam como referência. Essas espécies-modelo representam grupos de espécies com características comuns e que apresentam padrões genéticos e ecológicos extrapoláveis, até certo ponto, para todo o grupo (Yong & Boyle, 2000).

A escolha de *Cabralea canjerana* ssp. *canjerana* para ser objeto deste estudo teve justamente o propósito de assegurar que as informações obtidas sobre diversidade genética, dinâmica de fluxo gênico e o atual nível de conexão entre os fragmentos analisados possam ser extrapoladas para outras espécies. Isso porque as características biológicas, ecológicas e a grande área de ocorrência, principalmente em fragmentos florestais de Mata Atlântica, fazem de *Cabralea canjerana* uma espécie modelo, podendo ser considerada como referência para outras espécies da Mata Atlântica.

2.4 USO DE FERRAMENTAS GENÉTICAS NO MANEJO E CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES AMEAÇADAS

A biologia da conservação se baseia em estudos populacionais para a definição de unidades prioritárias para estratégias de manejo (Eizirik, 1996). Inserida, determinantemente, no contexto da biologia da conservação, a área da genética da conservação está totalmente relacionada, nos dias atuais, com a ecologia molecular. Avise (2010) define genética da conservação como estudos genéticos destinados à compreensão de processos populacionais e evolutivos relevantes para a conservação de espécies ameaçadas. O uso de marcadores moleculares juntamente com as teorias que abrangem a genética de populações, a filogenia/filogeografia e a ecologia molecular, é de extrema importância para planos de conservação *in situ* da biodiversidade brasileira e mundial.

Nos últimos trinta anos, as técnicas de biologia molecular revolucionaram a importância que a biologia da conservação dava à genética. Os dados genéticos ganharam espaço, e ao lado da ecologia de populações, fornecem informações muito importantes para os biólogos da conservação. Atualmente, os dados de genotipagem e sequenciamento de indivíduos de uma população já são considerados ferramentas poderosas no acesso a parâmetros demográficos e atuais de espécies ameaçadas de extinção. Conforme defendido por Haig (1998), as técnicas moleculares já fazem parte de uma gama de ferramentas que atualmente são usadas para acessar a perda, cada vez maior, da biodiversidade.

Os parâmetros genéticos populacionais fornecem informações determinantes quando são interpretados sob a ótica da abordagem conservacionista. Para Frankham (1995), existem sete questões que devem sempre ser levadas em consideração neste tipo de estudo: (1) a depressão por endogamia, (2) o acúmulo de mutações deletérias, (3) a perda de variabilidade genética em populações pequenas, (4) a adaptação genética ao cativeiro e seu efeito sobre o sucesso de reintrodução (no caso de animais), (5) a depressão por exocruzamento, (6) a fragmentação da população e a redução do fluxo gênico e (7) as incertezas taxonômicas.

O uso de marcadores moleculares, neste campo é extremamente difundido, sendo, em grande parte, responsável pela possibilidade de se estudar populações ameaçadas em condições naturais. Atualmente, os trabalhos usando as mais diversas classes de marcadores são realidade na grande maioria dos laboratórios de genética e biologia molecular do mundo todo. O'Brien (1994) e Moritz (1994) defendem claramente,

o uso de marcadores moleculares aplicados à teoria de genética de populações para a compreensão de questões conservacionistas. Balloux & Moulin (2002) fizeram uma revisão sobre o uso de marcadores microssatélites nos estudos genéticos de populações naturais, discutindo as interpretações biológicas dos parâmetros que medem os níveis de estruturação genética.

Além dos locos nucleares, há regiões genômicas que, após serem sequenciadas, alinhadas e analisadas, também fornecem informações fundamentais à compreensão de padrões evolutivos e dinâmica populacional. Estas regiões são, principalmente, do genoma mitocondrial (mtDNA) e do genoma cloroplastidial (cpDNA) para resolver problemas filogenéticos/filogeográficos de animais e plantas, respectivamente.

Os métodos de ordenação e, principalmente as análises de coordenadas principais (PCA) possuem uma importância singular para estudos que objetivam compreender os padrões de estruturação populacional com o intuito de definir áreas prioritárias para conservação. Anderson & Willis (2003) mostram que as análises derivadas dos métodos de ordenação são importantes para compreender a organização existente nos dados de riqueza de espécies coletados em campo. Estas análises podem ser comparadas com outras abordagens estatísticas que acessam a estruturação populacional como o caso da inferência Bayesiana, além de corroborar com as medidas do F_{ST} (Sahyum et al., 2010). Estes autores mostraram ainda a relação entre as análises de coordenadas principais e os valores de F_{ST} para três populações de *Maytenus aquifolium*, evidenciando uma forte estruturação interpopulacional e sugerindo a conservação efetiva das três populações desta espécie em estudo.

Reeves & Richards (2009), também esclarecem a importância dos métodos de ordenação no acesso a estrutura genética populacional e o quanto esta abordagem pode ser importante para estudos evolutivos da biodiversidade. Neste sentido, estes mesmos autores propuseram um novo método baseado nas análises de coordenadas principais para inferir a estrutura populacional a partir de dados multilocos, alegando que os métodos Bayesianos de alocação de indivíduos minimizam o equilíbrio de ligação e de Hardy-Weinberg dentro das populações.

A importância da inferência Bayesiana juntos com os métodos de Monte Carlo através das Cadeias de Markov (MCMC) nas análises de alocação de indivíduos é clara ao fornecer estimativas paramétricas mais precisas devido à robustez dos estimadores utilizados nesta estatística (Pritchard et al., 2000; Evano et al., 2005; Falush et al., 2007).

Em estudos genéticos de problemas complexos (como genética de populações, testes de paternidade, genética forense), a abordagem Bayesiana se destaca com enorme potencial de aplicação. Shoemaker et al. (1999) mostram que esta abordagem é de fácil interpretação e pode ser usada em diversas áreas da genética. Estes autores também defendem que através da estatística Bayesiana pode-se acessar a questão de interesse mais diretamente devido à credibilidade depositada sob a análise. A análise de agrupamento é realizada e fundamenta-se no princípio proposto por Rannala & Mountain (1997). Este princípio considera situações em que a partir de dados genéticos de uma amostra de indivíduos, e assumindo que estes são originados de populações desconhecidas, os algoritmos Bayesianos devem agrupar os indivíduos geneticamente similares e identificar grupos formados.

Avise (2010) relata que o futuro das análises genéticas voltadas à conservação está passando por outra revolução, ainda referente ao avanço das técnicas de biologia molecular, que agora fornecem marcadores capazes de detectar polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) e genotipagem por sequenciamento (GBS – *Genotype by Sequencing*). Com esta tendência, está havendo um ganho nas inferências estatísticas que se tornam cada vez mais robustas devido à grande quantidade de informações genéticas disponível. Assim, o autor mostra como será a abordagem conservacionista na era da genômica, onde as genealogias biológicas em todos os níveis da hierarquia filogenética serão estimadas com uma precisão muito maior. Isso é possível com a interligação entre: quantidades elevadas de informações biológicas (uso de marcadores SNPs), inferências estatísticas robustas (abordagem Bayesiana) e teorias inovadoras, como a teoria da coalescência.

2.4.1 O fluxo gênico e a diversidade genética

O processo de escolha de populações naturais candidata a um programa de manejo e conservação tem como primeiro e mais importante passo a caracterização destas populações. Os critérios genéticos baseados na utilização de marcadores moleculares estão entre os principais métodos de caracterização. Dentre os parâmetros genéticos populacionais mais importantes, que fornecem as informações mais preciosas para os projetos de conservação de espécies ameaçadas estão: o fluxo gênico, as medidas de diversidade genética e o grau de estruturação genética espacial das populações.

O fluxo gênico é um termo coletivo que caracteriza todos os mecanismos resultantes do movimento de genes de uma população para outra. Este movimento geralmente ocorre entre populações de uma mesma espécie, porém algum tipo de troca genética interespecífica é conhecido. Slatkin (1985; 1987) definiu que o fluxo gênico é a mudança evolutiva na frequência dos alelos causada pelo movimento de gametas entre populações de uma mesma espécie. O autor ainda discute o principal motivo que leva este fator evolutivo a ser considerado um dos principais parâmetros populacionais estimados nos trabalhos que objetivam a conservação de espécies ameaçadas: o fluxo gênico pode restringir o processo evolutivo por prevenir a adaptação às condições locais e promover a evolução espalhando novos genes e combinações gênicas entre populações de uma determinada espécie (Slatkin, 1987). Em outras palavras, a variação genética existente entre as espécies resulta de um balanço entre forças evolutivas que tendem a produzir diferenciação local – como a deriva genética e a seleção natural – e a força que tende a produzir uma homogeneização genética entre as populações – o fluxo gênico. Neste sentido de manter a heterozigosidade genética dentro das populações e combater as consequências genéticas negativas do processo de fragmentação ambiental é que o fluxo gênico limita/impede/retarda o processo de especiação. A interrupção das trocas genéticas interpopulacionais, por algum fator natural ou antrópico, permite que as populações acumulem diferenças genéticas ao longo do tempo, podendo se tornar espécies distintas (Slatkin, 1985). São os processos vicariantes, o isolamento de populações pela distância geográfica e os eventos de poliploidização que são capazes de limitar por completo o fluxo gênico entre duas populações, levando à ocorrência de especiação, seja ela alopátrica ou não. Portanto, pela definição biológica de espécie, para que a especiação ocorra, deve haver um isolamento reprodutivo entre duas espécies diferentes, isto é, sem que nenhum evento de fluxo gênico aconteça (Slatkin, 1987).

A magnitude do fluxo gênico pode ser considerada como um dos parâmetros mais difíceis de serem estimados. Sua estimativa não depende somente do processo de dispersão, mas também do sucesso reprodutivo do indivíduo migrante e do tamanho da população que recebe o migrante (Ennos, 1994). No entanto, há duas classes de métodos, muito bem discutidas por Slatkin (1985; 1987), para se estimar os níveis de fluxo gênico em populações naturais. Os métodos diretos se utilizam de estimativas de distância de dispersão e de sucesso reprodutivo. Um método eficiente de se estimar o fluxo gênico direto e atual é através de análises de paternidade. A medida direta é feita através da

análise de propagação de alelos distintos em uma população ou observando a movimentação de indivíduos entre as populações, no caso de animais, através de captura e recaptura de indivíduos marcados. A grande desvantagem da estimação direta é que a observação da dispersão está necessariamente limitada no tempo e no espaço. Indica o fluxo gênico de um tempo particular, não sendo capaz de captar os eventos ocorridos no passado histórico das populações.

As medidas indiretas usam dados genéticos de frequências alélicas e de sequenciamento de DNA. De acordo com Slatkin (1985), a estimativa indireta de fluxo gênico é feita em dois estágios. No primeiro são produzidas estimativas de determinados parâmetros e no segundo se verifica em qual modelo de fluxo gênico as estimativas dos parâmetros melhor se encaixam.

Teoricamente, o padrão de fluxo gênico existente em um conjunto de populações pode ser descrito por diversos modelos. Futuyma (1992) descreve os seguintes modelos:

- modelo continente-ilha: existe, efetivamente, um movimento unidirecional de uma subpopulação grande para uma menor, quase isolada;
- modelo de ilhas: a migração ocorre ao acaso dentro de um grupo de pequenas subpopulações;
- modelo de “alpondras” (*stepping-stone*): cada subpopulação recebe migrantes somente das subpopulações vizinhas;
- modelo de isolamento por distância: o fluxo gênico ocorre preferencialmente entre indivíduos mais próximos espacialmente, em subpopulações de distribuição contínua.

Há duas maneiras de se estimar os valores de fluxo gênico indiretamente. Uma é baseada nas estatísticas F de Wright que através do valor do F_{ST} consegue medir a quantidade de indivíduos migrantes por geração, como mostrado na Equação 1.

$$Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{ST}} - 1 \right) \quad (1)$$

onde N representa o tamanho efetivo populacional da população local e m a taxa média de migração. Este modelo assume que os locos em questão são neutros, que as subpopulações

se reproduzem segundo o modelo de Fisher-Wright e que o modelo de fluxo gênico vigente é o modelo de ilhas, estando as forças dispersivas de deriva genética em equilíbrio com as forças coesivas do fluxo gênico.

Outro método para se estimar o parâmetro Nm é o método proposto por Slatkin (1985), que leva em consideração a frequência dos alelos privados. O método se baseia no fato de que o logaritmo de Nm é linear ao logaritmo da frequência média dos alelos privados:

$$Nm = \frac{\exp\left\{-[\ln(\bar{p}(1))] + \frac{2.44}{0.505}\right\}}{\frac{N}{25}} \quad (2)$$

em que $p(1)$ é a frequência do alelo privado. Kourt (2004) discute que o método proposto por Slatkin (1985) é sensível a presença de alelos privados com alta frequência em algumas populações.

Qualquer que seja o método de estimação do fluxo gênico, o valor de Nm tem uma relação muito forte com a magnitude de deriva genética:

- $Nm > 1 \rightarrow$ O fluxo gênico é a força evolutiva predominante na determinação das frequências alélicas, homogeneizando as populações.
- $Nm < 1 \rightarrow$ A deriva genética tem maior atuação, resultando em significativa diferenciação genética entre as populações.

Segundo Hartl & Clark (2010), o produto Nm pode ser interpretado como o número absoluto de indivíduos migrantes que entram em cada subpopulação a cada nova geração. Os autores discutem também o quanto pequeno o nível de fluxo gênico pode ser para que as populações se mantenham como uma única unidade evolutiva e demonstram que um único migrante por geração é suficiente para anular parcialmente o efeito divergente da deriva genética. Na condição de equilíbrio de fluxo gênico-deriva, o valor de F_{ST} diminui quando o número de migrantes aumenta, mostrando claramente que o fluxo gênico diminui a divergência genética entre as populações. A redução dos valores de F_{ST} com o acréscimo de Nm é extremamente rápido, como mostra o exemplo abaixo de Hartl & Clark (2010):

- $Nm = 0,25$ (um migrante a cada quatro gerações) $\rightarrow F_{ST} = 0,50$
- $Nm = 0,50$ (um migrante a cada duas gerações) $\rightarrow F_{ST} = 0,33$
- $Nm = 1,00$ (um migrante por geração) $\rightarrow F_{ST} = 0,20$
- $Nm = 2,00$ (dois migrantes por geração) $\rightarrow F_{ST} = 0,11$

Devido à mobilidade limitada dos vegetais, o fluxo gênico pode ocorrer de duas maneiras: através da dispersão de sementes ou através da dispersão de polens. Em condições naturais, o que se percebe é a combinação destes dois mecanismos. Sabe-se que o nível de fluxo gênico existente entre populações de plantas é dependente do sucesso migratório dos agentes de dispersão de polens e sementes (Ennos, 1994). Este processo é dependente de outros fatores que envolvem, além da ecologia comportamental dos animais responsáveis pela dispersão, os mecanismos de interação planta/dispersor mediados pela anatomia floral e desenvolvimento dos frutos (Ghazoul, 2005).

Loveless & Hamrick (1984) discutem a complexidade dos padrões de estruturação genética espacial de populações naturais de plantas, causados pela atuação conjunta de diversos fatores evolutivos e ecológicos. Dentre estes fatores, o fluxo de genes entre populações distintas tem a capacidade de determinar o padrão de estruturação genético-espacial entre elas. Ghazoul (2005) relata que o espaçamento geográfico entre plantas é fator relevante para a ocorrência de polinização. Para este autor, o sucesso reprodutivo das plantas é reduzido em condições de alta densidade, mas, por outro lado, a densidade populacional elevada favorece o mecanismo de polinização. Franceschinelli & Kesseli (1999) também mostram a relação entre a densidade populacional e a ocorrência de polinização para *Helicteres brevispira*, além de esclarecerem que a dispersão limitada de sementes, o efeito fundador e a germinação destas sementes podem afetar a estrutura genética populacional.

Outro ponto complicador do processo de estimação do fluxo gênico foi levantado por Ennos (1994). Para ele, o fluxo gênico é dependente do processo de herança da marca genética, uma vez que o tipo de herança genética influencia o valor do tamanho efetivo populacional, do qual os valores de F_{ST} são dependentes. Para marcadores nucleares – como os microssatélites – e/ou herdados biparentalmente, o fluxo gênico revela padrões de dispersão via pólen e via semente. Já para marcadores herdados uniparentalmente – como os locos situados no DNA citoplasmático (mitocôndria ou

cloroplasto) – os genes são apenas dispersos via fluxo de sementes (Hamilton & Miller, 2002). Considerando o equilíbrio de fluxo gênico-deriva, as taxas de diferenciação populacional podem assumir diferentes valores dependendo do loco genético usado nas estimativas, uma vez que há diferença entre os níveis relativos de migração via pólen e via semente. Essa diferença entre os valores estimados podem ser explicadas devido a dependência que os estimadores do fluxo gênico tem do tamanho efetivo populacional (Ne) e o quanto este valor varia dependendo da ploidia do genoma usado nas análises genético estatísticas (Hamilton & Miller, 2002). Sabe-se que o tamanho efetivo populacional é cerca de duas vezes menor em genomas organelares se comparado com genoma nuclear sob condições do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Como a redução da densidade populacional e a fragmentação do habitat são consequências de paisagens alteradas, é de delicada importância perceber como a perda de diversidade causada pela fragmentação altera os padrões e mecanismos de dispersão de semente e de polens (Ghazoul, 2005).

Outro parâmetro populacional importante é a medida de diversidade genética intrapopulacional que refere-se ao número total de alelos existente na população, sendo de fundamental importância por estar relacionado com a capacidade das populações de se adaptarem às alterações ambientais. A medida de riqueza alélica, como um componente da diversidade genética, fornece subsídios para a escolha de quais populações devem ser priorizadas nos programas de manejo e conservação. Sob a luz das teorias ecológicas, a riqueza de espécies é o principal parâmetro utilizado na determinação de áreas prioritárias para conservação (Petit et al., 1998). Por outro lado, alguns pesquisadores como Petit et al. (1998), Leberg (2002), Foulley & Ollivier (2006) e Cabalero et al. (2010) defendem claramente a importância de se elucidar os valores da riqueza alélica intrapopulacional, de modo a permitir a comparação entre populações para que a definição de áreas prioritárias para conservação possam ser feitas com maior objetividade. A riqueza alélica revela a quantidade de alelos segregando em um loco em determinada população. A distribuição das frequências alélicas pode mostrar a existência de alelos privados em populações específicas. A riqueza alélica que mede o número de alelos privados por loco e por população, também fornece uma estimativa da diversidade genética (Petit et al., 1998).

A fragmentação leva ao isolamento das populações e o isolamento aumenta as taxas de endogamia local. Populações nestas condições sofrem efeitos genéticos negativos de perda de variabilidade genética devido à depressão por endogamia. É neste sentido que

Caballero et al. (2010) defendem a utilização de estimativas de riqueza alélica para fins de conservação, pois este parâmetro pode revelar como deve ser direcionado o fluxo gênico entre populações. Com o objetivo de introduzir alelos inexistentes em algumas populações, o fluxo gênico direcional pode controlar a endogamia intrapopulacional e atenuar os efeitos da depressão por endogamia, diminuindo os risco de extinção. Em outras palavras, procedimentos conservacionistas que contribuem para minimizar o grau de coancestralidade dos alelos maximizam a diversidade genética intrapopulacional em termos de heterozigozidade esperada e tamanho efetivo populacional, e contribuem para a manutenção da riqueza alélica da população, inclusive em termos da distribuição original das frequências alélicas (Caballero et al., 2010).

Além de representar uma medida de diversidade genética, segundo Leberg (2002) a riqueza alélica é um parâmetro informativo sobre mudanças do passado demográfico das populações. Os valores de riqueza alélica podem ser utilizados em estudos que buscam avaliar a hipótese de que as populações passaram por um evento de *boottleneck* em um passado recente. Sabe-se que a redução do tamanho efetivo populacional causa uma perda em proporções muito maiores, sobre a riqueza alélica do que sobre a diversidade genética conforme definida por Nei (1973) (Spencer et al., 2000). A riqueza alélica é mais sensível aos efeitos de um evento de *boottleneck* se comparada com a heterozigosidade propriamente dita (Spencer et al., 2000; Petit et al., 1988). Para estes autores a riqueza alélica é um bom indicador das mudanças demográficas sofridas por uma população no passado.

Os processos de estimação da riqueza alélica são altamente dependentes do tamanho amostral (Caballero et al., 2010). Existem métodos que estimam a riqueza alélica com base na média do número de alelos por loco. Foulley & Ollivier (2006) discutem alguns destes métodos com ênfase no método desenvolvido por Petit et al. (1998). Estes autores, usando o método de rarefação proposto por Hurlbert (1971) desenvolveram um estimador da riqueza alélica de um loco para um tamanho efetivo populacional fixo, ou seja, o método de rarefação padroniza o Ne para populações pequenas de modo que os valores da riqueza alélica não sejam afetados pela diferente quantidade de indivíduos existente nas populações em estudo. Assim, o estimador da riqueza alélica intrapopulacional, usando o princípio da rarefação como correção é:

$$A = \sum_{i=1}^n \left[1 - \frac{\binom{2N-Ni}{2n}}{\binom{2N}{2n}} \right] \quad (3)$$

em que Ni é o número de alelos do tipo i entre os $2N$ genes. A probabilidade de amostragem do alelo i acontece pelo menos uma vez em uma amostra de tamanho $2n$. Se o alelo i é tão comum que temos certeza em amostrá-lo, sua probabilidade é definida como um.

2.4.2 Estimativas tradicionais e indiretas do fluxo gênico

A medida proposta por Sewall Wright por volta de 1950, conhecida como estatísticas F , é o mais conhecido e tradicional critério de avaliação do grau estruturação genética e consequente e indiretamente do fluxo gênico existente entre as populações. Os valores das estatísticas F estimados são capazes de captar o efeito que a deriva genética e a estruturação populacional exerce na distribuição não aleatória dos genótipos, entre as populações. Os efeitos históricos não são distinguidos dos processos atuais na avaliação do grau de estruturação genética das populações. A equação (1) fornece uma forma de se converter o índice de fixação estimado para pares de subpopulações (F_{ST} para pares de populações) em uma estimativa do fluxo gênico (Nm) entre elas.

Estimativas seguras do grau diferenciação genética entre populações são cruciais para o entendimento da conectividade que existe entre elas. A utilização deste tipo de informação foi inicialmente proposta por Wright na década de 30, como uma medida de diferenciação populacional baseada no índice de fixação (F_{ST}), que se refere à probabilidade de se amostrar dois alelos de uma população e eles serem idênticos por descendência, utilizando o conjunto de populações como referência. Posteriormente, Cockerham (1969, 1973) propôs uma série de parâmetros populacionais análogos (f , F e θ). A estimação dos parâmetros neste caso é feita a partir de componentes de variância obtidos na análise de variância das frequências alélicas nos diversos níveis de hierarquia populacional. Na mesma época em que Cockerham propunha seus parâmetros, Nei (1973) introduziu um outro parâmetro análogo ao F_{ST} com base em medidas de heterozigosidade. Pela metodologia de Nei (1973), a diversidade genética de qualquer população pode ser decomposta em termos de heterozigosidade dentro e entre subpopulações. A grande

contribuição de Nei (1973) foi estender o parâmetro F_{ST} de Wright para um contexto de análise de dados genéticos multialélicos e multilocos. Atualmente, existem diversos outros parâmetros (G_{ST} , D_{ST} , R_{ST}) que mensuram o grau de estruturação genética de populações e que também podem ser usados como medidas indiretas de fluxo gênico.

Como definido por Slatkin (1995), o R_{ST} é um estimador análogo ao F_{ST} , apropriado para medir a subestruturação populacional quando os dados genéticos forem obtidos a partir de locos microssatélites, assumindo que estes locos sofrem mutação seguindo o modelo *stepwise*. O R_{ST} capta a fração da variância total do tamanho dos alelos que está entre as populações. Slatkin (1995) ainda relata que o valor de R_{ST} é mais similar ao valor de θ definido por Weir & Cockerham (1984) por ambos serem baseados em componentes de variância interpopulacional.

A comparação destes dois estimadores pode fornecer alguma interpretação teórica, principalmente quando os valores acessados pelo R_{ST} e θ são similares. Quando este cenário ocorre há indícios de que a divergência genética entre as subpopulações é recente e que a deriva genética é o principal fator evolutivo que causa a divergência genética entre as populações. Hardy et al. (2003) e Estoup et al. (1998) mostraram que a comparação dos valores de R_{ST} e θ para locos microssatélites deve sugerir a importância relativa que as mutações e a deriva genética possuem no processo de diferenciação entre subpopulações. Porém, é preciso testar a diferença entre estes dois parâmetros para que seja possível propor a relação que forças evolutivas como as mutações e a deriva genética exercem na determinação da diferenciação interpopulacional (Hardy et al., 2003).

Slatkin (1995) defende que, assumindo-se o modelo de mutação *stepwise* para locos microssatélites, o estimador R_{ST} fornece estimativas menos viesadas dos principais parâmetros demográficos quando comparado com o F_{ST} . Neste sentido, Gaggiotti et al. (1999) fizeram um estudo simulando dados microssatélites respeitando o modelo de mutação *stepwise* para comparar a performance, tanto do R_{ST} quanto do F_{ST} para estimar o tamanho efetivo populacional (N_e). Os autores concluíram que o uso de locos SSRs para estimar o tamanho efetivo populacional pode levar a sérios problemas de superestimação, principalmente quando se tem um tamanho amostral pequeno e taxas de migração moderadas. Em condições ideais – tamanhos populacionais acima de 50 indivíduos e quantidade de locos analisados acima de 20 – o R_{ST} possui um desempenho melhor em comparação ao F_{ST} . Porém, as estimativas baseadas no F_{ST} são melhores quando se trata de dados de populações naturais (informação de poucos locos para um tamanho amostral

reduzido), tornando-a uma abordagem mais conservadora (Gaggiotti et al., 1999). Já Balloux & Goudet (2002) sugerem que o F_{ST} é mais eficiente em casos de altos níveis de fluxo gênico, enquanto o R_{ST} reflete melhor a diferenciação populacional quando existe um baixo nível de fluxo gênico.

Conforme Weir & Cockerham (1984), Neigel (2002) e Balloux & Moulin (2002), o F_{ST} é uma ferramenta poderosa e auxilia nas estimativas do número de subpopulações geneticamente distintas, estimativas de diferenciação populacional, número de agrupamento de indivíduos geneticamente distintos, estimativas de fluxo gênico aparente, efeito relativo de isolamento e migração, atual e histórico tamanho efetivo populacional.

Holsinger & Weir (2009) fazem uma ótima revisão sobre estimadores da estatística F_{ST} através de abordagens estatísticas diferentes, como o Método dos Momentos, a Máxima Verossimilhança e a Inferência Bayesiana. Para eles, o F_{ST} está diretamente relacionado com a variância das frequências alélicas entre as populações. Se o valor de F_{ST} é baixo, quer dizer que a frequência dos alelos dentro da cada subpopulação é similar; se seu valor for alto, o contrário. O valor de F_{ST} varia de zero a um. $F_{ST} = 1$ indica subpopulações completamente homozigotas com a fixação de alelos distintos entre elas. $F_{ST} = 0$ indica subpopulações com frequências alélicas idênticas, ou seja, não existe diferença genética entre as subpopulações. Hartl & Clark (2010) sugeriram as seguintes orientações qualitativas para interpretação do F_{ST} :

- $0 - 0,05 \rightarrow$ pequena diferenciação genética;
- $0,05 - 0,15 \rightarrow$ diferenciação genética moderada;
- $0,15 - 0,25 \rightarrow$ grande diferenciação genética;
- $> 0,25 \rightarrow$ diferenciação genética muito grande.

Balloux & Moulin (2002) fazem uma revisão do uso de marcadores microssatélites para estimativa de diferenciação genética populacional, com enfoque nas estimativas de F_{ST} e de seu análogo R_{ST} (Slatkin, 1995), levando em consideração diferentes modelos de mutação. É reconhecido que o F_{ST} também consegue detectar o efeito Whalund, ou seja, consegue medir a deficiência de heterozigosidade devido à subdivisão de populações de tamanho reduzido.

O coeficiente de endogamia quantifica a probabilidade de dois genes, em qualquer loco de um indivíduo, serem originados da cópia de apenas um gene em uma geração anterior (Templeton 2006). Em termos biológicos, o coeficiente de endogamia (f)

mede a redução fracionária na heterozigosidade, em relação a uma população que se reproduz por panmixia, com as mesmas frequências alélicas da população sob análise. Quando $f = 0$ tem-se panmixia, ou seja, não existe endogamia e a população tem frequências gênicas e genotípicas de acordo com aquelas que são esperadas na condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Quando $f = 1$ tem-se endogamia total e a população só apresentará genótipos homozigóticos para cada um dos seus alelos. Qualquer outro valor de f indica a presença de algum fator genético ou estocástico alterando as frequências genotípicas esperadas pela condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

De acordo com a notação de Cockerham (1969), a relação entre os coeficientes de caracterização da estrutura genética das populações pode ser expressa assim:

$$(1 - F) = (1 - f) (1 - \theta) \quad (4)$$

onde f é o índice de fixação intrapopulacional, F é o índice de fixação total e θ representa a proporção da variação total que está entre populações. Assim, podemos definir θ como:

$$\theta = \frac{\sigma_p^2}{p(1-p)} \quad (5)$$

em que p é a frequência média do alelo em questão e σ_p^2 representa o componente de variância associado aos efeitos de populações sobre a frequência do alelo em questão. Neste sentido, θ pode ser compreendido como a proporção da diversidade genética total que é devida à variância da frequência dos alelos entre as populações (Cockerham, 1969). Relacionando estes três parâmetros populacionais têm-se:

$$f = \frac{(F - \theta)}{(1 - \theta)} \quad (6)$$

Utilizando-se a relação com as estatísticas F de Wright, em que: $F = F_{IT}$; $\theta = F_{ST}$ e $f = F_{IS}$, demonstra-se que:

$$F_{ST} = \frac{(F_{IT} - F_{IS})}{(1 - F_{IS})} \quad (7)$$

É importante ressaltar que o F_{ST} , como indicador da magnitude da subdivisão populacional, capta somente o efeito da atuação da deriva genética na determinação da estrutura genética populacional. Como mostrado na equação (1) existe uma correlação não linear entre o grau de diferenciação genética interpopulacional e a taxa de fluxo gênico existente entre as populações. As estatísticas F e suas derivações fornecem estimativas dos processos microevolutivos atuais, mas não são capazes de inferir sobre o passado demográfico de uma população (Templeton, 1998). Esta ferramenta para estudos de genética de populações leva em consideração um determinado modelo de fluxo gênico e a partir deste, mede, indiretamente, a quantidade de indivíduos migrantes por geração. No entanto, como discutem Templeton et al. (1995) os modelos microevolutivos de fluxo gênico não são necessariamente excludentes e assim, usar os estimadores de subdivisão populacional para medir fluxo gênico não é uma alternativa segura, do ponto de vista estatístico e biológico. Neste sentido, a teoria da coalescência aparece como uma alternativa solucionadora deste problema por conseguir diferenciar processos populacionais demográficos históricos daqueles atuais.

2.4.3 A metodologia TwoGener

TwoGener é um método, relativamente novo, de estimação do fluxo gênico. Por este método, a magnitude do fluxo gênico é representada por parâmetros associados às curvas de distribuição de probabilidade de alcance de pólen. Para a utilização deste método são necessários: a genotipagem e o posicionamento geográfico de algumas matrizes e a genotipagem de progêneres derivadas destas matrizes. O método é tratado como revolucionário porque nenhuma informação dos possíveis pais é necessária, diminuindo os custos de coleta e genotipagem. Para Ennos (1994) o fluxo de pólen é o principal componente do fluxo de genes entre populações de plantas. Este parâmetro populacional é um fator importante para se entender a atual distribuição dos genótipos de uma população no espaço geográfico. Os biólogos evolutivos e os biólogos conservacionistas interessados nos impactos causados por mudanças ambientais requerem um método preciso que possa medir o processo de fluxo gênico em tempo real. Foi com essa visão que Smouse et al. (2001) propuseram o método TwoGener com o objetivo de fornecer estimativas mais precisas sobre um dos mais importantes parâmetros genéticos populacionais.

Entretanto, assim como os métodos tradicionais de estimação do fluxo gênico, a metodologia TwoGener fornece estimativas indiretas do fluxo de genes intra ou interpopulacional, levando em consideração amostras de duas gerações e o tamanho efetivo populacional. Ambas as abordagens assumem equilíbrio fluxo gênico-derivado e seleção neutra (Smouse et al., 2001). TwoGener é uma abreviação da palavra *Two Generation* que significa que o fluxo de pólen será estimado avaliando alguns genótipos (mães e filhos) de uma população em duas gerações. Austerlitz et al. (2004) defendem que o uso das medidas de diferenciação populacional (F_{ST} e seus análogos) como medidas indiretas de fluxo gênico é preocupante, pois estas estatísticas não conseguem diferenciar o efeito de processos históricos daqueles resultantes de processos atuais.

O método TwoGener, mesmo não oferecendo uma estimativa direta do fluxo gênico, como em uma análise de paternidade, fornece uma curva de dispersão de polens e outros parâmetros que permitem inferir sobre a estrutura genética espacial das populações e sobre como as mudanças na paisagem influenciam os padrões de fluxo gênico (Austerlitz & Smouse, 2001).

Para Smouse et al. (2001), a grande vantagem da metodologia TwoGener é que ela combina a simples abordagem de estrutura genética das populações com uma análise de parentesco dedutiva de mães e filhos. Uma análise de variância é realizada, em que a variação na composição genética do pool de polens é atribuída aos efeitos entre as matrizes e dentro delas. Ou seja, com o objetivo de responder se os polens que fecundam diferentes fêmeas são amostrados ao acaso ou se diferentes fêmeas são fecundadas por diferentes pools de polens levando em consideração a distância geográfica entre as fêmeas e os machos, é feita uma análise molecular de variância (AMOVA; Excoffier et al. 1992) para avaliar a hipótese nula de que não há diferença entre as nuvens de polens que fecundaram as fêmeas amostradas. Se o delineamento da análise for feito para gametas diplóides, os resultados são equivalentes às análises propostas por Weir & Cockerham (1984) no uso das estatísticas F para dados multilocais (Tabela 1).

O Φ_{FT} é o principal parâmetro estimado pela análise TwoGener. A sua interpretação é que nos permite inferir sobre a quantidade de fluxo gênico em tempo real existente entre populações. Como se percebe, o Φ_{FT} é um estimador da correlação intraclasse das frequências alélicas de um conjunto de fêmeas amostradas de uma população com o intuito de gerar uma curva de dispersão de polens (Austerlitz & Smouse, 2001). É importante perceber a relação direta deste estimador com as medidas de

diferenciação populacional propostas por Wright, ou seja, o Φ_{FT} é mais um novo parâmetro análogo ao F_{ST} , considerando-se as progênies como subpopulações (Smouse et al., 2001). O parâmetro Φ_{FT} é estimado como a fração da variância total explicada pela diferença entre os pools de polens que fecundam as fêmeas. Em outras palavras, o valor de Φ_{FT} mede o quanto estruturado está o pool de polens que fecundaram as fêmeas amostradas. De acordo com Smouse et al. (2001), quanto maior a estruturação menor será a dispersão de pólen e consequentemente, menor será o fluxo gênico. Porém, nem sempre a estruturação gênica entre as progênies é explicada através do fluxo de polens, isto é, há exceções ao fato de que o fluxo gênico via dispersão de polens corresponde exatamente com a dispersão física do pólen. Em espécies, nas quais ocorre forte seleção sexual, dependendo do parentesco entre machos e fêmeas, a diferenciação genética entre as progênies das fêmeas pode sofrer o efeito desta seleção sexual (Mitchell & Marshall, 1998).

Tabela 1. Análise molecular de variância (AMOVA) para determinar a heterogeneidade genética do pool de polens entre as fêmeas.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio Estimado	Quadrado Médio Esperado	Variância e Heterogeneidade Estimada
Entre as fêmeas	$J - 1$	SS_A	$MS_A = \frac{SS_A}{J - 1}$	$\sigma^2_W + K \sigma^2_A$	$S^2_A = \frac{MS_A - MS_W}{K}$
Dentro das fêmeas	$J(K-1)$	SS_W	$MS_W = \frac{SS_W}{J(K-1)}$	σ^2_W	$S^2_W = MS_W$
Total	-	-	-	-	$\phi_{FT} = \frac{S^2_A}{S^2_W - S^2_A}$

J é o número de fêmeas. K é o número de progênies para cada fêmea. SS_A é a soma dos quadrados entre as fêmeas. SS_W é a soma dos quadrados dentro das fêmeas. MS_A é a média dos quadrados entre as fêmeas. MS_W é a média dos quadrados dentro das fêmeas. S^2_A e σ^2_A é a variância estimada e paramétrica entre as fêmeas, respectivamente. S^2_W e σ^2_W é a variância estimada e paramétrica dentro das fêmeas, respectivamente. Φ_{FT} é a heterogeneidade do pool de polens que fecundaram as fêmeas.

Smouse et al. (2001) esclarecem que o Φ_{FT} é uma medida da estruturação do pool de polens que fecundam as fêmeas dependente da distância média de dispersão de pólen (δ) e da média da distância entre as matrizes (\bar{x}). Esta dependência é a seguinte: quanto maior a distância de dispersão de pólen, menor serão os valores assumidos pelo Φ_{FT} . Quanto mais distantes geograficamente forem as mães, maior será a diferenciação esperada entre as nuvens de polens que as fecundaram, aumentando o valor de Φ_{FT} . Os autores sugerem que matrizes próximas geograficamente podem ser fecundadas por polens de diferentes doadores e que essa medida de estruturação local fornece informações sobre a

distribuição da dispersão de pólen. Resumindo, quanto mais próximo de zero for o valor do Φ_{FT} , maior será o nível do fluxo gênico existente.

Além de estimar o fluxo de polens, o Φ_{FT} pode fornecer outras informações populacionais. Smouse et al. (2001) propuseram que o Φ_{FT} poderia medir a quantidade de machos (tamanho efetivo) que possivelmente forneceriam polens para determinadas fêmeas. O tamanho efetivo da população de doadores de polens é:

$$\Phi_{FT} \approx [2Nep]^{-1} \quad (8)$$

No entanto, o valor de Φ_{FT} pode ser superestimado na população parental devido à ocorrência de endocruzamento (Austerlitz & Smouse, 2001). Nestes casos, a estimativa do parâmetro deve ser corrigida para o coeficiente de endogamia na geração parental (F_p):

$$\Phi'^{FT} = \frac{\Phi_{FT}}{(1 + \hat{F}p)} \quad (9)$$

No entanto, com base na equação (8) o número efetivo de doadores de pólen para uma população diploide é:

$$\hat{N}_{ep} = \frac{1}{2\Phi'^{FT}} \quad (10)$$

Smouse et al. (2001) chamam a atenção para o fato de a capacidade de se detectar a estruturação dos pools de polens (Φ_{FT}) depende do polimorfismo dos locos usados e do tamanho amostral. Sugerem que a quantidade de matrizes e filhos por matriz deve variar de 15 a 20 indivíduos e que a probabilidade de exclusão dos locos deve ser alta para que a variância do estimador de Φ_{FT} seja baixa e o poder estatístico elevado. Em uma comparação com o F_{ST} de Wright, Smouse et al. (2001), num trabalho com *Quercus alba*, calcularam o valor do F_{ST} e do Φ_{FT} e não encontraram uma estruturação genética entre os adultos, porém usando o Φ_{FT} perceberam que haviam uma heterogeneidade substancial da estrutura genética entre os indivíduos adultos, o que também pode ser explicado pela seleção sexual e não somente pelo fluxo gênico (Mitchell & Marshall, 1998). Mostrando

uma melhor eficiência desta metodologia se comparada com as estimativas tradicionais e indiretas de fluxo gênico.

2.4.4 Estrutura Genética Espacial

Muitos estudos têm revelado o padrão de distribuição dos genótipos em populações de plantas usando marcadores moleculares e técnicas de autocorrelação espacial. Collevatti et al. (2010) fizeram uma comparação da Estrutura Genética Espacial (SGS – *Spatial Genetic Structure*) intrapopulacional entre três espécies do Cerrado usando a estatística Sp e perceberam que o contraste do padrão da SGS destas espécies era devido, principalmente, à variação da história de vida que cada uma destas espécies possui. Estes autores discutem ainda, que a SGS é diretamente influenciada por processos demográficos e ecológicos. Hardy et al. (2006) afirmam também que o modo de dispersão de sementes, a variação no sistema de cruzamento e a densidade populacional podem influenciar nos padrões de distribuição espacial dos genótipos de uma população.

A teoria de isolamento por distância pode prever o padrão da SGS sob uma dispersão gênica limitada, sugerindo com base nas informações de parentesco par a par e da distância espacial entre os indivíduos, um método para quantificar o grau de SGS e inferir sobre os níveis de dispersão gênica. Neste contexto espera-se que a similaridade genética seja maior entre os indivíduos vizinhos quando comparada com aquela entre indivíduos mais distantes. Assim, a teoria do isolamento por distância sugere o padrão esperado da SGS sob a condição de equilíbrio dispersão-deriva (Venkemans & Hardy, 2004). Estes mesmos autores fazem uma revisão da teoria existente por detrás destes métodos e discutem suas aplicações em estudos de SGS em populações de plantas, enfatizando qual o melhor estimador do grau de parentesco, qual o modelo adotado e os procedimentos para testar a existência de SGS e as interpretações dos parentescogramas. Estes autores sugerem o uso da estatística Sp para quantificar a SGS intrapopulacional. Este parâmetro capta a magnitude da diminuição dos níveis do coeficiente de parentesco entre indivíduos comparado com o aumento da distância geográfica medida em escala logarítmica. Ainda defendem que sob certas circunstâncias esta estatística estima o inverso do tamanho do grupo de vizinhança.

Abordagens indiretas para acessar o fluxo gênico histórico partem do pressuposto que a estrutura genética exibida por locos neutros é resultado da deriva genética local e que tem seu efeito balanceado pela dispersão gênica. Foi fundamentado nesta teoria que Wright propôs que a diferenciação genética entre as populações depende do equilíbrio local entre a deriva genética e a taxa de migração populacional por geração. O modelo de isolamento por distância assume claramente a relação entre o espaço geográfico e a semelhança genética entre populações e/ou indivíduos. Este modelo pode fornecer previsões semelhantes ao modelo de Wright (Hardy et al., 2006). A diferenciação genética aumenta com a distância geográfica, numa proporção de $1/D_e\sigma^2$, onde D_e é a densidade populacional e σ^2 é a distância de dispersão, expressa pelo alcance da dispersão gênica (Rousset, 1997). É neste sentido que o modelo de isolamento por distância pode ser usado para quantificar a SGS intrapopulacional (Venkemans & Hardy, 2004).

A maior vantagem destes métodos indiretos de estimação de parâmetros populacionais de interesse é que eles podem ser usados em populações naturais. Diferentemente das análises de parentesco e paternidade, a inferência sobre o nível de SGS intrapopulacional não requer uma exaustiva amostragem populacional e nem uma grande quantidade de locos altamente polimórficos. Entretanto, estes métodos não fornecem os detalhes sobre a forma de distribuição da dispersão que seriam fornecidos por uma análise de paternidade. A dependência que o processo de estimação da SGS tem no balanço entre a dispersão gênica e a deriva genética local fez com que estudos com dados simulados fossem feitos para indicar que estes estudos podem fornecer índices seguros da dispersão gênica (Hardy et al., 2006). Foi assim que Venkemans & Hardy (2004) propuseram o uso da estatística Sp para medir o grau de SGS intrapopulacional usando o coeficiente de parentesco par a par entre os indivíduos. Essa abordagem baseia-se na seguinte previsão do modelo de isolamento por distância num espaço bidimensional. Para o equilíbrio dispersão-deriva espera-se que o coeficiente de parentesco entre os indivíduos decresça linearmente com $\ln(d_{ij})$ a uma taxa dada por:

$$b \approx -\frac{(1 - F_p)}{(4\pi D_e \sigma_g^2)} \quad (11)$$

onde D_e é a densidade populacional efetiva e F_p é o coeficiente de parentesco entre indivíduos vizinhos. Com a genotipagem dos indivíduos, b e F_p podem ser estimados

usando o coeficiente de parentesco par a par. Por isso, a estatística Sp foi proposta para mediar a intensidade da estrutura genética espacial intrapopulacional da seguinte forma:

$$Sp = \frac{b}{(F_p - 1)} \quad (12)$$

Venkemans & Hardy (2004) argumentam que a estatística Sp é útil para mediar a SGS e permite compará-la com outras populações e outras espécies porque a curva de parentesco é aproximadamente linear com $\ln(d_{ij})$ sob a escala espacial investigada e é menos sensível à amostragem populacional do que outras estimativas da SGS. Este estimador pode ser encontrado no aplicativo computacional SPAGeDi 1.2 (Hardy & Vakemans, 2002).

A maneira como a paisagem e o meio ambiente influencia a estrutura genética espacial de uma população tem se tornado uma informação muito importante nos estudos genéticos de populações naturais, atualmente. Uma área específica da genética, chamada de genética da paisagem (*Landscape Genetics*) é que tem se dedicado em desenvolver modelos teóricos para testar o quanto a paisagem modela a distribuição atual dos genótipos das mais diversas espécies de animais e plantas. Os avanços das técnicas moleculares e das ferramentas estatísticas combinado com o desenvolvimento de técnicas computacionais modernas permitiram o surgimento desta nova área do conhecimento que faz uma ligação entre as teorias e modelos da ecologia de paisagem e da genética de populações para acessar parâmetros populacionais de interesses evolutivos e conservacionista (Manel et al., 2003).

Guillot et al. (2005a) relatam que o uso de modelos da genética de paisagem permite inferir como o ambiente em que as populações estão inseridas influenciam nos padrões de fluxo gênico, na estrutura populacional e na adaptação local, além de determinar a continuidade genética de uma população. A delimitação espacial da composição genética de uma população fornece informações sobre o reconhecimento e distinção de unidades taxonômicas operacionais e/ou unidades evolutivas significantes (*OTUs/ESUs* – Moritz, 1994), permitindo ações de manejo mais precisas. Ainda, é possível identificar como os fatores bióticos e abióticos, como as fragmentações do habitat, alteram os processos evolutivos e como estas alterações podem ser modeladas, em diferentes cenários, para predizer a evolução da diversidade genética de uma espécie.

O principal objetivo dos estudos da genética de paisagem é entender como os processos microevolutivos atuam na formação da estrutura genética espacial intrapopulacional (Guillot et al., 2005a). Estes estudos são fundamentados na detecção/localização de uma descontinuidade genética (distribuição espacial não aleatória dos genótipos de uma população) e o relacionamento desta descontinuidade com as características ambientais (rios, montanhas, rodovias, gradientes de umidade, fragmentação ambiental) da paisagem onde as populações estão inseridas.

A grande vantagem desta abordagem em relação aos métodos de alocação de indivíduos (*genotype assigment*), como os propostos por Pritchard et al. (2000), Dawson and Belkhir (2001) e Falush et al. (2003) é que na genética de paisagem os limites geográficos entre as unidades genéticas panmíticas são estabelecidos. Portanto, além de usar modelos Bayesianos para atribuição de indivíduos a populações previamente desconhecidas com identificação dos genótipos migrantes, o modelo proposto por Guillot et al. (2005a, 2005b) fornece os limites físicos, isto é, a natureza espacial das descontinuidades genéticas entre as populações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAIS DE COLETA

O local de estudo pertence à Área de Proteção Ambiental – APA Fernão Dias, compreendendo diversos sítios localizados entre os municípios de Gonçalves e Camanducaia, Minas Gerais (Figura 4). A região encontra-se entre 1.600 e 2.000 m de altitude.

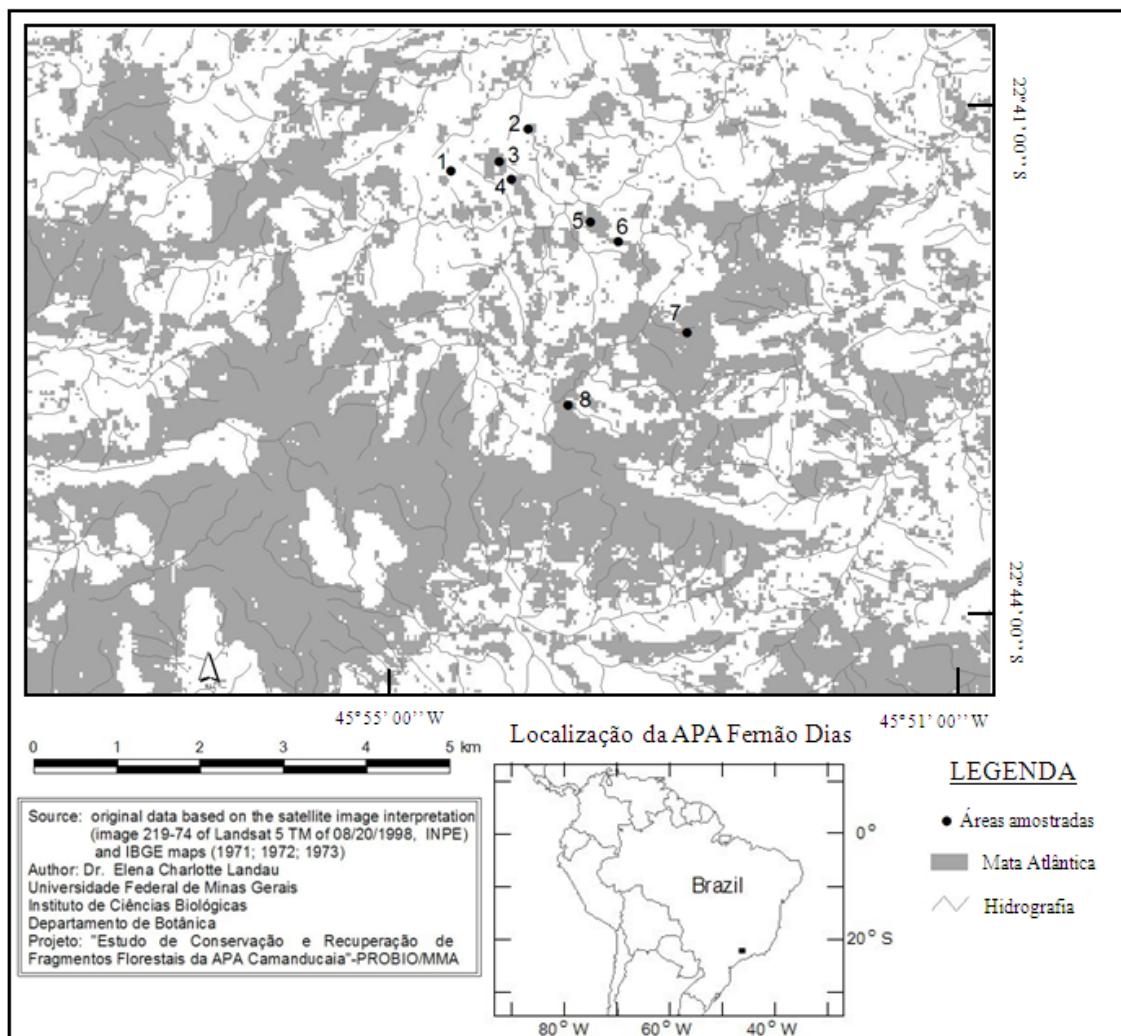


Figura 4. Localização da Área de Proteção Ambiental "Fernão Dias" no Estado de Minas Gerais, Brasil. Disposição das oito populações amostradas para o presente estudo.

A Área de Proteção Ambiental está localizada no sul do Estado de Minas Gerais numa região extremamente montanhosa onde nos vales destes morros, nos últimos 60 anos, houve um grande desmatamento para o extrativismo e o plantio de batata. A APA Fernão Dias foi criada em 1997 como um plano de compensação ambiental pela duplicação da BR 381 (Fernão Dias), possuindo 180.073 hectares.

Nesta região, o material vegetal foi coletado em oito áreas: em quatro fragmentos pequenos aparentemente isolados, em duas áreas caracterizadas como um corredor e em duas áreas que são um contínuo populacional (Figura 4). Foram coletadas, em média, folhas de cerca de 30 plantas por população. Para as análises de fluxo gênico entre e dentro dos fragmentos, foram coletados, em média, oito frutos de quinze matrizes em três fragmentos diferentes. A amostra total consistiu de 221 indivíduos adultos, dos quais quinze são matrizes e 121 indivíduos constituintes das progêniens. Foram amostrados 15 matrizes e 121 filhos em três fragmentos florestais. O fragmento 01 contém cinco matrizes e 33 filhos, o fragmento 04 contém cinco matrizes e 49 filhos e o fragmento 07 contém cinco matrizes e 39 filhos. Houve uma amostragem média de cinco matrizes e 40,3 filhos por fragmento. As amostras foram embaladas em sacos de papel, depois organizadas em sacos plásticos e acondicionadas em gelo a fim de conservar a sua integridade até a chegada ao freezer (-20°C) do Laboratório do Setor de Melhoramento de Plantas da EA/UFG. O tamanho e localização destas áreas de coleta se encontram na Figura 4 e na Tabela 2.

Tabela 2. Coordenadas geográficas e características dos fragmentos onde os dados de fenologia de *Cabralia canjerana* foram coletados. O grau de isolamento foi considerado a distância do fragmento amostrado a outro mais próximo de pelo menos 50 ha.

nº	Nome do Fragmento	* Tamanho da área efetiva (ha)	Grau de isolamento (Km)	Latitude S	Longitude W	Altitude (m)	* Densidade Populacional
1	Dito Ferreira	0,90	0,71	22° 41' 11"	45° 54' 28"	1681	26
2	Afonso Luiz	1,4	1,10	22° 40' 59"	45° 53' 58"	1667	76
3	Sr. Wilson	12,0	0,86	22° 41' 12"	45° 54' 11"	1630	86
4	Lauriano	7,50	0,66	22° 41' 18"	45° 54' 06"	1603	86
5	Bicho do Mato	15,00	Conectado	22° 41' 35"	45° 53' 32"	1598	187
6	Corredor	1,95	Corredor	22° 41' 43"	45° 53' 28"	1600	67
7	Johnny	4.000,00	Conectado	22° 42' 19"	45° 52' 52"	1810	221
8	Rancho Falcão	4.000,00	Conectado	22° 42' 47"	45° 53' 52"	1928	298

* E. C. Landau, em comunicação pessoal.

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA E AMPLIFICAÇÃO DOS LOCOS

A extração de DNA genômico, realizada a partir de tecidos foliares de 221 indivíduos adultos e das sementes de 121 frutos, foi conduzida utilizando-se o protocolo proposto por Slotta et al. (2008). Tanto os tecidos foliares quanto as sementes foram macerados usando o equipamento TissueLyser da Qiagen. Para a extração de DNA das sementes e dos indivíduos adultos foram utilizados cerca de 50mg e 100mg de embrião e tecido foliar, respectivamente. O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose 1% utilizando-se como referência, quantidades de 50 e 100 ng de DNA de fago λ (Invitrogen). Após a eletroforese, o gel foi visualizado em transluminador de luz UV, pela utilização de Brometo de Etídeo.

A genotipagem foi conduzida a partir de seis pares de primers microssatélites (Ccan_04; Ccan_10; Ccan_17; Ccan_28; Ccan_31; Ccan_32) descritos por Pereira et al. (2011), relatados no Anexo A. As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para amplificação destes locos ocorreram em condições de pré-ciclo de 5 minutos a 94°C; extensão de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto; 1 minuto de anelamento na temperatura específica de cada primer e 72°C por 1 minuto. A extensão final utilizada foi de 72°C por 7 minutos. Estas amplificações tiveram um volume final de reação de 13 μ L, contendo 2,0 μ L de DNA a 2,5ng/ μ L; 2,0 μ L de cada par de primer a 4,0 picomoles/ μ L; 1,3 μ L de Tampão 10x; 1,2 μ L de dNTP a 0,2 mM de cada nucleotídeo; 1,0 μ L de BSA a 0,25mg/ μ L; 0,78 μ L de MgCl₂ a 25 mM e 1,5 U (0,3 μ L) da enzima Taq DNA Polimerase e 13 μ L (q.s.p) de água ultrapura. As eletroforeses foram conduzidas no analisador automático de fragmentos ABI 3100 (Applied Biosystems). A PCR foi realizada individualmente para cada par de primer, porém, devido à marcação com as fluorescências hexacloro-6-carboxifluoresceina (HEX) e 6-carboxifluoresceina (FAM), as eletroforeses aconteceram na forma de multiplex (duplex). A genotipagem dos locos foi realizada pela utilização do software GeneMapper 3.5 (Applied Biosystems).

3.3 ANÁLISES GENÉTICO-ESTATÍSTICAS

3.3.1 Análise de diversidade e da estrutura genética populacional

As estatísticas descritivas dos locos e das populações são acessadas pelos principais parâmetros genético-populacionais. Na caracterização destes parâmetros, a média do número de alelos encontrados por população (A), a riqueza alélica de cada população (A_R) conforme caracterizada por El Mousadik & Petit (1996), a heterozigosidade observada (H_O) e a esperada (H_E) e os estimadores (f , F e θ) da estruturação genética, derivados dos índices de fixação (F) de Wright, descritos em Weir & Cockerham (1984) foram estimados pelo software FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002) usando 10000 permutações. Também foram testadas as hipóteses nulas de que as populações e os locos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação, utilizando a correção de Bonferroni (Goudet, 1996) para um nível de $p < 0,05$, através do software GDA (Lewis & Zaykin, 2001). O R_{ST} é um estimador do nível de diferenciação populacional proposto por Slatkin (1995) que leva em consideração a variação no tamanho dos locos microssatélites, além de assumir que o processo de mutação destes locos se baseia no modelo de mutação *stepwise* (Valdes et al., 1993). Para a obtenção da estimativa do R_{ST} , foi utilizado o software *RST-Calc* (Goodman, 1997) utilizando 10000 *bootstraps* com o intuito de compará-lo com o valor de diferenciação populacional θ .

Para se verificar a hipótese de que os maiores fragmentos florestais apresentam os maiores níveis de diversidade genética, foi realizada uma comparação entre a dimensão da área de coleta/tamanho do fragmento (hectares) e os valores de riqueza alélica (A_R) e heterozigosidade esperada (H_E) para as oito populações. Também foi realizada a comparação destas medidas de diversidade com a elevação/altitude em que se encontram os fragmentos. Estas comparações foram feitas utilizando a correlação de Pearson e o teste de t de Student. A correlação e os p-valores a 95% foram obtidos pelo software R (R Core Development Team, 2011).

Um dendograma representativo das distâncias genéticas entre as populações foi construído a partir de uma matriz de distância genética interpopulacional baseada na distância genética de Nei (1972), através do software NTSys (Rohlf, 1998), utilizando o critério de UPGMA. A matriz de distância genética de Nei, juntamente com os valores de

bootstrap de consistência dos nós do dendograma foi gerada no aplicativo BOOD (Coelho, 2001) utilizando 10000 *bootstraps*. Para se avaliar o grau de representatividade do dendograma, foi conduzida uma comparação entre a matriz de valores cofenéticos – obtida pelo programa NTSys (Rohlf, 1998) – e a matriz de distâncias genéticas, através da análise de correlação matricial e pela utilização do teste de Mantel, com 10000 permutações. Ainda usando o aplicativo NTSys (Rohlf, 1998) foi realizada uma análise de coordenadas principais com objetivo de se representar as distâncias genéticas entre as populações em um gráfico de duas dimensões. Esta análise procura, dentro de um espaço bidimensional, identificar os eixos que captam de modo mais eficiente possível a variação existente entre as populações.

Para identificar o número de subpopulações que melhor explica o conjunto de dados obtidos, realizou-se uma análise Bayesiana fundamentada nos procedimentos de alocação dos indivíduos (*genotype assigment*) utilizando-se o software STRUCTURE 2.3.3 (Falush et al., 2003). Assumiu-se o modelo que permite mistura de alelos entre as populações para cinco corridas independentes com valores de K variando de um a dez, com um milhão de randomizações dos Métodos de Monte Carlo através das Cadeias de Markov (MCMC). Como período de aquecimento da cadeia (*burn-in*), foram utilizadas 500.000 randomizações. A média dos valores da verossimilhança de cada K para todas as corridas foi determinada pela estatística ΔK desenvolvida por Evanno et al. (2005), a qual fornece uma estimativa do número de subpopulações existentes. Os resultados das randomizações obtidas nas diferentes corridas do STRUCTURE foram processados no aplicativo CLUMP (Jakobsson & Rosenberg, 2007) de modo a permitir a construção do gráfico no programa DISTRUCT (Rosenberg, 2007). Os grupos sugeridos por esta análise foram considerados em uma análise de variância de frequências alélicas para a quantificação do grau de diferenciação genética entre eles por meio do estimador θ de Weir & Cockerham (1984).

3.3.2 Estimativas da dispersão atual de polens via TwoGener

O primeiro passo foi validar o poder do conjunto de marcadores microssatélites pela estimação dos valores das probabilidades de exclusão e de identidade dos locos através do programa Identity 1.0 (Wagner & Sefc, 1999).

Para examinar os padrões atuais de dispersão de pólen de *Cabralea canjerana* ssp. *canjerana* foram utilizados três, dos oito, fragmentos florestais de Mata Atlântica. Devido à melhor amostragem de plantas matrizes e de suas progêneres e o fato de que a genotipagem ocorreu para estas amostras, são os fragmentos 01, 04 e 07 que foram utilizados nestas análises. O aplicativo TWOGENER (Smouse et al., 2001) foi usado para quantificar a dispersão atual de polens através das medidas de Φ_{FT} . Este aplicativo é parte integrante do pacote de softwares POLDISP (Robledo-Arnuncio et al., 2006). A estatística Φ_{FT} foi utilizada por ser uma medida da diferenciação nas frequências alélicas entre as nuvens de polens amostradas em diferentes matrizes cuja coordenada geográfica é conhecida (Austerlitz & Smouse, 2001). O TWOGENER calcula a diferenciação global existente entre os pools de polens que fecundam as matrizes, ou seja, o Φ_{FT} que é uma medida do grau de estruturação da nuvem de polens que fecundam as matrizes. O Φ_{FT} e a distância de dispersão (δ) de pólen foram estimados usando o modelo da curva de dispersão normal e exponencial e um número fixo para a densidade dos machos (d_e).

Austerlitz & Smouse (2001) discutem que o Φ_{FT} pode ser superestimado devido ao coeficiente de endogamia da geração parental (F_p) e sugerem a correção da seguinte forma:

$$\Phi'_{FT} = \frac{\Phi_{FT}}{(1 + \hat{F}p)} \quad (13)$$

Depois da correção do Φ_{FT} , o tamanho efetivo da população de doadores de pólen (N_{ep}) foi calculado assim:

$$\hat{N}_{ep} = \frac{1}{2\Phi'_{FT}} \quad (14)$$

Bittencourt & Sebbenn (2008) mostram que a correlação de paternidade que é estimada pelo software MLTR (Ritland, 2002) pode ser calculada como duas vezes o valor de Φ'_{FT} ($rp_{(m)} = 2\Phi'_{FT}$). Então, a média do coeficiente de coancestria dentro da progênie pode ser calculado como:

$$\hat{\Theta}_{xy} = 0.125(1 + \hat{F}p)(1 + 2\hat{\phi}_{FT}) \quad (15)$$

em que F_p é o coeficiente de endogamia na geração parental (Sousa et al., 2005). O conhecimento da estrutura genética de cada progênie permite calcular o tamanho efetivo de variância como proposto por Cockerham (1969):

$$\hat{N}_{e(v)} = \frac{0.5}{\hat{\Theta}_{xy}} \quad (16)$$

Outro ponto que merece destaque é o uso do tamanho efetivo da população de doadores de pólen N_{ep} para medir o tamanho da área efetiva de vizinhança levando em consideração a densidade (d_e) dos indivíduos de cada fragmento, como proposto por Austerlitz & Smouse (2001):

$$\hat{A}_{ep} = \frac{\hat{N}_{ep}}{d_e} \quad (17)$$

As análises do TWOGENER foram executadas usando 95% de intervalo de confiança computadas a partir de 10000 *bootstraps* entre as progêniens.

A taxa de migração de pólen para os três fragmentos florestais (fragmentos 01, 04 e 07) também foi estimada através da atribuição de paternidade implementada no CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2007), baseada no método de máxima verossimilhança. O processo de estimação leva em consideração que a espécie em estudo é diplóide e que as populações e os locos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e de ligação. Assume também, que os locos usados são codominantes. Para se determinar os valores críticos de Δ – que determina a confiança da análise – realizou-se um processo de simulação com os seguintes parâmetros: 10000 testes para identificar os valores críticos de Δ e 95% e 80% como níveis de confiança restrito e relaxado, respectivamente.

3.3.3 A estrutura genética espacial

O padrão da estrutura genética espacial foi avaliado pela análise comparativa do parentesco (*kinship*) entre os indivíduos adultos e a distância geográfica entre eles através da construção de um parentescograma. O coeficiente de parentesco foi calculado utilizando-se o estimador F_{ij} de Loiselle et al. (1995). A estrutura genética espacial foi

quantificada pelo parâmetro $S_p = b/(F_1-1)$, em que F_1 é a média do coeficiente de parentesco entre indivíduos da primeira classe de distância e b é o coeficiente de regressão proposto por Vekemans & Hardy (2004). Estas análises foram conduzidas utilizando-se o programa SPAGeDi 1.2 (Hardy & Vakemans, 2002). Com exceção dos indivíduos que compõem o fragmento 08, que não tiveram os dados de posicionamento geográfico coletados, todos os indivíduos dos outros sete fragmentos foram utilizados.

Foi construído, também, um gráfico de dispersão mostrando a relação entre o valor de R_{ST} par a par e a distância geográfica. Os valores de R_{ST} foram obtidos pelo software R_{ST} -Calc (Goodman, 1997), enquanto a matriz de distâncias geográficas foi gerada no programa NTSys (Rohlf, 1998) utilizando-se a distância euclidiana para os dados de coordenadas geográficas dos fragmentos no sistema UTM. A correlação entre as duas variáveis foi quantificada pelo método de Pearson e a significância da análise foi acessada pelo teste de Mantel com 10000 permutações.

Para a finalização da abordagem sobre a estrutura genética espacial, foi utilizado o software GENELAND (Guillot et al., 2005b), encontrado como pacote dentro do programa R (R Core Development Team, 2011), para estimar o número de grupos genéticos panmíticos e as fronteiras geográficas entre eles. O GENELAND foi utilizado para se fazer uma análise de agrupamento de indivíduos dentro de populações, assumindo que todos eles obedecem aos pressupostos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com os locos estando em Equilíbrio de Ligação (HWLE – *Hardy-Weinberg Linkage Equilibrium*). O modelo espacial considera que o número de grupos é desconhecido e é estimado diretamente por procedimentos Bayesianos (Guillot et al., 2005a). Cinco corridas independentes foram realizadas obedecendo ao modelo espacial F com 100000 iterações de MCMC, utilizando uma frequência de amostragem de 1 a cada 100 passos para se determinar a distribuição de probabilidade *a posteriori* (*thinning*). Para se determinar os limites geográficos de cada subpopulação foi utilizado um *burn-in* de 500 passos, assumindo como fixo o número de grupos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL

Todos os locos utilizados nas análises foram polimórficos e corroboram com as premissas do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,00010$). Não foi possível rejeitar a hipótese de que os pares de locos estavam em equilíbrio de ligação, para um nível de significância de 5%. A hipótese nula de que as populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg foi rejeitada para os fragmentos 03 e 07, a um nível de significância de 5%.

Foram encontrados 147 alelos nas oito populações de *Cabralea canjerana* para os seis locos avaliados. O número de alelos variou de 18 (Ccan10) a 32 (Ccan04 e Ccan31), com uma média de 24,5 alelos por loco, corroborando com os resultados de Nybom (2004) e Pereira et al. (2011). O loco Ccan04 apresentou a maior heterozigosidade esperada ($H_E = 0,930$), enquanto o loco Ccan28 o menor valor ($H_E = 0,729$). O padrão de diversidade genética nos fragmentos foi acessado pela medida de diversidade de Nei (1973) e pelos valores de riqueza alélica (A_R). A média da diversidade genética de Nei (1973) nos oito fragmentos foi de 0,724, enquanto que a média da riqueza alélica foi de 8,589. A heterozigosidade média observada (H_O) para os oito fragmentos foi de 0,685.

Comparando-se estes valores com outros encontrados na literatura pode-se concluir que existe uma elevada diversidade genética nos fragmentos florestais de *Cabralea canjerana*. Moreira et al. (2010) encontraram uma heterozigosidade esperada (H_E) média de 0,529 em treze locos microssatélites para nove populações de *Coccoloba cereifera*, em campos rupestres da Serra do Cipó em Minas Gerais. Utilizando dez locos microssatélites, Zucchi et al. (2003) estimaram, para dez populações de *Eugenia dysenterica*, uma espécie arbórea do Cerrado brasileiro, uma heterozigosidade esperada média de 0,442. Conte et al. (2003) encontraram baixos valores de heterozigosidade esperada ($H_E = 0,278$) entre populações de *Euterpe edulis* na Mata Atlântica, porém

usaram locos izoenzimáticos nas suas estimativas. Por se tratar de locos menos informativos, há uma subestimação deste parâmetro populacional. Quando comparado com espécies endêmicas, os valores de heterozigosidade do presente trabalho são ainda maiores. Kang et al. (2008), estimaram uma heterozigosidade esperada $H_E = 0,46$ para *Berchemiella wilsonii*, espécie florestal endêmica da China, usando 10 locos SSR, enquanto Furches et al. (2009), utilizando dez locos microssatélites, encontraram valores de heterozigosidade esperada, $H_E = 0,215$ para populações de *Lithophragma maximum*, uma espécie rara extremamente ameaçada de extinção. A Tabela 3 mostra as estimativas dos principais parâmetros genéticos descritivos das populações de *Cabralea canjerana* nos oito fragmentos florestais de Mata Atlântica avaliados. As populações 07 e 08 detêm dos maiores níveis de riqueza alélica (A_R) e heterozigosidade esperada (H_E), mostrando que são os dois fragmentos que possuem mais diversidade genética intrapopulacional.

Tabela 3. Características genéticas dos oito fragmentos de *Cabralea canjerana*, com base na análise de seis locos SSR.

Fragmentos	N ^a	A ^b	Ar ^c	H _E	H _O
Frag. 01	27	8,000	5,560	0,666	0,716
Frag. 02	33	8,500	6,370	0,736	0,718
Frag. 03	31	6,663	6,666	0,748	0,772
Frag. 04	33	6,333	5,486	0,682	0,732
Frag. 05	17	9,333	6,651	0,726	0,615
Frag. 06	11	8,666	6,238	0,713	0,674
Frag. 07	39	10,833	7,272	0,749	0,675
Frag. 08	30	9,833	7,391	0,778	0,578

^a Número de indivíduos amostrados; ^b Número médio de alelos encontrados; ^c Riqueza alélica média.

Para se verificar a hipótese de que os maiores fragmentos florestais apresentam os maiores níveis de diversidade genética, foi realizada uma comparação entre o tamanho do fragmento (hectares) e os valores de riqueza alélica (Ar) e heterozigosidade esperada (H_E) para as oito populações. Os fragmentos 07 e 08 apresentaram os maiores índices de diversidade genética, com a riqueza alélica alcançando o valor de 7,391 no fragmento 08, enquanto o número médio de alelos encontrados no fragmento 07 foi de quase 11 alelos para os indivíduos genotipados.

Percebe-se uma forte e positiva relação entre o tamanho dos fragmentos avaliados e os níveis de diversidade genética detectados, ou seja, é possível supor que, em populações de *Cabralea canjerana* da APA Fernão Dias, amostradas nos contínuos

florestais de Mata Atlântica, possuem mais diversidade genética do que os fragmentos pequenos (Figura 5). Este padrão foi observado para as duas variáveis (riqueza alélica e heterozigosidade esperada) usadas para medir a diversidade genética. A correlação, baseada no método de Pearson, entre o tamanho do fragmento e a medidas de diversidade riqueza alélica ($r = 0,775$; p -valor = 0,023) foi elevada e significativa a 5% de índice de confiança. Utilizando a heterozigosidade esperada como medida de diversidade, a correlação foi mediana e não significativa ($r = 0,649$; p -valor = 0,081). É interessante discutir que a medida do tamanho do fragmento é uma medida muito delicada e que deve ser feita com base em técnicas mais precisas e não somente utilizando um GPS comum. Esta, talvez seja uma explicação para este resultado, pois se percebe que alguns fragmentos amostrados são, na verdade, áreas contínuas de Mata Atlântica, o que eleva as medidas de diversidade genética. Com base na semelhança dos valores de R_{ST} e do F_{ST} apresentados a seguir (Tabela 4), pode-se dizer que a fragmentação ocorrida nesta área é recente, de aproximadamente 60 anos como relata uma ONG que trabalha com a conservação ambiental da região (Aguari, 2001). Este cenário de fragmentação recente pode corroborar com o fato de que fragmentos pequenos ainda possuem elevados níveis de diversidade genética, como pode ser visto na Figura 5. Franceschinelli et al. (2007), em um estudo com *Myrciaria floribunda*, uma espécie comum na Mata Atlântica, relacionaram a diversidade genética, medida através de locos izoenzimáticos, com o tamanho de seis fragmentos florestais e perceberam haver uma relação com o fato de que populações situadas em fragmentos florestais maiores apresentavam índices mais elevados de diversidade genética.

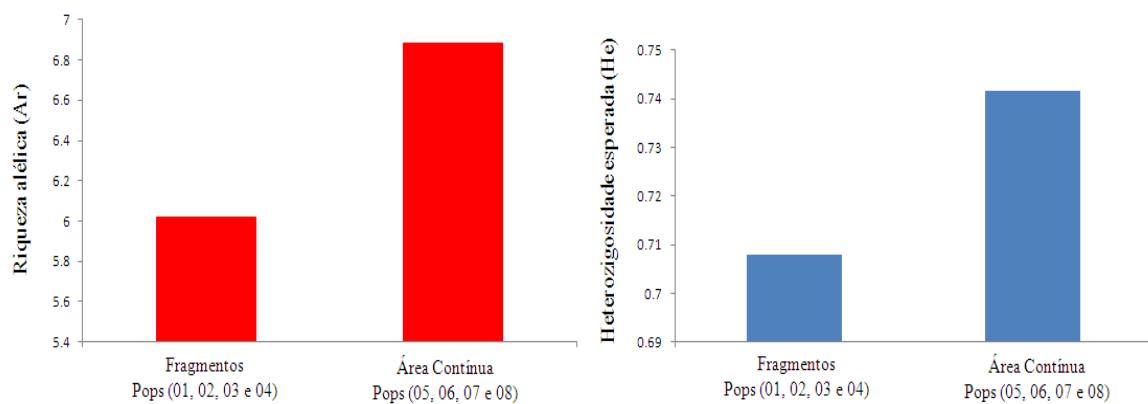


Figura 5. Relação do tamanho (em hectare) dos oito fragmentos florestais com duas medidas de diversidade genética, mostrando a relação existente entre estas variáveis. A correlação entre o tamanho do fragmento e duas medidas de diversidade genética foi mediana e não significativas.

Houve uma tendência, não significativa, para o aumento da diversidade genética nas populações situadas em altitudes mais elevadas (Figura 6), como é o caso dos fragmentos 07 e 08 que estão localizados a quase dois mil metros acima do nível do mar. Isto pode ser confirmado pelos valores da correlação existente entre as variáveis, altitude e as utilizadas como medidas da diversidade. Entre a altitude e a riqueza alélica a correlação foi de $r = 0,692$ (p-valor = 0,056) e entre a altitude e a H_E foi de $r = 0,621$ (p-valor = 0,099). A distribuição da diversidade genética entre populações de plantas num gradiente de altitude pode ser afetada por processos neutros e/ou seletivos (Shi et al., 2011). Estes autores encontraram um padrão de estruturação genética para *Castanopsis eyrei* em diferentes altitudes. Ohsawa et al. (2008) perceberam um padrão diferente do encontrado para *Cabralea canjerana* em populações de *Quercus serrata*, uma espécie importante pelo valor econômico de sua madeira, numa análise de quinze populações ao redor da montanha de Chichibu, no Japão. Para uma variação de altitude de 140 a 1200 metros, perceberam que as populações mais elevadas detinham menores índices de diversidade genética, concluindo que a variação genética entre as populações era afetada pela topografia do local.

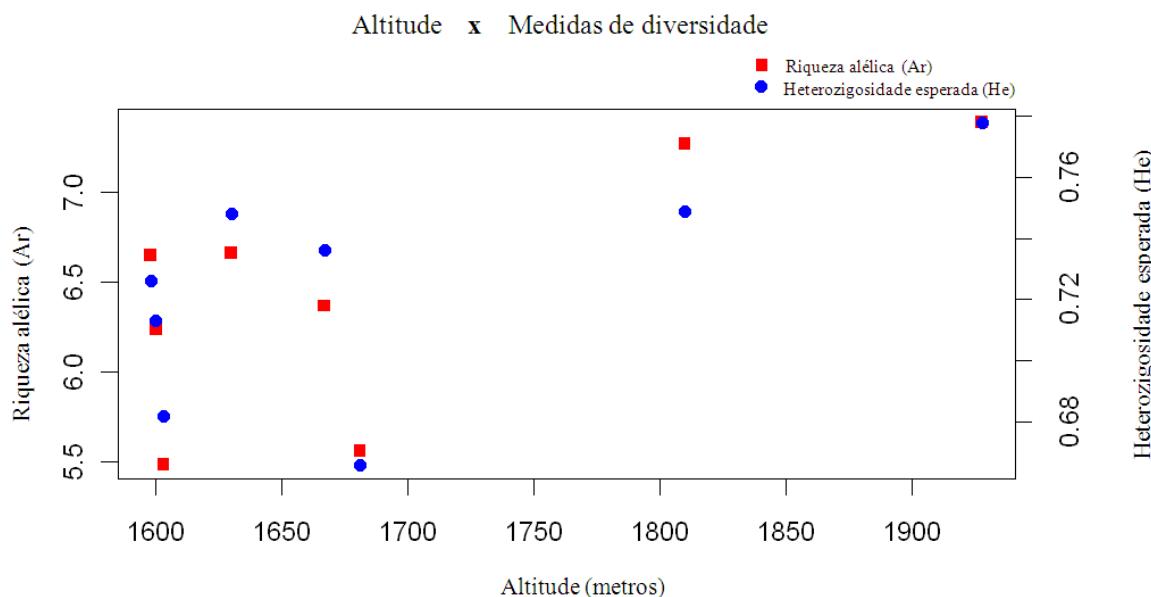


Figura 6. Relação da altitude (metros) em que estão localizados os oito fragmentos florestais com duas medidas de diversidade genética, mostrando que há uma tendência dos fragmentos localizados em áreas de maior altitude apresentarem maiores níveis de diversidade genética.

Ao mostrar que populações localizadas em regiões mais elevadas detêm de maiores níveis de diversidade genética, abre-se uma discussão sobre a importância das APPs (Áreas de Preservação Permanente) na preservação da diversidade genética existente

dentro de populações naturais de espécies nativas. Isto é, de acordo com o código florestal brasileiro, regiões acima de 1800 metros de altitude são consideradas APPs e estas áreas possuem a função de preservar recursos hídricos, paisagem, estabilidade geológica, biodiversidade, fluxo gênico de fauna e flora e outros. Os resultados apresentados para os fragmentos 07 e 08 situados acima de 1800 metros de altitude mostram a eficiência destas APPs na manutenção da diversidade genética intrapopulacional. No entanto, com a nova proposta do novo código florestal, que está sob discussão na câmara e no senado federal, estas áreas acima de 1800 metros de altitude deixariam de ser consideradas APPs, o que eliminaria a sua eficiência na preservação de nascentes de rios e na manutenção da diversidade genética existente. Sabe-se que na APA Fernão Dias existe nascente de rios, localizadas nestas Áreas de Preservação Permanente, importantes no abastecimento de cidades do Estado de São Paulo. A aprovação do novo código florestal brasileiro mostra, mas uma vez, que existem falhas nas políticas públicas nacionais de conservação da natureza.

Os valores multilocos de $f = 0,061 [-0,174 - 0,278]$, $F = 0,184 [-0,031 - 0,388]$ não foram estatisticamente diferentes de zero, enquanto que o valor estimado de $\theta = 0,131 [0,066 - 0,222]$ foi considerado significativo com base no intervalo de confiança de 99% (Tabela 4). A análise de variância das frequências alélicas mostrou como estão estruturadas geneticamente as oito populações. A maior parte da variância da frequência dos alelos foi detectada dentro das populações ($\sigma^2_G = 4,073$; $\sigma^2_I = 0,655$ e $\sigma^2_P = 0,264$), o que é típico de espécies alógamas. O grau de diferenciação entre as populações, que pode fornecer uma estimativa do fluxo gênico aparente, foi de média magnitude ($\theta = 0,131$), gerando uma diferenciação interpopulacional moderada e/ou um isolamento recente das populações. A moderada diferenciação genética é confirmada pela interpretação qualitativa proposta por Hartl & Clark (2010), porém, devido à pequena escala geográfica de distribuição destas populações, a estruturação genética que existe entre elas pode ser considerada elevada. Este valor de θ mostra que ainda há troca de genes, ao longo das gerações, entre as oito populações de *C. canjerana* da APA Fernão Dias.

Os valores de θ e R_{ST} , obtidos de uma análise multilocos, foram semelhantes ($R_{ST} = 0,189$ e $\theta = 0,131$), mas com o valor de R_{ST} maior do que o valor de θ , diferentemente do encontrado por Moreira et al. (2010) em nove populações de *Coccobola cereifera* em campos rupestres da Serra do Cipó em Minas Gerais, que encontraram valores semelhantes, mas com o valor de F_{ST} maior. A comparação destes dois

estimadores pode fornecer alguma interpretação teórica, principalmente quando os valores acessados pelo R_{ST} e θ são similares. Quando este cenário ocorre há indícios de que a divergência genética entre as subpopulações é recente e que a deriva genética é o principal fator evolutivo que causa a divergência genética entre as populações (Hardy et al., 2003).

Tabela 4. Estrutura genética populacional dos seis locos microssatélites usados nas estimativas genéticas dos 221 indivíduos de *Cabralea canjerana*.

Loco	N	A	f^a	F ^b	θ^c	R_{ST}
Ccan17	219	27	0,064	0,164	0,106	0,346
Ccan04	205	32	0,344	0,376	0,049	0,038
Ccan31	215	32	0,055	0,131	0,083	0,402
Ccan28	218	14	-0,259	-0,150	0,087	0,005
Ccan32	171	24	0,283	0,482	0,278	0,167
Ccan10	179	18	-0,184	0,039	0,189	0,178
Valores Multilocos	-	24,5	0,061	0,184	0,131	0,189

^a Índice de fixação intrapopulacional; ^b Índice de fixação total; ^c Coeficiente de diferenciação populacional.

A matriz de distância genética foi gerada utilizando-se a distância genética de Nei (1972). Esta matriz foi usada na construção de um dendograma dos oito fragmentos de *Cabralea canjerana* mostrando a relação genética existente entre eles (Figura 7). O dendrograma mostra a formação de dois grupos. Grupo **A**: fragmentos 01, 02, 03 e 04 e Grupo **B**: fragmentos 05, 06, 07 e 08. O valor de consistência dos nós fornece uma confiança para a subestruturação encontrada nos oito fragmentos. Para testar a relação entre a matriz de distância genética e a matriz cofenética, uma análise correlação matricial (r) foi feita. A significância da análise de correlação foi estimada utilizando-se o teste de Mantel. O valor da correlação entre as matrizes ($r = 0,863$, p-valor = 0,0003) foi elevado e significativo. Através da Análise de Coordenadas Principais (PCA – *Principal Coordinate Analysis*) percebe-se também que os oito fragmentos se estruturaram em dois subgrupos, isto é, a variabilidade genética existente entre as populações foi ordenada em dois grupos distintos, corroborando o resultado obtido com o dendrograma. A Figura 8 mostra a ordenação dos grupos em três dimensões, as quais explicam 90% da variação existente nos dados.

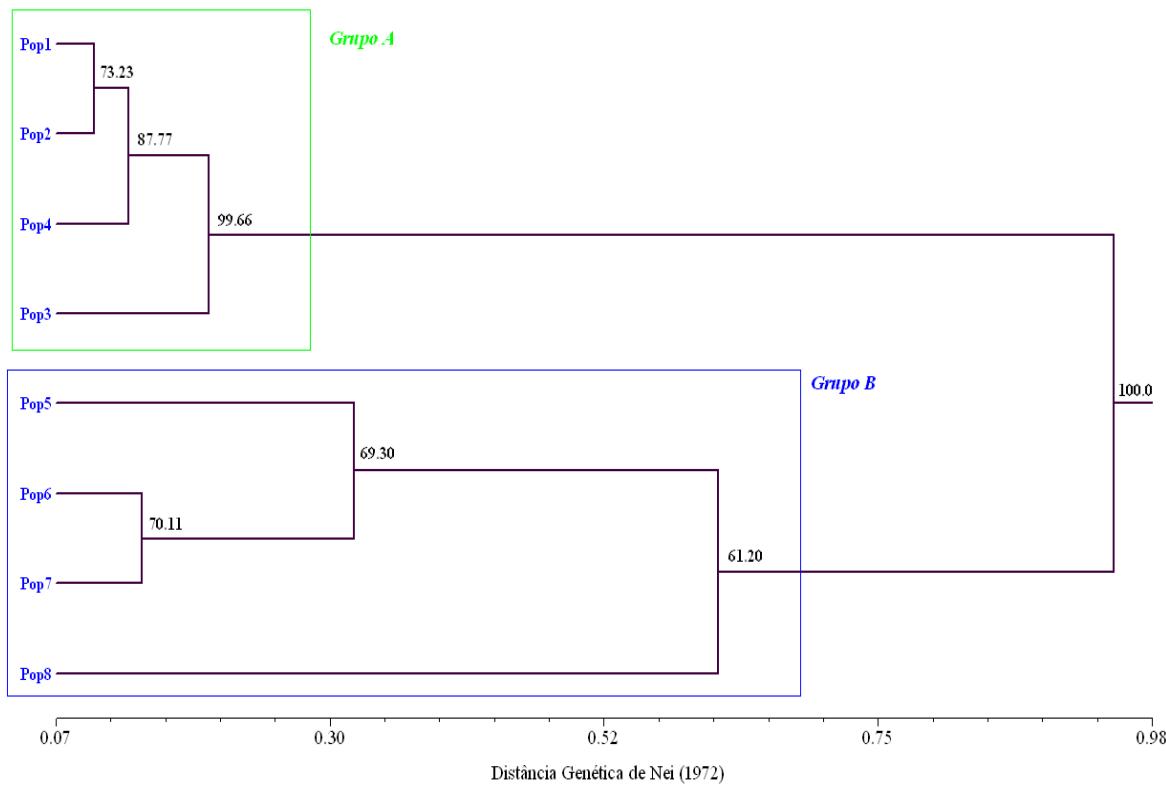


Figura 7. Dendrograma das oito populações de *Cabralea canjerana* mostrando os dois subgrupos formados e os valores de consistência dos nós.

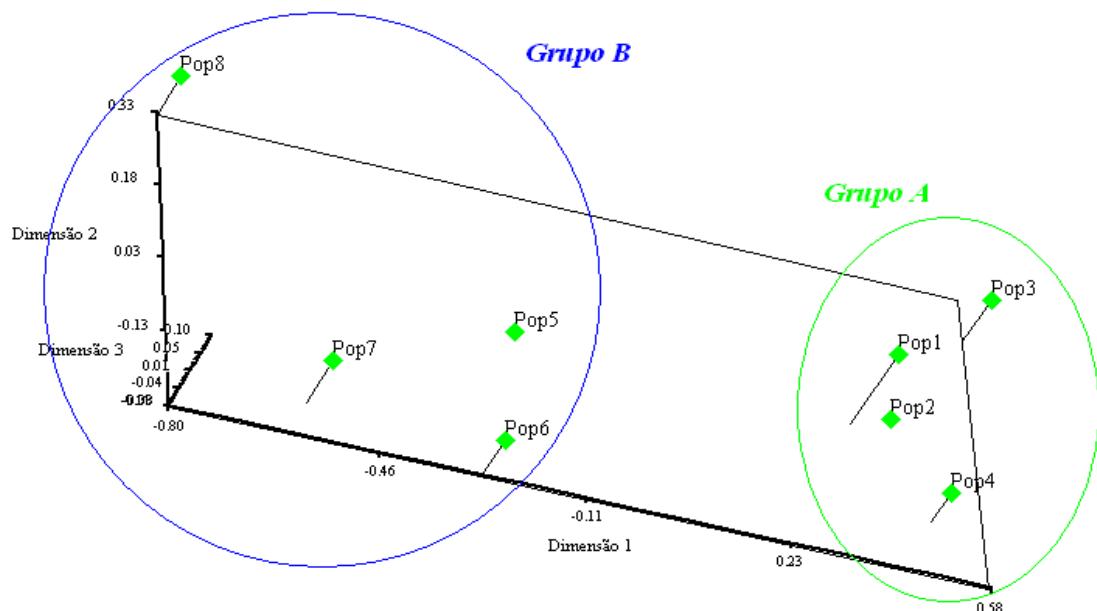


Figura 8. Análise de coordenadas principais (PCA) para os oito fragmentos de *Cabralea canjerana* indicando a formação de dois subgrupos.

A abordagem Bayesiana foi usada para a confirmação dos resultados que indicam a formação de dois subgrupos. Pôde-se perceber que os oito fragmentos florestais foram, realmente, estruturados em dois grupos (Figuras 9 e 10), assim como já havia sido indicado pelas análises do dendograma e de PCA (*Principal Coordinate Analysis*). Um Grupo (**A**) formado pelos fragmentos 01, 02, 03 e 04 e outro Grupo (**B**) formado pelos fragmentos 05, 06, 07 e 08. Este resultado foi obtido pelo método de Evanno et al. (2005) através do maior valor de ΔK que representa um $K = 2$.

As análises de estrutura populacional indicam que o fragmento 08 possui uma composição genética distinta dos outros fragmentos do Grupo **B**. Isso pode levar a uma interpretação diferente da proposta no presente trabalho, com a formação de três subgrupos, e este terceiro sendo composto exclusivamente pelo fragmento 08. O ΔK apresentou um valor elevado para uma estruturação em três subgrupos ($K = 3$) o que pode sugerir a divisão do Grupo **B** em dois grupos, um formado pelos fragmentos 05, 06 e 07 e outro grupo somente pelo fragmento 08 (Figuras 9 e 10). O fragmento 08 é o maior e mais preservado entre todos os fragmentos amostrados, apresentando altos valores de diversidade genética (Tabela 3), árvores bem grandes e densidade populacional elevada, o que pode explicar o padrão encontrado, mostrando a importância deste fragmento como potencial doador de alelos raros para outras populações adjacentes.

Portanto, levando-se em consideração as três análises, considerou-se que os oito fragmentos se estruturaram geneticamente em dois subgrupos com o fragmento 08 apresentando-se distante geneticamente dos outros fragmentos que formam o agrupamento **B** (Figura 10). Definiu-se, desta forma, a formação do Grupo **A**, composto pelos fragmentos 01, 02, 03 e 04 e Grupo **B**, composto pelos fragmentos 05, 06 e 07 e 08. A formação de dois grupos foi claramente influenciada pela característica do relevo local, pelo nível de fragmentação existente nos quatro primeiros fragmentos e pela proximidade geográfica entre eles. Uma comparação par a par da divergência genética existente entre os dois grupos e o Fragmento 08, com base na frequência dos alelos intragrupo realizada pelo Structure, é mostrada na Tabela 5. Os valores são concordantes com o fato de o fragmento 08 possuir uma composição alélica que o faz se distanciar geneticamente dos fragmentos 05, 06 e 07.

É perceptível que os fragmentos componentes do Grupo **B** estão a uma altitude maior em relação aos fragmentos que formam o Grupo **A**. A média para o Grupo **A** é de 1645,25 metros, já para o Grupo **B** é de 1734 metros acima do nível do mar, uma diferença

de aproximadamente 88,5 metros. Concordando com o fato de que os fragmentos de altitudes mais elevadas possuem mais diversidade genética intrapopulacional.

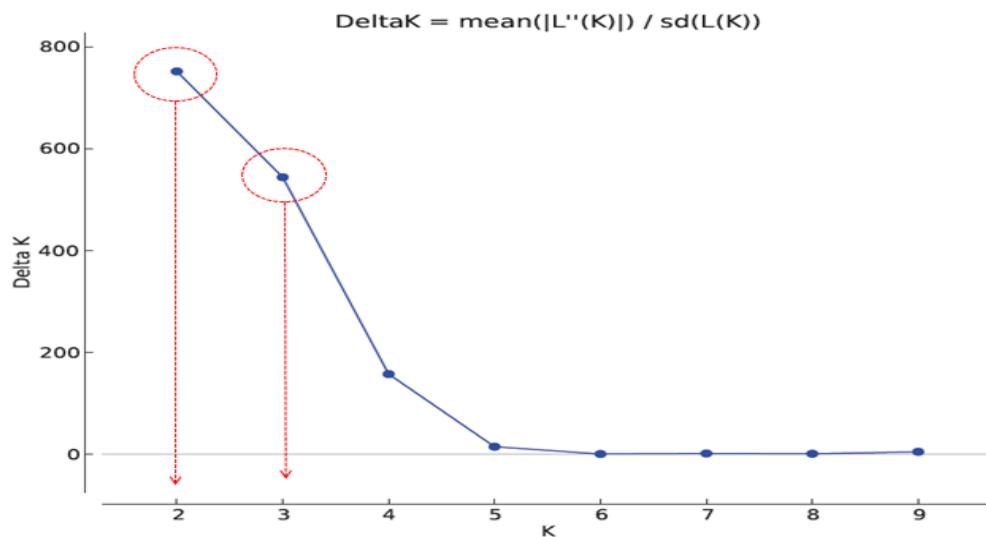


Figura 9. Valores de ΔK para o número de subpopulações (K) mais verossímil. Dois é o número de subpopulações mais provável.

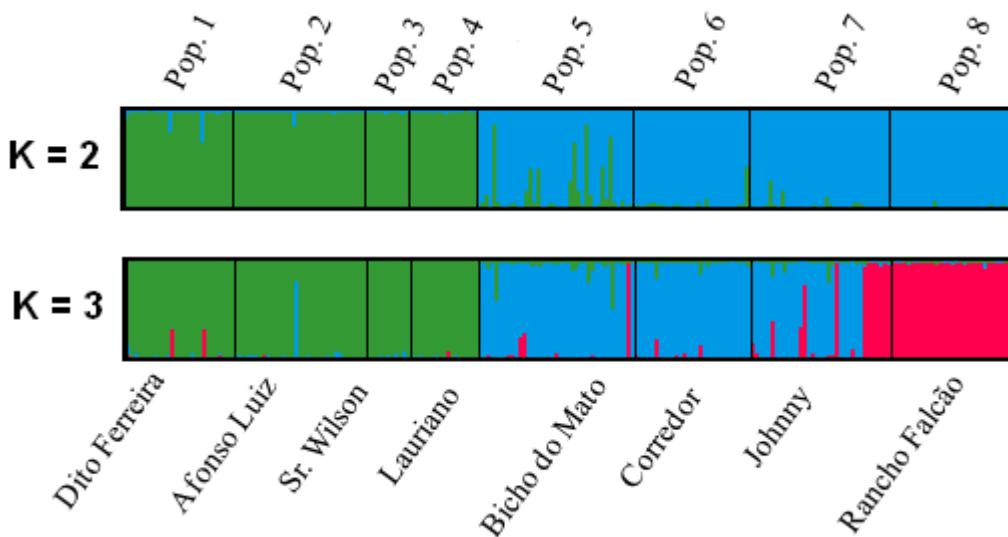


Figura 10. Gráfico de barras representando todos os indivíduos de *Cabralea canjerana* coletados em oito fragmentos florestais, mostrando a estruturação populacional em dois grupos ($K = 2$). Como a população 08 possui uma composição genética divergente das outras ela pode aparecer como um subgrupo ($K = 3$) dentro do Grupo B.

Tabela 5. Divergência genética existente entre os dois grupos formados e o fragmento 08, mostrando que este fragmento possui uma composição alélica divergente dos demais.

	Grupo A	Grupo B	Fragmento 08
Grupo A	-	0,0887	0,1732
Grupo B	0,0887	-	0,1201
Fragmento 08	0,1732	0,1201	-

Dos 221 indivíduos analisados, 124 (56,10%) agruparam-se no Grupo A, enquanto o Grupo B foi composto por 97 indivíduos (43,90%). Analisando-se a estruturação populacional dos quatro fragmentos que compõem o Grupo A, percebeu-se uma baixa estruturação genética ($\theta = 0,029$), devido a proximidade geográfica das populações e principalmente a uniformidade do relevo entre as populações que formam este grupo. A heterozigosidade esperada dentro do Grupo A foi elevada ($H_E = 0,712$). Analisando-se somente o Grupo B, pode-se perceber uma estruturação genética moderada ($\theta = 0,074$) e uma heterozigosidade esperada ($H_E = 0,755$) maior em relação ao Grupo A, o que pode ser explicada por estas populações terem sido coletadas em contínuos florestais de Mata Atlântica. A maior estruturação genética encontrada no Grupo B pode estar relacionada com as características geográficas do local, isto é existe uma acentuada diferenciação do relevo entre as populações que formam este grupo, principalmente em relação aos Fragmentos 07 e 08. A estruturação populacional entre os dois grupos é elevada ($\theta = 0,139$). A Tabela 6 apresenta os valores destes parâmetros genéticos populacionais para os dois Grupos.

Tabela 6. Principais parâmetros genéticos estatísticos inferidos para os dois subgrupos formados.

Nível da análise	N	A ^a	Ar ^b	H _E	f	θ	Nm ^c
GRUPO A	88	7,5	6,436	0,712	-0,027	0,029	8,370
GRUPO B	133	10,375	10,187	0,755	0,144*	0,080*	2,875
ENTRE ELES	221	16,83	19,575	0,763	0,103	0,139	1,548

^a Número médio de alelos; ^b Riqueza alélica; ^c Número de indivíduos migrantes por geração; * Estatisticamente significativo: p < 0,05.

Os níveis de fluxo gênico aparente possuem os valores de 8,370; 2,875 e 1,548 indivíduos migrantes por geração para o Grupo A, Grupo B e entre eles, respectivamente, mostrando que o fluxo gênico é maior dentro dos grupos do que entre eles. Este dado é claramente influenciado pela fragmentação existente e pela diferença de altitude em que se encontram estes dois grupos, o que limita os agentes de dispersão de sementes e polens.

Estes valores que indicam o padrão de fluxo gênico são cruciais para definir, sob o ponto de vista genético, as estratégias de conservação dos oito fragmentos estudados, uma vez que através da informação sobre a magnitude e o padrão de fluxo gênico e os grupos formados pode-se determinar qual área necessita de uma política mais eficiente de conservação. Percebe-se que a diferenciação genética entre os quatro primeiros fragmentos (Grupo **A**) é baixa, consequentemente o fluxo gênico aparente é elevado. As populações do Grupo **A** estão situadas em regiões de menor variação do relevo, além de estarem mais próximas, o que favorece o número de migrantes por geração.

Desta maneira, evidencia-se que o fluxo gênico desempenha um papel importante na manutenção destas populações como uma unidade evolutiva significante (ESU). Mesmo com elevado índice de migração entre os fragmentos do Grupo **A**, pode-se perceber que são fragmentos pequenos (Tabela 2) e que possuem medidas de diversidade menor quando comparados com o Grupo **B**. Mesmo possuindo uma taxa menor de fluxo gênico, devido à grande variação de relevo existente entre as populações que compõem o Grupo **B**, a riqueza alélica (Ar) e heterozigosidade esperada (H_E) são elevadas. Portanto, é possível concluir que o Grupo **A**, formado por fragmentos menores, e de acordo com os parâmetros estimados, é mais frágil geneticamente e sofre maiores consequências genéticas e estocásticas devido à fragmentação ocorrida.

4.2 FLUXO GÊNICO E ANÁLISE DA DISPERSÃO DE POLENS

As probabilidades de exclusão de paternidade e de identidade genotípica confirmam o poder de resolução dos locos no acesso a parâmetros genético estatísticos de populações naturais. Estas medidas são importantes para análises de parentesco e da estrutura genético-espacial (Marshall et al., 1998). Para os seis locos microssatélites utilizados neste trabalho, as probabilidades de exclusão e de identidade foram 0,9987 e $3,66 \cdot 10^{-7}$ respectivamente.

As estimativas indiretas do fluxo gênico podem ser fundamentadas nas estatísticas F de Wright e suas análogas, assumindo o modelo de ilhas. Entre os oito fragmentos de *Cabralea canjerana*, a média estimada do valor multiloco de θ foi de 0,131. Com isso, pode-se dizer que o fluxo gênico (Nm) médio entre os oito fragmentos é de 1,65 indivíduos migrantes por geração. O fluxo gênico possui um papel importante na manutenção da

variabilidade genética intrapopulacional, impedindo a divergência genética entre os fragmentos devido à deriva e adaptação local (Slatkin, 1987). Moraes et al. (1999) encontraram um valor de Nm menor que zero para *Cryptocarya moschata* em populações de Mata Atlântica, usando locos izoenzimáticos, mostrando a baixa eficiência deste tipo de loco em detectar alelos comuns em populações distintas.

Os parâmetros genéticos descritivos dos seis locos microssatélites (Anexo A) foram calculados para os 121 frutos coletados em três fragmentos diferentes (01, 04 e 07). O número de alelos por loco polimórfico variou de oito (Ccan 28) a 22 (Ccan17) com 14 sendo o número médio de alelos por loco. A heterozigosidade esperada (H_E) variou de 0,617 (Ccan32) a 0,866 (Ccan17). A Tabela 7 mostra os detalhes destas estimativas.

Tabela 7. Estatísticas descritivas dos locos SSR avaliados em sementes de 121 frutos amostrados em três fragmentos de *Cabralea canjerana*.

Loco	A ^a	Ar ^b	f ^c	θ ^d	H _O	H _E
Ccan17	22	9,912	0,017*	0,063	0,851	0,866
Ccan04	17	9,556	0,300	0,078	0,603	0,861
Ccan31	12	6,874	0,451	0,043	0,363	0,661
Ccan28	8	3,833	-0,131*	0,046	0,785	0,694
Ccan32	10	4,869	-0,044*	0,065	0,644	0,617
Ccan10	15	8,888	0,242	0,060*	0,595	0,784
Valores Multilocos	14	7,322	0,143*	0,061*	0,640	0,747

^a Alelos por loco; ^b Riqueza Alélica; ^c Índice de fixação intrapopulacional; ^d Coeficiente de diferenciação populacional; * Estatisticamente significativo: $p < 0,05$.

A densidade populacional, ou seja, a relação do número de indivíduos pela área é uma informação importante para os programas de conservação. Utilizando um total de 500 indivíduos como um tamanho populacional efetivo (Ne) de referência, como suficiente para manutenção da população a longo prazo, é possível inferir que as espécies muito comuns (alta densidade de indivíduos por área) não necessitam grandes áreas para sua manutenção. Ao contrário, as espécies muito raras (baixa densidade de indivíduos por área) requerem milhares de hectares como área utilizada na manutenção de sua população. Uma espécie no limite da raridade, que a literatura aponta como sendo de uma árvore adulta por hectare, exige cerca de 500 hectares para representar uma população mínima viável, o que poderia ser uma referência para a discussão das ações conservacionistas (Kageyama & Gandara, 1995). Para o contexto das espécies de *Cabralea*, nos fragmentos florestais de Mata Atlântica, temos uma média de quase 130 indivíduos por hectare (Tabela 2).

Supondo que a proporção sexual seja de 1:1 (macho: fêmea), a densidade dos indivíduos machos por fragmento é a metade do valor da densidade apresentado na Tabela 2. A taxa sexual entre machos e fêmeas da progênie influencia diretamente nos valores do tamanho efetivo populacional. Conforme Vencovsky et al. (2012), os desvios da proporção sexual de 1:1 entre macho e fêmea nas progêñies tornam o valor de N_e menor e diminui a eficiência do controle gamético no aumento do tamanho efetivo populacional. Estes autores ainda discutem que em populações finitas onde todos os indivíduos são considerados pais, em potencial, a redução do N_e devido aos desvios da proporção sexual pode ser compensada através do controle gamético feminino.

A densidade para os fragmentos envolvidos nas análises de fluxo de polens é: fragmento 01, 13 machos/ha; fragmento 04, 43 machos/ha e fragmento 07, 105,5 machos/ha. O valor da densidade de machos por hectare é importante para a estimativa da estruturação global da nuvem de polens que fecundam as matrizes (Φ_{FT}).

O valor global que mede a estruturação da nuvem de polens que fecundam as matrizes (Φ_{FT}) não apresentou diferenças para as estimativas usando o modelo de dispersão normal e exponencial. Seu valor foi significativo para um intervalo de confiança de 95%. $\Phi_{FT} = 0,143$ [0,047- 0,289] para o fragmento 01, $\Phi_{FT} = 0,147$ [0,038 - 0,281] para o fragmento 04 e $\Phi_{FT} = 0,180$ [0,114 – 0,236] para o fragmento 07. Estes valores mostram uma elevada estruturação do pool de polens que fecundam as matrizes, o que indica que o fluxo de polens dentro dos fragmentos está estruturado. O valor médio estimado do Φ_{FT} foi igual a 0,156. Aplicando-se a correção sugerida por Austerlitz & Smouse (2001) os valores de Φ'_{FT} para os três fragmentos são 0,154; 0,143 e 0,155, respectivamente. Já o valor médio de Φ'_{FT} foi igual a 0,150 (Tabela 8), mostrando que devido ao baixo índice de fixação intrapopulacional da geração parental a diferença entre os valores de Φ_{FT} e Φ'_{FT} é pequena.

Os baixos níveis de fluxo gênico via dispersão de polens existente dentro dos fragmentos permite discutir a limitada dispersão dos agentes que realizam a dispersão de polens. Pizo & Oliveira (1998) relatam que a dispersão de polens é realizada exclusivamente por mariposas, principalmente as da ordem Lepidóptera. Portanto a concentração da dispersão de polens dentro dos fragmentos é devido à limitada dispersão destes insetos entre os fragmentos, isto é, estes insetos possuem comportamento de vôos curtos, polinizando árvores próximas, não se dispersando a outros fragmentos. Isso pode ser confirmado ao perceber o aumento do valor de Φ_{FT} nas populações maiores. Das três

populações estimadas, a população 07 apresentou o maior valor de Φ_{FT} , mostrando que os agentes de dispersão de polens possuem limitações de vôo dentro da mesma população.

Estes valores de Φ'_{FT} , encontrados para *C. canjerana*, foram maiores do que os encontrados por Bittencourt & Sebbenn (2008) para *Araucaria angustifolia* ($\Phi'_{FT} = 0,084$), uma espécie arbórea dominante nas florestas ombrófila mista do sul do Brasil. Cloutier et al. (2007) também encontraram valores menores para duas espécies (*Carapa guianensis*, $\Phi'_{FT} = 0,053$ e *Sextonia rubra*, $\Phi'_{FT} = 0,064$) da Amazônia, sendo a primeira pertencente a família das Meliaceae. Os valores do Φ'_{FT} também foram maiores do que Larsen & Kjaer (2009) para uma espécie nativa da Dinamarca (*Malus sylvestris*, $\Phi'_{FT} = 0,064$). Porém, valores semelhantes aos encontrados para *Cabralea canjerana* foram observados por Dick et al. (2003) em *Dinizia excelsa*, uma espécie nativa da Amazônia em que sua madeira possui elevado valor econômico, utilizada na construção civil ($\Phi'_{FT} = 0,104$) e para *Eurycorymbus cavaleriei* ($\Phi'_{FT} = 0,128$), a única espécie do gênero *Eurycorymbus*, altamente afetada pela fragmentação ambiental do sudeste asiático (Wang et al., 2010).

Utilizando-se o modelo de distribuição exponencial, a distância média para dispersão dos polens (δ), considerando-se uma densidade de árvores fixa e a densidade de machos reprodutivos, fixada em 50%, foi para o Fragmento 01, de 206 metros, variando de 140 a 1040 metros. No fragmento 04, $\delta = 111$ metros com amplitude de 42 a 351 metros e no fragmento 07 a distância de dispersão dos polens foi de aproximadamente $\delta = 65$ metros (10 – 78 metros). Estes resultados indicaram que polens produzidos em um fragmento têm a capacidade de fecundar fêmeas de outros fragmentos adjacentes, uma vez que existem fragmentos em que sua proximidade geográfica é menor do que o limite máximo de dispersão dos polens. No entanto, a grande concentração de dispersão de polens está dentro dos fragmentos, uma vez que a média de dispersão de polens entre os três fragmentos é de $\delta = 127,33$ metros (Tabela 8).

Tabela 8. Análises da estruturação da nuvem de polens que participaram dos cruzamentos (Φ_{FT}) e da média da distância de dispersão de polens entre as diferentes matrizes (δ).

Fragmentos	Φ_{FT}	Φ'_{FT}	^a	δ (amplitude) ^b
Fragmento Dito Ferreira (01)	0,143 *	0,154	0,104	206 (140 - 1040)
Fragmento Lauriano (04)	0,147 *	0,143	0,060	111 (42 - 351)
Fragmento Johnny (07)	0,180 *	0,155	0,034	65 (10 - 78)
Média	0,156 *	0,150	-	127,33 (42 - 1040)

^a Parâmetro que controla a extensão da dispersão dos polens; ^b Distância média de dispersão dos polens e sua amplitude, medida em metros. * Estatisticamente significativo a 5%.

Comparando os valores de δ estimados para *C. canjerana*, Wang et al. (2010) encontraram valores bem menores da distância de dispersão de polens em populações de *E. cavaleriei* no sudeste asiático, afirmando haver uma baixa distância de dispersão de polens intrapopulacional. Cloutier et al. (2007) também encontraram valores próximos aos de *C. canjerana*, com uma variação na distância de dispersão de pólen para *Carapa guianensis* de 69 a 355 metros e para *Sextonia rubra* uma amplitude de 86 – 303 metros, em populações da floresta Amazônica. É verdade que, aumentando o número de matrizes amostradas uma amplitude maior pode ser detectada e os resultados são mais confiantes (Cloutier et al., 2007; Dick et al., 2003; Larsen & Kjaer, 2009).

Existe uma relação positiva entre a distância média das matrizes de cada fragmento amostrado com o valor de Φ_{FT} , ou seja, há uma relação da distância, em metros, entre as matrizes amostradas com o grau de estruturação das nuvens de polens que as fecundaram (Figura 11).

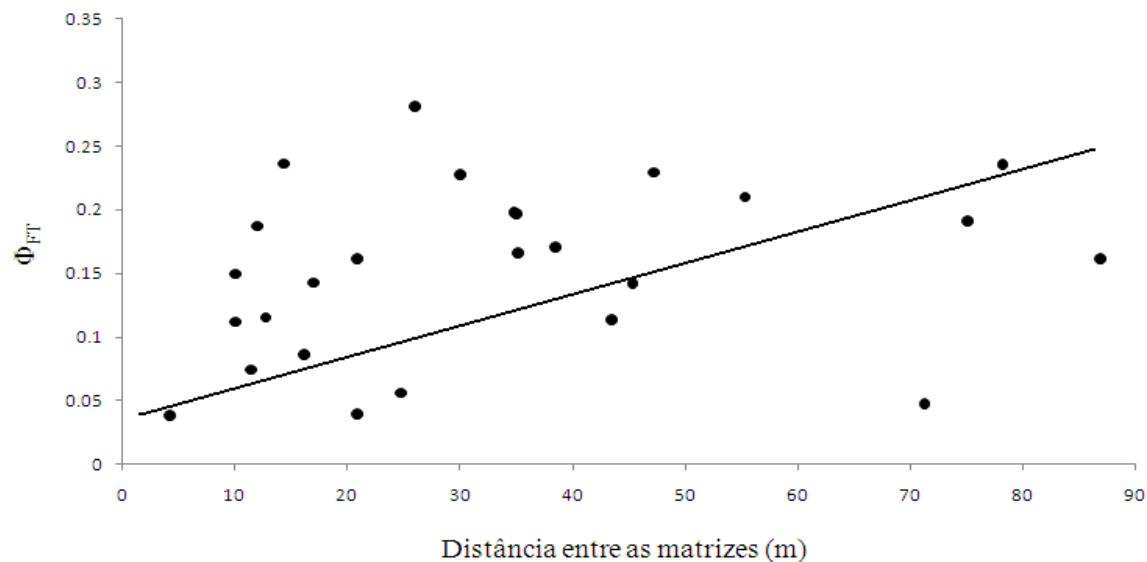


Figura 11. Distância média, em metros, entre as matrizes fecundadas, nos três fragmentos de *C. canjerana* e o grau de estruturação do pool de polens (Φ_{FT}). A correlação, pelo método de Pearson, entre as duas variáveis foi $r = 0,312$, p -valor = 0,092.

O tamanho efetivo da população de doadores de polens (N_{ep}) para cada um dos três fragmentos pode ser estimado com base na equação 14. Para o fragmento 01, dos 26 indivíduos adultos/machos, o tamanho efetivo da população de doadores de polens foi de aproximadamente, três indivíduos. Para o fragmento 04 o valor de N_{ep} foi de 3,496 e no fragmento 07 também existem aproximadamente, três indivíduos, dos 35 adultos/machos, como tamanho populacional efetivo dos doadores de polens (Tabela 9).

Considerando-se que o coeficiente de endogamia da geração parental (F_p) para os três fragmentos em questão foi: $f_{FRAG01} = -0,076$, $f_{FRAG04} = 0,025$ e $f_{FRAG07} = 0,159$, pode-se determinar o coeficiente de coancestria dentro da progênie (Θ_{xy}). Para o fragmento 01, $\Theta_{xy} = 0,151$, para o fragmento 04, $\Theta_{xy} = 0,164$ e para o fragmento 07, $\Theta_{xy} = 0,189$. Com estes valores é possível calcular o tamanho populacional efetivo de variância [$N_{e(v)}$] para os três fragmentos. Este tamanho foi, para os fragmentos amostrados de $N_{e(v) FRAG.01} = 3,311$, $N_{e(v) FRAG.04} = 3,048$ e $N_{e(v) FRAG.07} = 2,645$. O tamanho efetivo (N_e) é um dos mais importantes e difíceis parâmetros populacionais acessados em estudos de genética de populações e quantitativa voltada para o melhoramento ou conservação de espécies ameaçadas (Sugg & Chesson, 1994). O tamanho efetivo de variância mede o efeito que a deriva genética causa na amplitude das frequências alélicas em populações subdivididas (Harlt & Clark, 2010). O tamanho da área de vizinhança (A_{ep}) quantifica o tamanho da área necessária para que uma população sob as condições do modelo de isolamento por distância sofra a mesma quantidade de deriva genética que a população em estudo está sofrendo. Este valor foi, para o fragmento 01 é de 2490 m^2 ; para o fragmento 04 o $A_{ep} = 920\text{ m}^2$ e para o fragmento 07 o tamanho da área de vizinhança é de 344 m^2 (Tabela 9) e possui uma importância singular quando se objetiva coletar amostras populacionais representativas.

Tabela 9. Parâmetros estimados com base na genotipagem das progêniess, dos três fragmentos utilizados nas inferências de fluxo gênico via dispersão de polens para *C. canjerana*.

Fragmento	N^a	N_{ep}^b	A_{ep}^c	F_p^d	Θ_{xy}^e	$N_{e(v)}^f$
Fragmento 01	31	3,246	2490	- 0,076	0,151	3,311
Fragmento 04	33	3,496	920	0,025	0,164	3,048
Fragmento 07	39	3,225	344	0,159	0,189	2,645
Média	34,3	3,322	1251	-	0,168	3,001

^a Número de indivíduos amostrados; ^b Tamanho efetivo da população de doadores de polens; ^c Tamanho da área efetiva de vizinhança (m^2); ^d Índice de fixação intrapopulacional da geração parental; ^e Coeficiente de coancestria intrafamiliar; ^f Tamanho populacional efetivo de variância.

A estruturação média do pool de polens que fecundam diferentes progêniess permite considerar que há um baixo fluxo gênico interpopulacional para as populações amostradas de *C. canjerana* nesta região da Mata Atlântica. Isto é, ocorre mais fluxo de polens dentro dos fragmentos do que entre eles, pois houve uma elevada estruturação da

nuvem de polens que fecundam as diferentes matrizes $\Phi'_{FT} = 0,150$. O número médio da população de doadores de pólen para *C. canjerana* foi de aproximadamente três indivíduos. Para *E. cavaleriei* o valor médio de N_{ep} foi de 4,75 (Wang et al., 2010), enquanto que para populações de *Malus sylvestris* localizadas no sul da Dinamarca o número médio da população de doadores de pólen foi de 10,2 (Larsen & Kjaer, 2009). Bittencourt & Sebbenn (2008) encontraram um N_{ep} de 5,1 para *A. angustifolia*.

O sucesso esperado de atribuição da paternidade com um nível de confiança de 95% foi baixo (19% para o Frag.01, 18% para o Frag.04 e 19% para o Frag.07), mas com um nível de confiança mais relaxado de 80%, a paternidade foi determinada da seguinte maneira: dentre os 33 filhos amostrados no fragmento 01, a paternidade foi atribuída a nove pais candidatos (26%) dentro do mesmo fragmento e a 24 (74%) pais candidatos provenientes de fragmentos adjacentes (Tabela 10). No fragmento 04, para os 49 filhos amostrados, foi atribuída a paternidade a 15 (30%) doadores de polens alocados dentro do mesmo fragmento e a 34 (70%) pais situados em outros fragmentos. Já no fragmento 07, foram encontrados 13 (33%) doadores de polens presente dentro deste fragmento, enquanto que 26 (67%) pais candidatos estão presentes fora do fragmento 05, do qual foram amostrados 34 filhos (Tabela 10).

Tabela 10. Perfil do fluxo de polens observado através de uma análise de paternidade, para três fragmentos de *Cabralea canjerana*.

Fragmento	Nº de pais candidatos/Nº de mães	Nº de filhos por mãe (média)/ Total de filhos	Fluxo de polens (proporção)	
			Dentro do fragmento	Fora do fragmento
Dito Ferreira (01)	22 / 5	3-12 (6,6) / 33	9 (26)	24 (74)
Lauriano (04)	28 / 5	6-12 (9,8) / 49	15 (30)	34 (70)
Johnny (07)	34 / 5	4-12 (7,8) / 39	13 (33)	26 (67)
Média	28 / 5	- / 40.3	12.3 (29.6)	28(70.4)

A paternidade não foi atribuída em aproximadamente 70% dos casos, mostrando que o pool de pólen provavelmente teve origem em indivíduos não amostrados. Os resultados da análise de paternidade para *C. canjerana* sugerem que ocorre mais fluxo de polens entre os fragmentos do que dentro deles. Porém, a análise de paternidade na abordagem deste estudo não é tão informativa, uma vez que não foi realizada a coleta e

muito menos a genotipagem de todos os indivíduos machos existente nos fragmentos. A falta de genotipagem de indivíduos machos amostrados no mesmo fragmento que as matrizes faz com que a paternidade seja atribuída a indivíduos machos de outros fragmentos, equivocadamente. Portanto, a informação desta análise de que existe mais fluxo gênico acontecendo entre os fragmentos não está correta quando comparada com os valores de Φ_{FT} , que indicam claramente a concentração de fluxo de polens dentro dos fragmentos.

Wang et al. (2010) também realizaram uma análise de paternidade e encontraram uma proporção maior de fluxo de polens entre duas populações de *Eurycorymbus cavaleriei* do que dentro delas. O mesmo cenário foi relatado por Bittencourt & Sebben (2008) para 10 árvores matrizes de *Araucaria angustifolia*. Sebbenn et al. (2011) perceberam baixos níveis de fluxo gênico via pólen e semente em populações pequenas e isoladas de *Copaifera langsdorffii* na Mata Atlântica.

Contudo, é possível concluir que o fluxo gênico estimado via dispersão de polens acontece numa proporção maior dentro dos fragmentos se comparado com a dispersão que acontece entre eles. Isto pode ser explicado pela fauna associada à dispersão, principalmente por que são mariposas da ordem Lepidoptera que realizam a dispersão de polens (Pizo & Oliveira, 1998). A limitada capacidade de vôo destes insetos permite entender a concentração do fluxo gênico via dispersão de polens dentro dos fragmentos, uma vez que a variação de altitude e do relevo da região é extrema. Sabendo que o fluxo gênico via pólen acontece dentro dos fragmentos numa proporção elevada, fica implícito que a dispersão via semente acontece entre os fragmentos, o que pode corroborar para a explicação da diferenciação genética entre as populações. Pizo & Oliveira (1998) mostram que são algumas espécies de aves, de morcegos, pequenos mamíferos e algumas espécies de formigas que realizam a dispersão de sementes. Esta dispersão, devido à capacidade de vôos longos de aves e morcegos, pode explicar o fluxo gênico que acontece entre os fragmentos. Pode-se imaginar que a fragmentação do habitat tenha limitado a dispersão destes pequenos mamíferos, aumentando a quantidade de fluxo gênico via dispersão de sementes que ocorre dentro de cada fragmento. É neste sentido que Ghazoul (2005) relatou que a fragmentação dos ecossistemas pode afetar o comportamento dos animais dispersores de polens e sementes, interferindo diretamente na estrutura genética das populações.

Há uma discussão teórica sobre qual dos componentes do fluxo gênico é mais importante. Para Ennos (1994), o fluxo de pólen é o principal componente do fluxo de genes entre populações de plantas. Porém, Hamilton & Miller (2002) defendem que o fluxo de genes via semente é mais importante na determinação do tamanho populacional efetivo e dos níveis de subdivisão populacional, uma vez que, em espécies diplóides, as sementes carregam dois alelos nucleares, enquanto que os grãos de pólen somente um alelo nuclear. Para as populações de *C. canjerana* o fluxo gênico via dispersão de semente não foi exclusivamente medido, portanto não existe comprovação de qual dos dois componentes é o mais importante, nem como realmente se dá a relação entre eles.

4.3 ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL

O conhecimento e o entendimento do padrão de distribuição dos genótipos no espaço geográfico são extremamente importantes para a conservação dos recursos naturais, pois auxilia a definição de estratégias de conservação *in situ* para espécies ameaçadas.

A correlação entre os valores de R_{ST} para cada par de fragmentos e as respectivas distâncias geográficas entre estes fragmentos (Tabela 11) foi considerada elevada ($r = 0,836$) e bastante significativa ($p\text{-valor} = 2,92 \cdot 10^{-8}$), através do teste de Mantel. O resultado indica que o padrão de variabilidade genética existente entre as populações está estruturado na paisagem geográfica (Figura 12). Moreira et al. (2010) encontraram uma baixa relação, porém significativa ($r = 0,31$, $p < 0,001$) entre matrizes dos valores de R_{ST} e distância geográfica para *C. cereifera* em fragmentos florestais no Estado do Paraná. Usando a distância genética de Nei 1972, Zucchi et al. (2003) encontraram uma forte correlação matricial ($r = 0,872$, $p < 0,001$) da distância genética com a distância geográfica entre populações *Eugenia dysenterica*, uma espécie arbórea do Cerrado brasileiro. Para esta mesma espécie, através dos locos RAPD também houve uma correlação positiva e significativa entre as matrizes de distância genética e distância geográfica (Zucchi et al., 2005). Entretanto, para populações de *Schizolobium parahyba*, uma espécie da família das Fabáceas de crescimento extremamente rápido, chegando a 30 metros de altura, numa região de Mata Atlântica, Freire et al. (2007) não identificaram um padrão na estruturação espacial ($r = 0,036$) usando marcadores RAPD. Franceschinelli et

al. (2007), analisando populações de *Myrciaria floribunda*, uma espécie arbórea comum na Mata Atlântica, em três áreas distintas, encontraram relações não significativas entre a diversidade genética de seis populações, medida através de locos izoenzimáticos, e a distância e o grau de isolamento destas populações. A relação entre estas duas matrizes depende de características biológicas e evolutivas em que populações das espécies em discussão sofreram ao longo da sua história de vida. As espécies usadas nesta discussão são árvores de porte arbóreo, assim como a *C. canjerana*.

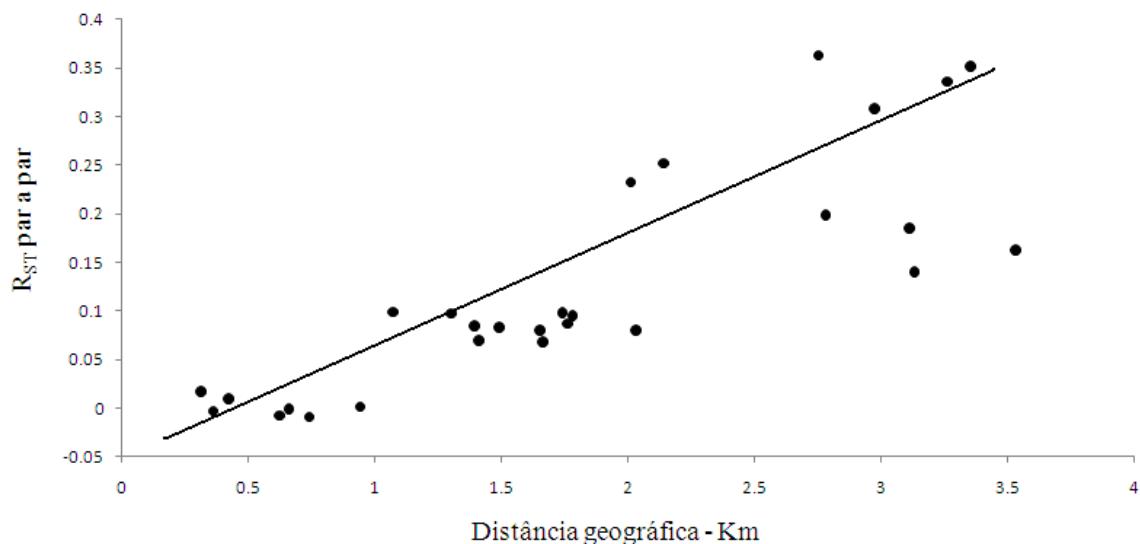


Figura 12. Relação entre os valores de R_{ST} par a par e a distância geográfica (km) para todos os fragmentos de *C. canjerana*. Teste de Mantel para correlação, $r = 0,836$, p -valor $< 0,0001$.

Tabela 11. Valores de R_{ST} par a par (diagonal superior) e distância geográfica (km) baseada na distância euclidiana (diagonal inferior) para os oito fragmentos de *C. canjerana*.

	Frag.01	Frag.02	Frag.03	Frag.04	Frag.05	Frag.06	Frag.07	Frag.08
Frag.01	-	0,011	0,0093	-0,0091	0,0951	0,0798	0,1626	0,3357
Frag.02	0,940	-	-0,0014	-0,0075	0,0843	0,0798	0,1856	0,3519
Frag.03	0,420	0,660	-	-0,0034	0,0698	0,0684	0,1404	0,3084
Frag.04	0,740	0,620	0,360	-	0,0986	0,0975	0,1991	0,3628
Frag.05	1,780	1,390	1,410	1,070	-	0,0168	0,0984	0,2520
Frag.06	2,030	1,650	1,660	1,310	0,310	-	0,0832	0,2323
Frag.07	3,530	3,110	3,130	2,780	1,740	1,490	-	0,0868
Frag.08	3,260	3,350	2,970	2,750	2,140	2,010	1,760	-

Todos os valores de R_{ST} par a par foram significativos para IC de 95%.

A caracterização da SGS (*Spatial Genetic Structure*) dentro dos sete fragmentos (com exceção do fragmento 08 que não possui informação de posicionamento geográfico) de *Cabralea canjerana* foi realizada através da estatística *Sp* que quantifica a força da estrutura genética espacial (Venkemans & Hardy, 2004). Através dos valores de *b* e da estatística *Sp* percebe-se que não há uma estruturação genética espacial dentro dos fragmentos analisados, dado o valor médio de $Sp = -3,67 \cdot 10^{-4}$ (Tabela 12). Isto é, não existe uma relação entre a distância física das árvores adultas amostradas dentro dos fragmentos e o grau de parentesco entre elas.

Tabela 12. Parâmetros genético-espaciais usados para quantificar a estrutura genética espacial intrapopulacional em sete populações de *C. canjerana*.

Fragmento	N	D	b	F_1	Sp
Dito Ferreira (01)	27	26	$2,02 \cdot 10^{-5}$	-0,074	$-1,88 \cdot 10^{-5}$
Afonso Luiz (02)	33	76	-0,00015	0,077	$1,62 \cdot 10^{-5}$
Sr. Wilson (03)	31	86	$1,85 \cdot 10^{-6}$	0,249	$-2,46 \cdot 10^{-5}$
Lauriano (04)	33	86	$-2,13 \cdot 10^{-5}$	0,025	$2,18 \cdot 10^{-5}$
Bicho do Mato (05)	17	187	$4,80 \cdot 10^{-4}$	-0,076	$-4,46 \cdot 10^{-4}$
Corredor (06)	11	67	$-9,76 \cdot 10^{-5}$	-0,033	$9,44 \cdot 10^{-5}$
Johnny (07)	39	221	$-8,54 \cdot 10^{-5}$	0,144	$9,97 \cdot 10^{-5}$
Média	27,28	107	-	-	$-3,67 \cdot 10^{-4}$

N – número de indivíduos amostrados; D – densidade (nº de indivíduos por hectare); *b* – coeficiente de regressão para o logaritmo de parentesco; F_1 – correlação F_{ij} intraclass; *Sp* – força que mede a grau de estrutura genética espacial existente.

Portanto, analisando a força da estruturação genética espacial para os indivíduos dentro dos sete fragmentos, percebe-se que não há, absolutamente, nenhum padrão de estrutura genética espacial intrapopulacional (*fine scale spatial genetic structure*). Analisando populações naturais de *Caryocar brasiliensis* (*Sp* = 0,0116), *Dipteryx alata* (*Sp* = 0,0172) e *Tibouchina papyrus* (*Sp* = 0,0085), Collevatti et al. (2010) encontraram uma fraca estruturação genética espacial, com baixos valores de *Sp*. Analisando três populações de *Dimorphandra mollis* em Minas Gerais, Gonçalvez et al. (2010) também encontraram fraca estruturação genética espacial em duas populações, mas na terceira população, confirmaram que os indivíduos mais parentados eram os mais próximos geograficamente. Born et al. (2008) trabalhando com cinco populações de uma

espécie arbórea (*Aucoumea klaineana*) da África central, perceberam uma estruturação genética espacial intrapopulacional muito parecida entre as cinco populações. Conseguiram identificar dois pools gênicos distintos e uma fraca SGS.

A distância média entre os indivíduos de *C. canjerana*, assumindo todos os fragmentos analisados, variou de 26,1 metros para os indivíduos do fragmento 04 a 61,9 m para os indivíduos do fragmento 07. Com uma média geral dos sete fragmentos é possível afirmar que a distância média entre dois indivíduos de *C. canjerana* em fragmentos da APA Fernão Dias é de 45,9 m. Estas informações são importantes quando se deseja coletar amostras que maximizam a variabilidade genética dentro e entre populações. Collevatti et al. (2010) em um estudo de SGS para espécie nativas do Cerrado brasileiro, encontraram a média de distância entre indivíduos adultos de *Caryocar brasiliensis* como sendo de 168,4 m e em *Dipteryx alata*, de 147,5 m.

A confirmação de que não existe estrutura espacial entre os indivíduos que compõem cada fragmento pode ser confirmada pela análise dos parentescogramas, os quais representam a relação entre a distância geográfica média e o grau de parentesco F_{ij} (Loiselle et al., 1995) entre os indivíduos (Figura 13). A falta de estruturação espacial intrapopulacional permite discutir a eficiência dos métodos de dispersão usados por esta espécie. Como já foi relatado por Pizo & Oliveira, (1998) que os principais agentes dispersores de polens são mariposas, é interessante pensar que estes agentes têm um comportamento de percorrer baixas distâncias até polinizar outra árvore de *C. canjerana*. Provavelmente, os pequenos mamíferos relacionados com a dispersão de sementes, possuem dispersão limitada pela fragmentação ambiental e pelas características do relevo local. Assim, é possível supor que mesmo com elevada estruturação genética do pool de polens, a dispersão de semente acontece de maneira mais abrangente dentro do próprio fragmento, podendo acontecer também entre fragmentos. Geralmente, em espécies onde o sistema de dispersão de polens e semente acontece pelo vento, à estrutura genética espacial é fraca, como é o caso de *T. papyrus* no Cerrado brasileiro (Collevatti et al., 2010). A Figura 13 mostra os parentescogramas para os sete fragmentos de *C. canjerana* analisados.

O alcance de dispersão dos polens variando de 70 a 208 metros dentro das populações analisadas pode ser outro fator que explique a falta de estruturação genética espacial intrapopulacional dos indivíduos adultos, uma vez que os polens produzidos num fragmento fecundam matriz existentes no mesmo fragmento. Ou seja, devido às características do relevo local e a fragmentação ambiental, o fluxo gênico via dispersão de

polens e semente está concentrada dentro dos fragmentos e não possui um padrão de ocorrência, corroborando com a falta de estrutura genética espacial dos indivíduos adultos de *C. canjerana*, nestes fragmentos florestais de Mata Atlântica.

É interessante discutir que a fragmentação pode reduzir o tamanho populacional e aumentar o grau de isolamento entre as populações favorecendo uma forte estruturação genética espacial e alterando pouco a taxa de fluxo gênico. Wang et al. (2011) fizeram um ótimo estudo ao comparar a SGS intrapopulacional e os níveis de fluxo gênico antes e depois da fragmentação de uma região florestal da China, para populações de *Castanopsis sclerophylla*, uma espécie arbórea, da família das Fagaceae em que todo o gênero é nativo do sudeste asiático. Encontraram um aumento elevado da estrutura genética espacial causada pela fragmentação (antes da fragmentação: $S_p = -0,0033$; depois da fragmentação: $S_p = 0,011$) e pouca alteração nos níveis de dispersão de pólen mediado pelo vento.

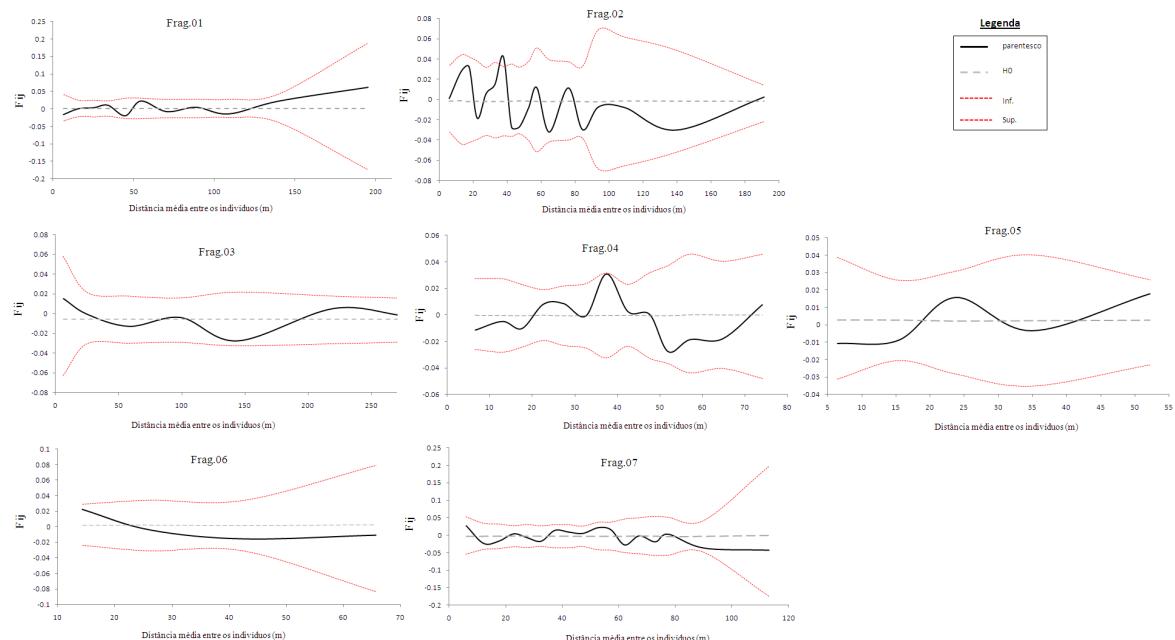


Figura 13. Relação entre o parentesco (F_{ij}) e a distância geográfica em metros para os indivíduos dos sete fragmentos florestais analisados.

Uma nova abordagem da estrutura genética na paisagem geográfica pode ser conduzida usando métodos e teorias novas. Manel et al. (2003) deixam muito claro a importância da genética de paisagem na compreensão detalhada de como a geografia e o meio ambiente influenciam a estrutura genética espacial das populações de uma espécie e o quanto esta abordagem apresenta implicações ecológicas, evolutivas e conservacionistas

importantes. Com a intenção de perceber o padrão genético das populações de *C. canjerana* na paisagem da APA Fernão Dias, a Figura 14 mostra a probabilidade das populações pertencerem aos dois grupos, como sugerido pela análise do Structure. Cada ponto no gráfico significa um conjunto de indivíduos, ou seja, um fragmento amostrado. Percebe-se que, no Grupo A as probabilidades maiores (cerca de 90%), representado pela cor branca estão localizadas justamente onde se encontram as populações que pertencem a este grupo (fragmentos 01, 02, 03 e 04). Ainda na representação do Grupo A, percebe-se que as outras populações aparecem plotadas no gráfico na região de cor vermelha, que indica baixa probabilidade daquelas populações fazerem parte de Grupo A. Na representação do Grupo B, o cenário é inverso, os fragmentos (05, 06 e 07) que realmente fazem parte deste grupo estão representados pela cor branca, enquanto os fragmentos mais ao norte possuem baixa probabilidade de pertencerem a este grupo, justamente porque fazem parte do Grupo A. A representação destes dois grupos é fiel a real localização deles no espaço geográfico (Figura 4).

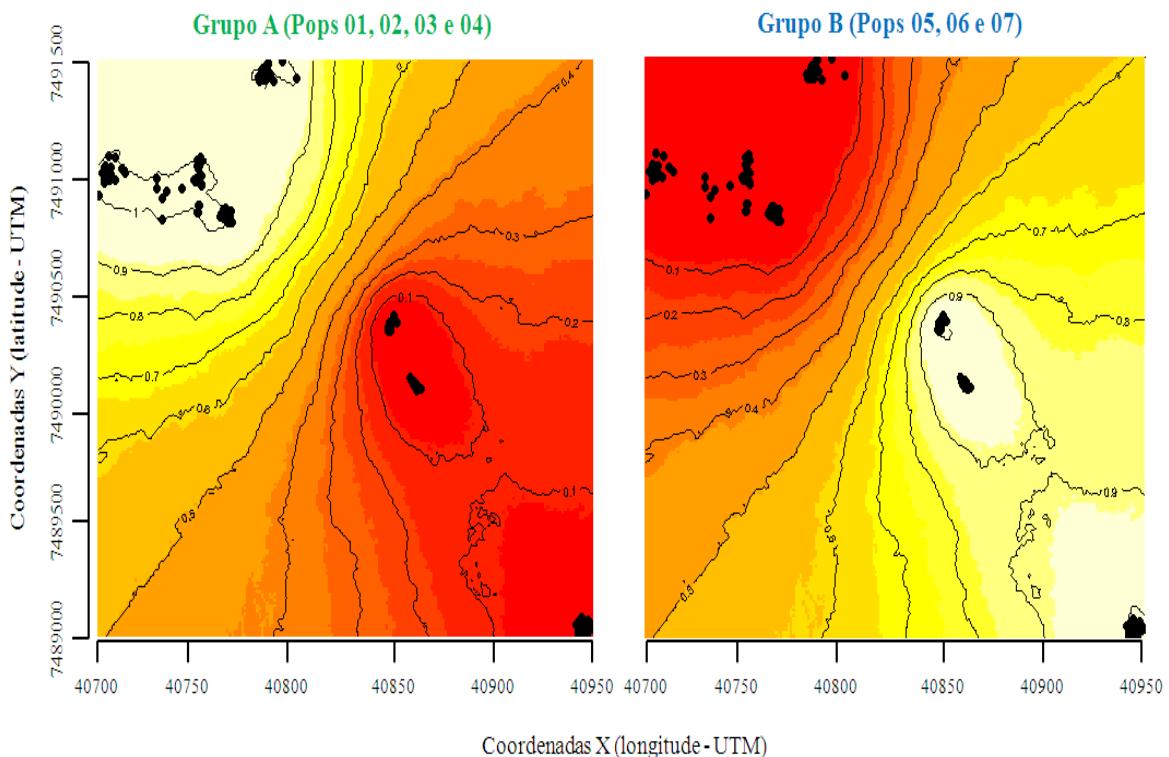


Figura 14. Gráfico gerado pelo Geneland (Guillot et al., 2005b), com a probabilidade de cada membro das sete populações amostradas pertencerem aos subgrupos pré definidos pela análise do Structure.

5 CONCLUSÕES

- Os indivíduos que formam as populações remanescentes dos oito fragmentos florestais de *Cabralea canjerana* da APA Fernão Dias, detêm de uma elevada variabilidade genética.
- Existe uma tendência, para as maiores populações de *C. canjerana* da APA Fernão Dias, apresentarem elevados índices de diversidade genética. Os fragmentos maiores são também os fragmentos situados em regiões mais elevadas, portanto há mais diversidade genética nos contínuos florestais localizados acima de 1800 metros de altitude.
- De acordo com o código florestal brasileiro, áreas situadas acima de 1800 metros de altitude são consideradas Áreas de Preservação Permanente (APPs), e com este estudo fica claro a importância destas áreas na manutenção da variabilidade genética existente dentre e entre as populações. Portanto, na discussão do novo código florestal brasileiro, estas áreas deixariam de ser APPs e estes dados mostram que a manutenção destas áreas é de extrema importância como medida eficiente de preservação ambiental.
- Os valores multilocos de $\Theta = 0,131$ e $R_{ST} = 0,198$ mostraram uma estruturação genética moderada entre os oito fragmentos de *C. canjerana*. Os quais, através de uma análise Bayesiana dos dados, foram estruturados em dois grandes grupos: Grupo **A**, formado pelos fragmentos 01, 02, 03 e 04 e Grupo **B**, formados pelos fragmentos 05, 06, 07 e 08. Dentro do Grupo **B**, a composição genética do fragmento 08 diverge das outras populações.

- As estimativas indiretas de fluxo gênico indicam que há mais fluxo gênico dentro destes grupos do que entre eles e os fragmentos do Grupo A estão mais conectados devido à menor variação do relevo existente na região destes fragmentos.
- Os fragmentos que formam o Grupo A sofrem maiores consequências genéticas negativas devido à fragmentação ambiental e necessitam de maiores atenções dos programas de conservação.
- As análises de dispersão de pólen mostram uma elevada estruturação da nuvem de polens que fecundam as matrizes ($\Phi_{FT} = 0,150$) indicando que o fluxo gênico via dispersão de polens está concentrado dentro dos fragmentos. Isso mostra a limitação de vôos de mariposas da ordem Lepidóptera, durante a polinização, devido à fragmentação ambiental e às características do relevo. O alcance médio destes polens dentro do fragmento é de 130 metros, enquanto que o tamanho efetivo da população de doadores de polens é de aproximadamente três indivíduos.
- Há uma elevada e significativa estruturação genética espacial entre as oito populações ($r = 0,836$, p -valor < 0,001), o que pode indicar que os agentes de dispersão de sementes (aves e morcegos) conseguem dispersar genes entre os fragmentos.
- Não existe estruturação dos genótipos no espaço geográfico quando são avaliados fragmentos individuais. A estatística que mede a força da SGS intrapopulacional teve seu valor de $Sp = -3,67 \cdot 10^{-4}$. Este fato pode ser explicado pela concentração de fluxo gênico via dispersão de sementes e polens, dentro dos fragmentos. Não existe um padrão de relação dos indivíduos mais parentados estarem mais próximos geograficamente.
- O fluxo gênico ainda é uma importante força evolutiva atuante nestas populações e sua manutenção seguramente depende da preservação da Área de Preservação Ambiental (APA) Fernão Dias. A eficiência das estratégias de conservação da biodiversidade *in situ* pode ser comprovada para as populações de *C. canjerana* analisadas neste estudo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUARI. **Ações sociais para a preservação de fragmentos florestais na bacia do Rio Camanducaia.** Camanducaia: PROBIO/MMA, 2001. 40 p.

ANDERSON, M. J.; WILLIS, T. J. Canonical analysis of principal coordinates: a useful method of constrained ordination for ecology. **Journal of Ecology**, London v. 84, p.511-525, 2003.

ANGIOSPERM PYLOGENY GROUP II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Kew, v. 141, p. 399-436, 2003.

ASHWORTH, L.; AGUILAR, R.; GALETTO, L.; AIZEM, M. A. Why do pollination generalist and specialist plant species show similar reproductive susceptibility to habitat fragmentation? **Journal of Ecology**, London, v. 92, p. 717-719, 2004.

AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P. Two-Generation analysis of pollen flow across a landscape. II. Relation between Φ_{FT} , pollen dispersal and interfemale distance. **Genetics**, Baltimore v.157, p. 851-857, 2001.

AUSTERLITZ, F.; DICK, C. W.; DUTECH, C.; KLEIN, E. K.; ODDOU-MURATORIO, S.; SMOUSE, P.; SORK, V. L. Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 937-954, 2004.

AVISE, J. C. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 11, p.665-669, 2010.

BARREIROS, H. D. S.; SOUZA, D. S. E. Notas Geográficas e Taxonômicas sobre *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. no Brasil (Meliaceae). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 46, p.17-26, 1986.

BALLOUX, F.; MOULIN, N. L. The estimation of population differentiation with microsatellite marker. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 155-165, 2002.

BALLOUX, F.; GOUDET, J. Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 771-783, 2002.

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

BORN, C.; HARDY, O. J.; CHEVALLIER, M. H.; OSSARI, S.; ATTÉKÉ, C.; WICKINGS, E. J.; HOSSAERT-MCKEY, M. Small-scale spatial genetic structure in the

Central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. **Molecular Ecology**, Oxford, v.17, p. 2041-2050, 2008.

CABALLERO, A.; RODRÍGUEZ-RAMILO, S. T.; ÁVILA, V.; FERNÁNDEZ, J. Management of genetic diversity on subdivided populations in conservation programmes. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 11, p. 409 – 419, 2010.

CARMO, R. M. **Biologia reprodutiva de *Cabralea canjerana* ssp. *canjerana* e a influência do tamanho do fragmento florestal no sucesso reprodutivo e diversidade genética**. 2005. 108 f. Tese (Doutorado em Ecologia)– Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

CARNEIRO, M. R. B. **A flora medicinal do Centro Oeste do Brasil: Um estudo de caso com abordagem etnobotânica em campo limpo de Goiás**. 2009. 243f. Dissertação (Mestrado em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente). UniEvangélica. Anápolis, 2009.

CLOUTIER, D.; HARDY, O. J.; CARON, H.; CIAMPI, A. Y.; DEGEN, B.; KANASHIRO, M.; SCHOEN, D. J. Low inbreeding and high pollen dispersal distances in populations of two Amazonian Forest tree species. **Biotropica**, Zurich, v. 39, n. 3, p. 406-415, 2007.

CONTE, R.; NODARI, R. O.; VENCOVSKY, R.; REIS, M. S. Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, London, v. 91, n. 4, p. 401-406, 2003.

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

COCKERHAM, C. C. Analysis of gene frequencies. **Genetics**, Baltimore, v. 74, p. 679-700, 1973.

COELHO, A.S.G. BOOD: Avaliação de dendrogramas baseada em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Versão 3.0, Goiânia, Universidade Federal de Goiás, 2001.

COLLEVATTI, R. G.; LIMA, J. S.; SOARES, T. N.; TELLES, M. P. C. Spatial Genetic Structure and life history traits in Cerrado tree species: Inferences for conservation. **Natureza & Conservação**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 54-59, 2010.

DAWSON, K. J.; BELKHIR, K. A Bayesian approach to the identification of panmictic populations and the assignment of individuals. **Genetic Research**, Raleigh, v. 78, p. 59-77, 2001.

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

EL MOUSADIK, A.; PETIT, R. J. Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, p. 547-555, 1996.

- EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, n.4, p.23-29, 1996.
- ENNOS, R. A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, London, v.72, p.250-259, 1994.
- ESTOUP, A.; ROUSSET, F.; MICHALAKIS, J. M.; CORNUET, M. A. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 339-353, 1998.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v.14, p. 2611–2620, 2005.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. **Genetics**, Baltimore, v.131, p. 479–491, 1992.
- EWERS, R. M.; DIDHAM, R. K. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. **Biological Reviews**, Oxford, v. 81, p. 117-142, 2006.
- FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 34, p. 487-515, 2003.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. **Genetics**, Baltimore, v. 164, p. 1567–1587, 2003.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 574-578, 2007.
- FOULLEY, J. L.; OLLIVIER, L. Estimating allelic richness and its diversity. **Livestock Science**, Tjele, v. 101, p. 150–158, 2006.
- FOURNET, A.; ROJAS, A. A.; CHARLES, B.; BRUNETON, J. Chemical constituents of essential oils of Muña, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas disease vectors. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v.52, p.145-149, 1996.
- FRANCESCHINELLI, E. V.; KESSELI, R. Population structure and gene flow of the Brazilian shrub *Helicteres brevispira*. **Heredity**, London, v. 82, p. 355-363, 1999.
- FRANCESCHINELLI, E. V.; VASCONCELOS, G, M. P.; LANDAU, E. C.; ONO, K, Y.; SANTOS, F. A. M. The genetic diversity of *Myrciaria floribunda* (Myrtaceae) in Atlantic forest fragments of different size. **Journal of Tropical Ecology**, Winchelsea, v. 23, p. 361-367, 2007.
- FRANKHAM, R. Conservation Genetic. **Annual Review of Genetics**, Madson, v.29, p.305-327, 1995.

FREIRE, J. M.; RODRIGUES, F. C. M. P.; LIMA, E. R.; SODRÉ, S. R. C.; CORRÊA, R. X. Estrutura genética de populações de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (guapuruvu) por meio de marcadores RAPD. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n. 74, p.27-35, 2007.

FURCHES, M. S.; WALLACE, L. E.; HELENURM, K.; High genetic divergence characterizes populations of the endemic plant *Lithophragma maximum* (Saxifragaceae) on San Clement Island. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 10, p. 115-126, 2009.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2^a. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631 p.

FUZETO, A. P.; LOMÔNACO, C. Potencial plástico de *Cabralea canjerana* subsp. *polytricha* (Adr. Juss.) Penn. (*Meliaceae*) e seu papel na formação de ecótipos em áreas de cerrado e vereda, Uberlândia, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.23, n.2, p. 169-176, 2000.

FUZETO, A. P.; BARBOSA, A. A. A.; LOMÔNACO, C. *Cabralea canjeranna* subesp. *polytricha* (Adri. Juss.) Penn. (*Meliaceae*), uma espécie dióica. **Acta botânica brasileira**, Feira de Santana, v. 15, n.2, p.167-175, 2001.

GAGGIOTTI, O. E.; LANGE, O.; RASSMANN, K.; GLIDDON, C. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 1513-1520, 1999.

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

GONÇALVEZ, A. C.; REIS, C. A. F.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Estrutura genética espacial em populações naturais de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae) na região norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 325 – 332, 2010.

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

GOUDET, J. FSTAT: a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices Versão 2.9.3, 2001. Disponível em <<http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>>. Acesso em: 15 de setembro de 2010.

GOUDET, J.; RAYMOND, M. de MEEDS, T.; ROUSSET, F. Testing differentiation in diploid population. **Genetics**, Baltimore, v. 144, p. 1933-1940, 1996.

GOUVÊA, C. F. **Estudo do desenvolvimento floral em espécies arbóreas da família Meliaceae**. 2005. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências: Biologia na Agricultura e no Meio Ambiente)– Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

GUILLOT, G.; ESTOUP, A.; MORTIER, F.; COSSON, J. F. A spatial statistical model for landscape genetics. **Genetics**, Baltimore, v. 170, p.1261– 1280, 2005a

- GUILLOT, G.; MORTIER, F.; ESTOUP, A. GENELAND: a computer package for landscape genetics. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, p. 712–715, 2005b.
- HAIG, S. M. Molecular contributions to Conservation. **Journal of Ecology**, London, v.79, n.2, p.413-245, 1998.
- HAMILTON, M. B.; MILLER, J. R. Comparing relative rates of pollen and seed gene flow in the island model using nuclear and organelle measure of population structure. **Genetics**, Baltimore, v. 162, p. 1897-1909,2002.
- HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, p. 618-620, 2002.
- HARDY, O. J.; CHARBONNEL, N.; FRÉVILLE, H.; HEUERTZ, M. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. **Genetics**, Baltimore, v. 163, p. 1467–1482, 2003.
- HARDY, O. J.; MAGGIA, L.; BANDOU, E.; BREYNE, P.; CARON, H.; CHEVALLIER, M. H.; DOLIGEZ, A.; DUTECH, C.; KREMER, A.; LATOUCHE-HALLÉ, C.; TROISPOUX, V.; VERON, V.; DEGEN, B. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 559-571, 2006.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4^a ed. Editora Artmed: Porto Alegre, 2010.
- HOLSINGER, K. E.; WEIR, B. S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . **Fundamental Concepts in Genetics**, London, v. 10, p. 639-650, 2009.
- HURLBERT, S. H. The Nonconcept of Species Diversity: A Critique and Alternative Parameters. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 577-586, 1971.
- JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 1801-1806, 2007.
- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v.12, n.32, p.65-70, 1998.
- KALLINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p 1099-1006, 2007.
- KANG, M.; WANG, J.; HUANG, H. Demographic bottlenecks and low gene flow in remnant populations of the critically endangered *Berchemiella wilsonii* var. *pubipetiola* (Rhamnaceae) inferred from microsatellite markers. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 9, p. 191-199, 2008.

- KOURTI, A. Estimates of gene flow from rare alleles in natural populations of medfly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Bulletin of Entomological Research**, Cardiff, v. 94, p. 449–456, 2004.
- LARSEN, S. A.; KJAER, D. Pollen mediated gene flow in a native population of *Malus sylvestris* and its implications for contemporary gene conservation management. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 10, p. 1637-1646, 2009.
- LEBERG, P. L. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 2445-2449, 2002.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Versão 1.0, 2001. Disponível em <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>>. Acesso em: 15 de setembro de 2010.
- 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**, St. Louis, v. 82, p. 1420-1425, 1995.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1. ed. 1992. p. 239.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, p.65-95, 1984.
- MANEL, S.; SCHUWARTZ, M. K.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v.18, n. 4, p. 189-197, 2003.
- MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUUK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 639-655, 1998.
- MITCHELL, R. J.; MARSHALL, D. L. Nonrandom mating and sexual selection in a desert mustard: an experimental approach. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 85, n. 1, p. 48-55, 1998.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e campos sulinos**. Brasília, 2010. 46p.
- MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R.; VENCOVSKY, R. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 237-248, 1999.
- MOREIRA, R. G.; McCUALEY, R. A.; PALOMEC-CORTÉS, A. C.; FERNANDES, W. G.; OYAMA, K. Spatial genetic structure of *Coccoloba cereifera* (Polygonaceae), a critically endangered microendemic species of Brazilian rupestrian fields. **Conservation Genetic**, Dordrecht, v. 11, p. 1247–1255, 2010.

- MORITZ, C. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, London v.9, n.10, p.373-375, 1994.
- MOSCHETA, I. S.; SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M.; ROSA, S. M. Morfo-anatomia e aspectos da biologia floral de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae). **Acta Científica Venezolana**, Caracas, v.53, n.4, p. 239–244, 2002.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **The American Society of Naturalists**, Saint Louis, v. 106, n. 949, p. 283-292. 1972.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided population. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, San Diego, v. 70, n. 12, p. 3321–3323, 1973.
- NEIGEL, J. E. Is F_{ST} obsolete? **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 3, p. 167–173, 2002.
- NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraespecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 1143 – 1155, 2004.
- O'BRIEN, S. J. A role for molecular genetics in biological conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, San Diego, v. 91, p. 5748-5755, 1994.
- OLIVEIRA, V. B.; PAGLIA, A. P.; FONSECA, M.; GUIMARÃES, E. **RPPN e Biodiversidade: O papel das reservas particulares na proteção da biodiversidade da Mata Atlântica**. Belo Horizonte, 2010. 52 p.
- OHSAWA, T.; SAITO, Y.; SAWADA, H.; IDE, Y. Impact of altitude and topography on the genetic diversity of *Quercus serrata* populations in the Chichibu Mountains, central Japan. **Flora**, Neuwerk, v. 203, n. 3, p. 187-196, 2008.
- PÉREZ-FIGUEROA, A.; SAURA, M.; FERÁNDEZ, J.; TORO, M. A.; CABALLERO, A. METAPOP—a software for the management and analysis of subdivided populations in conservation programs. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v.10, p. 1097-1099, 2009.
- PETIT, R. J.; EL MOUSADI, A.; PONS, A. O. Identifying Populations for Conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, Gainesville, v.12, n.4, p. 844-855, 1998.
- PENNINGTON, T. D.; STYLES, B. D.; TAYLOR, D. A. H. Meliaceae. **Flora Neotropica**, New York, v.28, p. 235-244, 1981.
- PEREIRA, M. F.; BANDEIRA, L. F.; BLANCO, A. J. V.; COELHO, A. S. G.; CIAMPI, A. Y.; FRANCESCHINELLI, E. V. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Cabralea canjerana* (Meliaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 98, n. 1, p. e01- e03, 2011.
- PIZO, M. A.; OLIVEIRA, P. S. Interaction between ants and seeds of a nonmyrmecochorous neotropical tree, *Cabralea canjerana* (Meliaceae), in the Atlantic forest of southeast Brazil. **American Journal of Botany**, St. Louis, v.85, n.5, p.669–674, 1998.

- PIZO, M. A.; OLIVEIRA, P. S. Size and lipid content of nonmyrmecochorous diaspores: effects on the interaction with litter-foraging ants in the Atlantic rain forest of Brazil. **Plant Ecology**, Perth, v. 157, p. 37–52, 2001.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, Baltimore, v. 155, p. 945-959, 2000.
- R Core Development Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2011.
- RANNALA, B.; MOUNTAIN, J. L. Detecting immigration by using multilocus genotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, La Jolla, v. 94, p. 9197–9201, 1997.
- REEVES, P. A.; RICHARDS, C. M. Accurate inference of subtle population structure (and other genetic discontinuities) using principal coordinates. **PLoS ONE**, Melbourne, v.4, n.1, p. 1-11, 2009.
- RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity**, London, v. 88, p. 221-228, 2002.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J.; AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P. E. A New Method of Estimating the Pollen Dispersal Curve Independently of Effective Density. **Genetics**, Baltimore, v. 173, p. 1033–1045, 2006.
- ROHLF, J. F. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Versão 2.0, New York, 1998. Disponível em <<http://www.ExeterSoftware.com>>. Acesso em: 15 de setembro de 2010.
- ROSENBERG, N. A. Distruct: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 4, p. 137-138, 2007.
- ROUSSET, F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. **Genetics**, Baltimore, v. 145, p. 1219–1228, 1997.
- SAHYUN, S. A.; RUAS, E. A.; RUAS, C. F.; MEDRI, C.; SOUZA, J. R. P.; JOHANSSON, L. A. P. S.; MIRANDA, L. V.; RUAS, P. M. Genetic variability of three natural population of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) from Telêmaco Borda, Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Paraná, v. 53, n. 5, p. 1037-1042, 2010.
- SAUNDERS, D. A.; HOBBS, R. J.; MARGULES, C. R. Biological Consequences of Ecosystem Fragmentation: A Review. **Conservation Biology**, Gainesville, v. 5, n. 1, p. 18-32, 1991.
- SCHUSSLER, G. **Dinâmica populacional e aspectos de regeneração natural de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) em uma zona de contato entre as florestas ombrófilas montanas, RS**. 2006. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia)–Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

- SCHWARTZ, M. K.; LUIKART, G.; WAPLES, R. S. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 22, p. 25-33, 2006.
- SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, London, v. 106, p. 134-145, 2011.
- SHI, M. M.; MICHALSKI, S. G.; CHEN, X. Y.; DURKA, W. Isolation by elevation: genetic structure at neutral and putatively non-neutral loci in a dominant tree of subtropical forests, *Castanopsis eyrei*. **PLoS ONE**, Melbourne, v. 6, n. 6, p. 1-8, 2011.
- SHOEMAKER, J. S.; PAINTER, I. S.; WEIR, B.S. Bayesian Statistics in genetics: a guide for the uninitiated. **Trends in Genetics**, London, v.15, n. 9 p. 354-358, 1999.
- SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 16, p. 393-430, 1985.
- SLATKIN, M. Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. **Science**, Washington D. C., v. 236, 1987.
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Baltimore, v. 139, p. 457-462, 1995.
- SLOTTA, T. A. B.; BRADY, L.; CHAO, S. High throughput tissue preparation for large-scale genotyping experiments. **Molecular Ecology Resource**, Oxford, v. 8, p. 83-87, 2008.
- SMOUSE, P. E.; DYER, R. J.; WESTFALL, R. D.; SORK, V. L. Two-Generation Analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. **Evolution**, Lawrence, v. 55, n. 2, p. 260-271, 2001.
- SOARES, M. S.; SILVA, M. F.; FERNANDES, J. B.; VIERIA, P. C. Triterpeno e Limonídeos isolados dos frutos de *Cabralea canjerana*. In: XXVI REUNIÃO ANUAL SOBRE EVOLUÇÃO, SISTEMÁTICA E ECOLOGIA MICROMOLECULARES, p.23. Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2004.
- SOUSA, V. A.; SEBBENN, A. M.; HATTEMER, H.; ZIEHE, M. Correlated mating in populations of a dioecious Brazilian conifer, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 12, p. 107-119, 2005.
- SPENCER, C. C.; NEIGEL, J. E.; LEBERG, P. L. Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 1517-1528, 2000.
- STORFER, A. Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. **Conservation Biology**, Gainesville, v. 87, p. 173-180, 1999.
- SUGG, D. W.; CHESSER, R. K. Effective population size with multiple paternity. **Genetics**, Baltimore, v. 137, p. 1147-1155, 1994.

- TEMPLETON, A. R.; ROUTMAN, E.; PHILLIP, C. A. Separating Population Structure from Population History: A Cladistic Analysis of the Geographical Distribution of Mitochondrial DNA Haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Genetics**, Baltimore, v. 140, p. 767-782, 1995.
- TEMPLETON, A. R. Nested Clade Analysis of Phylogeographic data: testing hypothesis about gene flow and population history. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, v. 381-397, 1998.
- TEMPLETON, A. R. **Population Genetics and Microevolutionary Theory**. A John Wiley & Sons., Inc., Publication: USA, 2006. 716 p.
- VALDES, A. M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N. B. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. **Genetics**, Baltimore, v. 133, n. 3, p. 737-749. 1993.
- VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 921-935, 2004.
- VENCOVSKY, R. CHAVES, L. J.; CROSSA, J. Variance effective population size for dioecious species. **Crop Science**, Madson, v. 52, p. 79- 90, 2012.
- YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 11, n. 10, p. 413-418, 2001.
- YOUNG, A. G.; BOYLE, T. J. B. Forest Fragmentation. In: YOUNG, A. G & BOYLE, T. J. B.; BOSHIER, D. (Ed.). **Forest Conservation Genetics – Principles and Practice**. Wallingford, 2000, v.1, cap.10, p. 456-481.
- WAGNER, H. W.; SEFC, K. M. Identiy 1.0: Freeware program for the analysis of microsatellite data. 1999. Disponível em <<http://www.uni-graz.at/~sefck/>>. Acesso em: 15 de setembro de 2011.
- WANG, J.; KANG, M.; GAO, P.; HUANG, H. Contemporary pollen flow and mating patterns of a subtropical canopy tree *Eurycorymbus cavaleriei* in a fragmented agricultural landscape. **Forest Ecology and Management**, Victoria, v. 260, p. 2180-2188, 2010.
- WANG, R.; COMPTON, S. G.; CHEN, X. Y. Fragmentation can increase spatial genetic structure without decreasing pollen-mediated gene flow in a wind-pollinated tree. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, p. 4421-4432, 2011.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lawrence, v. 38, p. 1358–1370, 1984.
- ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p. 449-457, 2003.

ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; COUTO, M. A.; MORAIS, L. K.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 10, p. 975-980, 2005.

ANEXOS

Anexo A. Trinta e dois pares de primers de locos microssatélites para *Cabralea canjerana*. Tabela com as sequências *forward* (F) e *reverse* (R) dos primers, o *motif* de repetição e o número de acesso no Gene Bank. Em vermelho estão os primers utilizados no presente trabalho.

Primer	Sequência de nucleotídeos (5' → 3')		Motif de repetição	Acesso ao GeneBank
Ccan_01	F	AGACAACCTCTGTCTTCCGA	(AG)67	GQ254817
	R	TCCCCAAAAATCCAGTCAGC		
Ccan_02	F	CCAACAAATGCGTGCCTAAA	(AG)33GAGAAA(AG)42	GQ254818
	R	ATGCACGGACAAACAAATGC		
Ccan_03	F	AGCCTAGCTGGTCTGTCTTA	(AG)79	GQ254819
	R	GCCAATGGCTACTCTTTGT		
Ccan_04	F	TCTACTGGTTATGGCTGTGC	(CT)44TCTG(TC)39TCATG(TC)29	GQ254820
	R	TGGTTGTCGTGTAGTGAAA		
Ccan_05	F	CATATACAGCACCCCCACACC	(AG)40	GQ254821
	R	TGGGAAACTTGTCTGCATCC		
Ccan_06	F	CGCTCCCCAAAGTACTCAAG	(CT)42	GQ254822
	R	AGAGAGATTGTCGAGGTGGG		
Ccan_07	F	AGTTGAGTTCTGCCTTGA	(CT)47	GQ254823
	R	AAGCATGAGTCCATGGGTTG		
Ccan_08	F	GGTCAATCCATGTTCTCCA	(CT)79	GQ254824
	R	CTGCACGTGTGTAAAGAGT		
Ccan_09	F	TGTTGGCTCATCCATTGCT	(CT)60	GQ254825
	R	TGGAGGATCAGAGGGAGTTG		
Ccan_10	F	TCATGGGCGAATTCTACACG	(TC)15TGTG(TC)31	GQ254826
	R	GCAGTTGTCAGGAAGGTTGA		
Ccan_11	F	GCTCAGCAGCAACAAGAGTA	(CT)34	GQ254827
	R	CAATGGTCGGACATCTTCCC		
Ccan_12	F	CCTCACACCTCTTGTGCAT	(GA)54	GQ254828
	R	TCTTAGCTCTGTCCCCCTCC		
Ccan_13	F	GTGCAACTCTAGGCCATT	(AG)54	GQ254829
	R	CCTTGGCAACACCATTCTCT		
Ccan_14	F	TTTCCACTGCACCCTCCTA	(CT)44	GQ254830
	R	GAGCCTCGGGGGAGAGAG		
Ccan_15	F	CCTTGAGTCAAACATGCCCT	(TC)45	GQ254831
	R	AGCCATACAAACCTCTCCCT		
Ccan_16	F	AGAGGGGTAAAAGAGGGAGC	(GA)56	GQ254832
	R	GAAGCTTCAACCATCGGTAGG		
Ccan_17	F	GAGAAGAGAAGGCTGTGC	(CT)47	GQ254833
	R	GAAACCTGATTGTCGTCGT		
Ccan_18	F	GTGGTCCGAGGATCAAACA	(GA)26	GQ254834
	R	TGGGACGAAATGGAACCTTG		
Ccan_19	F	AGCCAAGCTGCTTTGGTAT	(AG)51	GQ254835
	R	AACACATGCATAGCCCACAA		
Ccan_20	F	TGAATTCCGAGCAGCTTGT	(CT)7C(CT)48	GQ254836
	R	ACGGAGGGAATGGTTGATTG		
Ccan_21	F	CGCAACAAGACAAAGCCAA	(GA)54	GQ254837
	R	TGGCAAGTTTAGCAGTGGT		
Ccan_22	F	GCCAAGATCCAGCTAATGCT	(GA)47	GQ254838
	R	GCTGTTGCCTCCCTAACT		
Ccan_23	F	TGCTATGTTGTTGTCTGCTG	(GA)43	GQ254839
	R	GTGTGCCACTTCCAGATCA		
Ccan_24	F	AGTGCAGTAAGTGACTTGGC	(GA)48	GQ254840
	R	CCTCTCTGAAACTGCGATGG		
Ccan_25	F	GTGACAGAGCGAGATTCCAT	(GA)47	GQ254841
	R	CCCCTTCAGCTCCAAAATGT		
Ccan_26	F	TCGAACCTCCACCAATTAC	(CT)54	GQ254842
	R	TTACTTCGAGGGAGGAGTGG		
Ccan_27	F	CCTCAATGGCTCCTCCTTG	(AG)54	GQ254843

Ccan_28	R	AGCATCACATCTCTCCCCTT		
	F	GAGAGATGCACACCTTGTCC	(GA)63	GQ254844
	R	TCGCATATTGCTCTCACACC		
Ccan_29	F	CTTGCATGGCAATCAAACC	(GA)26A(AG)32	GQ254845
	R	AGAAGGGCATACCAGGTTCT		
Ccan_30	F	TCAACGTAAGGAGATAGAGAGA	(GA)34	GQ254846
	R	TATTCGGCCTCAGACTTCAC		
Ccan_31	F	CTCCTCGTTGCCACTCATT	(CT)20	GQ254847
	R	AAACAGAGGGTTTCGGTGC		
Ccan_32	F	ATATAGCGCTGCTGATAACGC	(TC)37	GQ254848
	R	TCCATTGCAACTCATGGTCC		

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.