

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

**Importância da conservação *in situ* de *Copaifera langsdorffii* Desf. em  
remanescentes de cerrado de propriedades particulares rurais.**

**Renata Gabriela Villegas de Castro e Souza**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre  
em Ciências, Programa: Recursos Florestais. Opção em:  
Conservação de Ecossistemas Florestais

**Piracicaba  
2011**

Renata Gabriela Villegas de Castro e Souza  
Bacharel em Ciências Biológicas

**Importância da conservação *in situ* de *Copaifera langsdorffii* Desf. em remanescentes de cerrado de propriedades particulares rurais.**

Orientador:  
Prof. Dr.: **PAULO YOSHIO KAGEYAMA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa: Recursos Florestais. Opção em: Conservação de Ecossistemas Florestais

**Piracicaba  
2011**

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

Souza, Renata Gabriela Villegas de Castro e  
Importância da conservação *in situ* de *Copaifera langsdorffii* Desf. em remanescentes de cerrado de propriedades particulares rurais / Renata Gabriela Villegas de Castro e Souza. - Piracicaba, 2011.  
78 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.  
Bibliografia.

1. Cerrado 2. Diversidade genética 3. Marcador molecular 4. Áreas de conservação 5. Propriedade rural I. Título

CDD 634.97323  
S729i

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



**DEDICO**

A todos que, de alguma forma, participaram

desta importante etapa da minha vida,

especialmente à minha amada mãe, ao meu irmão e

ao meu companheiro Felipe.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda luz, proteção e saúde para vencer todos os obstáculos dessa caminhada.

À minha amada família! Minha mãe Elide e meu irmão Guilherme, sem o apoio de vocês não teria conseguido! Ao meu pai Paulo por todo o ensinamento e crescimento pessoal.

Ao Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama pela oportunidade, orientação e por proporcionar todo o crescimento profissional. Em especial, por me alertar sobre a importância da biodiversidade e da necessidade das políticas públicas para a conservação da mesma.

Ao pesquisador Roberto Tarazi por todo auxílio desde o princípio deste trabalho. Sua ajuda foi muito importante para mim! À Monita Tarazi por todo apoio.

Ao meu companheiro e amigo Felipe por todo amor dedicado, apoio, pela paciência, pelo companheirismo e palavras de incentivo! Te amo muito!

À Lia Maris Orth, minha amiga, pela grande ajuda em todas as etapas da minha dissertação, pelas nossas viagens divertidíssimas de coleta e tantas histórias. Obrigada!

Ao Prof. Flávio Gandara pelas sugestões, auxílio e apoio.

A toda equipe LARGEA – Paulo, Lia, Andréia, Elza, Bruna, Flávio, Carol, Roberto, Rebeca, Luana, Jessica, Giulia, Vinicius e Laís. Obrigada por todo apoio, principalmente a Maria Andréia Moreno pelos ensinamentos práticos de laboratório (pergunte 2 vezes, mas não faça errado!).

A todos aqueles que me auxiliaram nas coletas de campo: Chico, Eric, Vinicius, Lia, Felipe, Eurípides, Furlan, Bruna e Buza. Vocês foram demais!

À amiga do coração Larissa Andrade, pela força, apoio e conselhos, principalmente no início dessa etapa.

Aos amigos queridos: Thais (titi) vizinha e amigona querida, Sandro, Wellington, Miguel (Miguelito), Lilian, Caio, pessoal do LMQ ( Jú, Camila, Tito, Samuca, Isadora, Jaime, Edgar e Gabi).

A todos os meus amados amigos da UFLA e irmãs de república (Bel, Robertinha, Rafaela, Thaty, Micheli, Selmita e Aline).

Ao Instituto Florestal, pela permissão de coletas, especialmente, aos funcionários Gilson, Paulo, Furlan e Eurípides pelo auxílio nos trabalhos de campo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – financiamento do projeto.

A Capes pela bolsa de Mestrado.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Objetivos.....	15
1.2 Hipóteses .....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1 Copaifera langsdorffii Desf. ....	17
2.2 Importância econômica de C. langsdorffii Desf. ....	19
2.3 Cerrado .....	20
2.4 Fragmentação florestal: conseqüências genéticas e ecológicas. ....	23
2.5 Marcadores microsatélites.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Justificativa e escolha da espécie modelo para o estudo .....	29
3.2 Áreas de estudo e amostragem.....	29
3.2.1 Estação Ecológica de Assis.....	30
3.2.2 Propriedade Particular Rural de Assis .....	33
3.2.3 Estação Experimental de Itirapina.....	35
3.2.4 Propriedade Particular Rural de Brotas .....	37
3.3 Procedimentos laboratoriais.....	39
3.3.1 Extração de DNA e análise genética .....	39
3.3.2 Marcadores genéticos em Copaifera Langsdorffii .....	39
3.3.3 Amplificação dos locos microsatélites.....	40
3.4 Análises estatísticas.....	41

3.4.1 Análise da distribuição espacial .....	41
3.4.2 Análise da diversidade genética .....	42
3.4.3 Detecção de gargalos genéticos .....	42
3.4.4 Análise da estrutura genética espacial .....	42
3.4.5 Correções do índice de fixação para o efeito Wahlund .....	43
3.4.6 Tamanho efetivo populacional e área mínima viável para conservação .....	43
3.4.7 Fluxo gênico aparente.....	44
4 RESULTADOS.....	47
4.1 Aspectos demográficos.....	47
4.2 Diversidade genética de <i>C. langsdorffii</i> .....	48
4.3 Gargalos genéticos .....	52
4.4 Estrutura genética espacial .....	52
4.5 Correções do índice de fixação para o efeito Wahlund.....	54
4.6 Tamanho efetivo populacional e área mínima viável para conservação .....	55
4.7 Fluxo gênico aparente .....	57
5 DISCUSSÃO .....	59
5.1 Aspectos demográficos e estrutura genética espacial .....	59
5.2 Diversidade genética e parâmetros afins .....	60
5.3 Estrutura Genética e Fluxo Gênico .....	62
5.4 Implicações para a conservação.....	63
6 CONCLUSÕES .....	65
REFERÊNCIAS.....	67

## RESUMO

### **Importância da conservação *in situ* de *Copaifera langsdorffii* Desf. em remanescentes de cerrado de propriedades particulares rurais**

A espécie arbórea *Copaifera langsdorffii* foi utilizada como modelo de estudo para manutenção da estrutura demográfica, diversidade genética e do fluxo gênico aparente entre as Unidades de Conservação (UCs) e em propriedades particulares rurais (PPRs) no cerrado do Estado de São Paulo. Para tanto, utilizou-se oito locos microssatélites nucleares específicos de *C. langsdorffii*; e foram mapeados, mensurados e genotipados ao todo 400 indivíduos com DAP  $\geq 5$  cm em quatro áreas nas cidades de Assis, Itirapina e Brotas. Em Assis foram amostrados 100 indivíduos na Estação Ecológica de Assis (EEA) e 100 indivíduos em uma PPR a 13 km de distância da EEA. Em Itirapina 100 indivíduos foram amostrados na Estação Ecológica de Itirapina (EEI) e 100 indivíduos numa PPR em Brotas a 24 km de distância da EEI. As populações em propriedade particulares rurais e unidades de conservação apresentaram alta diversidade genética. Contudo as PPRs tiveram um número maior de alelos exclusivos do que as UCs, indicando que as populações nas PPRs necessitam urgentemente de planos de manejo para conservar esses alelos exclusivos que podem conferir às populações do cerrado vantagens adaptativas. Todas as populações apresentaram fraca estrutura genética espacial, porém significativa por volta de 20 m de distância, indicando uma dispersão restrita de sementes. Foi observado nas populações analisadas um alto índice de fixação que, provavelmente, deve-se à sobreposição de gerações. A estimativa do tamanho efetivo das populações sugere que tanto as UCs quanto as PPRs têm área mínima viável para a conservação *in situ* das respectivas populações. A divergência genética entre as populações foi alta segundo o estimador  $G_{ST}$  e o fluxo gênico aparente entre as UCs e PPRs foi baixo, sendo insuficiente para contrapor os efeitos da deriva genética. A alta porcentagem de alelos raros encontrados nas populações, provavelmente, evidencia o comprometimento das mesmas com a perda de diversidade genética, através da deriva genética. É fundamental a conservação de remanescentes de cerrado em áreas particulares rurais, para que seja mantida a manutenção do potencial evolutivo da espécie no longo prazo. A *C. langsdorffii* mostrou-se ser uma espécie eficiente para estudos comparativos em áreas de cerrado, provavelmente devido à sua ampla abrangência e alta densidade populacional.

Palavras-chave: Cerrado; Fragmentos; Copaíba; Diversidade genética; Fluxo gênico; Microssatélites



## ABSTRACT

### **Importance of *in situ* conservation of *Copaifera langsdorffii* Desf. in cerrado fragments of rural private properties**

The tree species *Copaifera langsdorffii* was used as a model for maintaining the population structure, genetic diversity and gene flow between Protected Areas (PAs) and Rural Private Properties (RPPs) in the cerrado of São Paulo State. For this purpose, eight nuclear microsatellite loci specific of *C. langsdorffii* were used, and altogether 400 individuals were mapped, measured and genotyped with DHB  $\geq 5$  cm in four areas in the municipalities of Assis, Itirapina and Brotas. In Assis, 100 individuals were sampled at the Assis Ecological Station (AES) and 100 individuals in a RPP 13 km away from the EEA. In Itirapina 100 individuals were collected at the Itirapina Ecological Station (IES) and 100 individuals in a RPP in Brotas 24 km away from the IES. The populations in RPPs and PAs showed high genetic diversity. However the RPPs had a greater number of exclusive alleles than the PAs, indicating that the populations of RPPs are in urgent need of management plans to conserve such alleles, which can confer to the populations of cerrado adaptive advantages. All populations showed weak spatial genetic structure, but significant around 20 m away, indicating a restricted dispersal of seeds. It was observed in the populations analyzed a high fixation rate which is probably due to the overlapping of generations. The estimated effective size of populations suggests that both PAs and RPPs have minimum viable area for *in situ* conservation of their populations. The genetic divergence among populations was high according to estimator  $G_{ST}$  and the apparent gene flow between PAs and RPPs was low, insufficient to counteract the effects of genetic drift. The high percentage of rare alleles found in populations probably demonstrates the compromising condition of the populations with loss of genetic diversity through genetic drift. The conservation of cerrado fragments in rural private properties is essential to ensure the evolutionary potential of species in the long term. *C. langsdorffii* proved to be an efficient species for comparative studies in cerrado areas, probably due to its wide coverage and high population density.

Keywords: Cerrado; Fragments; Copaiba; Genetic diversity; Gene flow; Microsatellites



## 1 INTRODUÇÃO

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando cerca de 2 milhões de km<sup>2</sup> do Brasil central, e apresenta uma biodiversidade extremamente rica (KLINK; MACHADO, 2005). A riqueza de espécies do Cerrado vem sendo utilizada por comunidades para a produção de alimentos, medicinais fitoterápicos e óleos essenciais de modo sustentável. Tal fato, aliado aos conhecimentos ecológicos e genéticos dessas espécies são fundamentais para encontrar alternativas de uso e conservação do cerrado, dado a rápida destruição deste bioma nas últimas décadas, cedendo lugar para extensas monoculturas, principalmente de soja, canaviais ou para pastagens (DURIGAN, 2003; KLINK; MACHADO, 2005). Dos 204 milhões de hectares originais, 39% já foram completamente destruídos e apenas 3,18% dos remanescentes estão protegidos e distribuídos entre 48 unidades de conservação federais, estaduais e municipais (BRASIL, 2006). Segundo Machado et al. (2004) pelo menos 20% das espécies endêmicas e ameaçadas permanecem fora dos parques e reservas existentes. No Estado de São Paulo o quadro é ainda mais alarmante, pois a área original do cerrado era de 14% do território e atualmente restam apenas 0,74%, distribuídos em pequenos fragmentos (KRONKA et al., 2005).

A fragmentação do habitat e o avanço das fronteiras agrícolas têm alterado a dinâmica populacional de muitas espécies do cerrado (DURIGAN, 2003). As conseqüências imediatas do desmatamento são redução da diversidade genética das espécies por deriva genética, a restrição do fluxo gênico e conseqüentemente o aumento da endogamia. A endogamia pode conduzir à fixação de alelos deletérios e à redução da adaptabilidade das espécies, principalmente as climáticas (COLLEVATTI; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 1999; YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996). Nas últimas décadas houve um crescente interesse em avaliar as conseqüências genéticas da fragmentação de habitats em espécies vegetais (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996). Essa preocupação tem provocado debates sobre a redução da diversidade genética, diminuição da adaptabilidade de populações e estratégias de conservação, as quais demandam informações sobre as espécies que compõe os ecossistemas (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; KAGEYAMA et al., 2003).

A execução de estudos genéticos populacionais para todas as espécies que constituem um ecossistema é inviável (BOYLE, 2000). Uma solução para impasse consiste na escolha de espécies que sirvam de modelo ou referência para estudos de conservação *in situ* do ecossistema. Espécies-modelo representam grupos de espécies com características comuns e que apresentam padrões ecológicos e

genéticos extrapoláveis para todo o grupo (KAGEYAMA et al., 2001). Essas espécies podem servir como indicadores de degradação ambiental, fragmentação e de outros impactos antrópicos. Existem alguns critérios a serem seguidos para a escolha da espécie-modelo, tais como: importância ecológica e econômica da espécie, especialização dos vetores de fluxo gênico, abrangência da espécie e densidade populacional (NAMKOONG et al., 2002).

A *C. langsdorffii* é uma espécie arbórea que apresenta as características indicadas por Namkoong et al. (2002) para espécies modelo. Árvore hermafrodita, a *C. langsdorffii* apresenta flores bissexuais e hercogâmicas, que apresenta sistema de reprodução misto (OLIVEIRA; CARVALHO; ROSADO, 2002). As sementes são muito apreciadas pelas aves e sua dispersão natural é barocórica (atua a força da gravidade), ocorrendo ainda por primatas, pela água e por formigas (PEDRONI; SANCHEZ; SANTOS, 2002; CARVALHO, 2003; CHRISTIANINI, 2007). Apesar da grande variedade de dispersores, a maior parte dos frutos é dispersa de forma restritiva, próximo à copa e distantes até 14 m do tronco (PEDRONI, 1995). Outro aspecto citado por Namkoong et al. (2002) para a identificação de espécies modelo é a grande amplitude de distribuição e alta densidade populacional. *C. langsdorffii* é uma espécie comum e encontra-se amplamente distribuída pelo cerrado (CARVALHO, 2003), possibilitando estudos comparativos inter-regionais.

Nesse contexto, através da escolha de espécies modelo torna-se imprescindível gerar informações relacionadas com a variabilidade genética dos poucos remanescentes do cerrado, principalmente no Estado de São Paulo. Assim, o presente trabalho visou conhecer a diversidade genética, a estrutura genética e o fluxo gênico aparente de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinioideae, Leguminosae) em remanescentes de cerrado localizados em propriedades particulares rurais (PPRs). No intuito de investigar a importância desses remanescentes de cerrado para a conservação da diversidade genética e manutenção do fluxo gênico entre as Unidades de Conservação (UCs) no Estado de São Paulo.

## 1.1 Objetivos

Este estudo teve como objetivo geral conhecer a importância dos remanescentes de cerrado em propriedades particulares rurais (PPRs) para a conservação da diversidade genética e manutenção do fluxo gênico aparente de *C. langsdorffii* entre as Unidades de Conservação (UCs) no Estado de São Paulo. Os objetivos específicos foram:

- Estimar, com auxílio de marcadores SSR, a diversidade genética e fluxo gênico aparente em propriedades particulares rurais (PPRs) e Unidades de Conservação (UCs).
- Utilizar a espécie *C. langsdorffii* como referência (modelo) para estudo da conservação genética no cerrado.
- Subsidiar políticas públicas para a conservação do cerrado no Estado de São Paulo, com base nas estimativas de diversidade genética e fluxo gênico.

## 1.2 Hipóteses

O presente trabalho teve como base as seguintes hipóteses:

- A diversidade genética em propriedades particulares rurais assemelha-se às das Unidades de Conservação.
- As PPRs são conectores genéticos para as UCs, mantendo um fluxo genético capaz de contrapor os efeitos gerados pela deriva e seleção.
- O fluxo gênico entre as Unidades de Conservação deve ser baixo, devido à distância geográfica entre essas unidades, apontando a importância das propriedades particulares rurais como Corredores Ecológicos.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Copaifera langsdorffii* Desf.

O gênero *Copaifera l.*, descrito por Linnaeus em 1762, possui 72 espécies nativas da região da América Latina e também da África Ocidental. Na América Latina, são encontradas espécies na região que se estende do México ao norte da Argentina, sendo que 16 dessas espécies são endêmicas do Brasil (ALENCAR, 1982; VEIGA JR.; PINTO, 2002). A *Copaifera langsdorffii* Desf., conhecida como copaíba ou pau d'óleo, pertence à família Caesalpiniaceae (Caesalpinioideae, Leguminosae) e é a espécie de maior ocorrência do gênero no Brasil, abrangendo latitudes de 2°32'S (Maranhão) a 24°50'S (Paraná) com uma ampla variação altitudinal de 50 m a 1.600 m. (Figura 1) (CORRÊA, 1984; LORENZI, 1992; CARVALHO, 2003).

A *C. langsdorffii* é uma árvore semicaducifolia, longeva, secundária tardia e apresenta grande plasticidade fenotípica. Na Floresta Ombrófila Densa, na idade adulta, pode atingir 35m de altura e 100 cm de DAP (diâmetro à altura peito) (KAGEYAMA; BIELLA; PALERMO, 1990; CARVALHO, 2003). No Cerrado, na Caatinga e nos Campos Rupestres, apresenta menor porte, podendo variar de 1,20 a 10 m de altura (Figura 2). A densidade natural de indivíduos lenhosos varia entre as diferentes regiões fitoecológicas (CARVALHO, 2003). No Cerrado do Estado de São Paulo, a densidade de indivíduos pode variar de 1 (GOMES; 2003) a 2126 ind.ha<sup>-1</sup> (DURIGAN; FILHO, 1995), de acordo com as diferentes fitofisionomias.



Figura 1 - Ocorrência natural de *Copaifera langsdorffii* no Brasil (em cinza). Fonte: Tarazi (2009)

Segundo Carvalho (2003), a espécie apresenta folhas compostas, alternas, paripinadas, com folíolos medindo 4 a 5 cm de comprimento e 2 a 3 cm de largura (Figura 2 b). As folhas novas, de tonalidade avermelhada, constituem elemento valioso para a identificação. As flores, de coloração branco-esverdeada, estão dispostas em inflorescência paniculadas, terminais e multiflorais (Figura 2 c). As pétalas são ausentes e o cálice é formado por quatro sépalas livres. Têm odor intenso, doce e suave desde a abertura, possuem néctar e são efêmeras apresentando senescência a partir do segundo dia (FREITAS; OLIVEIRA, 2002).



Figura 2 - *Copaifera langsdorffii* a) árvore adulta; b) folha; c) flores; d) fruto. Fonte: Valdir Dala Marta (2008)

A *C. langsdorffii* é uma árvore hermafrodita com flores bissexuais e hercogâmicas, que apresenta sistema de reprodução misto com até 8% de autofecundação (Figura 2 a) (OLIVEIRA; CARVALHO; ROSADO, 2002). A estratégia de florescimento é a cornucópia, padrão que produz uma grande quantidade de flores durante várias semanas e, desta maneira, atrai um amplo espectro de polinizadores potenciais. A melitofilia é a principal síndrome de polinização e os visitantes mais frequentes são *Apis mellifera*, *Scaptotrigona cf. depiles* e *Trigona spinipes* (CRESTANA;

KAGEYAMA, 1989; FREITAS; OLIVEIRA, 2002). A periodicidade da floração pode ser anual a supra-anual, com intervalos de dois a quatro anos (PEDRONI; SANCHEZ; SANTOS, 2002; CARVALHO, 2003).

A maturação e dispersão dos frutos de *C. langsdorffii* ocorrem na estação seca, enquanto que a germinação e o crescimento das plântulas ocorrem durante o período chuvoso, onde há uma abundância temporária de nutrientes e umidade (FREITAS; OLIVEIRA, 2002). Nessa espécie, o fruto é um legume unispermo, deiscente, elipsóide, com cerca de 4 cm de comprimento (Figura 2 d). Contém uma semente elipsóide, de coloração negra e brilhante, envolta por um arilo abundante e de coloração amarelo-aralajado (CARVALHO, 2003; GUERRA; FILHO; GALLÃO, 2006).

As sementes são muito apreciadas pelas aves tais como o tucano (*Ramphastos toco*, Rhamphastidae), a gralha-do-campo (*Cyanocorax cristatellus*, Corvidae) e o sabiá-laranjeira (*Turdus rufiventris*), que engolem o arilo e regurgitam a semente. Sua dispersão natural é barocórica (atua a força da gravidade), ocorrendo ainda por primatas, pela água e por formigas (PEDRONI; SANCHEZ; SANTOS, 2002; CARVALHO, 2003; CHRISTIANINI, 2007). Apesar da grande variedade de dispersores, a maior parte dos frutos é dispersa de forma restritiva, próximo à copa e distantes até 14 m do tronco (PEDRONI, 1995). As sementes são ortodoxas e apresentam dormência, por inibidor de germinação, pela presença de cumarina no tegumento (EIRA et al., 1992).

## **2.2 Importância econômica de *C. langsdorffii* Desf.**

O óleo de copaíba ou óleo-resina, produzido pelas árvores do gênero *Copaifera L.*, é um produto economicamente valioso. O óleo-resina bruto varia de transparente a opaco, de coloração variada desde o amarelo-pálido até o castanho claro dourado, apresenta certa viscosidade, forte odor de cumarina e sabor levemente amargo. Pode ser classificado quanto à sua coloração, turbidez e viscosidade. É insolúvel em água e parcialmente solúvel em álcool. Em contato com o ar, o óleo escurece e aumenta sua viscosidade e densidade (AZEVEDO, 2004).

O óleo-resina de cor vermelha, produzido pelas árvores *C. langsdorffii*, é utilizado como combustível caseiro, para a produção de diversos produtos na indústria de cosméticos, como inseticida, aditivos para vernizes e tintas (CARVALHO, 2003). Na medicina popular, as principais atividades relatadas são de antiinflamatório, cicatrizante, antitumoral e no tratamento de doenças respiratórias, (PAIVA et al., 1998; VEIGA JR.; PINTO, 2002).

Nessa espécie, a madeira apresenta densidade moderada, alta durabilidade e resistência ao ataque de organismos xilófagos. É indicada para construção civil e naval, para a produção de álcool e carvão (CARVALHO, 2003).

A *C. langsdorffii* é recomendada para a recuperação de áreas degradadas, principalmente em matas ciliares (KAGEYAMA; BIELLA; PALERMO, 1990; CARVALHO, 2003); para a apicultura, devido à grande produção de pólen e mel das suas flores, e para o paisagismo (CRESTANA; KAGEYAMA, 1989; LORENZI, 1992; CARVALHO, 2003).

Apesar da importância ecológica e econômica, a *C. langsdorffii* está na lista das espécies que correm perigo de extinção no Estado de São Paulo (CARVALHO, 2003).

### 2.3 Cerrado

As savanas representam uma comunidade vegetal associada às regiões tropicais, caracterizada pela codominância de espécies arbórea (lenhosas) e espécies herbáceas que variam em cobertura e densidade (SANKARAN et al., 2005). O cerrado, que ocupa a região do Brasil Central, é classificado como savana úmida e possui uma estrutura e composição própria, distinguindo-se de outras savanas por apresentar uma grande variabilidade de espécies lenhosas arbustivas e arbóreas (TROPPEMAIR, 2002).

Considerado o segundo maior bioma brasileiro, o cerrado ocupa uma área de 2 milhões de km<sup>2</sup> que está distribuída principalmente pelo Planalto Central e nas regiões consideradas periféricas, que abrangem os Estados do Maranhão, Piauí, Tocantins, São Paulo e Paraná (Figura 3) (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, 2009). Ocupando o equivalente a 24% do território nacional, o cerrado apresenta interfaces com os principais biomas da América do Sul (Amazônia, Pantanal, Caatinga e Mata Atlântica), resultando em ambientes contrastantes, como as interfaces entre cerrado e florestas tropicais úmidas e aquelas entre cerrado e caatinga (FELFILI; SCARIOT; SILVA, 2005).

O clima do cerrado é predominantemente tropical estacional com um regime de chuvas no verão. A precipitação anual varia entre 750 a 2000 mm, com média de anual de 1500 mm. Durante a estação das secas, os índices pluviométricos mensais reduzem-se bastante, podendo chegar à zero. As temperaturas médias são em torno de 23°C na região sul e 27°C na porção norte (KLEIN, 2002; BIZERRIL, 2004).

No geral, o relevo do cerrado é suave, com cerca de 50% de sua área situada em altitudes que

ficam entre 300 e 600 m acima do nível do mar e apenas 5,5% com altitudes além de 900 m (FELFILI; SCARIOT; SILVA, 2005). Os solos são profundos, porosos, bem drenados e sua maioria distróficos, ou seja, possuem pH baixo, ricos em ferro e alumínio e de baixa fertilidade (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997; KLINK; MACHADO, 2005)



Figura 3 - Distribuição do Cerrado no Brasil (em cinza). Fonte: World Wildlife Fund – WWF (2009)

Do ponto de vista hidrológico, no cerrado, além de encontrarem-se três das maiores bacias hidrográficas da América do Sul (Tocantins-Araguaia, São Francisco e Paraná), a região possui diversas nascentes de rios, conseqüentemente, importantes áreas de recarga hídrica, que contribuem para grande parte das bacias hidrográficas brasileiras. Assim, o cerrado contribui com 14% da produção hídrica superficial brasileira e possui grande importância na geração de vazão para a bacia do rio São Francisco, fundamental para o desenvolvimento da Região Nordeste, região freqüentemente assolada por secas (LIMA; SILVA, 2005).

O cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade. Detentor de uma das mais ricas floras dentre as savanas mundiais, o cerrado possui mais de 11.000 espécies de plantas catalogadas, sendo que 44% são endêmicas dessa área (IBAMA, 2009; MENDONÇA et al., 2008). Para as plantas herbáceas, o nível de endemismo pode chegar a mais de 70%, como é o caso das espécies da família Velloziaceae associadas aos campos rupestres (FILGUEIRAS, 2002). Quanto à diversidade faunística, o cerrado apresenta 837 espécies de aves; 67 gêneros de mamíferos, abrangendo 161 espécies, das quais 19 endêmicas; 150 espécies de anfíbios,

sendo 45 endêmicas; e 120 espécies de répteis, das quais 45 são endêmicas (IBAMA, 2009). No caso dos répteis, o nível de endemismo pode chegar a 38% do total de espécies (COLLI; BASTOS; ARAUJO, 2002).

O cerrado é notável também pela grande variação fisionômica, apresentando formas campestres, savânicas e florestais. As formações florestais, com predominância de espécies arbóreas e formação de dossel contínuo ou descontínuo, são representadas por Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão. As savanas, áreas com árvores e arbustos espalhados sobre um estrato gramíneo onde não há formação de dossel contínuo, são representadas por cerrado *stricto sensu*, Vereda, Parque de Cerrado e Palmeiral. Devido à sua complexidade, o cerrado *stricto sensu* pode apresentar quatro subtipos: cerrado denso, cerrado típico, cerrado ralo e cerrado rupestre. As formações campestres, com predomínio de espécies herbáceas e algumas arbustivas, são representadas por campo: sujo, limpo e rupestre (RIBEIRO; WALTER, 1998). Fatores como o pH, o teor de alumínio, a fertilidade e profundidade do solo, disponibilidade hídrica, frequência de queimadas e ações antrópicas podem influenciar na composição florística e na estrutura da vegetação (HENRIQUES, 2005).

Além dos aspectos ambientais, o cerrado tem grande importância social e cultural, representada por muitas populações humanas que sobrevivem de seus recursos naturais, incluindo etnias indígenas, quilombolas, ribeirinhos, babaçueiras, que, juntas, fazem parte do patrimônio histórico e cultural brasileiro, e detêm um conhecimento tradicional de sua biodiversidade. Mais de 220 espécies têm uso medicinal e mais de 10 tipos de frutos comestíveis são regularmente consumidos pela população local e vendidos nos centros urbanos, como os frutos do Pequi (*Caryocar brasiliense*), Buriti (*Mauritia flexuosa*), Cagaita (*Eugenia dysenterica*) e as sementes do Barú (*Dipteryx alata*) (BRASIL, 2009).

Apesar de sua grande importância ecológica e cultural, o processo de ocupação do cerrado, sobretudo nos últimos cinquenta anos, provocou uma perda de pelo menos 55% da cobertura vegetal nativa, tornando-o a savana mais ameaçada do Planeta e um dos 34 *hotspots* mundiais (MACHADO et al., 2004). Aspectos como topografia favorável à mecanização, proximidade de centros consumidores e exportadores, risco nulo de salinização do solo, possibilidade de irrigação e grande extensão territorial, apontam a região do cerrado como uma das de maior potencial agrícola do país (KER; RESENDE, 1996; LANDERS, 2000).

No cenário agrícola nacional e mundial dos últimos 5 anos, o cerrado tem recebido enorme destaque por abrigar 41% dos 163 milhões dos bovinos do rebanho nacional e é responsável por 43% da produção nacional de soja, milho, arroz e feijão; dos 35 milhões de toneladas de soja produzidos no

país, 18 milhões escoam do Cerrado. As pastagens cultivadas abrangem 50 milhões de hectares (EMBRAPA, 2009).

As transformações ocorridas no cerrado trouxeram grandes danos ambientais, tais como fragmentação de habitats, perda da diversidade genética, extinção da biodiversidade, invasão de espécies exóticas, erosão dos solos, poluição de aquíferos e alterações nos regimes de queimadas (KLINK; MOREIRA, 2002). Embora seja um ecossistema adaptado ao fogo, as queimadas utilizadas para estimular a rebrota das pastagens alteram o regime natural de incêndios no cerrado, provocando a perda de nutrientes, a compactação e a erosão dos solos, um problema grave que atinge enormes áreas (MIRANDA; SATO, 2005). Apenas 6.233.193,73 ha ou 3,18% do cerrado estão protegidos em 48 unidades de conservação federais, estaduais e municipais (MMA, 2006). Cerca de pelo menos 20% das espécies endêmicas e ameaçadas do bioma permanecem fora das unidades de conservação existentes (MACHADO et al., 2004).

No Estado de São Paulo, a devastação do cerrado segue em índices alarmantes. O cerrado, que originalmente correspondia a 14% do território estadual, atualmente ocorre sob a forma de fragmentos isolados, o que corresponde apenas a 0,74% da superfície estadual (KRONKA et al., 2005). Segundo Metzger e Rodrigues (2008), somente 0,51% do cerrado original do estado está protegido na forma de unidades de conservação de proteção integral (UCs). Neste sentido, a conservação da maior parte dos remanescentes de cerrado do estado de São Paulo está sujeita aos interesses do setor privado, o que define uma situação de fragilidade para estes remanescentes (SMA/PROBIO-SP, 1997).

No estudo realizado por Durigan; Siqueira; Franco (2007) foi verificado que as ameaças mais frequentes no entorno de 81 fragmentos de cerrado no Estado de São Paulo foram: gramíneas invasoras (35% das áreas parcial ou totalmente invadidas), presença de gado (32%), desmatamento (21%) e fogo (21%). No Estado de São Paulo, as áreas de cerrado estão sendo substituídas principalmente por canaviais, enquanto que, em outros estados do núcleo do Cerrado, a soja tem sido a principal causa do seu desmatamento (KRONKA et al., 2005; DURIGAN; FRANCO; SIQUEIRA, 2007).

#### **2.4 Fragmentação florestal: conseqüências genéticas e ecológicas.**

O processo da fragmentação florestal e da perda de habitat é reconhecido atualmente como a maior ameaça à biodiversidade (MYERS et al., 2000). Os fragmentos florestais são remanescentes de florestas contínuas que foram reduzidas e isoladas espacialmente através da atividade antrópica

(YOUNG; BOYLE, 2000). A fragmentação florestal modifica o tamanho e a conectividade dos remanescentes florestais, provocando o aumento da área de borda desses fragmentos (AIZEN; FEINSENGER, 1994). A borda de um fragmento florestal sofre fortes influências do ambiente ao seu redor, o que acarreta em modificações físicas e estruturais em sua porção marginal. Assim, as conseqüências do “efeito de borda” no fragmento florestal incluem: mudanças na composição e estrutura da vegetação; alteração do ciclo de nutrientes, da temperatura e da umidade; mudanças nas interações das espécies, como predação, parasitismo, competição, herbivoria, polinização e dispersão de sementes (MURCIA, 2005).

Do ponto de vista genético, nas populações remanescentes que sofreram o processo de gargalo genético (“bottleneck”) pode ocorrer a perda imediata do número de alelos devido à redução do tamanho da população (CASCANTE et al., 2002). Em longo prazo, contínua fixação de alelos devido à deriva genética aleatória e, conseqüentemente, a perda da diversidade genética (BARRET; KOHN, 1991). Populações de plantas em ambientes fragmentados tendem a apresentar um aumento na taxa de autofecundação e de cruzamentos entre indivíduos aparentados, conseqüentemente eleva-se a endogamia e divergência genética interpopulacional (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996).

A endogamia biparental é mais freqüente quando as populações são pequenas ou quando exibem estrutura genética espacial. Esta estrutura é desenvolvida quando a dispersão de pólen e semente é restrita (ELLSTRAND; ELAN, 1993). A endogamia é prejudicial para as plantas que apresentam fecundação cruzada, pois aumenta a probabilidade de alelos deletérios estarem em homozigose, contribuindo para a depressão endogâmica (CHEPTOU; SHOEN, 2007). Desse modo, a endogamia reduz a heterozigosidade e a capacidade de adaptabilidade dessas espécies e, conseqüentemente, aumenta a probabilidade de extinção (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996; REED, 2005).

Remanescentes florestais pequenos, isolados e com acentuado efeito de borda, podem influenciar direta ou indiretamente na dispersão de pólen e de sementes. A visitação de polinizadores torna-se restrita em ambientes fragmentados, reduzindo a produção de frutos em comparação com ambientes não fragmentados (AIZEN; FEINSENGER, 1994). Árvores isoladas, porém na presença de seus agentes polinizadores, tendem a apresentar um aumento na distância de dispersão de pólen e na dominância de poucos doadores de pólen. Este processo pode acarretar, no futuro, a perda da diversidade genética e o aumento da estrutura genética espacial intrapopulacional (FUCKS; LOBO;

QUESADA, 2003; HANSON et al., 2008).

A diversidade genética garante às espécies um alto potencial adaptativo para tolerar os efeitos gerados pelas estocasticidades ambientais e é a base para programas de conservação genética (GEBUREK, 2000). Segundo Kageyama (1987), estudos genéticos visando o entendimento da estrutura genética das espécies existentes nos fragmentos florestais remanescentes são fundamentais para a escolha correta das estratégias de manejo e conservação a serem adotados. Neste contexto, diversos estudos relacionados com a conservação genética de espécies do cerrado apontam que a degradação e fragmentação do bioma provocada por atividade antrópica, possivelmente, causaram a redução da variabilidade genética das espécies e a restrição do fluxo gênico. Conseqüentemente, este processo pode resultar na redução na adaptabilidade de populações remanescentes e na extinção das espécies no habitat. Esse acúmulo de dados vem indicando algumas direções importantes como referência para as ações de minimização dos impactos ambientais nesse ecossistema (COLLEVATTI et al., 1999; LACERDA et al., 2001; VENCOVSKY, 1987; ZUCCHI et al., 2005; TARAZI et al., 2010).

## 2.5 Marcadores microssatélites

Marcadores microssatélites são conhecidos também como STR (*Short Tandem Repeat*) ou SSR (Sequências Simples Repetidas) e foram descritos pela primeira vez por três diferentes grupos de autores no ano de 1989: Litt e Luty (1989); Weber e May (1989); Tautz (1989). Os microssatélites são pequenas seqüências de um a seis nucleotídeos de comprimento, repetidos em série (*tandem*) e são amplamente distribuídos pelo genoma da maior parte dos eucariotos, tanto em regiões codificantes de proteínas quanto em regiões não codificantes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002). Classificados de acordo com o tipo de repetição, os microssatélites são divididos em quatro categorias, os perfeitos, os imperfeitos, os interruptos e os compostos. Uma seqüência microssatélite perfeita é aquela que não é interrompida por qualquer base que não seja o motivo da repetição (ex. TATATATATATATATA). Enquanto, a seqüência imperfeita é interrompida por bases não repetidas (ex. TATATATACTTATATA). No caso do microssatélite interrupto, há uma pequena seqüência dentro do motivo (ex. TATATACGTGTTATATATATA); já no composto, existem duas seqüências de repetição adjacentes diferentes (ex. GTGTGTGTTATATATA) (OLIVEIRA et al., 2006).

Os microssatélites representam regiões instáveis do genoma, que sofrem alterações mutacionais a taxas muito maiores do que as observadas nas seqüências de cópia única. Acredita-se que esta instabilidade surge através de um mecanismo específico de mutação chamado deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase durante a duplicação da molécula, o que pode resultar numa pequena expansão ou deleção de curtas seqüências de DNA. Outra provável causa é o pareamento não desigual das seqüências durante na meiose (PINTO et al., 2001; GIFFORD; BROWN, 2004). Além das curtas repetições em *tandem*, as seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a seleção de iniciadores (“*primers*”) específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os produtos da amplificação podem ser visualizados no gel por meio de coloração com brometo etídeo ou nitrato de prata. Recentemente, tem sido utilizados “*primers*” fluorescentes em combinação com seqüenciador automatizado (PINTO et al., 2001)

A maior limitação da tecnologia de microssatélites refere-se ao custo necessário para o desenvolvimento prévio dos marcadores. O desenvolvimento de marcadores microssatélites para uma nova espécie exige isolamento, clonagem, seqüenciamento e caracterização dos locos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Porém, esta é facilmente compensada pela ampla potencialidade de pesquisas desenvolvidas após sua obtenção.

A ocorrência de alelos nulos ou silenciosos pode levar a interpretações errôneas em populações avaliadas por locos microssatélites. Por definição, um alelo nulo é qualquer alelo que falha em amplificar em reações PCR e ocorre devido mutações nos sítios complementares aos “*primers*”. Como consequência, indivíduos heterozigotos que possuam um alelo nulo serão considerados erroneamente como homozigotos, o que diminui a variabilidade genética observada (JARNE; LAGODA, 1996). Entretanto, alelos nulos podem ser detectados através do teste de aderência das freqüências observadas nas proporções de Hardy- Weinberg (PINTO et al., 2001), ou pela observação e comparação direta dos genótipos maternos com os de suas progênies (MORENO, 2009).

A homoplasia de SSR é outro caso que pode causar distorções nas estimativas a respeito da estrutura genética de populações e filogenia de espécies. Isso ocorre quando alelos de locos microssatélites com o mesmo número de repetições são idênticos, entretanto não por ter ancestral comum, mas por simples acaso. Isto se deve às altas taxas de mutações em locos de microssatélites (ESTOUP; JARNE; CORNUET, 2002).

Apesar de ocorrer dificuldades de interpretação, os marcadores microssatélites possuem todas as características desejáveis para estudos de genética de populações, além de permitir a quantificação dos efeitos da fragmentação de habitats e estabelecer estratégias para a conservação de espécies. Eles são codominantes, o que permite a diferenciação entre os genótipos homozigotos e heterozigotos nos indivíduos analisados; apresentam segregação mendeliana simples e sua expressão não é influenciada pelo ambiente. Além dessas características, os microssatélites são abundantes na maioria dos genomas, possuem grande conteúdo informativo, são hipervariáveis, são baseados em PCR e necessitam de reduzidas quantidades de DNA para sua amplificação. Cada loco de microssatélite é definido por um par de “*primer*”, sendo que a genotipagem é realizada em ensaios “multiplex”, o que permite a análise de vários locos ao mesmo tempo, sendo transferíveis entre populações e espécies do mesmo gênero (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998, BUZO et al., 2003).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Justificativa e escolha da espécie modelo para o estudo

A *C. langsdorffi* foi utilizada neste estudo como espécie modelo por apresentar ampla distribuição geográfica, por ser uma espécie comum no cerrado e por possibilitar o uso de microssatélites.

#### 3.2 Áreas de estudo e amostragem

A pesquisa foi realizada em quatro áreas de Cerrado do Estado de São Paulo, abrangendo os municípios de Itirapina, Brotas e Assis (Figura 6). As duas áreas situadas nos municípios de Itirapina e Assis encontram-se localizadas em Unidades de Conservação (Estação Experimental de Itirapina e Estação Ecológica de Assis), e são administradas pelo Instituto Florestal do Estado de São Paulo. Enquanto que, as outras duas áreas situadas nos municípios de Brotas e Assis encontram-se localizadas em propriedades particulares rurais.

A escolha do local de estudo buscou avaliar o grau de conservação genética de populações naturais de *C. langsdorffii* nos remanescentes de Cerrado localizados em PPRs, a fim de verificar a sua importância para a conservação da diversidade genética e manutenção do fluxo gênico entre as UCs. A caracterização das fisionomias da vegetação das áreas em estudo se baseou na classificação apresentada por Ribeiro e Walter (1998). O levantamento de possíveis populações de *C. langsdorffi* nos remanescentes de Cerrado do Estado de São Paulo foi realizado, primeiro, a partir de busca bibliográfica de levantamentos florísticos realizados. A posterior localização dos indivíduos de *C. langsdorffii* se deu por meio de viagens a campo e consulta a técnicos e pesquisadores das UCs.

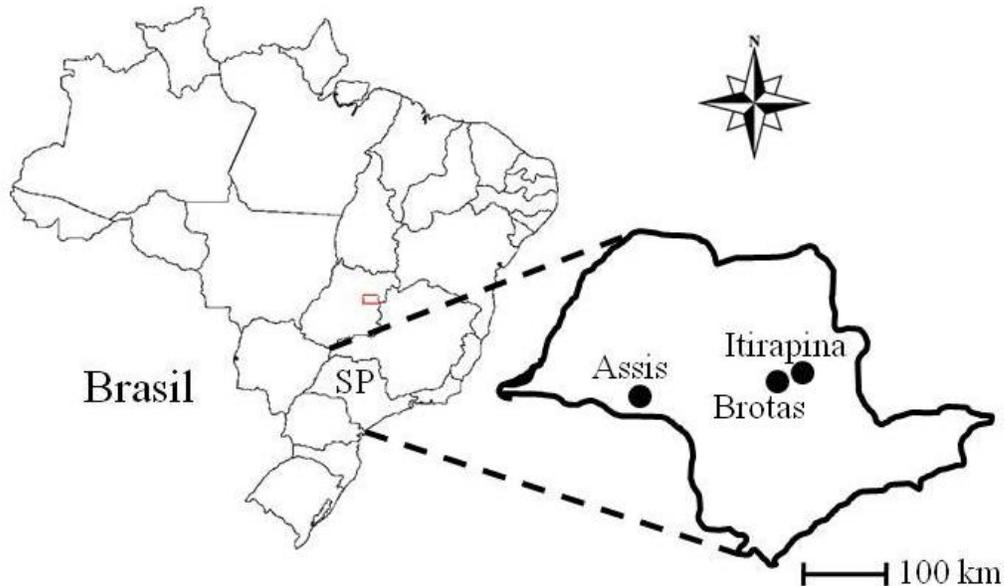


Figura 4 - Mapa da localização geográfica dos municípios de Assis-SP, Brotas- SP e Itirapina-SP

Para estudar a diversidade genética, a estrutura genética espacial e o fluxo gênico, foram amostrados 100 indivíduos de *C. langsdorffii* acima de 5 cm de DAP em cada área estudada, utilizando-se a metodologia de Caminhamento proposta por Filgueiras et al (1994). Segundo Carves et al. (2005), para a garantia de uma apurada detecção da estrutura genética espacial, são necessárias amostras de pelo menos 100 indivíduos e de cinco a dez locos SSR. Desses indivíduos, foram coletadas amostras foliares para a extração do DNA genômico. As folhas foram armazenadas em sacos de papel devidamente identificados com o número da árvore de origem. As amostras foliares foram secas imediatamente em recipientes herméticos contendo sílica gel (previamente secas em estufa à 85° C por 48 horas) à temperatura ambiente. A sílica foi trocada diariamente nos primeiros dias até a desidratação das folhas.

### 3.2.1 Estação Ecológica de Assis

A Estação Ecológica de Assis (EEA), com área de 1.760,64 ha, está localizada no município de Assis, no Oeste do Estado de São Paulo ( 22°33'20" a 22°37'41" S e 50°24'4,8" a 50°21'27 O) (Figura 5 a). A altitude varia de 500 a 590 m e o clima, segundo classificação de Köppen, caracteriza-se como subtropical, numa zona de transição entre Cwa e Cfa. O entorno da EEA inclui a Estação Experimental

de Assis, canaviais e pastos (INSTITUTO FLORESTAL, 2010). A amostragem nesta UC foi realizada numa área de aproximadamente 0,9 ha (Figura 5 b). Os indivíduos foram marcados com plaquetas metálicas, devidamente numeradas e georeferenciados com auxílio de um aparelho GPS (Garmin GPSMAP 76S). Foi utilizado o programa de georeferenciamento GPS Trackmaker (FERREIRA, 2002) para transferir os dados do aparelho GPS para o computador.

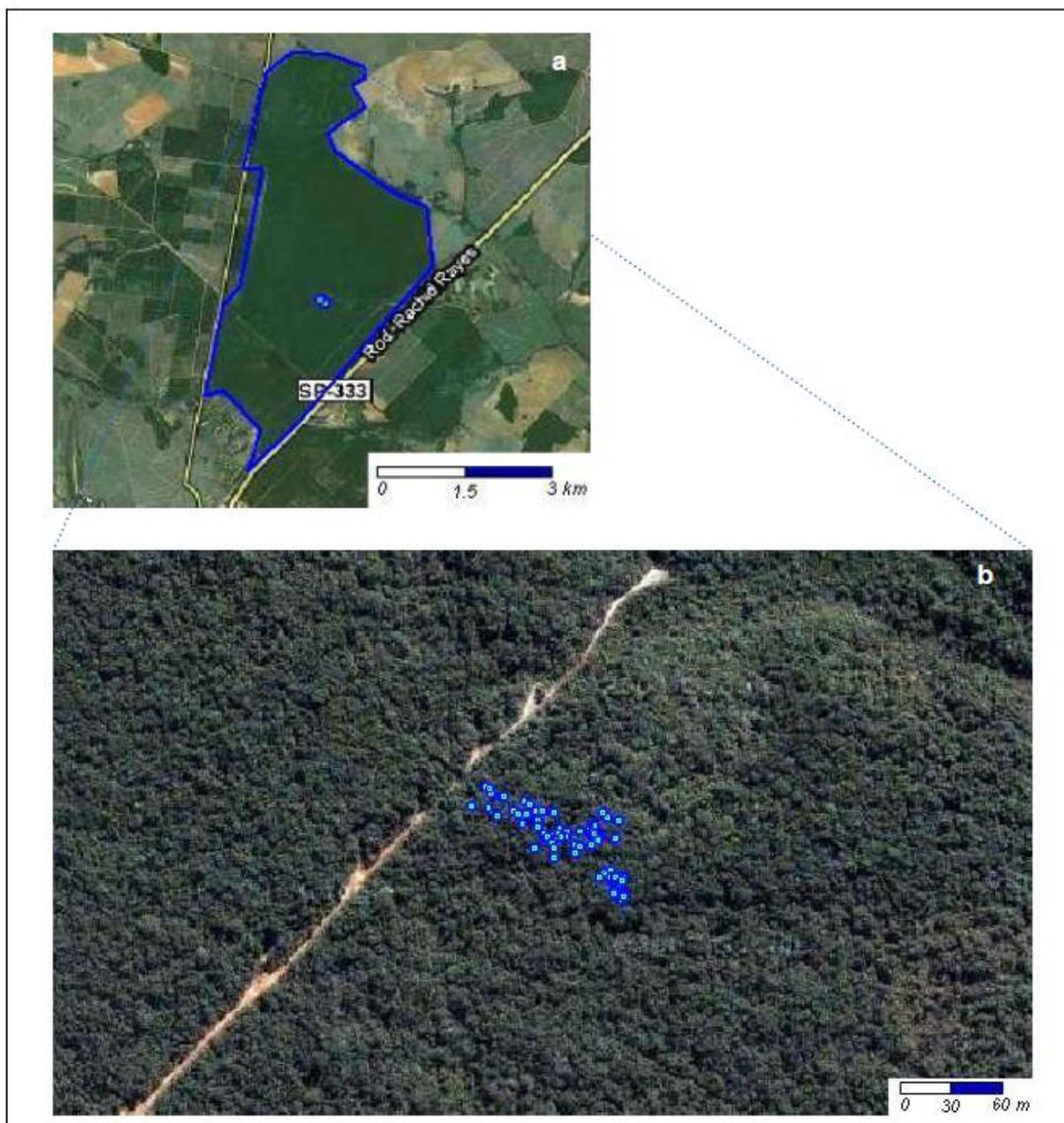


Figura 5 – Localização da população de *C. langsdorffii* na Estação Ecológica de Assis, Assis-SP. a) Área da EEA (contorno azul). b) Espacialização das plantas *C. langsdorffii* coletadas na área da EEA. Fonte: Mapa base Google Earth (2010)

### 3.2.2 Propriedade Particular Rural de Assis

A população de *C. langsdorffii* está localizada em um remanescente de cerrado de aproximadamente 83 ha em uma propriedade particular rural, no município de Assis, SP, entre as coordenadas 22°33'19,22''S e 50°15'52,77''O. O fragmento florestal apresenta fisionomias de cerradão e cerrado *sensu stricto*, e o seu entorno inclui canaviais e pastos (Figura 6). A área amostrada foi de aproximadamente 3,0 ha e sua distância geográfica em relação à EEA é de 13 km.

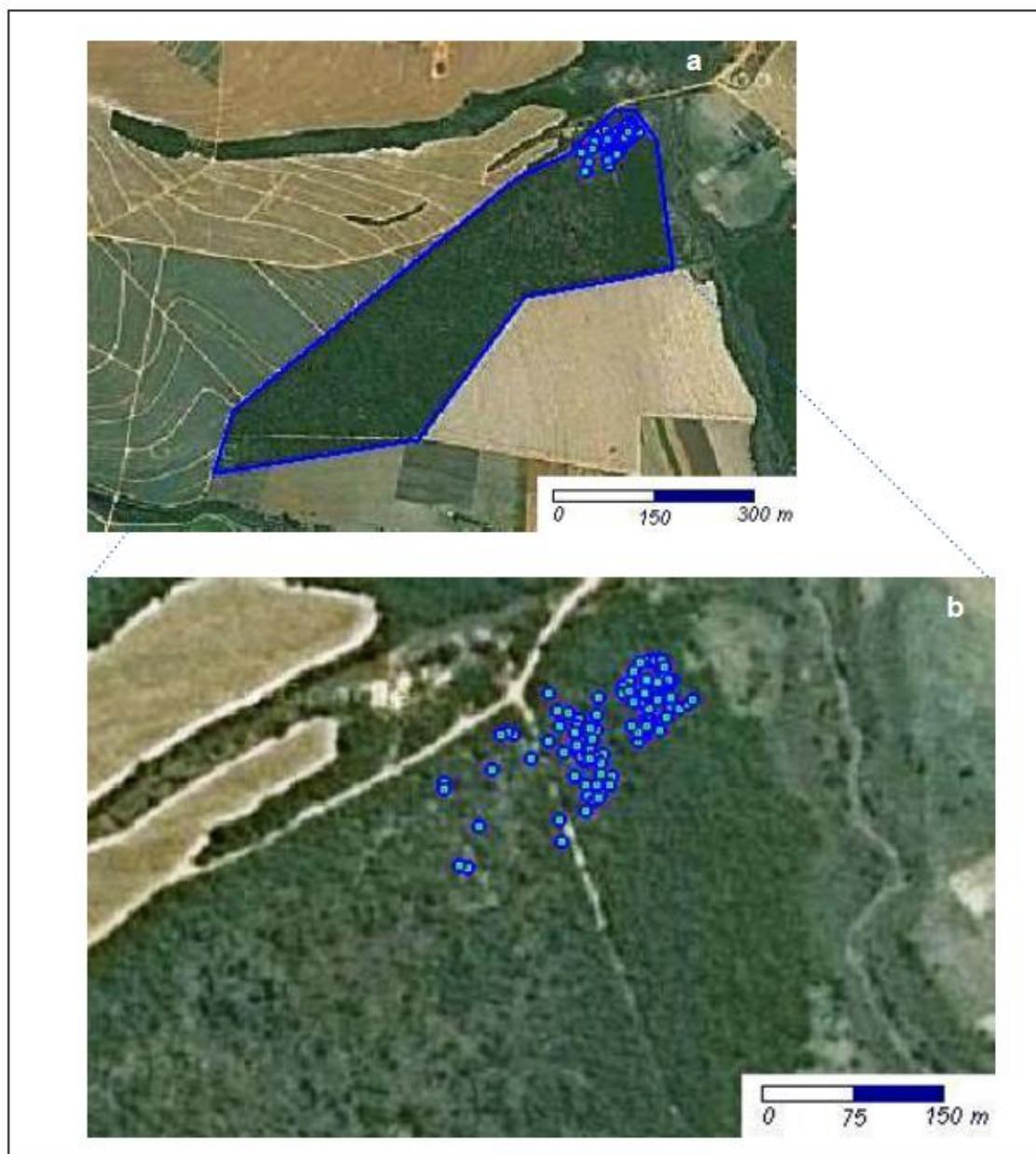


Figura 6 – Localização da população de *C. langsdorffii* na Propriedade Particular Rural de Assis, Assis-SP. a) Área do fragmento na PPRA (contorno azul). b) Espacialização das plantas *C. langsdorffii* coletadas na área da PPRA. Fonte: Mapa base Google Earth (2010)

### 3.2.3 Estação Experimental de Itirapina

A Estação Experimental de Itirapina (EEI), com área de 3.212,81 ha, está localizada no município de Itirapina, Estado de São Paulo, entre as coordenadas 22°10' a 22°15' de latitude Sul e 47°45' a 48°00' de longitude Oeste Grw. (Figura 7). O entorno da EEI inclui a Estação Ecológica de Itirapina (situada contígua a esta UC), canaviais, pastos, reflorestamento de *Pinus* spp e *Eucalyptus* spp (INSTITUTO FLORESTAL, 2010). O clima é do tipo Cwa de Köppen, tropical de altitude com inverno seco e verão quente e chuvoso, com precipitação média anual de 1.450,1 mm e temperatura média de 21°C (CEPAGRI/UNICAMP, 2006). A altitude mínima encontrada é de 700 m e a máxima é de 827 m (INSTITUTO FLORESTAL, 2010, SILVA, 2005).

A área de coleta na EEI, com aproximadamente 2,3 ha, está inserida num fragmento de cerrado conhecido como “Vermelho” (22°14'35.5’’S 47°49'42.8’’O), com área de aproximadamente 170 ha (Figura 7). Segundo Ribeiro e Walter (1998), a fisionomia da área estudada é classificada como cerradão, caracterizando-se por apresentar flora com elementos do cerrado *strictu sensu* e da mata, com cobertura arbórea de 50-60%.



Figura 7- Localização da população de *C. langsdorffii* na Estação Experimental de Itirapina, Itirapina-SP. a) Localização do fragmento Vermelho (contorno azul). b) Espacialização das plantas *C. langsdorffii* coletadas na área da EEI. Fonte: Mapa base Google Earth (2010)

### 3.2.4 Propriedade Particular Rural de Brotas

A população está situada em um remanescente de cerrado de aproximadamente 400 ha localizado dentro de uma propriedade particular rural no município de Brotas, Estado de São Paulo, entre as coordenadas 22°22'18,58''S e 48°01'24,73''O. O fragmento florestal é constituído por fisionomias de cerradão e cerrado *sensu stricto*, e o seu entorno inclui canaviais e pastos (Figura 8 a). A área de amostragem foi de aproximadamente 1,6 ha e a sua distância geográfica em relação à EEI é de 24 km (Figura 8 b).

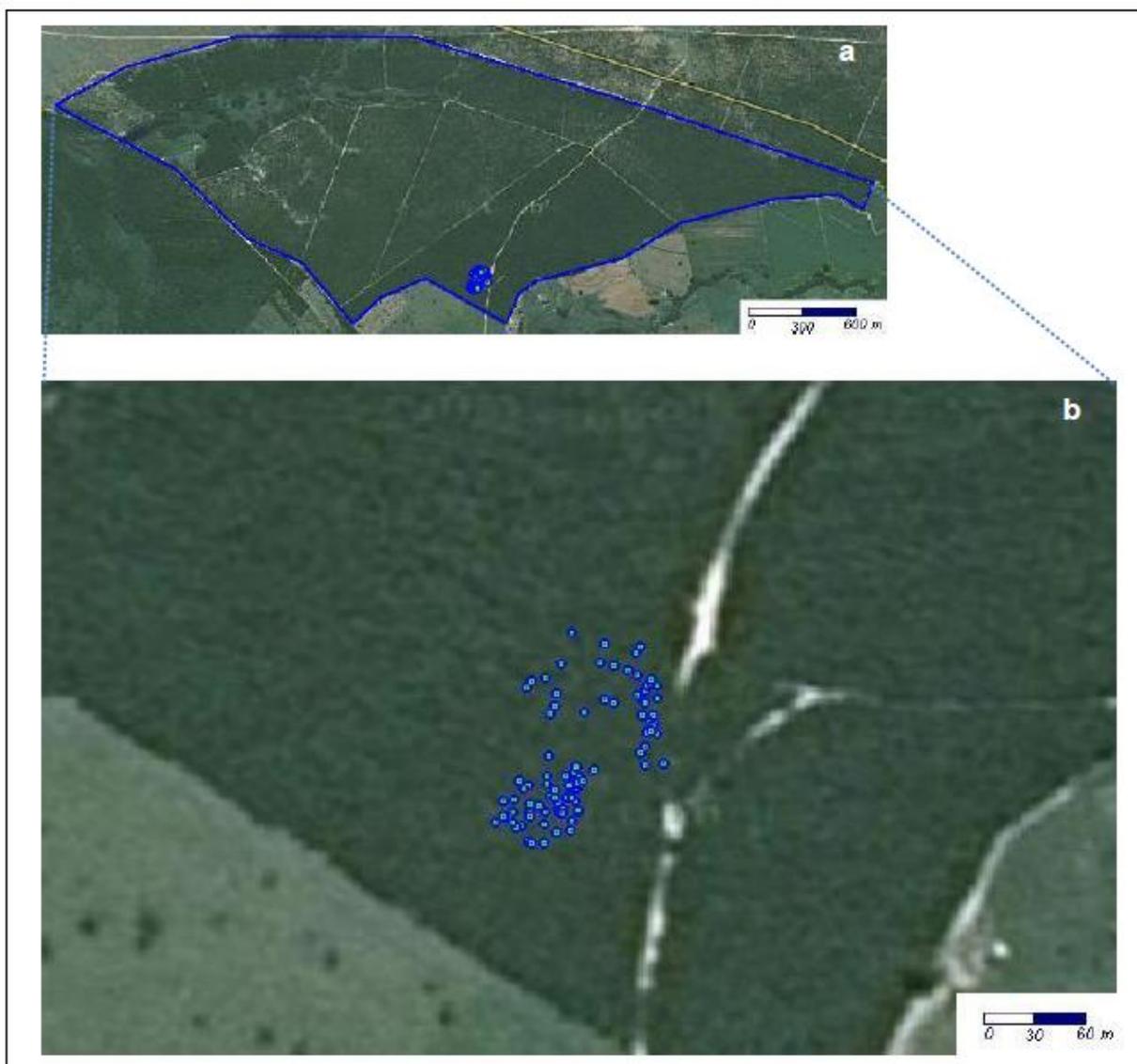


Figura 8- Localização da população de *C. langsdorffii* na Propriedade Particular Rural de Brotas, Brotas-SP. a) Localização do fragmento (contorno azul). b) Espacialização das plantas *C. langsdorffii* coletadas na área da PPRB. Fonte: Mapa base Google Earth (2010)

### **3.3 Procedimentos laboratoriais**

#### **3.3.1 Extração de DNA e análise genética**

Para realização de análises genéticas baseadas em marcadores do tipo microssatélites, foram genotipados 100 indivíduos em cada população, no total 400 indivíduos referentes às quatro populações estudadas. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA), localizado no Departamento de Ciências Florestais da ESALQ-USP, em Piracicaba - SP. A extração do DNA genômico total das amostras foi realizada seguindo o protocolo CTAB descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). Após a quantificação de DNA, as amostras foram diluídas em água MiliQ a 3ng/μl.

#### **3.3.2 Marcadores genéticos em *Copaifera Langsdorffii***

Nesse estudo foram utilizados oito pares de iniciadores SSR específicos para *C. langsdorffii* desenvolvidos por Ciampi, Brondani e Grattapaglia (2000). As seqüências “forward” e “reverse” de cada loco microssatélite estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Locos de microssatélites de *C. langsdorffii* com a respectiva temperatura de anelamento (Ta) e seqüência de nucleotídeos Locos de SSR Seqüência de nucleotídeos Ta (°C)

Locos de SSR	Seqüência de nucleotídeos	Ta (°C)
CL 01	F_AGA CTC CAT TCT TCC ACA GC R_CTG TCT TCT CTC TGC AAC CA	56
CL 02	F_CCT CGA TCC TCC TTG TGT TC R_TCA GTT CGG ATA GCG ATG C	56
CL 06	F_GAG CGT TGC AAG GAA TTT CT R_CGA AAC TTG CAT GCG GAT A	54
CL 20	F_ACC AAT CTC AAT CAT CGA GC R_GTG CGG GTG AAT GTA GAG TT	56
CL 27	F_GAA TAT ACA ATG CAC CGC AA R_CTC CAA AAG CCA TGC AAG	54
CL 32	F_GTG AGA GTA TGG AAT GTA AC R_TAG TCA TGA AAA TAG GAG TG	50
CL 34	F_TGT TGA CAT GAC ACT AAT TC R_ACA ACC GAC TTA TTG GA	50
CL 39	F_GCA GCT GTT CTC TTG TGA CT R_CAA GAA TCC GTG ACT TCA TC	56

Nota: F\_: foward; R\_: reverse

### 3.3.3 Amplificação dos locos microssatélites

Foi utilizado um coquetel (13 µl) para a realização da PCR composto por 7,5 ng de DNA genômico, 250 µM de dNTPs, 0,5 µM de MgCl<sub>2</sub>, tampão para PCR 1X (10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3), 2,5 µg / ml de BSA, 0,2 µM de cada iniciador e 1U de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria). As amplificações foram realizadas em termociclador MJ Research PTC-100, utilizando-se o seguinte protocolo: 96°C por 2 minutos; 29 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridação específica de cada par de iniciadores por 1 minuto (Tabela 1); 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos.

Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram segregados em gel desnaturante de poliacrilamida a 5%, em eletroforese de uma hora e trinta minutos em tampão TBE 1X em cuba

vertical. Os fragmentos foram observados na forma de bandas, após coloração com nitrato de prata, seguindo o protocolo desenvolvido por Creste, Tulmann-Neto e Figueira (2001). O tamanho dos alelos foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular padrão (10 pb “ladder” - Invitrogen®). Os fragmentos amplificados de diferentes tamanhos foram considerados alelos diferentes.

### 3.4 Análises estatísticas

#### 3.4.1 Análise da distribuição espacial

A fim de conhecer a estrutura demográfica dos indivíduos nas áreas estudadas, assim como de comparar esta estrutura entre as áreas, foi calculado o índice de dispersão de Clark-Evans ( $R$ ), a distância média do vizinho mais próximo ( $R_o$ ) e a densidade em número de indivíduos por hectare ( $d$ ). Foi utilizado o programa computacional SGS (DEGEN; PETIT; KREMER, 2001) para a obtenção de  $R_o$  e  $R$  conforme Clark e Evans (1954): fórmula (1)

$$R = \frac{R_o}{R_E} \quad (1)$$

Se  $R = 1$  distribuição aleatória,  $R < 1$  distribuição agregada (0 = mínimo) e  $R > 1$  distribuição uniforme (2,149 = máximo).

$R_o$  = distância média observada do vizinho mais próximo: fórmula (2)

$$R_o = \frac{\sum r_i}{n} \quad (2)$$

em que  $r_i$  = distância do vizinho mais próximo,  $n$  = número de observação.

$R_E$  = distância esperada do vizinho mais próximo: fórmula (3)

$$R_E = \frac{1}{2\sqrt{d}} \quad (3)$$

dado por  $d$  = densidade média de indivíduos / m<sup>2</sup>.

Para a significância estatística foi utilizado o teste  $Z$ : fórmula (4)

$$Z = \frac{|R_o - R_E|}{s} \quad (4)$$

em que  $s$  = desvio padrão.

### 3.4.2 Análise da diversidade genética

Os parâmetros para estimar a diversidade genética foram: número de alelos por loco ( $\hat{A}$ ), o número efetivo de alelos por loco ( $\hat{A}_e = 1/\sum p_i^2$ , NEI, 1987), das heterozigosidades médias observada ( $\hat{H}_o$ ) e esperada ( $\hat{H}_e$ ), e dos índices de fixação ( $\hat{f}$ ) conforme (WEIR, 1996), foram realizadas com auxílio do programa SPAGEDI (HARDY; VEKEMANS, 2002). Para verificar a significância de  $\hat{f}$  foi realizado o procedimento de 10.000 permutações sobre os locos ao nível de 5% de probabilidade, utilizando correção de Bonferroni e empregando-se o programa SPAGEDI. Para comparação das médias de  $\hat{A}$ ,  $\hat{A}_e$ ,  $\hat{H}_o$ ,  $\hat{H}_e$  e  $\hat{f}$ , entre as populações estudadas, foi calculado um intervalo de confiança a 95% a partir do erro padrão utilizando o método Jackknife sobre locos. O teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado pelo teste exato de Fisher através do programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007).

### 3.4.3 Detecção de gargalos genéticos

Para verificar reduções recentes no tamanho efetivo populacional foi utilizado o programa computacional BOTTLENECK (PIRY et al., 1999). Foram utilizados os métodos SMM (Modelo de Passos de Mutação) (OHTA; KIMURA, 1973) e TPM (Modelo de Duas Fases) (DI RIENZO et al., 1994) por serem mais adequados para marcadores microssatélites. Como foram utilizados menos de 20 locos de microssatélites, foi empregado o teste de significância de Wilcoxon com 1.000 iterações para SSM e TPM, como recomendado por Luikart e Cornuet (1998).

O programa BOTTLENECK (PIRY et al., 1999) testou a hipótese de  $\hat{H}_e > H_{eq}$  sob MPM e MDF, sendo  $\hat{H}_e$  = heterozigosidade esperada calculada a partir das frequências alélicas e  $H_{eq}$  = heterozigosidade esperada no equilíbrio entre mutação e deriva, calculada a partir do número de alelos.

### 3.4.4 Análise da estrutura genética espacial

Para a análise da estrutura genética espacial (EGE) dentro das populações foi utilizado o programa SPAGEDI (HARDY; VEKEMANS, 2002). A caracterização da distribuição espacial dos

genótipos dentro das populações foi realizada a partir das estimativas dos coeficientes de coancestria recente ( $\hat{\theta}_{xy}$ ) com base em Loiselle et al. (1995) entre plantas dentro das classes de distância definida para cada  $k$  alelo em cada par de indivíduos,  $x$  e  $y$ , como: fórmula (5)

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

Em que,  $p_{xlk}$  e  $p_{ylk}$  são as frequências do alelo  $k$  no loco  $l$  nos indivíduos  $x$  e  $y$  (assumindo valores de 0, 0,5 e 1 em indivíduos homozigotos para o alelo alternativo, heterozigotos e homozigotos para o alelo sob consideração, respectivamente) e  $\bar{p}_{lk}$  a média da frequência do alelo  $k$  no loco  $l$  na subpopulação com  $n_l$  (número de genes) no loco  $l$ . Foram realizadas 10.000 permutações sobre a localização de cada genótipo e sobre locos a fim de se obter intervalos de confiança a 95%.

### 3.4.5 Correções do índice de fixação para o efeito Wahlund

Na presença de estrutura genética espacial, o valor do índice de fixação tende a se elevar dentro da população devido ao efeito Wahlund (DICK et al., 2008). Este índice de fixação intrapopulacional ( $\hat{f}$ ) pode ser corrigido pela eliminação do efeito Wahlund, utilizando uma relação entre estatísticas  $\hat{f}$ , como descrito em Bittencourt e Sebbenn (2007), onde a fórmula de Wright (1965):  $1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$  é derivada em  $\hat{f}_N = 1 - [(1 - \hat{f}) / (1 - \hat{\theta}_{xy})]$  assumindo que  $F_{ST} = \hat{\theta}_{xy}$ , valor  $\hat{\theta}_{xy}$  corresponde à primeira classe de distância da análise da EGE;  $F_{IT} = \hat{f}$ , já que o índice de fixação intrapopulacional ( $\hat{f}$ ) representa o índice de fixação total dentro de uma população estruturada ( $F_{IT}$ ); e  $F_{IS} = \hat{f}_N$  onde o novo valor corrigido do índice de fixação ( $\hat{f}_N$ ) é a estimativa apenas relacionada com o sistema reprodutivo.

### 3.4.6 Tamanho efetivo populacional e área mínima viável para conservação

Foram estimados os tamanhos efetivos populacionais ( $\hat{N}_e$ ) para *C. langsdorffii* nas populações estudadas conforme expressão derivada por Cockerham (1969), envolvendo as estimativas do índice de fixação ( $\hat{f}$ ) e do coeficiente de coancestria médio ( $\Theta$ ) da geração sob consideração: fórmula (6)

$$\hat{N}_e = \frac{0,5}{\Theta \left( \frac{n-1}{n} \right) + \frac{1+\hat{f}}{2n}} \quad (6)$$

Em que,  $n$  = tamanho amostral. O índice de fixação foi estimado conforme previamente descrito no item 2.3.3. O coeficiente de coancestria médio ( $\Theta$ ) dentro das diferentes gerações foi estimado pela expressão: fórmula (7)

$$\Theta = \frac{n\hat{\theta}_{ii}(1+\hat{f}) + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{i \neq j}^{n-1} \hat{\theta}_{ij}(1+\hat{f})}{n^2}, \text{ (LINDGREN; GEA; JEFFERSON, 1996),} \quad (7)$$

em que,  $\hat{\theta}_{ii}$  = estimativa da autocoancestria dos indivíduos,  $\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{i \neq j}^{n-1} \hat{\theta}_{ij}$  = soma de todas as estimativas das coancestrias entre os pares de indivíduos de uma população, excluindo a autocoancestria,  $n$  = tamanho amostral e  $\hat{f}$  = estimativa do índice de fixação da população.

A área mínima viável ( $\hat{AMV}$ ) para conservação genética *in situ* foi estimada em função do tamanho efetivo de referência ( $N_{e(ref)} = 1000, 500$  e  $50$ ) proposto por Lynch (1996): fórmula (8)

$$\hat{AMV} = \frac{N_{e(ref)}}{d(\hat{N}_e/n)} \quad (8)$$

Em que,  $\hat{N}_e/n$  = relação entre tamanho efetivo e tamanho amostral e  $d$  = densidade de indivíduos por hectare.

### 3.4.7 Fluxo gênico aparente

Com a finalidade de verificar se cada unidade de conservação representa uma unidade significativa evolucionária (USE) e/ou uma unidade independente para manejo (UIM) segundo classificações propostos por Palsboll, Bérubé e Allendorf (2007), foram calculados a estrutura genética e o fluxo gênico entre as populações. Através do programa computacional FSTAT (versão 2.9.3) de Goudet (2008), foram estimadas as divergências genéticas com a estatística  $F$  de Weir e Cockerham (1984) ( $\hat{\theta}_p = F_{ST}$ ) e as estatísticas de Nei (1987) de populações subdivididas ( $H_T$  = diversidade genética

total,  $G_{ST}$  = diversidade genética entre e  $H_S$  diversidade genética dentro). Para estandardizar o valor de  $G_{ST}$ , foi utilizado o  $G_{ST}'$ , proposto por Hedrick (2005): fórmula (9)

$$G_{ST}' = \frac{G_{ST}(1 + H_S)}{1 - H_S} \quad (9)$$

O fluxo gênico aparente ( $Nm$ ) entre populações foi estimado de acordo com o modelo proposto por Crow e Aoki (1984), fórmula (10)

$$\hat{Nm} = \left( \frac{1}{4\alpha} \right) \left[ \left( \frac{1}{\hat{F}_{ST}} \right) - 1 \right] \quad (10)$$

$F_{ST}$  foi substituído pelo  $\hat{\theta}_P$ ,  $\hat{R}_{st}$  e  $G_{ST}'$  para conhecer a magnitude do fluxo gênico realizado e a variação dada por cada estatística.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Aspectos demográficos

As quatro populações de *C. langsdorffii* analisadas apresentaram alta densidade de indivíduos por hectare e uma distribuição agregada (Tabela 2). Na EEA, a distância média do vizinho mais próximo ( $R_o$ ) foi de 9,56 m, variando de 0,30 a 143,42 m, e a densidade de indivíduo por hectare ( $d$ ) foi de 11,11. O índice de dispersão para os indivíduos foi significativo ( $R= 0,590^{***}$ ), indicando uma distribuição agregada. Os indivíduos apresentaram diâmetro à altura do peito (DAP) de 16,47 cm (Tabela 2). Já na PPRA, a distância média do vizinho mais próximo ( $R_o$ ) foi de 16,77 m, variando de 0,85 a 249,31 m, e a densidade ( $d$ ) foi de 33,33. O índice de dispersão de Clark-Evans mostrou também uma distribuição agregada dos indivíduos pela PPRA ( $R= 0,670^{***}$ ). O DAP médio encontrado para esta população foi de 17,82 cm (Tabela 2).

Para a população da EEI, houve uma distribuição agregada dos indivíduos tendendo para a aleatoriedade ( $R= 0,820^{***}$ ) com  $R_o = 12,65$  m, variando de 0,69 a 186,76 m. Os indivíduos apresentaram DAP médio de 23,30 cm e a densidade ( $d$ ) foi de 43,47 (Tabela 2). Por fim, na PPRB, a distância média do vizinho mais próximo ( $R_o$ ) foi de 9,23 m, variando de 0,22 a 138,52 m e o índice de dispersão para os indivíduos foi significativo ( $R= 0,749^{***}$ ), indicando uma distribuição agregada tendendo para a aleatoriedade. A densidade de indivíduos por hectare ( $d$ ) foi de 71,43. O DAP médio encontrado foi de 11,42 cm (Tabela 2).

Tabela 2 - Aspectos demográficos de *C. langsdorffii* nas populações da EEA (Estação Ecológica de Assis), PPRA (Propriedade Particular Rural de Assis), EEI (Estação Ecológica de Itirapina) e PPRB (Propriedade Particular de Brotas), SP. Ano base 2010

População	N	Área (ha)	D	R	DAP (DP; mín.-máx.)
EEA	100	0,9	111,11	0,590 <sup>***</sup>	16,47 (5,41 – 47,59)
PPRA	100	3,0	33,33	0,670 <sup>***</sup>	17,82 (5,09 - 48,88)
EEI	100	2,3	43,47	0,820 <sup>***</sup>	23,30 (5,09 – 59,81)
PPRB	100	1,4	71,43	0,749 <sup>***</sup>	11,42 (5,57 - 63,38)

N: número de indivíduos localizados na população,  $D$ : densidade média por ha;  $R$ : índice de dispersão de Clark e Evans; <sup>\*\*\*</sup>= significativo ( $p=0,01$ ); DAP: diâmetro à altura do peito (cm); DP mín.-máx.= desvio padrão mínimo e máximo encontrado (cm)

#### 4.2 Diversidade genética de *C. langsdorffii*

O número de alelos ( $A$ ) foi moderadamente igual nas quatro populações analisadas. Por sua vez, o número efetivo de alelos ( $A_e$ ) foi praticamente a metade de  $A$  em todas as populações (Tabela 3). Isso indica que, apesar dos locos serem altamente polimórficos, há muitos alelos em baixa frequência.

Nas quatro populações estudadas, as estimativas médias de diversidade genética esperada ( $H_e$ ) foram superiores às estimativas de médias de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) (Tabela 3). As estimativas médias de  $H_o$  foram menores para as unidades de conservação (EEA e EEI) do que para as propriedades particulares rurais (PPRA e PPRB). Por sua vez, a estimativa média de  $H_e$  na EEA foi menor do que a da PPRA, porém as estimativas médias de  $H_e$  nas populações da EEI e PPRB não diferiram significativamente (Tabela 3).

Verificou-se a não aderências as proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg na maioria dos locos das populações analisadas (Tabela 3). As unidades de conservação da EEA e da EEI apresentaram, em média, índices de fixação mais alto e significativos ( $\hat{f} = 0,236$  e  $\hat{f} = 0,283$ ; P-valor = 0,006, respectivamente) do que as propriedades particulares rurais da PPRA e da PPRB ( $\hat{f} = 0,150$  e  $\hat{f} = 0,198$ ; P-valor = 0,006, respectivamente; Tabela 3).

Tabela 3 - Descrição dos locos de SSR nucleares para todos os indivíduos das populações da EEA (Estação Ecológica de Assis), PPRA (Propriedade Particular Rural de Assis), EEI (Estação Ecológica de Itirapina) e PPRB (Propriedade Particular de Brotas), SP. Ano base 2010. (continua)

Loco	A	$A_e$	$H_o$	$H_e$	HW	$\hat{f}$
Estação Ecológica de Assis ( $n = 100$ )						
CL1	11	5,490	0,660	0,818	NS	0,193
CL2	14	9,900	0,745	0,899	NC	0,171
CL6	16	9,260	0,768	0,892	NC	0,140
CL20	16	7,870	0,638	0,873	**	0,269
CL27	11	5,050	0,375	0,802	***	0,533
CL32	18	10,990	0,845	0,909	NC	0,070
CL34	12	5,180	0,786	0,807	NS	0,026
CL39	15	8,930	0,458	0,888	NC	0,484
Média	14,125	7,830	0,659	0,861	-	0,236**
IC <sub>(95%)</sub>	± 0,309	± 0,278	± 0,020	± 0,006	-	± 0,024

Tabela 4 - Descrição dos locos de SSR nucleares para todos os indivíduos das populações da EEA (Estação Ecológica de Assis), PPRA (Propriedade Particular Rural de Assis), EEI (Estação Ecológica de Itirapina) e PPRB (Propriedade Particular de Brotas), SP. Ano base 2010. (conclusão)

Loco	A	A <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	HW	$\hat{f}$
Propriedade Particular Rural de Assis ( <i>n</i> = 100)						
CL1	10	3,774	0,710	0,735	NS	0,034
CL2	12	5,747	0,670	0,825	NS	0,189
CL6	16	10,101	0,920	0,901	NC	-0,021
CL20	14	9,524	0,806	0,895	NC	0,099
CL27	12	8,000	0,485	0,873	NC	0,446
CL32	17	8,850	0,798	0,886	NS	0,100
CL34	17	10,204	0,816	0,901	NC	0,095
CL39	14	6,803	0,636	0,852	**	0,254
Média	14	7,875	0,730	0,859	-	0,150**
IC <sub>(95%)</sub>	± 0,903	± 0,273	± 0,016	± 0,007	-	± 0,019
Estação Experimental de Itirapina ( <i>n</i> = 100)						
CL1	12	7,300	0,800	0,863	NS	0,073
CL2	15	8,850	0,630	0,886	NC	0,290
CL6	11	7,460	0,455	0,864	NC	0,475
CL20	18	8,260	0,697	0,878	NC	0,207
CL27	7	4,930	0,450	0,795	**	0,435
CL32	20	10,000	0,531	0,898	NC	0,410
CL34	10	4,530	0,677	0,778	NS	0,131
CL39	13	6,450	0,639	0,844	NS	0,244
Média	15,50	7,223	0,610	0,852	-	0,283**
IC <sub>(95%)</sub>	± 0,610	± 0,295	± 0,018	± 0,006	-	± 0,018
Propriedade Particular Rural de Brotas ( <i>n</i> = 100)						
CL1	14	8,34	0,790	0,880	NS	0,102
CL2	14	9,09	0,758	0,890	NC	0,148
CL6	16	9,520	0,719	0,895	NC	0,196
CL20	18	7,750	0,677	0,871	**	0,222
CL27	7	1,720	0,419	0,824	***	0,419
CL32	18	9,170	0,757	0,891	NC	0,150
CL34	16	7,350	0,730	0,864	NS	0,155
CL39	23	15,350	0,744	0,935	NC	0,204
Média	15,75	8,540	0,699	0,881	-	0,198**
IC <sub>(95%)</sub>	± 0,545	± 0,443	± 0,013	± 0,003	-	± 0,012

N= número de indivíduos amostrados; A= número alelos;  $A_e$ = número efetivo de alelos;  $H_o$ = heterozigidade observada;  $H_e$  = diversidade gênica; HW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg; \*\* = significativo a 0,05;\*\*\* = significativo a 0,01; NC= não calculado; NS= não significativo;  $\hat{f}$  = índice de fixação, (IC) intervalo de confiança a 95% de probabilidade usando 10.000 reamostragens “bootstrap” sobre locos

Alelos exclusivos foram observados nas quatro populações de *C. langsdorffii*, sendo que a grande maioria deles é rara (Tabela 4). As áreas particulares rurais, PPRA e PPRB, apresentaram maior número de alelos exclusivos (8 e 21, respectivamente) em relação às unidades de conservação da EEA e da EEI ( 3 e 10, respectivamente; Figura 9).

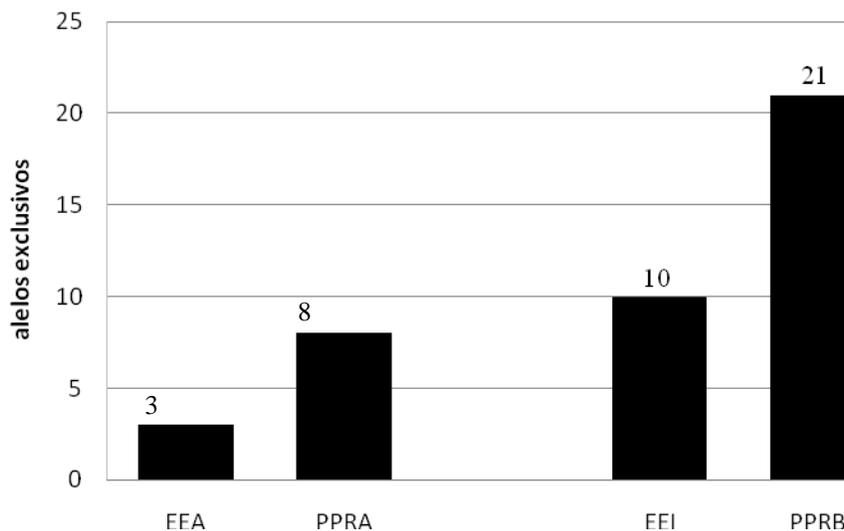


Figura 9 - Número de alelos exclusivos de *C. langsdorffii* nas populações da EEA (Estação Ecológica de Assis), na PPRA (Propriedade Particular Rural de Assis), na EEI (Estação Experimental de Itirapina) e na PPRB ( Propriedade Particular Rural de Brotas). Ano base 2010

Tabela 5 – Frequência de alelos exclusivos por loco, nas populações da EEA (Estação Ecológica de Assis), na PPRA (Propriedade Particular Rural de Assis), na EEI (Estação Experimental de Itirapina) e na PPRB ( Propriedade Particular Rural de Brotas). Ano base 2010..... (Continua)

Loco	Alelo	EEA	PPRA	EEI	PPRB
CL1	162	-	-	-	0,21
CL1	188	-	-	0,235	-
CL1	190	-	-	-	0,01
CL2	222	-	-	-	0,005
CL2	224	-	-	-	0,005
CL2	228	-	-	-	0,202
CL2	230	-	-	-	0,131

Tabela 6 – Frequência de alelos exclusivos por loco, nas populações da EEA (Estação Ecológica de Assis), na PPRA (Propriedade Particular Rural de Assis), na EEI (Estação Experimental de Itirapina) e na PPRB ( Propriedade Particular Rural de Brotas). Ano base 2010 ..... (Conclusão)

Loco	Alelo	EEA	PPRA	EEI	PPRB
CL2	280	-	-	0,005	-
CL6	120	-	0,005	-	-
CL20	80	-	-	0,020	-
CL20	92	-	0,107	-	-
CL20	108	-	-	0,030	-
CL20	128	-	-	0,005	-
CL27	170	-	-	-	0,057
CL27	192	0,005	-	-	-
CL27	198	-	0,035	-	-
CL27	208	-	0,010	-	-
CL32	132	-	-	-	0,025
CL32	136	0,113	-	-	-
CL32	148	-	-	-	0,066
CL32	160	-	0,106	-	-
CL32	162	-	0,020	-	-
CL32	174	0,015	-	-	-
CL32	176	-	-	0,036	-
CL32	186	-	-	0,046	-
CL32	188	-	-	-	0,005
CL32	190	-	-	-	0,005
CL34	194	-	-	-	0,015
CL34	196	-	-	-	0,02
CL34	202	-	0,021	-	-
CL34	212	-	0,005	-	-
CL34	216	-	-	0,035	-
CL34	218	-	-	-	0,015
CL39	132	-	-	-	0,005
CL39	138	-	-	-	0,010
CL39	142	-	-	-	0,031
CL39	144	-	-	-	0,031
CL39	146	-	-	-	0,056
CL39	156	-	-	-	0,005
CL39	160	-	-	-	0,005

### 4.3 Gargalos genéticos

No presente estudo, em geral, não foram detectadas reduções recentes no tamanho efetivo populacional nas populações analisadas (Tabela 5). O Modelo de Passos de Mutação (SMM) e Modelo de Duas Fases (TPM) convergiram, praticamente, para inexistência de gargalos genéticos (Tabela 5). No modelo TPM, todas as populações apresentaram a mesma proporção de locos com excesso e déficit de heterozigidade ( $E/D = 4/4$ ). Porém no modelo SMM, a população da EEA, além de diferir na proporção de locos em excesso e déficit de heterozigidade ( $E/D = 1/7$ ), apresentou redução recente no tamanho populacional ( $P^1 = 0,027$ ; Tabela 5).

Tabela 7 – Teste de Wilcoxon para determinar se as populações de *C. langsdorffii* estão sofrendo efeito de gargalo genético, em que E/D: locos em excesso/déficit de heterozigidade P: probabilidade de ocorrência de “bottleneck” para cada população; TPM: modelo de mutação em duas fases (Two-phase model) e SMM: modelo de mutação aos passos (Stepwise mutation model). Ano base, 2010

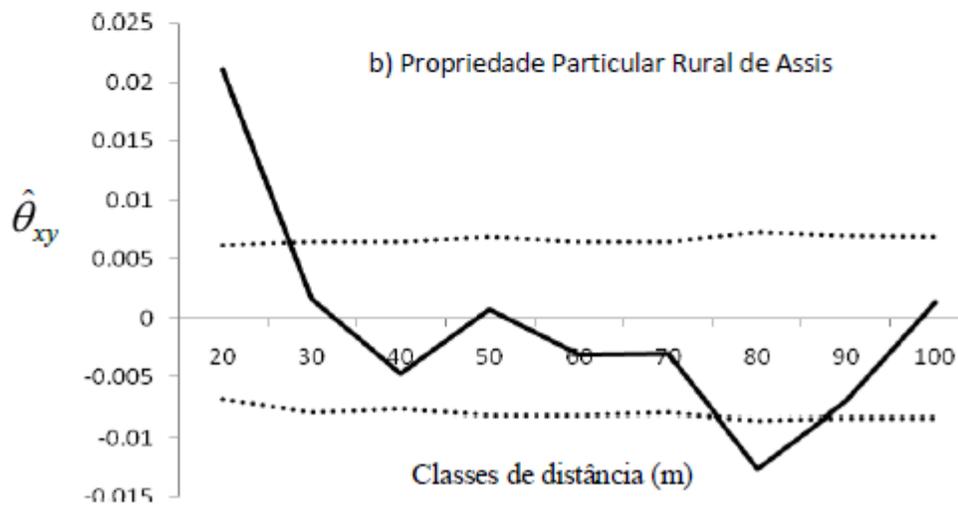
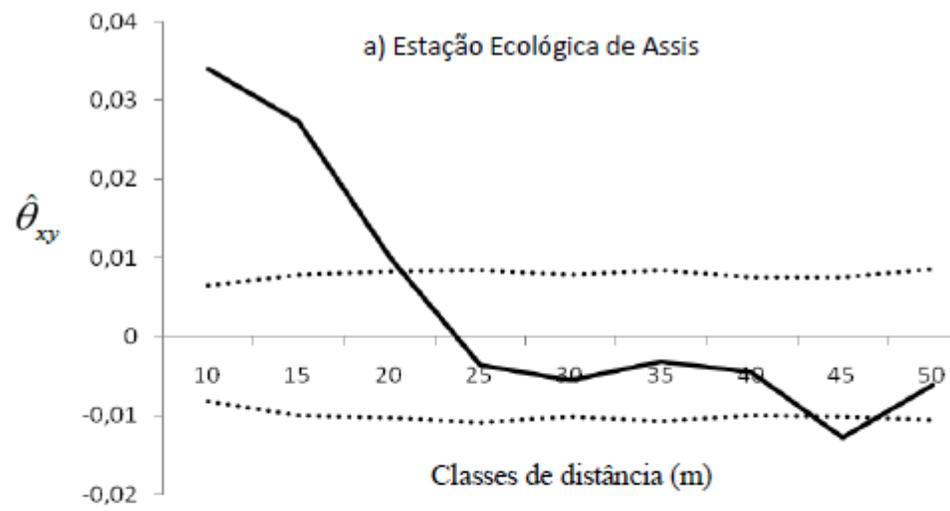
População	TPM		SMM	
	E/D	P <sup>1</sup>	E/D	P <sup>1</sup>
EEA	4/4	0,641	1/7	0,027 **
PPRA	4/4	1,000	3/5	0,195
EEI	4/4	0,945	3/5	0,195
PPRB	4/4	1,000	3/5	0,222

<sup>1</sup>Probabilidade do teste de Wilcoxon a 95%, teste unicaudal para excesso de heterozigidade; \*\* significativo a 99%.

### 4.4 Estrutura genética espacial

A análise da estrutura genética espacial das quatro populações de *C. langsdorffii* demonstrou valores baixos, porém significativos de  $\hat{\theta}_{xy}$ , indicando a formação de estrutura familiar por volta de 15 m de distância (Figura 10).

Para as populações da EEA e da PPRB, a EGE foi significativa até 15 m de distância, onde os indivíduos tendem a serem mais aparentados entre si. Nas classes de distância acima de 15 m houve uma disposição aleatória dos genótipos, ou seja, uma zona de panmixia (Figura 10 a; d). Na população da PPRA foi detectada uma EGE até 20 m de distância e uma zona de panmixia nas classes de distância superiores (Figura 10 b). Já para a EEI, a estrutura genética espacial foi pequena, porém significativa, a uma distância de até aproximadamente 45 m, onde as árvores tendem a ser mais aparentadas entre si, e que árvores mais distantes são geneticamente não relacionadas (Figura 10 c).



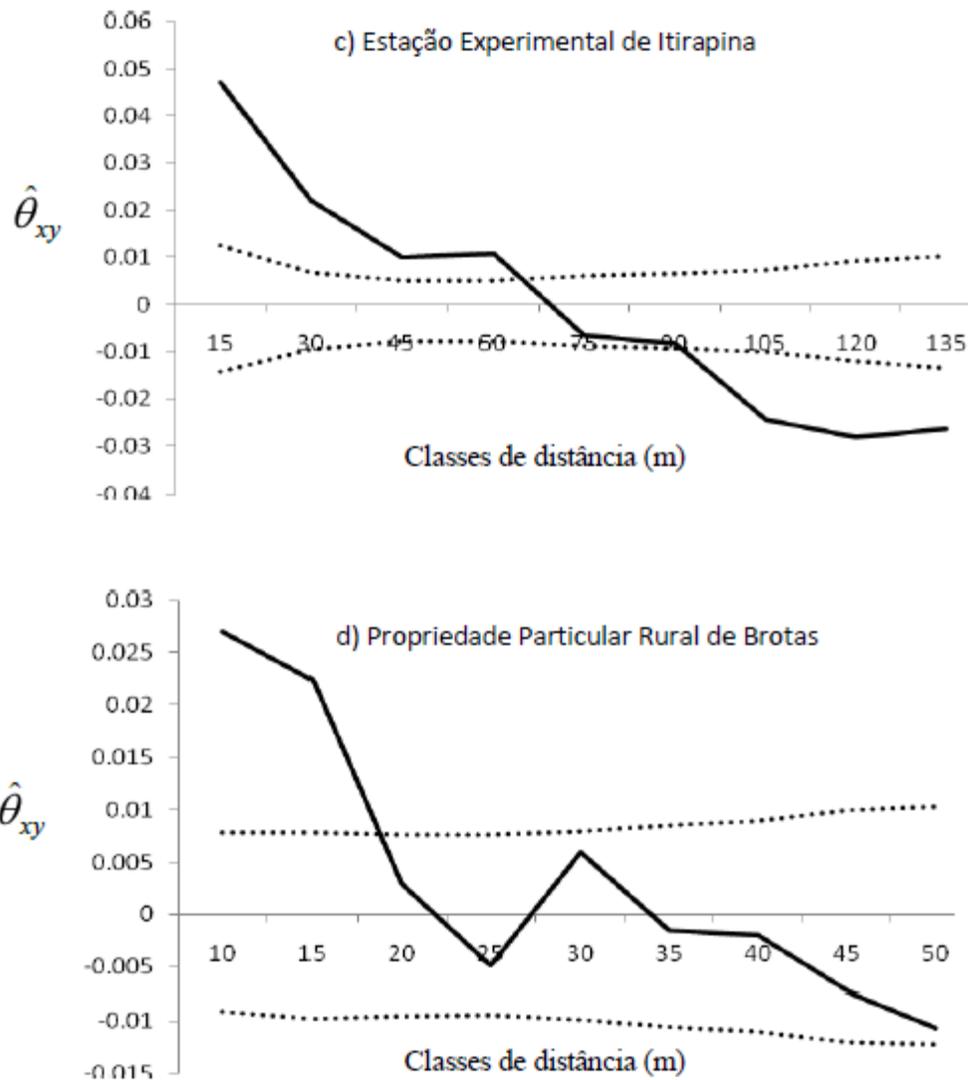


Figura 10 - Correlograma do coeficiente de coancestria ( $\hat{\theta}_{xy}$ ) em nove classes de distâncias entre árvores de quatro populações de *Copaifera langsdorffii*. (Linhas tracejadas indicam o limite inferior e superior do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade e a linha contínua representa a estimativa do coeficiente de coancestria, segundo LOISELLE et al., 1995). Ano base 2010

#### 4.5 Correções do índice de fixação para o efeito Wahlund

A influência do efeito Wahlund para o índice de fixação nas populações estudadas foi baixa, variando de 11 a 14% (Tabela 6). Para as populações da EEA e PPRB, aproximadamente 11% do valor de  $\hat{f}$  foi devido ao efeito Wahlund. Já para as populações da PPRA e EEI, o efeito Wahlund foi de, respectivamente, 14 e 12,32% (Tabela 6).

Tabela 8 – Correção do índice de fixação para as populações da EEA (Estação Ecológica de Assis), PPRA (Propriedade Particular Rural de Assis), EEI (Estação Ecológica de Itirapina) e PPRB (Propriedade Particular de Brotas), SP. Ano base 2010

População	$\hat{f}$	$\hat{\theta}_{xy}$	$F_n$
EEA	0,234	0,034	0,207
PPRA	0,150	0,024	0,129
EEI	0,284	0,047	0,249
PPRB	0,198	0,027	0,176

$\hat{f}$  = índice de fixação;  $\hat{\theta}_{xy}$  = valor mais alto da estrutura genética espacial;  $F_n$  = valor corrigido do índice de fixação

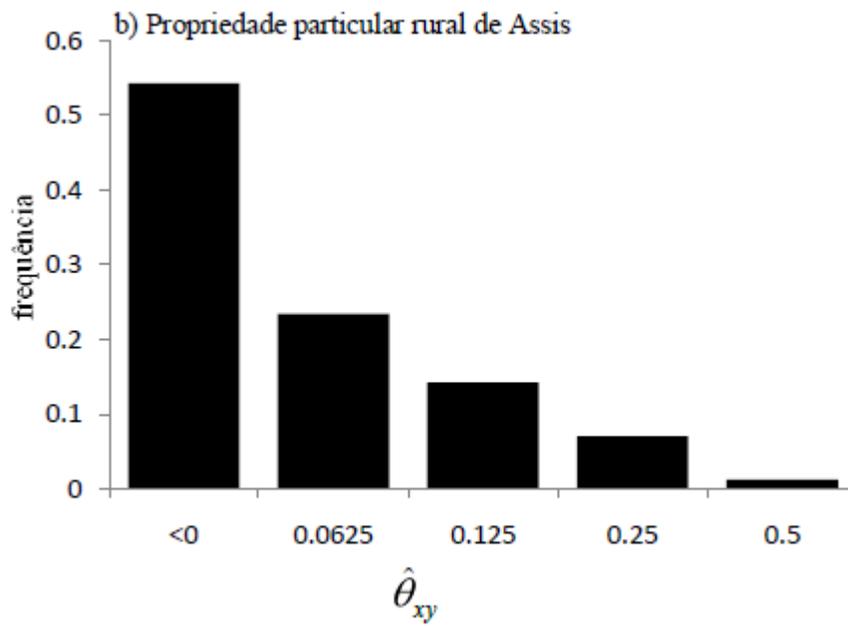
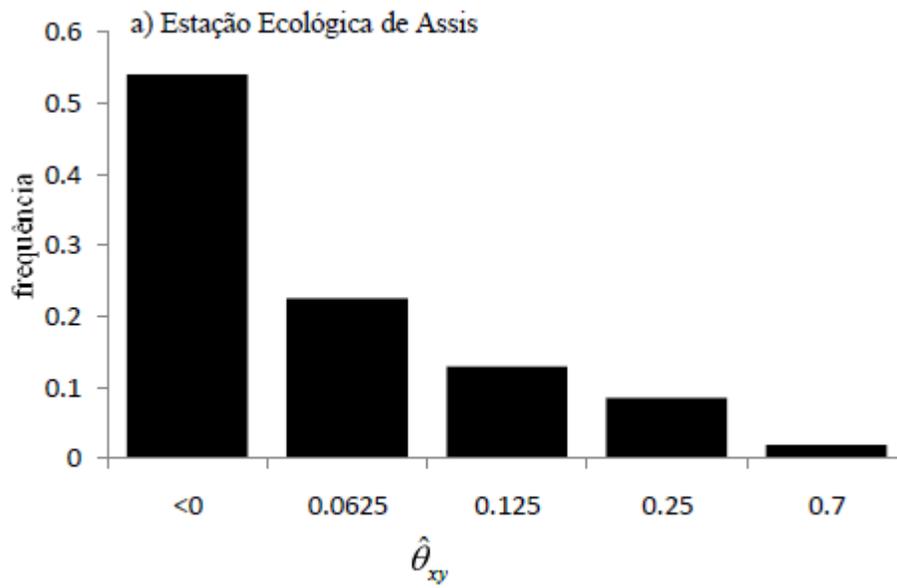
#### 4.6 Tamanho efetivo populacional e área mínima viável para conservação

Em geral, as populações estudadas indicaram uma baixa representatividade genética (Tabela 7). A diferença entre  $N_e$  e  $N$  está relacionada ao alto valor do índice de fixação ( $f$ ) e, principalmente, à grande quantidade de pares de indivíduos com  $\theta_{xy} > 0,0625$  (parentesco equivalente a primos; Figura 11 a - d). Baseando-se no tamanho efetivo de referência ( $N_{e(ref)} = 50, 500$  e  $1000$ ), a área mínima viável ( $\hat{AMV}$ ) para conservação genética *in situ* das populações estudadas encontram-se na Tabela 7.

Tabela 9 - Estimativas da área mínima viável (AMV) para conservação genética *in situ* para EEA (Estação Ecológica de Assis), PPRA (Propriedade particular rural de Assis), EEI (Estação Experimental de Itirapina), PPRB (Propriedade particular rural de Brotas), SP. Ano base 2010

População	N	$\hat{N}_e$	$\hat{AMV}_{(50)}$	$\hat{AMV}_{(500)}$	$\hat{AMV}_{(1000)}$
EEA	100	16,45	2,73	27,35	54,7
PPRA	100	19,22	7,8	78	156
EEI	100	14,27	8,1	80,7	161,3
PPRB	100	18,43	3,8	38	75,9

$n$  : tamanho amostral;  $\hat{N}_e$  : Tamanho efetivo populacional;  $d$  : densidade populacional em plantas por ha; AE: área atual estimada de cada fragmento;  $AMV_{1000}$ : área necessária para reter  $N_{e(ref)} = 1000$ ;  $AMV_{500}$ : área necessária para reter  $N_{e(ref)} = 500$ ;  $AMV_{50}$ : área necessária para reter  $N_{e(ref)} = 50$ , considerando o coeficiente de coancestria, de acordo com Sebbenn e Seoane (2005).



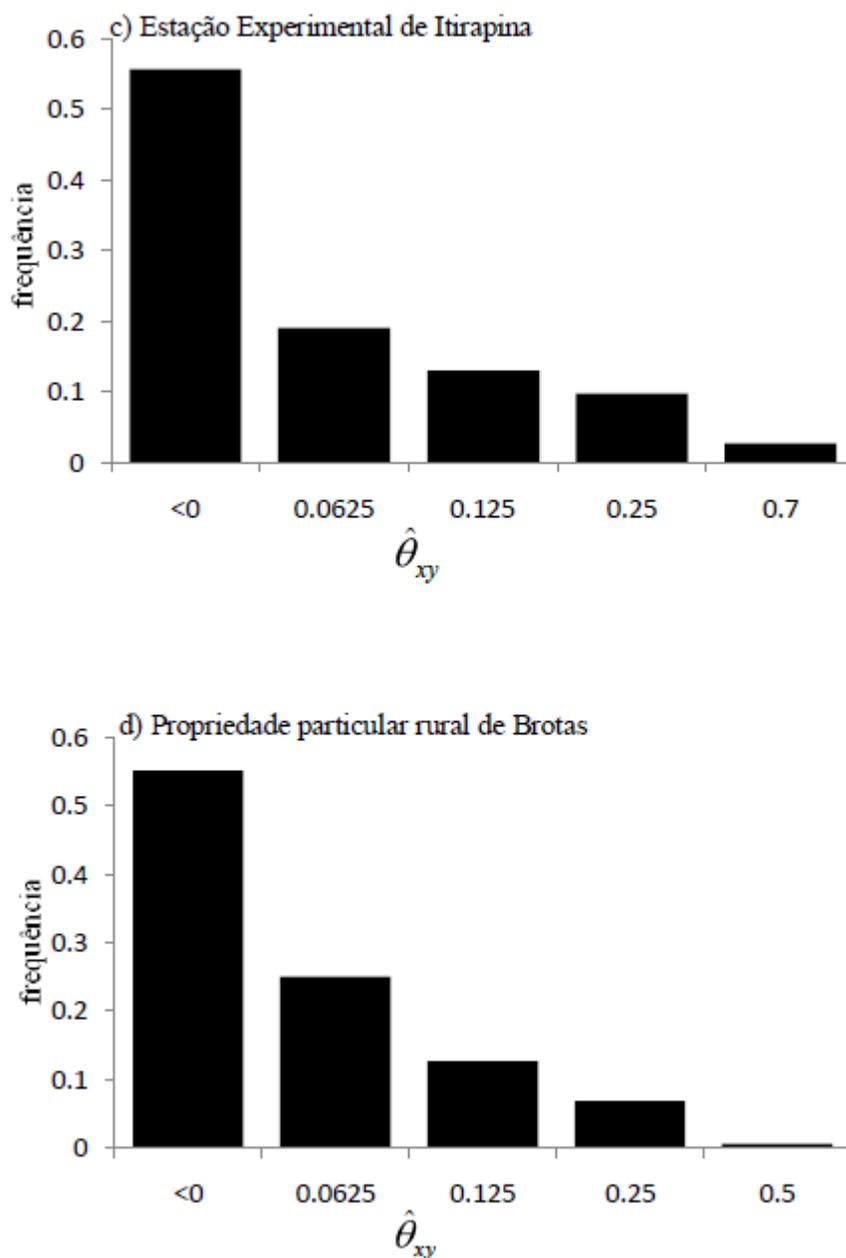


Figura 11 - Frequência de  $\hat{\theta}_{xy}$  entre pares de indivíduos de *C. langsdorffii* das populações estudadas, ano base 2010

#### 4.7 Fluxo gênico aparente

Os valores estimados de  $\hat{\theta}_p$ ,  $G_{ST}$  e  $\hat{R}_{st}$  apresentaram diferenças significativas entre as populações analisadas (Tabela 8). As diferenças observadas entre estas três estimativas ocorrem devido ao modelo mutacional utilizado no cálculo das mesmas. Enquanto o  $\hat{\theta}_p$  se baseia no modelo de alelos

infinitos, o  $\hat{R}_{st}$  utiliza o modelo de mutação aos passos. Por sua vez, o modelo do  $G_{ST}'$  considera, além das frequências alélicas no modelo de alelos infinitos, os diferentes tipos de alelos existentes nas populações. A diferenciação genética entre populações foi relativamente baixa para o estimador  $\hat{\theta}_p$ , intermediária para o  $\hat{R}_{st}$  e alta para a estatística  $G_{ST}'$  (Tabela 8).

A análise da distribuição da diversidade genética entre as populações, calculadas pelo método de Weir e Cockerham (1984), indicou uma baixa, porém significativa, diferenciação entre populações ( $\hat{\theta}_p \leq 0,071$ ), evidenciando que, aproximadamente, 93 % da diversidade genética se encontra dentro das populações (Tabela 8). O parâmetro  $N_m$  resultou no valor de, aproximadamente, 1 migrantes por geração entre as populações. Contudo, quando a análise da distribuição da diversidade genética foi medida pela estatística  $G_{ST}'$  de Hedrick (2005), verificou-se uma maior e significativa diferenciação genética entre as populações ( $G_{ST}' \leq 0,477$ ), indicando que, aproximadamente, 52,3 % da diversidade se encontra dentro das populações.

Tabela 10 - Divergência genética e fluxo gênico realizado entre as populações naturais de *C. langsdorffii*: EEA (Estação Ecológica de Assis), PPRA (Propriedade particular rural de Assis), EEI (Estação Experimental de Itirapina), PPRB (Propriedade particular rural de Assis), EEI (Estação Experimental de Itirapina), PPRB (Propriedade particular rural de Brotas), SP.  $\hat{\theta}_p$  = índice de divergência genética entre populações;  $G_{ST}'$  = índice de divergência genética (Hedrick, 2005);  $\hat{R}_{st}$  = índice de divergência genética (Goodman, 1997);  $N_m$  = número de imigrantes; IC<sub>95%</sub> = intervalo de confiança a 95% de probabilidade. Ano base 2010

Loco	$\hat{\theta}_p$	$\hat{R}_{st}$	$G_{ST}'$
EEA x PPRA	0,059	0,059	0,399
IC <sub>95%</sub>	± 0,003	± 0,013	± 0,016
$N_m$	1,000	1,000	0,095
EEA x EEI	0,071	0,107	0,477
IC <sub>95%</sub>	± 0,007	± 0,029	± 0,033
$N_m$	0,824	0,526	0,069
EEI x PPRB	0,060	0,163	0,432
IC <sub>95%</sub>	± 0,003	± 0,014	± 0,024
$N_m$	0,987	0,324	0,083

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Aspectos demográficos e estrutura genética espacial

As quatro áreas do presente estudo apresentam padrões fitogeográficos semelhantes, sendo a Estação Ecológica de Assis (EEA) e a propriedade rural de Assis (PPRA), situadas ao leste do Estado, apresentam uma fisionomia de cerradão e ecótono entre cerrado e floresta estacional semidecidual. Enquanto a Estação Ecológica de Itirapina (EEA) e a propriedade particular rural de Brotas, situadas ao oeste do Estado, apresentam uma fisionomia de cerradão. Nessas quatro áreas, os indivíduos apresentaram alta densidade e distribuição agregada. Segundo Condit et al. (2000), a distribuição espacial agregada é uma característica comum para a maioria das espécies arbóreas tropicais. Provavelmente, isto se deve à seleção de genótipos, à heterogeneidade ambiental (CLARK et al., 2004), à dispersão restrita de sementes (CONDIT et al., 2000) que, neste caso, pode ser barocórica (RESENDE; KLICK; SCHIAVINI, 2003) e zoocórica agregada (CLARK et al., 2004).

Nas populações estudadas ocorreu uma tendência de estruturação entre indivíduos mais próximos, sendo que esta diminuiu à medida que a distância aumentou. A estrutura genética espacial encontrada foi baixa, porém significativa para as populações analisadas. A existência de EGE por volta de 20 m de distância sugere que houve uma dispersão restrita de sementes. Esse fato poderia ser explicado pela dispersão de sementes através de aves de pequeno porte, que regurgitam as sementes próximas à planta-mãe (MOTTA JUNIOR; LOMBARDI, 1990), restringindo o fluxo gênico entre árvores distantes. Além disso, há frutos que não são consumidos pela fauna e caem ao solo, ficando sob a copa da planta-mãe.

Hamrick, Murawski e Nason (1993) verificaram que em espécies arbóreas tropicais, os indivíduos mais próximos possuem uma maior proporção de alelos em comum do que os mais distantes, e que a estrutura de família tende a desaparecer nos estágios mais avançados do ciclo de vida. Alguns estudos mostram que espécies arbóreas tropicais podem apresentar diversos padrões de agregação espacial, onde indivíduos mais jovens tendem a apresentar estruturação genética espacial enquanto os indivíduos mais velhos possuem distribuição aleatória (NG; LEE; KOH, 2004). Deve-se ressaltar que as populações do presente estudo consistiram de indivíduos acima de 5 cm de diâmetro, e que pode estar ocorrendo a de sobreposição de gerações. A alta densidade de *C. langsdorffii* no cerradão das áreas amostradas, provavelmente, aumentaria a taxa de mortalidade nos indivíduos jovens

devido à competição intraespecífica, o que explicaria os baixos níveis de coancestria encontrados.

## 5.2 Diversidade genética e parâmetros afins

Existem altos níveis de diversidade genética em todas as populações de *C. langsdorffii* amostradas (EEA, PPRA, EEI e PPRB). Estes altos valores de diversidade genética demonstram que tanto as populações localizadas nas unidades de conservação (EEA e EEI) quanto nas propriedades particulares rurais (PPRA e PPRB) apresentam um grande potencial para a conservação genética *in situ* e podem ser utilizadas como fonte de material genético para a conservação *ex situ*. Hamrick e Murawski (1991) compararam a diversidade genética em espécies arbóreas tropicais comuns e raras e verificaram a tendência de que espécies comuns apresentam maiores níveis de diversidade em relação às espécies raras. No caso de *C. langsdorffii*, a ampla distribuição geográfica, a alta densidade populacional, o ciclo de vida longo e o sistema de reprodução com predominância de cruzamentos, são características que explicam sua alta diversidade genética intrapopulacional (LEIMU et al., 2006). A alta diversidade genética foi verificada em outros estudos com essa espécie (MARTINS et al., 2008; OLIVEIRA; CARVALHO; ROSADO, 2002; CIAMPI; GRATTAPAGLIA 2001; PINTO; SOUZA; CARVALHO, 2004; SEBBENN et al.; 2010; TARAZI; 2009).

Vale salientar, que além da riqueza alélica detectada, um considerável número de alelos exclusivos foi encontrado (42) para as populações de *C. langsdorffii* estudadas, sendo, a grande maioria, inseridos nas populações de propriedade particular rural (29). Tanto a riqueza alélica quanto a presença de alelos raros ou exclusivos em populações naturais de espécies arbóreas são importantes na tomada de decisões conservacionistas (KALINOWSKI, 2004). De acordo com esses dados, deve-se fazer um esforço para conservar estas populações de *C. langsdorffii* localizadas nas propriedades particulares rurais, pois a perda de uma delas poderá acarretar um prejuízo genético importante para a manutenção da espécie.

A alta porcentagem de alelos raros encontrados nas populações possivelmente evidencia o comprometimento das mesmas com a perda de diversidade genética, através da deriva genética. Tal fato é mais acentuado na população de Brotas, na qual o número de alelos raros é aparentemente maior. A porcentagem da perda de alelos (geralmente alelos raros) é o melhor indicativo para evidenciar a perda de diversidade genética em populações oriundas de fragmentação (BARRET; KOHN, 1991). Desse modo, apesar de ter sido detectada uma alta diversidade genética nestas populações, existe a possibilidade de que a deriva genética esteja atuando. Desse modo, as frequências genotípicas se

afastam daquelas da população original, podendo levar a perda alelos (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996).

A maioria dos locos SSR analisados não aderiram às proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), sendo detectado um déficit de heterozigotos nas populações. Essa falta de heterozigotos pode ser gerada por endogamia através da autofecundação e cruzamentos entre parentes, segregação de alelos nulos nos locos avaliados ou por estrutura genética populacional (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Outro fator que poderia influenciar no déficit de heterozigotos é o efeito gargalo ou “bottlenecks”, porém, no presente estudo, não foram detectadas reduções recentes no tamanho efetivo populacional.

A presença de alelos nulos nos locos provoca o “mascaramento” de indivíduos heterozigóticos e, desse modo, induz a diminuição das frequências estimadas de heterozigotos nas populações e a superestimação dos valores de endogamia (PEMBERTON et al., 1995). No presente estudo não foi possível determinar a presença de alelos nulos, pois seriam necessárias amostras de progênies para analisar a segregação dos locos marcadores. Mas sabe-se que os marcadores SSR desenhados especificamente para *C. langsdorffii* apresenta ausência de alelos nulos, ausência de ligação física e segregação mendeliana (TARAZI ET AL, 2010). Dessa forma, existe uma baixa probabilidade para existência de alelos nulos nas populações.

Outra explicação seria ainda uma subdivisão dessas populações em unidades reprodutivas diferenciadas e isoladas, gerada pelo efeito Wahlund. Segundo Wright (1931), a subdivisão de uma população elevaria a probabilidade de cruzamentos entre indivíduos aparentados, conseqüentemente, aumentando a coancestria e a endogamia, e reduzindo a proporção de heterozigotos na população. Contudo, no presente estudo, estrutura genética espacial foi pequena e, conseqüentemente, a contribuição do efeito Wahlund para os altos níveis de endogamia encontrados foi baixa.

A alta taxa de endogamia encontrada nas populações provavelmente pode ser explicada pela sobreposição de gerações. Tal fato, possivelmente, tenha ocorrido devido ao método de amostragem adotado, no qual indivíduos acima de 5 cm de diâmetro foram considerados, incluindo jovens e adultos. No estudo realizado por Tarazi (2009) em uma população de *C. langsdorffii* na Estação Ecológica de Assis, o índice de fixação foi significativamente menor nos adultos em comparação com os jovens e as progênies, devido aos cruzamentos entre aparentados, autofecundações e a seleção dos indivíduos heterozigóticos. Diversos autores têm observado a seleção favorecendo indivíduos heterozigóticos em várias espécies arbóreas (DOLIGEZ; JOLY, 1997; GAIOTTO; GRATTAPAGLIA; VENCOVSKY,

2003; LEPSCH-CUNHA; KAGEYAMA; VENCOVSKY, 1999; SEBBEN et al., 2000) em que se verifica uma tendência ao aumento da heteroziguidade observada dos descendentes para os adultos, neste caso, os jovens dessas populações poderiam estar contribuindo para os altos níveis de fixação encontrados.

### 5.3 Estrutura Genética e Fluxo Gênico Aparente

Em geral, no presente estudo, as populações geograficamente mais próximas apresentaram menor divergência genética. Entretanto, ressalta-se que o fluxo gênico encontrado neste trabalho é histórico, e teve importância na formação destas populações antes da fragmentação. No entanto, é de suma importância futuramente avaliar o fluxo gênico contemporâneo, através da análise de paternidade, a fim de fazer-se inferência do nível atual de isolamento genético destas populações e das suas eventuais potencialidades para sobreviverem ou divergirem em termos genéticos de outras populações em longo prazo.

A estimativa do fluxo gênico aparente mostrou quadros diferentes em função dos diferentes métodos de estimação da diferenciação genética entre populações. A estimativa  $\hat{\theta}_p$  demonstrou que essas populações apresentaram um fluxo gênico baixo, porém suficiente para contrapor os efeitos de deriva genética. O parâmetro  $\hat{R}_{st}$  obteve valores intermediários, enquanto que o  $G_{ST}$  estimado pelo método de Hedrick (2005) indicou uma alta diferenciação genética entre populações. Esta grande diferença na medida de diferenciação genética se deve ao método de cálculo. Os métodos de análise das estatísticas  $F$  (NEI, 1973, 1977; WEIR; COCKERHAM, 1984) são baseados somente nas frequências dos alelos e na diversidade genética esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro das populações. Por outro lado, o parâmetro genético de Hedrick (2005), além de depender das frequências dos alelos e da variação dentro das populações, inclui a identidade dos alelos nos cálculos.

Como no presente estudo foi encontrado um alto índice de alelos exclusivos e raros nas populações, o  $G_{ST}$  é o estimador que melhor representa a real divergência genética (cerca de 47 %) entre as populações estudadas. Seoane, Kageyama e Sebben (2000) citam presença de alelos exclusivos em algumas populações é indicativo de fluxo gênico restrito, o que pode levar a um aumento da divergência genética entre as populações. De acordo com a estimativa  $G_{ST}$ , as populações estudadas apresentam um fluxo gênico baixo e insuficiente para contrapor os efeitos de deriva genética.

#### 5.4 Implicações para a conservação

Nos programas de conservação das reservas genéticas *in situ* devem ser levados em conta características genéticas e demográficas das espécies, considerando que este fato implica na possibilidade de evolução contínua e no desenvolvimento de novas estratégias adaptativas (MARTINS, 1987). A alta diversidade genética encontrada nas populações analisadas demonstrou que essas populações apresentam um grande potencial para a conservação genética *in situ*, como já mencionado. A estimativa do tamanho efetivo para as populações analisadas neste estudo foi menor que 50 indivíduos, sendo insuficiente para manter a endogamia estável em curto prazo, de até dez gerações (FRANKEL; SOULÉ, 1981). Contudo, as áreas amostradas representam apenas uma pequena fração do total de área de cada fragmento. Como *C. langsdorffii* encontra-se em alta densidade em todas as áreas amostradas, possivelmente o número de indivíduos existentes em cada local de estudo seria suficiente para alcançar um valor de  $N_e = 500$ . O mesmo raciocínio vale para a estimativa de área mínima viável de *C. langsdorffii* nas áreas estudadas. Com exceção do fragmento da PPRA, que comportaria uma  $AMV_{(500)}$ , as outras três áreas estudadas comportariam pelo menos uma  $AMV_{(1000)}$ , logo, os respectivos fragmentos, possuem um grande potencial para a conservação *in situ*, para a coleta de sementes (conservação *ex situ*) e recuperação ambiental.

Ressalta-se, principalmente, a importância da conservação dos fragmentos localizados em propriedades particulares rurais para a manutenção da conectividade entre fragmentos florestais no cerrado. Atualmente, com o ritmo acelerado de substituição do cerrado brasileiro por áreas cultivadas somado a existência de poucas unidades de conservação, menos de 3,15% de sua abrangência, retrata a necessidade dos proprietários rurais serem considerados os principais colaboradores para conservação da biodiversidade. Incentivos fiscais devem ser criados para o desenvolvimento sustentável das atividades agrícolas proporcionando um melhor uso da terra (HARVEY et al., 2008; PERFECTO; VANDERMEER, 2008).

A legislação prevê que 20% da área total das propriedades rurais sejam conservadas na forma de reserva legal, além de garantir corredores contínuos de fluxo gênico representados pelas áreas de proteção permanente (UCs). Porém, o atual alarmante quadro de degradação do cerrado pode ainda piorar com a aprovação no novo Código Florestal. Tal fato se deve pela proposta de desobrigatoriedade da reserva legal em pequenas propriedades rurais, além de diminuição da faixa de área de proteção permanente em rios com até 5 m de largura de 30 para 15 m. Com o novo código, em alguns Estados, toda a terra com até 400 hectares vai poder, pela proposta, ser usada para agropecuária.

Uma outra forma de aliar à conservação do cerrado é através de sistemas agroflorestais (SAFs) (HARVEY et al., 2008; PERFECTO; VANDERMEER, 2008). Estes sistemas poderiam servir como barreira contra incêndios no cerrado *stricto sensu*, fornecer sombra para as espécies típicas de cerradão, funcionar como corredores ecológicos e áreas de produção biodiversificadas, servindo como fonte de renda alternativa para os produtores rurais. Além disso, os SAFs poderiam reduzir os efeitos de borda, no caso do cerradão, como uma “zona tampão” ao redor dos fragmentos, promovendo a restauração da paisagem. Os sistemas agroflorestais têm um importante papel na busca de alternativas para o desenvolvimento rural sustentável (VIANA et al., 1997), principalmente por transformar as atividades de produção de degradantes em regenerativas.

O parâmetro  $G_{ST}$  demonstrou que as populações estudadas devem ser tratadas como Unidades Significativas Evolutivas (USE) e como Unidades Independentes para o Manejo (UIM). Faz-se necessária a conservação e o monitoramento dos caracteres evolutivos em cada reservatório gênico distribuído numa macrorregião (FRASER; BERNATCHEZ, 2001). Assim, definem-se diferentes formas de manejo e conservação para cada população, assumindo os aspectos evolutivos de caráter regional (PALSBOLL; BÉRUBÉ; ALLENDORF, 2007). Desse modo, ressalta-se a importância da preservação dos remanescentes de cerrado localizados em propriedades particulares rurais visando aumentar a conectividade entre esses fragmentos florestais e a preservação do pool gênico local.

## 6 CONCLUSÕES

As populações de *C. langsdorffi* localizadas nas propriedades particulares rurais apresentaram alta diversidade genética e uma quantidade de alelos exclusivos maior do que as UCs.

Devido à distância entre as áreas de estudo, o fluxo gênico aparente foi extremamente baixo.

A divergência genética entre as populações estudadas foi alta, indicando que cada população é considerada uma Unidade Independente para o Manejo (UIM) e, ao mesmo tempo, uma Unidade Evolutiva Significativa (USE).

Os resultados apontam a importância das áreas particulares de cerrado, próximas das Unidades de Conservação, para a conservação da espécie no Estado de São Paulo.



## REFERÊNCIAS

- AIZEN, M.A.; FEINSENGER, P. Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a Chaco Dry Forest, Argentina. **Ecology**, Washington, v. 75, n. 2, p. 330-351, 1994.
- ALENCAR, J.C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne - Leguminosae, na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 12, n. 1, p.75- 89, 1982.
- AZEVEDO, O.C.R. **Copaíba: Estrutura populacional, produção e qualidade do óleo-resina em populações nativas do Sudoeste da Amazônia**. 2004. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Manejo de Recursos Naturais) - Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2004.
- BARRETT, S.C.H.; KOHN, J.R. Genetic and evolutionary consequences of small population sizes in plants: implications for conservation. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (Ed.). **Genetics and conservation of rare plants**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 3-30.
- BITTENCOURT, J.V.M.; SEBBENN, A.M. Pollen movement and spatial genetic structure in a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. **Conservation Genetics**, Arlington, v. 9, p. 855-868, 2007.
- BIZERRIL, M.X.A. **Vivendo no cerrado e aprendendo com ele**. São Paulo: Saraiva, 2004. 79 p.
- BOYLE, T.J. Criteria and indicators for the conservation of genetic diversity. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2000. chap. 18, p. 239-251.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Programa Nacional de Conservação e Uso Sustentável do Bioma Cerrado- Programa Cerrado Sustentável**. Brasília, 2006. 56 p.
- \_\_\_\_\_. **Biodiversidade e florestas**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 10 set. 2009.
- BUZO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 30, p. 46-50, 2003.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira**. Colombo: EMBRAPA, CNPF, 2003. 639 p.
- CASCANTE, A.; QUESADA, M.; LOBO, J.J.; FUCHS, E.A. Effects of dry tropical Forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. **Conservation Biology**, Oxford, v. 16, p. 137-147, 2002.
- CAVERS, S.; DEGEN, B.; CARON, H.; LEMES, M.R.; MARGIS, R.; SALGUEIRO, F.; LOWE, A.J. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. **Heredity**, London, v. 95, p. 281–289, 2005.

CEPAGRI/UNICAMP. Clima dos Municípios Paulistas (série histórica de 1961-1990). Disponível em: <<http://orion.cpa.unicamp.br/portal/modules.php?name=climasp&file=municipios>>. Acesso em: 3 Dez. 2010.

CHEPTOU, P.O.; SCHOEN, D.J. Combining population genetics and demographical approaches in evolutionary studies of plant mating systems. **Oikos**, Copenhagen, v. 116, p. 271–279, 2007.

CHRISTIANINI, A.V. **Interação entre formigas, frutos e sementes em solos de cerrado: papel de formigas na biologia de sementes e plântulas**. 2007. 187 p. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CIAMPI, A.Y.; GRATTAPAGLIA, D. Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, v. 12, p. 1-32, 2001.

CIAMPI, A.Y.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera langsdorffii* Desf. (copaíba) Leguminosae – Caesalpinoideae e otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco. **Boletim de Pesquisa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, v. 16, p. 1-40, 2000.

CLARK, C.J.; POULSEN, J.R.; CONNOR, E.F.; PARKER, V.T. Fruiting trees as dispersal foci in a semi-deciduous tropical forest. **Oecologia**, Berlin, v. 139, p. 66-75, 2004.

CLARK, P.J.; EVANS, F.C. Distance to nearest neighbor as a measure of spatial relationships in populations. **Ecology**, Washington, v. 35, p. 445-456, 1954.

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

COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Estimation of gene flow from F-statistic. **Evolution**, Lancaster, v. 47, n. 3, p. 855-863, 1993.

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

COLLI, G.R.; BASTOS, R.P.; ARAÚJO, A.F.B. The character and dynamics of the Cerrado herpetofauna. In: OLIVEIRA, P.S.; MARQUIS, R.J. (Ed.). **The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical Savanna**. New York: Columbia University Press, 2002. p. 223-239.

CONDIT, R.; ASHTON, P.S.; BAKER, P.; BUNYAVEJCHEWIN, S.; GUNATILLEKE, S.; GUNATILLEKE, N.; HUBBELL, S.P.; FOSTER, R.B.; ITOH, A.; LA FRANKIE, J.V.; LEE, H.S.; LOSOS, E.; MANOKARAN, N.; SUKUMAR, R. E.; YAMAKURA, T. Spatial patterns in the distribution of tropical tree species, **Science**, Washington, v. 288, p. 1414-1418, 2000.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1984. 6 v.

- CRESTANA, C.M.; KAGEYAMA, P.Y. Ecologia de polinização de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae - Caesalpinioideae), “o óleo de copaíba”. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 1, p. 201-214, 1989.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.
- CROW, J. F.; AOKI, K. Group selection for polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, p. 6073-6077, 1984.
- DEGEN, B.; PETIT, R.; KREMER, A. SGS - Spatial Genetic Software: a computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structures of individuals and populations. **Journal of Heredity**, Washington, v. 92, p. 447-448, 2001.
- DICK, C.W.; HARDY, O.J.; JONES, F.A.; PETIT, R.J. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 1, p. 20-33, 2008.
- DI RIENZO, A.; PETERSON, A.C.; GARZA, J.C.; VALDES, A.M.; SLATKIN, M. FREIMER, N.B. Mutational processes of simple(sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 8, p. 3166-3170, 1994.
- DOLIGEZ, A.; JOLY, H. Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae), in French Guiana. **Heredity**, Washington, v. 79, p. 72-82, 1997.
- DURIGAN, G. Bases e diretrizes para a restauração da vegetação de cerrado. In: KAGEYAMA, P.Y.; OLIVEIRA, R.E.; MORAES, L.F.O.; ENGEL, V.E.; GANDARA, F.B. (Ed.). **Restauração ecológica de sistemas naturais**. Botucatu: FEPAP, 2003. p. 187-204.
- DURIGAN, G.; LEITÃO FILHO, H.F. Florística e fitossociologia de matas ciliares do oeste paulista. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 2, n. 7, p. 197-239, 1995.
- DURIGAN, G.; SIQUEIRA, M.F. de; FRANCO, G.A.D.C. Threats to the Cerrado remnants of the State of São Paulo, Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 355-363, 2007.
- EIRA, M.T.S.; SALOMÃO, A.N.; CUNHA, R. da; MELLO, C.M.C. de; TANAKA, D.M. Conservação de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. - Leguminosae. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 523-526, 1992.
- ELLSTRAND, N.C.; ELAN, D.R. Population genetic consequences of small population sizes: implication for plant conservation. **Annual Review of Ecological Systematics**, Palo Alto, v. 24, p. 217-242, 1993.

EMBRAPA. Disponível em: <[http://embrapa.br/linhas\\_acao](http://embrapa.br/linhas_acao)>. Acesso em: 05 set.2009.

ESTOUP, A.; JARNE, P.; CORNUET, J.M. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 1591-1604, 2002.

FELFILI, J.M.; SCARIOT, A.O.; SILVA, J.C.S. Biodiversidade, ecologia e conservação do cerrado: Avanços do conhecimento. In: SCARIOT, A.O.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Ed.). **Biodiversidade, ecologia e conservação do cerrado**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 25-44.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220 p.

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

FRAZER, D.J.; BERNATCHEZ, L. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 2741-2752, 2001.

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

FILGUEIRAS, T.S. Herbaceous plant communities. In OLIVEIRA, P.S.; MARQUIS, J.R. (Ed.). **The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna**. New York: Columbia University Press, 2002. p. 121-139.

FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E.; BROCHADO, A.L.; GUALA II, G.F. Caminhamento: um método expedito para levantamentos florísticos qualitativos. **Cadernos de Geociências**, Rio de Janeiro, n. 12, p. 39-43, 1994.

FUCHS, E.J.; LOBO, J.A.; QUESADA, M. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. **Conservation Biology**, Oxford, v.17, n. 1, p. 149-157, 2003.

GAIOTTO, F.A.; GRATAPAGLIA, D.; VENCOVSKY, R. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**, Cary, v. 94, p. 399-406, 2003.

GEBUREK, T. Effects of environmental population on the genetics of forest trees. In: YOUNG, A.; BOSCHER, D.; BOYLE, T. (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Collingwood: CSIRO, 2000. p. 135- 155.

GIFFORD, G.; BROWN, R. Microsatellite instability. In: ROULSTON J.E; BARTLETT, J.M.S. (Ed.). **Molecular diagnosis of cancer**. New York: Human Press, 2004. v. 97, p. 237-250.

GOMES, B.Z. **Estrutura da vegetação de cerrado e de transição entre cerrado e floresta paludícola no Horto Santa Fé (1) da Internacional Paper Ltda.(Brotas-SP)**. 2003. 33 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

GOODMAN, S.J. RSTCalc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and 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 (version 2.9.3)**. 2001. Disponível em: <[www.unil.ch/izea/software/fstat.html](http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html)>. Acesso em: 07 mar. 2008.

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

HAMRICK, J.L.; MURAWSKI, E.D.A. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon neotropical tree species. **Journal of Tropical Ecology**, London, v. 7, p. 395-399, 1991.

HAMRICK, J.L., MURAWSKI, D.A.; NASON J.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 107/108, n. 1, p. 281-297, June 1993.

HANSON, T.R.; BRUNSFELD, S.J.; FINEGAN, B.; WAITS, L.P. Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 2060-2073, 2008.

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.

HARVEY, C.A.; KOMAR, O.; CHAZDON, R.; FERGUSON, B.G.; FINEGAN, B.; GRIFFITH, D.M.; MARTÍNEZ-RAMOS, M.; MORALES, H.; NIGH, R.; SOTO-PINTO, L.; BREUGEL, M.V.; WISHNIE, M. Integrating agricultural landscapes with biodiversity conservation in the Mesoamerican hotspot. **Conservation Biology**, Oxford, v. 22, p. 8–15, 2008.

HEDRICK, P.W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, Lancaster, v. 59, n. 8, p. 1633-1638, 2005.

HENRIQUES, R.P.B. Influência da história, solo e fogo na distribuição e dinâmica das fitofisionomias no bioma do Cerrado. In: SCARIOT, A. O.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Ed.). **Biodiversidade, ecologia e conservação do cerrado**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 75-91.

INSTITUTO BRASILEIRO DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Ecosistemas – Cerrado**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em: 08 set. 2009.

INSTITUTO FLORESTAL. **Estação Experimental de Itirapina**. Disponível em: <[http://www.iflorestal.sp.gov.br/unidades\\_conservacao/index.asp](http://www.iflorestal.sp.gov.br/unidades_conservacao/index.asp)>. Acesso em: 23 mar. 2010.

JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Evolution and Ecology**, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 424-429, 1996.

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

KAGEYAMA, P.Y.; BIELLA, L.C.; PALERMO Jr., A. Plantações mistas com espécies nativas com fins de proteção a reservatórios. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. **Anais...** Campos do Jordão: SBS; SBEF, 1990. p. 109-113.

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA F.B.; SOUZA, L.M.I. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 12, n. 32, p. 65-70, dez. 1998

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B.; VENCOSKY, R. Conservação *in situ* de espécies arbóreas tropicais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELOIS, I.S. DE; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. cap. 7, p. 149-158.

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

KALINOWSKI, S.T; TAPER, M.L; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 1099-1106, 2007.

KER, J.C.; RESENDE, M. Recursos edáficos dos cerrados: ocorrência e potencial. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 8.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL SAVANNAS, 1., 1996, Brasília. **Anais...** Planaltina: EMBRAPA, CPAC, 1996. p. 15-19.

KLEIN, A.L. **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois**. São Paulo: UNESP; Imprensa Oficial do Estado, 2002. 147 p.

KLINK, C.A.; MACHADO, R. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Gainesville, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005.

KLINK, C.A.; MOREIRA, A. Past and current human occupation, and land use. In: OLIVEIRA, P.S.; MARQUIS, R.J. (Ed.). **Ecology and natural history of a neotropical Savanna**. New York: Columbia University Press, 2002. p. 69-88.

KRONKA, F.J.N.; NALON, M.A.; MATSUKUMA, C.K.; KANASHIRO, M.M.; YWANE, M.S.S.; PAVÃO, M.; DURIGAN, G.; LIMA, L.M.P.R.; GUILLAUMON, J.R.; BAITELLO, J.B.; BORGIO, S.C.; MANETTI, L.A.; BARRADAS, A.M.F.; FUKUDA, J.C.; SHIDA, C.N.; MONTEIRO, C.H.B.; PONTINHA, A.A.S.; ANDRADE, G.G.; BARBOSA, O.; SOARES, A.P. **Inventário florestal da vegetação natural do Estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente; Instituto Florestal; Imprensa Oficial, 2005. 200 p.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P.; LEMOS FILHO J.P.; LOVATO, M.B. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 1143–1152, 2001.

LANDERS, J.N. O plantio direto na agricultura: o caso do Cerrado. In: LOPES, I.V.I.; WIETHÖLTER, S.; GUIMARÃES, L.R.; SILVA, C.A. (Org.). **Gestão ambiental no Brasil: experiências e sucesso**. 3. ed. Rio de Janeiro: FGV, 2000. p. 11-34.

LEIMU, R.; MUTIKAINEN, P.; KORICHEVA, J.; FISHER, M. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? **Journal of Ecology**, Oxford, v. 94, p. 942–952, 2006.

LEPSCH-CUNHA, N.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOVSKY, R. Genetic diversity of *Couratari multiflora* and *Couratari guianensis* (Lecythydaceae): consequences of two types of rarity in central Amazonia. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 8, p. 1205-1218, 1999.

LIMA, J.E.F.W.; SILVA, E.M. Estimativa da produção hídrica superficial do Cerrado brasileiro. In: SCARIOT, A.O.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Ed.). **Biodiversidade, ecologia e conservação do cerrado**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 63-71.

LINDGREN, D.; GEA, L.; JEFFERSON, P. Loss of genetic diversity monitors by status number. **Silvae Genetica**, Forstgenetik, v. 45, n. 1, p. 52-59, 1996.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, p. 397-401, 1989.

LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 82, p. 1420-1425, 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.

LUIKART, G.; CORNUET, J.M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation Biology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 228-237, 1998.

LYNCH, M.A. quantitative-genetic perspective on conservation issues. In: AVISE, J.; HAMRICK, J. (Ed.). **Conservation genetics: case histories from nature**: New York: Chapman and Hall, p. 471-501, 1996.

MACHADO, R.B.; RAMOS NETO, M.B.; HARRIS M.B.; LOURIVAL, R.; AGUIAR, L.M.S. Análise de lacunas de proteção da biodiversidade no Cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO. 4., 2004. **Anais...** Curitiba: Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, 2004. p. 29-38.

MARTINS, K. **Diversidade genética e fluxo gênico via pólen e sementes em populações naturais de *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) no Sudeste de Goiás**. 2005. 128 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MARTINS, K.; SANTOS, J.D.; GAIOTTO, F.A.; MORENO, M.A.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae - Caesalpinioideae) em fragmentos florestais do Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, p. 61-69, 2008.

MARTINS, P.S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação "in situ". **IPEF**, Piracicaba, n. 35, p. 71-78, 1987.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JUNIOR, M.C.; RESENDE, A.V.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E. Flora vascular do Cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2008. No prelo.

METZGER, J.P.; RODRIGUES, R.R. Mapas-síntese das diretrizes para conservação e restauração da biodiversidade no Estado de São Paulo. In: SÃO PAULO. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. **Diretrizes para conservação e restauração da biodiversidade no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2008. p.248.

MIRANDA, E.S.; SATO, M.N. Efeitos do fogo na vegetação lenhosa do Cerrado. In: SCARIOT, A.O.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Ed.). **Biodiversidade, ecologia e conservação do cerrado**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 95-104.

MORENO, M.A. **Estrutura genética e diversidade clonal de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne) em duas populações no Cerrado do Estado de São Paulo**. 2009.116 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MOTTA-JÚNIOR, J.C.; LOMBARDI, J.A. Aves como agentes dispersores da copaíba (*Copaifera langsdorffii*, Caesalpiniaceae) em São Carlos, estado de São Paulo. **Ararajuba: Revista Brasileira de Ornitologia**, Brasília, v. 1, p. 105-106, 1990.

MURCIA, C. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 10, p. 58–62, 1995.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONESCA, G.A.B. da; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853–858, 2000.

NAMKOONG, G.; BOYLE, T.; EL-KASSAB, Y.A.; PALMBERG-LERCHE, C.; ERIKSSON, G.; GREGORIUS, H.R.; JOLY, H.; KREMER, J.A.; SAVOLAINEN, O.; WICKNESWARI, R.; YOUNG, A.; ZEH-NLO, M.; PRABHU, R. **Criteria and indicators sustainable forest management: assessment and monitoring of genetic variation**. Rome: FAO, 2002. 29 p.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

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

\_\_\_\_\_. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.

NG, K.K.S.; LEE, S.L.; KOH C.L. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 657–669, Mar. 2004.

OLIVEIRA, A.F.; CARVALHO, D.; ROSADO, S.C.S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 331-338, 2002.

OLIVEIRA, J.E.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OHTA, T.; KIMURA, M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. **Genetic Research**, Cambridge, v. 33, p. 201-204, 1973.

PAIVA, L.A.; RAO, V.S.; GRANOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* óleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal Ethnopharmacology**, Cagliari, v. 62, n. 1, p. 73-78, 1998.

PALSBOLL, P.J.; BÉRUBÉ, M., ALLENDORF, F.W. Identification of management units using population genetic data. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 11-16, 2007.

PEDRONI, F. Ecologia da copaíba. In: MORELLATO, P.C.; LEITÃO FILHO, H.F. (Ed.). **Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana: Reserva de Santa Genebra**. Campinas: UNICAMP, 1995. p. 70-76.

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

PEMBERTON, J.M.; SLATE, J.; BANCROFT, D.R.; BARRET, J.A. Non-amplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 4, p. 249-252, 1995.

PERFECTO, I.; VANDERMEER, J. Biodiversity conservation in tropical agroecosystems: a new conservation paradigm. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v.1134, p.173–200, 2008.

PINTO, L.R.; VIEIRA, L.M.C.; SOUZA, A.P.; SOUZA JÚNIOR, C.L. Isoenzimas e microssatélites em plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 4, n. 20, p. 16-19, 2001.

PINTO, S.I.C.; SOUZA, A.M.; CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffii* Desf. Em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 65, p. 40-48, 2004.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNEUT, J.J. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 90, n. 4, p. 502-503, 1999.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, Oxford, v. 80, p. 223-230, 1997.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 86, p. 248–249, 1995.

REED, D.H. Relationship between population size and fitness. **Conservation Biology**, Oxford, v. 19, p. 563–568, 2005.

RIBEIRO, J.F.; WALTER B.M.T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S.; ALMEIDA, S.P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMPRAPA Cerrados, 1998. p. 87-166.

SANKARAN, M.; HANAN, N.P.; SCHOLE, R.J.; RATNAM, J.; AUGUSTINE, D.J.; CADE, B.S.; GIGNOUX, J.; HIGGINS, S.I.; LE ROUX, X.; LUDWIG, F.; ARDO, J.; BANYIKWA, F.; BRONN, A.; BUCINI, G.; CAYLOR, K. K.; COUGHENOUR, M.B.; DIOUF, A.; EKAYA, W.; FERAL, C.J.; FEBRUARY, E.C.; FROST, P.G.H.; HIERNAX, P.; HRABAR, H.; METZGER, K.L.; PRINS, H.H.T.; RINGROSE, S.; SEA, W.; TEWS, J.; WORDEN J.; ZAMBATIS, N. Determinants of woody cover in African savannas. **Nature**, London, v. 438, n. 8, p. 846-849, 2005.

SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE. Programa Estadual para a Conservação da Biodiversidade. **Cerrado**: bases para conservação e uso sustentável das áreas de Cerrado do Estado de São Paulo. São Paulo, 1997. 111p. (Série PROBIO/SP).

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

SEBBEN, A.M.; CARVALHO, A.C.M.; FREITAS, M.L.M.; MORAES, S.M.B.; GAINO, A.P.S.C.; SILVA, J.M. da; 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, 2010.

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

SILVA, D.A. Levantamento do meio físico das Estações Ecológica e Experimental de Itirapina, São Paulo, Brasil. **Revista Instituto Florestal**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 113-128, jun. 2005.

SLATKIN, M. A measure of population based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Austin, v. 139, n.1, p. 457-462, Jan.1995.

TARAZI, R. **Diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico em uma população de *Copaifera langsdorffii* Desf. no cerrado**. 2009. 141 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TROPPEMAYER, H. Biogeografia e Meio Ambiente. Metodologias simples para pesquisar o Meio Ambiente. 5. ed. Rio Claro: Divisa, 2004. p. 232.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**. São Paulo, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

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

VIANA, V.M.; MATOS, J.C.S.; AMADOR, D.B. Sistemas agroflorestais e o desenvolvimento rural sustentável no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., 1997, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: EMBRAPA, p. 18, 1997.

WEBER, J.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphism, which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal Human Genetic**, Chicago, v. 44, p. 388- 396, 1989.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data**. 2<sup>nd</sup> ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445 p.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lawrence, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, New York, v. 15, n. 4, p. 313-354, 1951.

YOUNG, A.; BOYLE, T. Forest fragmentation. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Collingwood: CSIRO, 2000. p. 123-132.

YOUNG, A.; BOYLE, T., BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.

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

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO, J.B.; BRONDANI, C.; VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, p. 512-514, 2002.

ZUCCHI, M.I.; PINHEIRO, J.B.; COELHO, A.S.G.; MORAIS, L.K. de; COUTO, M.A.; CHAVES, L.J.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in Brazilian Cerrado utilizing RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 10, p. 975-980, 2005.