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

**Estudos genéticos de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em área natural e
restauração florestal com espécies nativas**

Lya Carolina da Silva Mariano Pereira

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora
em Ciências, Programa: Recursos Florestais. Opção em:
Conservação de Ecossistemas Florestais

**Piracicaba
2017**

Lya Carolina da Silva Mariano Pereira
Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas

**Estudos genéticos de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em área natural e restauração
florestal com espécies nativas**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **KARINA MARTINS**

Tese apresentada para a obtenção de título de Doutora
em Ciências, Programa: Recursos Florestais. Opção em:
Conservação de Ecossistemas Florestais

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Pereira, Lya Carolina da Silva Mariano

Estudos genéticos de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em área natural e restauração florestal com espécies nativas / Lya Carolina da Silva Mariano Pereira - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

83 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Depressão endogâmica 2. Diversidade genética 3. Mata Atlântica 4. Reflorestamento 5. Sistema de cruzamento I. Título

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama, por ter aceitado me orientar, pelos ensinamentos em aula, em reuniões e em conversas durante o cafezinho, que mesmo ocorrendo por pouco tempo foram de grande valia. E à Cris Rocha, que mesmo em seu momento de dor, me ajudou na tentativa de permanecer com o projeto e fomento.

À Profa. Dra. Karina Martins, que não me conhecendo, aceitou me orientar no meio do processo, pelo acolhimento durante os experimentos na UFSCar – Sorocaba, pela amizade e pela força principalmente na etapa final.

Ao Prof. Dr. Evandro Vagner Tambarussi pela coorientação na montagem do experimento e na fase final.

A Profa. Dra. Lia Maris Orth Ritter Antiqueira pela coorientação no início do doutorado, principalmente na elaboração do projeto.

À CAPES, pela bolsa concedida para a realização do trabalho.

Aos professores que aceitaram participar da banca examinadora da defesa: Profa. Dra. Marina Corrêa Côrtes, Prof. Dr. Evandro Vagner Tambarussi, Prof. Dr. José Marcelo D. Torezan e Prof. Dr. Sérgio Gandolfi e pelas contribuições e sugestões dadas para a melhoria do trabalho. Ao Prof. Dr. Edson Vidal, Prof. Dr. Flavio B. Gandara e ao Dr. João D. Santos pelas contribuições na qualificação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Florestais por todo o suporte durante doutorado, inclusive aos dois coordenadores no período Prof. Dr. Edson José Vidal da Silva e Prof. Dr. Demóstenes Ferreira da Silva Filho, por todo apoio. Aos professores do programa pelas aulas e apoio. E à Giovana, por tudo: orientações burocráticas, desabafos, conversas, conselhos, risadas, e a parceria de sempre.

Aos funcionários da CESP por toda ajuda na escolha das áreas de restauração, principalmente ao Celso Machado por todo o suporte antes e durante os campos. Aos ajudantes de campo Assis Pereira de Souza (Paraíba) e Edvan Ferreira Moura.

À Duke Energy, e funcionários Rogério Marchetto, Simone Santos, Claudio Heleno, Norberto Viana e Miguel Conrado, por permitirem o acesso à área de restauração no município de Rosana.

Aos funcionários do Parque Estadual Morro do Diabo, pelo suporte e auxílio em campo na busca de indivíduos para o estudo. Principalmente ao gestor do parque Eriqui M. Inazaki e ao David Ferreira de Soares (seu Dario). E ao monitor Wilton Felipe Teixeira pelo envio de fotos do parque.

À técnica Elza Ferraz pelo auxílio com o desenvolvimento inicial da pesquisa.

À técnica Ms. Maria Andréia Moreno pelo auxílio no início da pesquisa e principalmente pela paciência e explicação de técnicas, mesmo depois de ter mudado de laboratório.

Aos funcionários do Viveiro do Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP Donizete Aparecido Sabino e Natanael da Silva Duarte, por todo auxílio desde o preparo do plantio e durante os experimentos, além do cuidado e carinho com as mudas produzidas durante o estudo.

Aos estagiários do Largea que me ajudaram a medir, pesar, lavar e plantar minhas 1.532 sementes de jatobá, Alexandre e Eduardo. Aos alunos de iniciação científica do Largea, que coorientei, Alexandre, Camilla e Mayara, por ajudarem na minha formação como profissional. E mais uma vez a Alexandre e Mayara, pela ajuda em meu segundo campo.

Ao técnico Ms. Renato Kenji Kimura por toda a paciência em me ensinar a trabalhar com os equipamentos de genotipagem e me auxiliar no uso do Laboratório Didático de Genética da UFSCar – Sorocaba, assim como a Profa. Dra. Ana Claudia Lessinger por permitir o uso do mesmo.

À Vera Beatriz Ferreira Gualtieri que me ajudou a superar e a manter a calma durante todos os processos pelos quais passei durante o doutorado.

A todos os amigos que fiz durante o doutorado pelas conversas, orientações, parcerias tanto profissionais como pessoais, principalmente a Cris, Débora, Fer, Cambs, Cinthia, Perla, Laine, Nino, Rafa, Sams e Lu.

Às meninas que moraram comigo: Miriam, Ana Paula, Cinthia, Maria Letícia, Hannah, Taís, Carolina e Júlia, por toda paciência em especial a Jack que partilhou a casa comigo por mais tempo.

Às amigas de antes e sempre Júlia Luciana, Carolis, Renatildes, Katião, Lu Franci e às Lhindas, pelo apoio e incentivo constante, e por partilharem dos mesmos sentimentos durante o doutorado.

Aos amigos do Largea por toda ajuda, durante todo o processo, Bruna, Marcelo, Mayara e Natália, que deixaram o clima mais descontraído possível (na “good vibes”), principalmente nas etapas de laboratório que foram bem desgastantes e pesadas.

E em especial a toda à minha família, principalmente aos meus Pais, Lúcia e Edison, meus irmãos, Elyne e Victor Luiz e ao meu namorado Leonardo, que me apoiaram em todos os momentos, inclusive nas horas mais difíceis, sem contar com a ajuda em campo “né pai?!”.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
1.1. CONSEQUÊNCIAS GENÉTICAS DA FRAGMENTAÇÃO	11
1.2. RESTAURAÇÃO FLORESTAL E GENÉTICA.....	13
1.3. ESPÉCIE DE ESTUDO	17
1.4. OBJETIVOS E HIPÓTESES	19
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 1: GENÉTICA POPULACIONAL DE JATOBÁ (<i>Hymenaea courbaril</i> L.) EM ÁREA NATURAL E RESTAURAÇÃO FLORESTAL NA REGIÃO DO PONTAL DO PARANAPANEMA - SP	27
RESUMO	27
ABSTRACT	28
1. INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1. ÁREAS DE ESTUDO E AMOSTRAGEM	31
2.1.1. Parque Estadual Morro do Diabo.....	33
2.1.2. Reflorestamento Anaurilândia.....	37
2.1.3. Reflorestamento Rosana.....	40
2.2. PROGÊNIES	43
2.3. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA	43
2.4. GENOTIPAGEM	44
2.5. ANÁLISE DE DADOS.....	46
2.5.1. Desequilíbrio de ligação.....	46
2.5.2. Diversidade Genética	46
2.5.3. Estrutura genética populacional	47
2.5.4. Estrutura genética espacial.....	47
2.5.5. Sistema de reprodução	47
3. RESULTADOS	48
3.1. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO	48
3.2. DIVERSIDADE GENÉTICA.....	49
3.3. ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL.....	51
3.4. ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL	52
3.5. SISTEMA DE REPRODUÇÃO	54
4. DISCUSSÃO	55
5. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS	58
CAPÍTULO 2:DEPRESSÃO ENDOGÂMICA EM PROGÊNIES DE JATOBÁ (<i>Hymenaea courbaril</i> L.).....	65
RESUMO	65
ABSTRACT	66
1. INTRODUÇÃO	67
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	69
3. RESULTADOS	71
4. DISCUSSÃO	75
5. CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	77
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83

RESUMO

Estudos genéticos de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em área natural e restauração florestal com espécies nativas

O bioma Mata Atlântica tem sofrido com a fragmentação florestal e como forma de reestabelecer ambientes florestais são realizados plantios de restauração. Porém, por muito tempo houve preocupação somente com a composição florística das áreas e a diversidade genética foi negligenciada. Além disso, muitas áreas são implantadas a partir de sementes coletadas em áreas florestais geralmente pouco conservadas, pequenas e isoladas, o que pode comprometer a qualidade genética das mudas, produzindo indivíduos menos adaptados em decorrência da depressão endogâmica. Assim este trabalho teve como objetivo principal analisar o aspecto genético em áreas de restauração na região do Pontal do Paranapanema e área natural de referência, o Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), utilizando o jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) como espécie modelo. No capítulo 1 com o objetivo de verificar a diversidade genética de *H. courbaril* em áreas de restauração florestal, foram selecionadas duas áreas de plantio com espécies nativas. Nestas áreas e no PEMD foram coletadas amostras foliares de indivíduos adultos que foram genotipadas para oito locos microssatélites. No PEMD ainda foram coletados frutos em 12 matrizes para caracterização do sistema reprodutivo. As três áreas estudadas apresentaram diversidade genética e níveis de endogamia similares. Nas três áreas de estudo foi identificada baixa estruturação genética espacial. Houve predomínio de fecundação cruzada para a produção de frutos na área natural, porém a taxa de cruzamentos entre indivíduos aparentados foi até dez vezes maior que a observada em outras populações da espécie. No capítulo 2 com o objetivo de verificar se há depressão endogâmica em progênies provenientes do PEMD foram selecionadas 320 sementes de 12 matrizes. Estas e seus frutos foram medidos. As plântulas a que deram origem também foram mensuradas, mensalmente, durante 15 meses. Todos os indivíduos foram genotipadas para oito locos microssatélites. A coancestria, foi estimada e os indivíduos separados em: não aparentados (t_u), aparentados (t_r) e autofecundação (s). Foi verificada diferença entre as métricas das plantas de acordo com o nível de coancestria entre indivíduos. Também foram estimados os valores de depressão endogâmica (ID). A quantidade de indivíduos irmãos de autofecundação foi muito pequena, sendo a maioria proveniente de cruzamento entre indivíduos não aparentados. A depressão endogâmica por autofecundação foi mais evidente no peso e tamanho dos frutos, e amena ou inexistente para os demais caracteres. Isto provavelmente por estas sementes terem sido coletadas em um fragmento grande e bem conservado e que ainda não sofre as consequências da depressão endogâmica. Assim, nosso trabalho mostrou que áreas de restauração florestal que seguiram as recomendações genéticas de implantação, apresentam diversidade genética suficiente para *H. courbaril*, podendo estas áreas serem fonte de coleta de sementes no futuro. E que os indivíduos provenientes de sementes do PEMD não apresentaram efeito de depressão endogâmica até 15 meses de desenvolvimento em viveiro.

Palavras-chave: Depressão endogâmica; Diversidade genética; Mata Atlântica; Reflorestamento; Sistema de cruzamento

ABSTRACT

***Hymenaea courbaril* L. (jatobá): genetic studies in natural population and forest restoration areas with native species**

The Brazilian Atlantic Forest was severely deforested and restoration initiatives are necessary to reestablish environments. However, for a long time there is only concern over floristic composition and the genetic diversity has been neglected. In addition, several restoration areas are planted from seeds collected in forest areas that are generally poorly preserved, small and isolated, which may compromise the genetic quality of the seedlings, producing less adapted individuals due to inbreeding depression. The aim of this work was to analyze the genetic aspects of *Hymenaea courbaril* L. in restoration areas in Pontal do Paranapanema region, and a natural reference forest, the Morro do Diabo State Park (PEMD), where seeds were also collected. In Chapter 1, to verify the genetic diversity of *H. courbaril* in areas of forest restoration, using eight microsatellites, two restoration areas were selected. In these areas and in the PEMD, leaf samples from adult individuals were collected. In the PEMD, fruits were collected in 12 seed trees for mating system characterization. The three areas presented similar genetic diversity and levels of inbreeding. Low spatial genetic structure was identified in the three studied areas. In the natural forest, fruits were mainly produced through outcrossings, but the rate of mating among relatives was up to ten times higher than the observed in other *H. courbaril* populations. In Chapter 2, to verify the inbreeding depression in the PEMD were selected 320 seeds from eight seed trees. The seeds and their fruits were measured. The seedlings were also measured monthly, during 15 months. All seedlings were genotyped with eight microsatellite loci. From the pairwise coancestry the seedlings were separated into three categories: outcrossing among unrelated individuals (t_u), outcrossing among related individuals (t_r), and selfing (s). We verified differences among groups in the metrics of seedlings according to the level of coancestry among individuals. The values of inbreeding depression (ID) were also estimated. The number of selfed seedlings were very small, and the majority were from outcrossing among unrelated individuals. Inbreeding depression by selfing was more evident in weight and size fruit, and was insignificant or non-existent for other characters. This is probably because these seeds were collected in a large and preserved forest fragment, that does not suffer the consequences of inbreeding depression yet. Thus, our work showed that forest restoration areas that followed the genetic recommendations present enough genetic diversity for *H. courbaril*, and these areas may be a source of seeds for collection in the future. Besides that, seedlings from seed trees in PEMD did not present inbreeding depression effect up to 15 months of nursery development.

Keywords: Atlantic Forest; Genetic diversity; Inbreeding depression; Mating system; Restoration ecology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características de <i>Hymenaea courbaril</i> L.. Indivíduo adulto (a), folhas (b), flores (c), fruto fechado (d), fruto aberto com polpa aparente (e) e semente (f).	18
Figura 2. Distribuição de florestas isoladas na paisagem da região do Pontal do Paranapanema. Em cinza fragmentos florestais remanescentes e áreas sucessionais, em preto Unidades de Conservação (SOS Mata Atlântica 2017) e em vermelho áreas onde o trabalho foi realizado: reflorestamentos de Anaurilândia – Mato Grosso do Sul e Rosana – São Paulo e o Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), Teodoro Sampaio – São Paulo. Em azul na parte superior o rio Paraná (divisa entre os estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul) e na parte inferior o rio Paranapanema (divisa entre os estados de São Paulo e Paraná).	32
Figura 3. Localização das áreas de estudo e amostragem realizada nos três locais. Anaurilândia – Mato Grosso do Sul, Rosana – São Paulo e Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), Teodoro Sampaio – São Paulo.....	33
Figura 4. Aspecto do sub-bosque de áreas mais conservadas do Parque Estadual Morro do Diabo (a, b), mico-leão-preto - <i>Leontopithecus chrysopygus</i> (c) e pegadas de grandes mamíferos na área (d, e). Fonte: Wilton Felipe Teixeira.....	34
Figura 5. Distribuição dos indivíduos de <i>Hymenaea courbaril</i> L. amostrados no Parque Estadual Morro do Diabo, Teodoro Sampaio – SP.	35
Figura 6. Aspecto da área de coleta de sementes do Parque Estadual Morro do Diabo. Sub-bosque mais conservado (a, b), presença de bromélias terrestres (c) e clareiras (d).	36
Figura 7. Distribuição dos indivíduos de <i>Hymenaea courbaril</i> L. na área em restauração de Anaurilândia – MS.	37
Figura 8. Aspectos do sub-bosque do plantio de Anaurilândia – MS. Área com regeneração de capixingui (a), sem regeneração natural (b), com regeneração diversa (c) e dominado por gramíneas (d).	39
Figura 9. Distribuição dos indivíduos de <i>Hymenaea courbaril</i> L. Na área em restauração de rosana – sp.	40
Figura 10. Aspectos do sub-bosque do plantio de Rosana - SP. Área com regeneração natural (a), sem regeneração (b), dominada por gramíneas (c) e por outras herbáceas (d).	42
Figura 11. Gel de quantificação de DNA corado com brometo de etídeo. Da esquerda para direita, DNA λ com concentrações de 20, 100 e 300 ng/ μ l, seguido por 13 amostras de dna dos indivíduos do estudo.	44
Figura 12. Picos formados de pares de bases (pb) de uma amostra de DNA analisada pelo PROSize™ (versão 2.0). LM e UM são marcadores internos de 35 e 500 pares de base respectivamente e os valores no eixo X são os tamanhos em pares de bases do <i>ladder</i> . Os picos com valores em azul são o genótipo para a amostra analisada (124 e 136 pb).	46
Figura 13. Resultado do valor de K mais provável a partir dos valores de ΔK (Delta K) estimados como proposto por Evanno et al. (2005) com o programa STRUCTURE HERVESTER (Earl & Vonholdt 2012).	51
Figura 14. Agrupamento dos indivíduos de <i>Hymenaea courbaril</i> L. das três áreas de estudo em dois <i>clusters</i> , estimado segundo Evanno et al. (2005).	52
Figura 15. Estrutura genética espacial de <i>Hymenaea courbaril</i> L., nas áreas estudadas. Sendo a linha contínua referente a estimativa do coeficiente de coancestria médio (Loiselle et al. 1995) e as linhas pontilhadas representam o intervalo de rejeição para a hipótese nula de ausência de coancestria (95%)	53
Figura 16. Valores médios de altura, diâmetro do colo e número de folhas dos indivíduos de <i>Hymenaea courbaril</i> L., em crescimento no viveiro durante 15 meses, para cada sistema de reprodução: indivíduos de autofecundação (s – preto), indivíduos de cruzamento entre aparentados (t_r – cinza) e indivíduos de cruzamento entre não aparentados (t_u – branco).	73
Figura 17. Porcentagem de depressão endogâmica para altura, diâmetro do colo e número de folhas dos indivíduos de <i>Hymenaea courbaril</i> L., em crescimento no viveiro durante 15 meses. Depressão endogâmica em indivíduos de autofecundação (ID_s – preto), de cruzamento entre aparentados (ID_r – cinza) e para os de autofecundação e aparentados (ID_T – branco).	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diversidade genética de <i>Hymenaea courbaril</i> L. em trabalhos realizados em ambientes contínuos e fragmentados da Mata Atlântica e Floresta Amazônica. Sendo: k : total de alelos, $\hat{A}$: número médio de alelos, $\hat{H}_o$: heterozigosidade observada, $\hat{H}_e$: heterozigosidade esperada e $\hat{f}$: Índice de Fixação.	19
Tabela 2. Sequências dos oito locos de microssatélites nucleares utilizados para a genotipagem dos indivíduos de <i>Hymenaea courbaril</i> L., com tamanhos máximo e mínimo de fragmentos encontrados no presente estudo e número de acesso no genebank (Ciampi et al. 2008).	45
Tabela 3. Desequilíbrio de ligação entre os oito locos de microssatélites nucleares de <i>Hymenaea courbaril</i> L., nas três áreas de estudo. O valor limite de significância após a correção de bonferroni é 0,0005 ($\alpha = 0,05$).	49
Tabela 4. Contagem de alelos para os oito locos de microssatélites nucleares de <i>Hymenaea courbaril</i> L. Sendo: k : alelos totais, $\hat{A}$: número de alelos, $\hat{A}_r$: alelos raros, $\hat{A}_{rp}$: alelos raros e privados e SD: desvio padrão.	50
Tabela 5. Parâmetros genéticos calculados para os oito locos de microssatélites nucleares de <i>Hymenaea courbaril</i> L., sendo n : número de indivíduos de cada área, $\hat{H}_o$: heterozigosidade observada, $\hat{H}_e$: heterozigosidade esperada e $\hat{f}$: Índice de Fixação.	50
Tabela 6. Frequência de alelos nulos em <i>Hymenaea courbaril</i> L. calculado para cada loco e área.	51
Tabela 7. Sistema de cruzamento da população de <i>Hymenaea courbaril</i> L. do Parque Estadual Morro do Diabo. Valores e intervalo de confiança (10.000 bootstraps) para taxa de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$), taxa de cruzamento unilocos ($\hat{t}_s$), taxa de cruzamento entre aparentados ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$), correlação de paternidade ($\hat{r}_{pm}$), correlação de autofecundação ($\hat{r}_s$) e F parental ($\hat{F}_p$). Valores de taxa de autofecundação ($\hat{s}$), frequência de irmãos de autofecundação ($\hat{P}_{IA}$), meio irmãos ($\hat{P}_{MI}$), irmãos completos ($\hat{P}_{IC}$) e irmãos de autofecundação e cruzamento ($\hat{P}_{AC}$), coancestria dentro das progênes (θ), tamanho efetivo populacional ($\hat{N}_e$), número efetivo de doadores de pólen ($\hat{N}_{ep}$) e o número de matrizes para a coleta de sementes com base no tamanho efetivo de referência de 100 ($\hat{m}_{100}$), 500 ($\hat{m}_{500}$) e 1000 ($\hat{m}_{1000}$).	54
Tabela 8. Valores médios para medidas de frutos e sementes de indivíduos de <i>Hymenaea courbaril</i> L., para cada classe de coancestria: indivíduos de autofecundação (s), indivíduos de cruzamento entre aparentados (t_r) e indivíduos de cruzamento entre não aparentados (t_u). Letras diferentes representam diferença estatística estimada por Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$).	72
Tabela 9. Porcentagem de depressão endogâmica para medidas dos frutos e sementes de indivíduos de <i>Hymenaea courbaril</i> L.. Depressão endogâmica em indivíduos de autofecundação (ID_s), de cruzamento entre aparentados (ID_r) e para os de autofecundação e aparentados (ID_T).	72

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Consequências genéticas da fragmentação

A fragmentação florestal, além das consequências imediatas de diminuição do habitat e eliminação de indivíduos locais, em longo prazo pode trazer consequências danosas às espécies remanescentes no local (Saunders et al. 1991; Turner 1996; Fahrig 2003). Estas consequências podem ser identificadas a partir do estudo da diversidade genética das populações com uso de marcadores moleculares. A diversidade genética pode ser caracterizada por meio de alguns índices como: porcentagem de locos polimórficos, número de alelo por loco, heterozigotidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg, heterozigotidade observada e índice de fixação. Esses indicadores podem variar entre as populações de acordo com as taxas de mutação e recombinação, fluxo gênico, deriva genética, endocruzamentos e seleção natural (Nei 1987). Altos níveis de diversidade genética em uma população natural garantem combinações genotípicas suficientes para manter o potencial evolutivo da espécie em decorrência de sua maior capacidade de adaptação a alterações ambientais (Sebbenn et al. 2000).

O princípio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) afirma que quando uma população é infinitamente grande, ocorrem cruzamentos aleatórios, e não há atuação de fatores evolutivos como seleção natural, mutação, migração e deriva genética, as frequências alélicas e genotípicas são constantes em todas as gerações. As diferenças entre uma população real e a ideal em EHW, ou seja, as alterações na distribuição dos alelos e genótipos no espaço e no tempo, podem ser efeito de forças evolutivas (Futuyma 2002). A deriva genética é um processo que ocorre naturalmente em populações naturais, alterando as frequências alélicas de geração em geração (Futuyma 2002). Porém, é intensificada pela fragmentação florestal, pela diminuição do tamanho populacional, que em poucos eventos reprodutivos pode fixar alelos comuns e excluir alelos raros, alterando a frequências em diferentes áreas (Souza et al. 2004; Sebbenn et al. 2011). Em longo prazo, pode ainda causar alta divergência entre populações (Kageyama, Sebbenn, et al. 2003; Moraes et al. 2005; Zimback et al. 2011). Além da deriva genética o isolamento de fragmentos florestais limita o movimento de genes entre as populações remanescentes, ou seja, diminui o fluxo gênico via pólen e semente entre elas (Slatkin 1985; Young et al. 1996; Fahrig 2003).

O fluxo gênico garante maior diversidade genética dentro das populações e menor divergência entre elas (Slatkin 1985). Logo, a limitação do fluxo gênico entre remanescentes florestais tende a ocasionar o aumento da divergência genética entre essas populações e pode comprometer o futuro da espécie no local, sobretudo para espécies de plantas, que têm hábito sésil (Fahrig 2003; Young et al. 1996). Espécies com altas densidades populacionais e boa capacidade de

dispersão de pólen e sementes apresentam maior diversidade genética em pequenas áreas, principalmente as que foram fragmentadas recentemente (Kageyama, Sebbenn, et al. 2003; Zimback et al. 2011). Porém, alguns estudos em populações fragmentadas de espécies como *Aspidosperma polyneuron* Muell Arg., *Casearia sylvestris* Sw. e *Copaifera langsdorffii* Desf., nativas da Mata Atlântica, têm mostrado que o isolamento espacial de fragmentos tem dificultado a dispersão de pólen entre as áreas, provavelmente pela limitação de deslocamento dos polinizadores (Martins et al. 2008; Sebbenn et al. 2011; Zimback et al. 2011; Martins et al. 2015; Araujo et al. 2017). Quando o fluxo gênico via pólen é dificultado, o fluxo via semente pode estabelecer conexão entre fragmentos, contribuindo para a manutenção da diversidade destas populações, principalmente em ambientes muito antropizados (Ribas & Kageyama 2004), entretanto pode haver dificuldade também na chegada de sementes nos fragmentos (Sebbenn et al. 2011).

A restrição da dispersão de pólen e de sementes, principalmente em populações pequenas, altera a distribuição espacial da diversidade genética no local. Este fenômeno é chamado de estruturação genética espacial (EGE), que representa o maior grau de parentesco entre os indivíduos espacialmente mais próximos (Loiselle et al. 1995). Com o isolamento entre as populações, número limitado de árvores em idade reprodutiva e o aumento da proximidade entre indivíduos aparentados dentro da população, ocorre a formação de gerações com maiores proporções de homozigotos, decorrentes dos cruzamentos consanguíneos (Sebbenn et al. 2000).

Muitos trabalhos realizados na Mata Atlântica destacam a ocorrência de endogamia dentro de populações fragmentadas (Sebbenn et al. 2003; Souza et al. 2004; Kageyama et al. 2004; Seoane et al. 2005; Martins et al. 2008; Sebbenn et al. 2011; Tarazi et al. 2013; Martins et al. 2015; Reis et al. 2015; Tambarussi et al. 2016; Araujo et al. 2017; Carvalho et al. 2017; Giombini et al. 2017), mas poucos avaliam seu efeito sobre o desenvolvimento dos indivíduos (Sebbenn et al. 2001; Tambarussi et al. 2017). A redução da capacidade de adaptação, sobrevivência, estabelecimento e desenvolvimento de juvenis e adultos, assim como da reprodução destes indivíduos é chamada de depressão endogâmica (Charlesworth & Willis 2009). Este fenômeno ocorre pelo aumento de genótipos com alelos idênticos por descendência (IBD) (Charlesworth & Willis 2009) e aumenta a manifestação de alelos deletérios em homozigose (Charlesworth & Charlesworth 1987; Keller & Waller 2002), colocando em risco a conservação em longo prazo de populações.

Tendo em vista as consequências da fragmentação da Mata Atlântica, há grande preocupação com a diversidade genética das populações de espécies remanescentes neste bioma, e sua persistência no ambiente (Kageyama et al. 1998). Informações sobre a diversidade e estrutura genética de populações remanescentes podem auxiliar nas decisões de conservação genética, como identificar a área mínima viável para a manutenção e conservação *in situ*, verificar o número mínimo

de matrizes para a coleta de sementes, tanto para fins de restauração como para programas de melhoramento e conservação *ex situ* (Sebbenn et al. 2003). Essas informações podem contribuir ainda para a demarcação de áreas de corredor ecológico para facilitação de fluxo gênico e proposição de áreas como trampolins para maior conectividade entre as populações (Kageyama, Cunha, et al. 2003; Sebbenn et al. 2003; Martins et al. 2008; Araujo et al. 2017). O conhecimento da diversidade e estrutura genética de populações remanescentes pode ainda auxiliar na definição de estratégias de manejo de fragmentos florestais, como a exploração sustentável de recursos madeireiros por corte seletivo (Sebbenn et al. 2000), e a proposição de adensamento de espécies para exploração madeireira futura (Kageyama, Cunha, et al. 2003).

Para as análises de variação genética em populações são utilizados marcadores moleculares e, em sua maioria, os microssatélites. Estes microssatélites ou SSR (Sequências Simples Repetidas) são sequências de 1 a 6 nucleotídeos repetidas sequencialmente, são encontradas no genoma da maioria dos seres eucariotos e procariotos (Tóth et al. 2000), e são relativamente raros em regiões codificantes de proteínas (Li et al. 2002). A identificação de sequências SSR pode ocorrer por meio de isolamento de bibliotecas genômicas da espécie de interesse, *screening* de sequências EST (*Expressed Sequence Tags*) disponíveis em bases de dados e transferabilidade de marcadores de espécies relacionadas (Kalia et al. 2011). Esse marcador revela o polimorfismo em um determinado loco pelas diferenças no número de vezes em que estas repetições de sequência simples ocorrem. Esses marcadores sofrem mutações frequentemente, o que resulta em marcadores altamente polimórficos, multialélicos, além disso, apresentam herança codominante e são preservados entre indivíduos da mesma espécie, sendo muito úteis em estudos de genética de populações (Pinto et al. 2001; Kalia et al. 2011).

1.2. Restauração florestal e genética

Segundo a *Society for Ecological Restoration International* (SER 2004) a restauração ecológica compreende ações que aceleram a recuperação de um ambiente degradado ou danificado, tentando reestabelecer sua saúde, integridade e sustentabilidade ao longo do tempo. Dentro deste contexto, a restauração florestal é a tentativa de recuperar ambientes que antes da degradação ou danificação do ecossistema apresentavam fisionomias florestais. Este processo visa assegurar a biodiversidade, a estrutura e o funcionamento dos processos ecológicos no local, de forma que possa ocorrer maior conservação das espécies e seja reestabelecida a conectividade dos remanescentes. Além dos valores ecológicos, são também considerados na restauração os valores econômicos e sociais da região.

A Mata Atlântica é considerada um dos *hotspots* prioritários para a conservação da biodiversidade no mundo. Isto se deve ao seu alto número de espécies, ao alto grau de endemismo, à grande devastação que o bioma tem sofrido e ao nível de ameaça que o ambiente vem sofrendo (Myers et al. 2000). A redução da vegetação ocorreu desde o período de colonização e avança em decorrência do desenvolvimento de centros urbanos, do aumento de áreas para diversas culturas agrícolas, da expansão de áreas de pastagem e da implantação de áreas industriais.

De maneira geral, desde 1985 a taxa de desmatamento da Mata Atlântica vinha diminuindo, no entanto, ele voltou a aumentar no ano de 2016 (SOS Mata Atlântica & INPE 2017). Esse dado é preocupante, pois representa um aumento de quase 58% na taxa de desmatamento. Resta em todo território brasileiro em torno de 12% da vegetação florestal original da Mata Atlântica (Ribeiro et al. 2009; SOS Mata Atlântica & INPE 2017). No estado de São Paulo ocorre menos de 14% de vegetação remanescente do bioma e no último ano o aumento do desmatamento foi ainda maior que o nacional, pouco menos de 1500%, segundo a SOS Mata Atlântica & INPE (2017). Noventa por cento deste aumento ocorreu em junho de 2016, em consequência de fenômenos naturais (vendavais e tornados), e por regeneração natural está sendo recuperado (SOS Mata Atlântica & INPE 2017). No entanto, os outros 10%, equivalente a 68 ha, ocorreram de forma intencional, e se comparado ao desmatamento do censo anterior (2013-2014) representa aumento de pouco mais de 50%. Este aumento provavelmente seja consequência de expansão agrícola e principalmente de incertezas, ambiguidades e contradições presentes na Lei Nº 12.551, de maio de 2012, a Lei de Proteção da Vegetação Nativa (Brancalion et al. 2016).

A primeira iniciativa de restauração florestal do bioma no país, ainda na época do Brasil Império, foi motivada pela falta de recursos hídricos naturais. Houve um déficit de água na cidade do Rio de Janeiro, e a recomposição vegetal foi proposta para possibilitar a recuperação e manutenção de nascentes (Kageyama & Castro 1986). Este e os demais plantios realizados até a década de 1980, com o intuito de proteção a recursos como água e solo, ocorreram sem o conhecimento de teorias ecológicas. Nestes foram incluídas espécies nativas e exóticas, de maneira aleatória no sistema, priorizando espécies de crescimento rápido (Kageyama & Gandara 2000; Rodrigues, Lima, et al. 2009).

A partir dos anos 1980 houve uma maior discussão sobre restauração e uso de espécies nativas em plantios mistos para a recomposição de matas ciliares (Durigan & Nogueira 1990; Kageyama & Gandara 2000). Como forma de mitigação dos danos causados pela inundação de áreas na construção de reservatórios hidrelétricos, a CESP (Companhia Energética de São Paulo), em parceria com pesquisadores da Esalq/USP (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”) e IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais), iniciou plantio de espécies arbóreas no entorno dos

reservatórios (Kageyama et al. 1989). Esses plantios eram realizados com alta densidade de indivíduos (2000 a 2500 plantas por hectare), com base na teoria da sucessão florestal. Com o avanço dos estudos sobre a ocorrência das espécies em áreas florestais, os plantios foram sendo realizados de acordo com a densidade natural, raras e comuns (Kageyama & Gandara 2000). A partir do aprofundamento sobre grupos sucessionais das espécies nativas, um novo sistema de plantio foi implantado, onde linhas de espécies tolerantes ao sol (pioneiras) foram intercaladas com linhas de plantio de espécies não pioneiras (Kageyama & Gandara 2000; Cavalheiro et al. 2002), na tentativa de restaurar processos ecológicos para acelerar a recuperação das áreas.

Devido ao insucesso de alguns projetos, pela mortalidade precoce do plantio e falta de autossustentabilidade das áreas, novas metodologias foram desenvolvidas. Para realizar um sombreamento mais efetivo do solo, diminuindo a competição de gramíneas e para estabelecer diversidade de espécies dentro do plantio, foi desenvolvido o método de plantio em linhas de espécies de recobrimento, alternadas com linhas de espécies de diversidade. Assim, com a senescência das pioneiras num segundo momento, as espécies de crescimento mais tardio (linha de diversidade) poderiam ocupar o local e não inviabilizar o plantio (Brancalion et al. 2009).

Porém, áreas de restauração florestal que são consideradas modelos por seu aspecto ecológico (alta diversidade florística, colonização de sub-bosque, regeneração natural), podem apresentar baixa diversidade genética nos plantios, pois alguns projetos não deram a devida importância à coleta de sementes (Mori 2003). Devido a isso, recentemente trabalhos têm sido desenvolvidos no Brasil para avaliar estes aspectos genéticos de espécies arbóreas em áreas de restauração florestal, estimados por meio de parâmetros genéticos populacionais (Rodrigues 2013; Bajay 2014; Cruz Neto et al. 2014; Schwarcz 2014; Sujii et al. 2017). *Centrolobium tomentosum* Guill. ex Benth em áreas de restauração de Floresta Estacional Semidecidual apresentou diversidade genética equivalente a áreas de remanescentes florestais, em decorrência dos plantios terem sido estabelecidos com sementes coletadas em diversas áreas remanescentes (Sujii et al. 2017). Por outro lado, nestas mesmas áreas de restauração, indivíduos plantados de *Myroxylon peruiferum* L.f. e *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. não apresentaram diversidade similar à de áreas naturais, pois as sementes devem ter sido coletadas de somente algumas matrizes (Bajay 2014; Schwarcz 2014). Em decorrência de elevado fluxo gênico entre as áreas de restauração e fragmentos florestais do entorno, a população de juvenis e adultos regenerantes de *M. peruiferum* apresenta diversidade genética equivalente às áreas referência (Schwarcz 2014). Porém, *P. gonoacantha* parece estar geneticamente isolada nas áreas de restauração, sendo necessário enriquecimento genético da espécie nas áreas (Bajay 2014).

Para que as áreas de restauração possam se manter ao longo do tempo, sem necessidade de intervenções futuras, a preocupação com a diversidade genética inicial dos plantios se faz necessária (Mori 2003) e com este objetivo trabalhos têm apresentado algumas recomendações para a coleta de sementes. De forma geral o número de matrizes utilizadas como fonte de sementes deve ser de 20 a 50 (Sebbenn 2002; Mori 2003) para garantir diversidade genética mínima inicial e integridade ecológica da espécie ao longo do tempo (Vencovsky 1987; McKay et al. 2005; Broadhurst et al. 2008). As árvores utilizadas como matrizes não podem estar muito próximas, mas distantes pelo menos 100 m umas das outras (Sebbenn 2002), pois há o risco de produzirem gerações de indivíduos aparentados, o que aumentaria a probabilidade de endogamia futuramente (Kageyama et al. 1998). Preferencialmente a coleta deve ser realizada em locais próximos a área de restauração, para manter a regionalidade da espécie, uma vez que translocar genótipos da mesma espécie, de ambientes diferentes (solo, temperatura, altitude, regime hídrico) pode causar a introdução de alelos não adaptados e inviabilizar o plantio pelo menor desenvolvimento dos indivíduos (McKay et al. 2005; Hufford et al. 2012). Somado a isto, recomenda-se que sejam realizadas coletas em mais de um fragmento florestal, pois uma única população não necessariamente apresenta sementes de qualidade genética, especialmente em biomas muito devastados. As poucas áreas fonte de sementes atualmente disponíveis sofreram alterações pela fragmentação e encontram-se muitas vezes geneticamente isoladas (Sebbenn 2002; Mori 2003; Broadhurst et al. 2008; Zimback et al. 2011; Hufford et al. 2012). Espera-se que, ao usar essas recomendações, as chances de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento da espécie na área podem aumentar, e garantir a manutenção e evolução da floresta, sem a necessidade de interferências futuras (Broadhurst et al. 2008).

O aporte genético inicial introduzido na área de restauração permite o desenvolvimento de uma população geneticamente viável, promovendo seu crescimento por meio da reprodução e mantendo o potencial evolutivo da população implantada (Falk et al. 2001; McKay et al. 2005; Thomas et al. 2014). No entanto, as trajetórias que estas populações podem seguir são diferentes, como exemplificado anteriormente pelos trabalhos apresentados (Rodrigues 2013; Bajay 2014; Cruz Neto et al. 2014; Schwarcz 2014; Sujii et al. 2017), e ainda pouco estudadas. O entendimento desta dinâmica pode auxiliar futuros projetos de restauração florestal de modo a garantir a autossustentabilidade destes ambientes ao longo do tempo (McKay et al. 2005; Siqueira et al. 2013; Thomas et al. 2014).

Porém, por limitação de recursos, pode ocorrer o plantio de um número reduzido de indivíduos em áreas de restauração, que pelo efeito fundador, diminui a diversidade genética pela deriva genética (McKay et al. 2005). Neste contexto o aumento da conectividade destas áreas, com pequenas populações, pode auxiliar na manutenção da diversidade genética pelo aumento do fluxo

gênico entre as áreas, tanto por fluxo de pólen como pelo de sementes (Hamrick, 2004). Desta forma, estudos de genética molecular associados a estudos ecológicos, principalmente em áreas em processo de restauração podem auxiliar no entendimento da dinâmica populacional e na melhoria de metodologias para garantir a conservação e restauração das áreas.

1.3. Espécie de estudo

Hymenaea courbaril L. pertence à família Fabaceae e é conhecida popularmente como jatobá. A espécie ocorre desde o sul do México até a América do Sul, incluindo o Brasil. No Brasil ocorre na Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado (*lato sensu*), Pantanal e Mata Atlântica. Neste último a espécie ocorre desde a região Nordeste chegando até o Paraná, em matas ciliares, Floresta Ombrófila e Estacional Semidecidual. A espécie apresenta ampla plasticidade fenotípica, sendo quatro variedades conhecidas: *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril*, *H. courbaril* var. *stilbocarpa* (Hayne) Y.T. Lee & Langenh., *H. courbaril* var. *subsessilis* Ducke e *H. courbaril* var. *villosa* Y.T. Lee & Langenh., sendo que as duas últimas ocorrem somente em alguns estados das regiões Norte e Nordeste do Brasil, respectivamente (Lima & Pinto 2015).

De hábito arbóreo, a espécie pode alcançar de oito a 40 metros de altura (Figura 1A). É uma planta semidecídua, heliófita que está presente em ambientes bem drenados, não é exigente quanto à fertilidade do solo (Lorenzi 2008), e apresenta característica de plantas secundárias tardias/clímax. O caule exibe casca lisa com coloração cinza ou castanho-acinzentada e espessura de até 3 cm (Melo & Mendes 2005). Sua madeira apresenta alta densidade básica ($0,96 \text{ g/cm}^3$) com cerne vermelho a castanho-avermelhado de alto valor comercial, e é uma das madeiras mais exportadas pelo Brasil, sendo muito utilizada na construção civil e a resina na fabricação de verniz (Angelo et al. 2001; Alvino et al. 2005; Melo & Mendes 2005).

Suas folhas são pecioladas, bifoliadas e com disposição alterna (Figura 1B). Os folíolos apresentam comprimento de até 12 cm e largura de 5 cm, são subsésseis, com disposição oposta e formato oblongo e falciforme com base desigual, têm limbo glabro e coriáceo com nervura central e margem inteira (Melo & Mendes 2005). Em estações mais secas, nos meses de julho e agosto, ocorre a queda das folhas (Souza & Funch 2017).

As flores são actinomorfas, hermafroditas, unicarpelares e uniloculares, reunidas em corimbos terminais com média de 14 flores (Figura 1C). São constituídas por quatro sépalas e cinco pétalas de cor branca a creme (Melo & Mendes 2005). A espécie é predominantemente alógama (Lacerda et al. 2008b; Carneiro et al. 2011), polinizada principalmente por morcegos (Santos 2002). A floração da espécie ocorre de novembro a fevereiro (Lorenzi 2008; Souza & Funch 2017).

Figura 1. Características de *Hymenaea courbaril* L.. Indivíduo adulto (A), folhas (B), flores (C), fruto fechado (D), fruto aberto com polpa aparente (E) e semente (F).

O fruto é uma vagem indeiscente, lenhosa, glabra, oblonga a cilíndrica, medindo de seis a 16 cm de comprimento e peso médio de 65 g (Figura 1D). O exocarpo é espesso de vermelho-escuro a marrom, seu endocarpo é farináceo (Figura 1E), de odor característico, adocicado, amarelo-claro, duro e comestível. A produção de frutos ocorre entre março e maio, enquanto a maturação a partir do mês de julho (Lorenzi 2008; Souza & Funch 2017).

Cada fruto apresenta de uma a 13 sementes, de formato ovoide e pesam em média 3 g (Figura 1F). Seu tegumento é pétreo, liso, de pardo-claro a pardo-escuro. A dispersão das sementes pode ser realizada por roedores, que em sua maioria são predadores destas sementes, o que pode limitar a dispersão natural da espécie. São potenciais dispersores anta (*Tapirus terrestris*), cotia

(*Dasyprocta azarae*), macaco (*Cebus apella*), queixada (*Tayassu pecari*) e veado (*Mazama* sp.) (Santos 2002).

No Brasil, principalmente na Região Norte, o jatobá é consumido na forma de chá. A infusão da casca e resina, ou mesmo estes colocados em água fria, são utilizados como antianêmico e anti-inflamatório (Pinto & Maduro 2003). A polpa pode ser consumida *in natura*, na preparação de farinhas, doces e bebidas, ou utilizada na alimentação de animais domésticos (Melo & Mendes 2005; Lorenzi 2008).

Devido às características mencionadas anteriormente e à sua importância ecológica e econômica, foram desenvolvidos marcadores microsatélites específicos para a espécie (Ciampi et al. 2008; Buonamici et al. 2008) e alguns estudos genéticos foram realizados em ambientes contínuos e fragmentados (Tabela 1), de Mata Atlântica (Santos 2002; Kageyama et al. 2004; Toledo 2005; Guidugli 2007), Floresta Amazônica (Lacerda et al. 2008a, 2008b; Carneiro et al. 2011, 2012; Silva et al. 2014) e outros ambientes florestais (Dunphy et al. 2004; Feres et al. 2009). *Hymenaea courbaril* também é utilizada no plantio de áreas de restauração florestal (Durigan & Nogueira 1990; Souza & Batista 2004; Sampaio et al. 2007), ambiente foco desse estudo.

Tabela 1. Diversidade genética de *Hymenaea courbaril* L. em trabalhos realizados em ambientes contínuos e fragmentados da Mata Atlântica e Floresta Amazônica. Sendo: k : total de alelos, $\hat{A}$: número médio de alelos, $\hat{H}_o$: heterozigosidade observada, $\hat{H}_e$: heterozigosidade esperada e $\hat{f}$: Índice de Fixação.

Vegetação	Trabalho	Locos	k	$\hat{A}$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{f}$
Mata Atlântica	Santos 2002	5	*	12	0,789 a 0,816	0,821 a 0,872	-0,053 a 0,096
	Kageyama et al. 2004	7	126	8,26	0,44 a 0,86	0,71 a 0,78	0,207 a 0,284
	Toledo 2005	4	*	6,38	0,43 a 0,59	0,51 a 0,74	-0,01 a 0,31
	Guidugli 2007	7	124	9,32	0,376 a 0,575	0,576 a 0,822	0,355
Floresta Amazônica	Lacerda et al. 2008a	9	181	3,51	0,55 a 0,63	0,70 a 0,72	0,119 a 0,216
	Carneiro et al. 2011	9	103	11,4	0,111 a 0,963	0,091 a 0,927	-0,039 a 0,606
	Silva et al. 2014	8	107	9,16	0,581 a 0,654	0,651 a 0,728	0,004 a 0,203

*Informação não descritas pelo autor.

1.4. Objetivos e hipóteses

Tendo em vista a alta fragmentação em que se encontra o bioma Mata Atlântica, os esforços para a recuperação de áreas degradadas, as iniciativas de restauração florestal por meio de plantios de mudas e a necessidade de autossustentabilidade das áreas a serem implantadas, este trabalho foi realizado com o intuito de fornecer subsídios para futuras decisões sobre restauração florestal.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos com objetivo principal de comparar geneticamente uma população natural de *Hymenaea courbaril* com indivíduos da mesma espécie estabelecidos em duas áreas de restauração florestal. Os objetivos específicos foram:

- i. Analisar a diversidade genética de *H. courbaril* dentro das áreas natural e de restauração;
- ii. Verificar se há divergência genética entre as áreas natural e de restauração;
- iii. Verificar se há a estrutura genética espacial entre os indivíduos de *H. courbaril* em área natural e nas áreas de restauração;
- iv. Caracterizar sistema de reprodução de *H. courbaril* em uma população natural e
- v. Avaliar efeito de depressão endogâmica em progênies de *H. courbaril* provenientes de área natural.

Desta forma, foram levantadas as seguintes hipóteses:

- i. Assim como a maioria das espécies arbóreas tropicais, *H. courbaril* apresenta, predominantemente, sistema de reprodução por cruzamento;
- ii. Como foram seguidas metodologias de coleta de sementes em mais de 12 matrizes por espécie para estabelecimento dos plantios, as áreas de restauração apresentam indivíduos de *H. courbaril* com diversidade genética similar à da área natural, baixa divergência entre elas e não apresentam estruturação e
- iii. Como a depressão endogâmica causa menor adaptação aos indivíduos provenientes de autofecundação, as plântulas desta categoria têm menor desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- Alvino FDO, Silva MFF da, Rayol BP (2005) Potencial de uso das espécies arbóreas de uma floresta secundária, na Zona Bragantina, Pará, Brasil. *Acta Amazonica* 35:413–420
- Angelo H, Brasil AA, Santos J (2001) Madeiras tropicais: análise econômica das principais espécies florestais exportadas. *Acta Amazonica* 31:237–248
- Araujo FL et al. (2017) Genetic diversity of *Casearia sylvestris* populations in remnants of the Atlantic Forest. *Genetics and Molecular Research* 16:1–7
- Bajay MM (2014) Diversidade e estrutura genética de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. em áreas em processo de restauração florestal e remanescentes de Mata Atlântica.

- Brancalion PHS et al. (2016) Análise crítica da Lei de Proteção da Vegetação Nativa (2012), que substitui o antigo Código Florestal: atualizações e ações em curso. *Natureza & Conservação* 14:e1–e16
- Brancalion PHS, Gandolfi S, Rodrigues RR (2009) Incorporação do conceito da diversidade genética na restauração ecológica. In: *Pacto para a restauração da Mata Atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal*. Rodrigues, RR, Brancalion, PHS, & Isernhagen, I, editors. Instituto BioAtlântica, São Paulo pp. 37–54.
- Broadhurst LM et al. (2008) Seed supply for broadscale restoration: Maximizing evolutionary potential. *Evolutionary Applications* 1:587–597
- Buonamici A, Cavers S, Vendramin GG (2008) Microsatellite loci isolated from the tropical tree *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae). *Molecular Ecology Resources* 8:1020–1022
- Carneiro FS et al. (2011) Effects of selective logging on the mating system and pollen dispersal of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) in the Eastern Brazilian Amazon as revealed by microsatellite analysis. *Forest Ecology and Management* 262:1758–1765
- Carneiro FS et al. (2012) Mendelian inheritance, linkage and genotypic disequilibrium in microsatellite loci isolated from *Hymenaea courbaril* (Leguminosae). *Genetics and molecular research: GMR* 11:1942–1948
- Carvalho C da S et al. (2017) Climatic stability and contemporary human impacts affect the genetic diversity and conservation status of a tropical palm in the Atlantic Forest of Brazil. *Conservation Genetics* 18:467–478
- Cavalheiro AL, Torezan JMD, Fadelli L (2002) Recuperação de áreas degradadas: procurando por diversidade e funcionamento dos ecossistemas. In: *A bacia do rio Tibagi*. Medri, ME, Bianchini, E, Shibatta, OA, & Pimenta, JA, editors. Eduel, Londrina pp. 213–224.
- Charlesworth D, Charlesworth B (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 18:237–268
- Charlesworth D, Willis JH (2009) The Genetics of Inbreeding Depression. *Nature Reviews Genetics* 10:783–796
- Ciampi AY et al. (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. *Molecular Ecology Resources* 8:1074–1077
- Cruz Neto O et al. (2014) Genetic and ecological outcomes of *Inga vera* subsp. *affinis* (Leguminosae) tree plantations in a fragmented tropical landscape. *PLoS ONE* 9:1–8

- Dunphy BK, Hamrick JL, Schwagerl J (2004) A comparison of direct and indirect measures of gene flow in the bat-pollinated tree *Hymenaea courbaril* in the dry forest life zone of southwestern Puerto Rico. *International Journal of Plant Sciences* 165:427–436
- Durigan G, Nogueira JCB (1990) Recomposição de matas ciliares. *IF Série Registros* 4:1–14
- Fahrig L (2003) Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34:487–515
- Falk DA, Knapp EE, Guerrant EO (2001) An introduction to restoration genetics. *Society for Ecological Restoration* 30
- Feres JM et al. (2009) Microsatellite diversity and effective population size in a germplasm bank of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Leguminosae), an endangered tropical tree: Recommendations for conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56:797–807
- Futuyma DJ (2002) *Biologia Evolutiva*. 2nd ed. SBG
- Giombini MI et al. (2017) Early genetic consequences of defaunation in a large-seeded vertebrate-dispersed palm (*Syagrus romanzoffiana*). *Heredity* 1–10
- Guidugli MC (2007) Estudos de estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de *Hymenaea courbaril* L. utilizando marcadores moleculares SSR e RAPD. FFCLRP - Departamento de Biologia – USP
- Hamrick, JL (2004) Responses of forest trees to global environmental changes. *Forest ecology and management* 197:323–335
- Hufford KM, Krauss SL, Veneklaas EJ (2012) Inbreeding and outbreeding depression in *Stylidium hispidum*: Implications for mixing seed sources for ecological restoration. *Ecology and Evolution* 2:2262–2273
- Kageyama P et al. (2004) Conservation of Mata Atlântica forest fragments in the State of São Paulo, Brazil. In: Vincet, B. et al. *Challenges in managing forest genetic resources for livelihoods: examples from Argentina and Brazil*. pp. 167–185.
- Kageyama PY, Cunha GC da, et al. (2003) Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Scientia Forestalis* 64:108–119
- Kageyama PY, Sebbenn AM, et al. (2003) Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Scientia Forestalis* 64:93–107
- Kageyama PY et al. (1989) Sucessão secundária, estrutura genética e plantações de espécies arbóreas nativas. *IPEF* 41/42:83–93
- Kageyama PY, Castro CFA (1986) Conservação genética ‘in situ’ e uso múltiplo da floresta. *Silvicultura* 11:77–80

- Kageyama PY, Gandara FB (2000) Recuperação de áreas ciliares. In: Matas ciliares: conservação e recuperação. Rodrigues, RR & Leitão-Filho, H de F, editors. Edusp, São Paulo pp. 249–269.
- Kageyama PY, Gandara FB, Souza LMI (1998) Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. *Série Técnica IPEF* 12:65–70
- Kalia RK et al. (2011) Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177:309–334
- Keller L, Waller D (2002) Interbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution* 17:230–241
- Lacerda AEB, Kanashiro M, Sebbenn AM (2008a) Effects of Reduced Impact Logging on genetic diversity and spatial genetic structure of a *Hymenaea courbaril* population in the Brazilian Amazon Forest. *Forest Ecology and Management* 255:1034–1043
- Lacerda AEB, Kanashiro M, Sebbenn AM (2008b) Long-pollen movement and deviation of random mating in a low-density continuous population of a tropical tree *Hymenaea courbaril* in the Brazilian Amazon. *Biotropica* 40:462–470
- Leite EJ (2007) State-of-knowledge on *Hymenaea courbaril* L. var. *Stilbocarpa* (Hayne) Lee and Lang. (Leguminosae: Caesalpinioideae) for Genetic Conservation in Brazil. *Research Journal of Forestry* 1:1–26
- Li Y et al. (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanism: a review. *Molecular Ecology* 11:253–256
- Lima HC, Pinto RB (2015) *Hymenaea*. Lista de espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22972>>. Acesso em janeiro de 2017.
- Loiselle BA et al. (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82:1420–1425
- Lorenzi H (2008) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5th ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa
- Martins K et al. (2008) Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae - Caesalpinioideae) em fragmentos florestais do Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 31:61–69
- Martins K et al. (2015) The role of very small fragments in conserving genetic diversity of a common tree in a hyper fragmented Brazilian Atlantic forest landscape. *Conservation Genetics* 17:509–520
- McKay JK et al. (2005) ‘How local is local?’ A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. *Restoration Ecology* 13:432–440

- Melo MGG, Mendes AMS (2005) Jatobá *Hymenaea courbaril* L. Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia. 1–3
- Moraes MLT, Kageyama PY, Sebbenn AM (2005) Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sob diferentes condições antrópicas. Revista Árvore 29:281–289
- Mori ES (2003) Genética de populações arbóreas: orientações básicas para seleção e marcação de matrizes. Série Registros IF 25:35–44
- Myers N et al. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403:853–858
- Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics.
- Pinto AADC, Maduro CB (2003) Produtos e subprodutos da medicina popular comercializados na cidade de Boa Vista, Roraima. Acta Amazonica 33:281–289
- Pinto LR et al. (2001) Isoenzimas e microssatélites em plantas. Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento 4:16–19
- Reis TS et al. (2015) Elevation as a barrier: genetic structure for an Atlantic rain forest tree (*Bathysa australis*) in the Serra do Mar mountain range, SE Brazil. Ecology and Evolution 5:1919–1931
- Ribas LA, Kageyama PY (2004) Diversidade e estrutura genética em populações naturais de *Trema micrantha* (L.) B. Scientia Forestalis 66:66–75
- Ribeiro MC et al. (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. Biological Conservation 142:1141–1153
- Rodrigues NB (2013) Variabilidade genética de populações de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne e *Dipteryx alata* Vogel em áreas nativas e em plantios de recuperação de áreas degradadas em Paracatu, MG.
- Rodrigues RR et al. (2009) On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. Biological Conservation 142:1242–1251
- Sampaio AB, Holl KD, Scariot A (2007) Regeneration of seasonal deciduous forest tree species in long-used pastures in central Brazil. Biotropica 39:655–659
- Santos JD dos (2002) Estudos ecológicos e genéticos numa paisagem fragmentada visando sua conectividade, no Pontal do Paranapanema - SP. Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’
- Saunders DA, Hobbs RJ, Margules CR (1991) Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. Conservation Biology 5:18–32
- Schwarcz KD (2014) Viabilidade genética de restaurações florestais: Diversidade e estrutura genética em *Myroxylon peruiferum* L.f.

- Sebbenn AM et al. (2001) Depressão por endogamia em populações de jequitibá-rosa. *Revista Instituto Forestal* 13:61–81
- Sebbenn AM et al. (2000) Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). *Scientia Forestalis* 58:127–143
- Sebbenn AM et al. (2011) 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* 106:134–145
- Sebbenn AM (2002) Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. *Revista do Instituto Florestal* 14:115–132
- Sebbenn AM, Kageyama PY, Vencovsky R (2003) Conservação genética in situ e número de matrizes para a coleta de sementes em população de *Genipa americana* L. *Scientia Forestalis* 63:13–22
- Seoane CES et al. (2005) Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. *Revista do Instituto Florestal* 17:25–43
- SER (2004) The SER International primer on ecological restoration. Society for Ecological Restoration International Science & Policy Working Group 1–13
- Silva SMM et al. (2014) Parâmetros genéticos para a conservação de *Hymenaea courbaril* L. na Amazônia Sul-Occidental. *Ciência Florestal* 24:87–95
- Siqueira MVBM et al. (2013) How can molecular ecology contribute to forest restoration? *Journal of Biotechnology and Biodiversity* 4:316–321
- Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:393–430
- SOS Mata Atlântica, INPE (2017) Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica. Período 2015-2016. Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais 1–69
- Souza FM de, Batista JLF (2004) Restoration of seasonal semideciduous forests in Brazil: Influence of age and restoration design on forest structure. *Forest Ecology and Management* 191:185–200
- Souza IM, Funch LS (2017) Synchronization of leafing and reproductive phenological events in *Hymenaea* L. species (Leguminosae, Caesalpinioideae): the role of photoperiod as the trigger. *Revista Brasileira de Botânica* 40:125–136
- Souza LMRI de, Kageyama PY, Sebbenn AM (2004) Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). *Scientia Forestalis* 65:70–79
- Sujii PS et al. (2017) Recovery of genetic diversity levels of a Neotropical tree in Atlantic Forest restoration plantations. *Biological Conservation* 211:110–116

- Tambarussi E V et al. (2016) Several small: how inbreeding affects conservation of *Cariniana legalis* Mart. Kuntze (Lecythidaceae) the Brazilian Atlantic Forest's largest tree. *International Forestry Review* 18:502–510
- Tambarussi EV et al. (2017) Inbreeding depression from selfing and mating between relatives in the Neotropical tree *Cariniana legalis* Mart. Kuntze. *Conservation Genetics* 18:225–234
- Tarazi R et al. (2013) Edge effects enhance selfing and seed harvesting efforts in the insect-pollinated Neotropical tree *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *Heredity* 110:578–585
- Thomas E et al. (2014) Genetic considerations in ecosystem restoration using native tree species. *Forest Ecology and Management* 333:66–75
- Toledo RM de (2005) Modelagem especial do fluxo de sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*), através de marcadores moleculares, na paisagem fragmentada do Pontal do Paranapanema, SP. Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'
- Tóth G et al. (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome research* 10:967–981
- Turner IM (1996) Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. *Journal of Applied Ecology* 33:200–209
- Vencovsky R (1987) Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas. *IPEF* 79–84
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution* 11:413–418
- Zimback L et al. (2011) Estrutura genética de peroba (*Aspidosperma polyneuron*) no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto Florestal* 23:265–277

Capítulo 1:
**GENÉTICA POPULACIONAL DE JATOBÁ (*Hymenaea courbaril* L.) EM ÁREA
NATURAL E RESTAURAÇÃO FLORESTAL NA REGIÃO DO PONTAL DO
PARANAPANEMA - SP**

RESUMO

Restauração florestal tem sido realizada para recuperar áreas inseridas em uma paisagem onde a vegetação nativa está altamente fragmentada. No entanto, muitos destes plantios não foram estabelecidos com diversidade genética inicial necessária para manter sua autossustentabilidade ao longo do tempo. Para verificar a diversidade genética em áreas de restauração florestal, foram selecionadas duas áreas de plantio com espécies nativas e uma floresta natural de referência na região do Pontal do Paranapanema – São Paulo. Nesta áreas foram coletadas amostras foliares de no mínimo 100 árvores adultas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) para avaliação da diversidade genética com oito locos microssatélites. Na área natural também foram coletadas progênes de polinização aberta de 12 matrizes para caracterização do sistema reprodutivo. A diversidade genética e os níveis de endogamia em plantios de restauração foram elevados e similares à floresta natural. Apesar de ter sido identificada estruturação genética espacial na área natural e em uma área de restauração, estas apresentaram baixa coancestria ($\hat{\theta}_{xy} < 0,04$) entre indivíduos mais próximos. Foi verificado predomínio de fecundação cruzada para a produção de frutos na área natural (97,4%), mas a quantidade de cruzamentos entre indivíduos aparentados foi até dez vezes maior que a observada em outras populações da espécie. Nossos resultados mostraram que os plantios de restauração, por terem seguido as recomendações de implantação, garantiram diversidade genética inicial suficiente para *H. courbaril*. Dada a disponibilidade limitada de remanescentes na região, nossos dados sugerem ainda que esses indivíduos poderiam servir como matrizes para coleta de sementes para futuros plantios de restauração.

Palavras-chave: Diversidade genética; Estrutura genética espacial; Floresta Estacional Semidecidual; Sistema de reprodução

Population genetic of *Hymenaea courbaril* L. in natural and forest restoration areas in Pontal do Paranapanema region - SP

ABSTRACT

Forest restoration has been performed to recover areas in highly fragmented landscapes. However, many of these restorations were not established with the initial genetic diversity necessary to maintain their self-sustainability over time. To verify the genetic diversity in forest restoration areas, we selected two planting areas with native species and one natural reference forest in the Pontal do Paranapanema region, in São Paulo state. In this area, we collected leaf samples of at least 100 *Hymenaea courbaril* L. adult trees, to evaluate the genetic diversity with eight microsatellite loci. In the natural area (Morro do Diabo State Park) we also collected fruits from 12 seed trees to mating system characterization. Genetic diversity and levels of inbreeding in restoration areas were high and similar to the natural forest. Although spatial genetic structure was identified in the natural forest and in one restoration area, it was low as revealed by the small coancestry ($\hat{\theta}_{xy} < 0.04$) among the nearest individuals. We found a predominance of outcrossings in the natural area (97.4%), but the number of outcrossings among related individuals was up to ten times higher than the observed in other *H. courbaril* population. Our results showed that restoration areas that followed the implantation recommendations, ensured enough *H. courbaril* genetic diversity. Due to the limited forest remnants in this region, our data suggests that these individuals could be selected as seed trees to produce seedlings for future restoration plantings.

Key-words: Atlantic Forest, Genetic diversity; Mating system; Spatial genetic structure

1. INTRODUÇÃO

Em ecossistemas degradados, onde a regeneração natural não ocorre espontaneamente, são realizados reflorestamentos mistos de espécies nativas como forma de acelerar a sucessão florestal no local e recuperar o ambiente (Zanne & Chapman 2001; SER 2004; Brancalion et al. 2009; Rodrigues et al. 2011). Por meio desses plantios têm-se procurado restabelecer a função dos ecossistemas com o retorno de processos como ciclagem de nutrientes e as funções de proteção de sistemas hídricos, contenção de erosão e manutenção das espécies em seu ambiente natural (Hobbs et al. 2006; Brancalion et al. 2009; Rodrigues, Lima, et al. 2009).

Para que estas populações implantadas se mantenham autossustentáveis ao longo do tempo sem precisar de intervenções, é necessário que seja garantida a variabilidade genética inicial no local (Brancalion et al. 2009). Para tanto, recomenda-se que, para a produção de mudas para estabelecimento dos plantios, sejam colhidas sementes de diferentes matrizes da mesma espécie, não muito próximas umas das outras, a fim de assegurar diversidade genética mínima do plantio (Vencovsky 1987; Sebbenn 2002; Reis et al. 2007) e que as matrizes estejam em florestas próximas ao local de implantação para garantir melhor adaptação dos indivíduos à área (McKay et al. 2005; Hufford et al. 2012).

Além da ampla base genética do plantio original, a autossustentabilidade das áreas implantadas depende ainda do restabelecimento das interações ecológicas, em especial as interações que possibilitam o fluxo gênico entre remanescentes florestais. Em uma paisagem fragmentada, o fluxo gênico, que em plantas ocorre por meio da migração de pólen e de sementes, contribui para a manutenção da diversidade genética das populações, aumentando as chances de conservação em longo prazo da espécie nestas áreas (Kageyama, Sebbenn, et al. 2003; Zimback et al. 2011). Inclusive, há estudos com marcadores moleculares que relatam que o fluxo gênico tem contribuído para o aumento da diversidade genética em regenerantes amostrados em áreas de restauração florestal implementadas com baixa diversidade genética inicial (Schwarcz 2014; Sujii et al. 2017). As áreas de restauração também podem ser fonte de pólen e sementes para áreas fragmentadas, reestabelecendo a conectividade em paisagens degradadas.

O Pontal do Paranapanema, localizado no extremo oeste do estado de São Paulo, é uma região em que vegetação original de Mata Atlântica foi praticamente dizimada. Atualmente, restam apenas 5% da cobertura florestal original (Faria 2006), a maioria concentrada no Parque Estadual Morro do Diabo e o restante em pequenos fragmentos dispersos. Como os remanescentes são muito pequenos e imersos em uma matriz agrícola pouco permeável, estudos feitos com marcadores moleculares têm mostrado que os fragmentos parecem não conseguir conservar as populações

naturais de várias espécies arbóreas (Santos 2002; Kageyama et al. 2004; Toledo 2005; Martins et al. 2008), sendo necessárias ações de restauração para aumentar o número de indivíduos e a conectividade entre as áreas. Nesta região alguns esforços de restauração têm sido realizados como implantação de sistemas agroflorestais, silvipastoris (Kageyama et al. 2004) e recomposição florestal com espécies nativas (Kageyama & Gandara 2000), mas a área restaurada ainda é pequena e são raros os estudos publicados que avaliaram o sucesso desses plantios (Souza & Batista 2004; Rodrigues et al. 2010). O monitoramento de áreas em processo de restauração é importante para estabelecer estratégias para a implantação de novas áreas, de maneira mais efetiva e com menor custo (Rodrigues, Brancalion, et al. 2009). Porém, pouco se sabe sobre as trajetórias ecológicas que as áreas em processo de restauração mais antigas da região tomaram (Souza & Batista 2004; Rodrigues et al. 2010) e elas não tem sido avaliadas quanto a seus aspectos genéticos. O presente trabalho foi idealizado com o objetivo de atender a essa demanda e utiliza como estudo de caso o jatobá.

Hymenaea courbaril L., o jatobá, é uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae e tem sido utilizado em plantio de áreas de restauração florestal (Durigan & Nogueira 1990; Souza & Batista 2004; Sampaio et al. 2007), inclusive nesta região. É uma espécie de grande importância comercial principalmente por sua madeira e tem sido foco em estudos científicos, sobre seus aspectos genéticos, em ambientes contínuos e fragmentados, de Mata Atlântica e Floresta Amazônica (Santos 2002; Dunphy et al. 2004; Kageyama et al. 2004; Toledo 2005; Buonamici et al. 2008; Ciampi et al. 2008; Lacerda et al. 2008a, 2008b; Carneiro et al. 2011, 2012; Silva et al. 2014). Embora as populações remanescentes da espécie na região do Pontal do Paranapanema apresentem alta diversidade genética, em decorrência da alta fragmentação e da exploração madeireira ilegal no passado, populações regenerantes têm apresentado elevados níveis de endogamia e de divergência genética, principalmente entre pequenos fragmentos (Santos 2002; Kageyama et al. 2004; Toledo 2005).

Além de contribuir com o conhecimento do estado de conservação de remanescentes florestais em paisagens fragmentadas, estudos genéticos em áreas de restauração podem auxiliar no entendimento do cenário atual dos indivíduos implantados. Esses estudos trazem subsídios para que sejam propostas ações de manutenção ou ampliação da diversidade local, de maneira que possam contribuir com a conservação regional e indicar estratégias para plantios futuros (Rodrigues 2013; Siqueira et al. 2013; Bajay 2014; Schwarcz 2014; Sujii et al. 2017).

Com o intuito de trazer informações que subsidiem estratégias de conservação e restauração florestal na região do Pontal do Paranapanema, este trabalho teve como objetivo avaliar: i) a diversidade genética do jatobá de áreas em processo de restauração florestal tendo como

referência uma área natural remanescente; ii) verificar a estrutura genética espacial nas áreas de restauração florestal e remanescente florestal da região; iii) identificar possíveis divergências genéticas entre as áreas e iv) verificar o sistema de cruzamento na população presente na área natural. Assim, levantamos as seguintes hipóteses: 1. Como sabemos que houve a preocupação com a seleção de número suficiente de matrizes para a coleta de sementes, as áreas de restauração terão diversidade genética suficiente para serem autossustentáveis ao longo do tempo, ou seja, terão diversidade genética equivalente a área natural; 2. A população natural apresentará predominantemente sistema de reprodução por cruzamento, por ser considerada uma espécie alógama.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Áreas de estudo e amostragem

Para o estudo foi escolhida a região do Pontal do Paranapanema, localizada no extremo Oeste de São Paulo, entre as confluências dos rios Paraná e Paranapanema (Figura 2). A vegetação característica da região é classificada como Floresta Estacional Semidecidual, inserida nos domínios da Mata Atlântica, conhecida também como "Mata Atlântica do Interior" (Veloso et al. 1991; Kronka et al. 2005). Esta região é marcada pela recente e voraz devastação florestal, intensificada a partir da década de 1950, que transformou a paisagem da região em extensas áreas de monocultivos e pastagens (Dean 1996). A partir de 1988 a região tem recebido projetos de restauração na tentativa de reestruturar a paisagem para melhor desenvolvimento e conservação da flora e fauna (IPÊ 2017). Apesar desses esforços, apenas 5% da região apresenta cobertura florestal, sendo essa dividida em pequenos fragmentos (Faria 2006).

O solo da região é caracterizado como argissolo vermelho, latossolo vermelho e nitossolo vermelho (Braido & Tommaselli 2012), formado a partir do grupo Bauru, que possui como principais características elevada concentração de areia, baixa fertilidade natural, boa permeabilidade e drenagem excessiva (Faria 2006). O clima da região é classificado segundo Koppen como Aw e Cwa, ou seja, tropical de altitude com inverno seco e verão quente e chuvoso. A área apresenta precipitação média de 1.295,5 mm e com temperaturas médias entre 22,7 °C a 23,3 °C (Faria 2006; Braido & Tommaselli 2012).

Figura 2. Distribuição de florestas isoladas na paisagem da região do Pontal do Paranapanema. Em cinza fragmentos florestais remanescentes e áreas sucessionais, em preto Unidades de Conservação (SOS Mata Atlântica 2017) e em vermelho áreas onde o trabalho foi realizado: reflorestamentos de Aneurilândia – Mato Grosso do Sul e Rosana – São Paulo e o Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), Teodoro Sampaio – São Paulo. Em azul na parte superior o rio Paraná (divisa entre os estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul) e na parte inferior o rio Paranapanema (divisa entre os estados de São Paulo e Paraná).

Para o estudo, nesta região foi selecionada uma área de ocorrência natural de Floresta Estacional Semidecidual no Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD) utilizada como ambiente de referência por apresentar vegetação conservada e preservada. Com auxílio de funcionários do Horto Florestal da CESP (Companhia Energética de São Paulo), localizado no município de Rosana – SP, foram selecionadas duas áreas de restauração florestal em Rosana – SP e Aneurilândia – MS (Figura 3). Estas áreas restauradas foram implantadas com os mesmos padrões (procedimento de coleta de sementes, produção de mudas, alta diversidade de espécies, etc.).

Figura 3. Localização das áreas de estudo e amostragem realizada nos três locais. Anaurilândia – Mato Grosso do Sul, Rosana – São Paulo e Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), Teodoro Sampaio – São Paulo.

2.1.1. Parque Estadual Morro do Diabo

Como representante de uma população natural foi escolhido o remanescente florestal mais expressivo da região, o Parque Estadual Morro do Diabo - PEMD (entre 22°21'57"S, 52°23'13"O e 22°40'40"S, 52°09'28"O). Localizado no município de Teodoro Sampaio – SP, a área de floresta foi denominada em 1941 como reserva florestal, e como parque em 1986. O parque está inserido em uma matriz de pastagem, é cortado pela rodovia SP-613. Sua porção sul está à margem do rio Paranapanema.

O PEMD apresenta 33.845,33 ha, e o ponto mais alto do parque, o Morro do Diabo, está a quase 600 m acima do nível do mar. A área é a maior porção vegetal de Floresta Estacional Semidecidual, classificada também como Mata Atlântica do Interior, do estado de São Paulo e uma das últimas áreas de floresta de planalto do Brasil. Dentro da área ainda ocorrem áreas de transição entre Mata Atlântica e o Cerrado pela quantidade de espécies deste segundo bioma (*Qualea cordata*, *Ouratea floribunda*, *Pera obovata*, *Roupala montana* e *Tabebuia ochracea*) e a presença de espécies

características da Caatinga (*Cereus hildmanianus* e *Praecereus euchlorus*). O parque abriga grande diversidade e importantes espécies, inclusive ameaçadas de extinção (Faria 2006).

Em relação às espécies arbóreas, no parque podem ser encontradas espécies indicadoras de qualidade de solo (*Gallesia integrifolia*, *Metrodorea nigra* e *Bouganivillea glabra*), de madeira nobre (*Aspidosperma polyneuron*, *Cedrella fissilis* e *Balfourodendron riedelianum*) em áreas mais conservadas. No PEMD também ocorrem espécies animais brasileiras ameaçadas ou em risco de extinção como mamíferos (*Tapirus terrestres*, *Tayassu pecari*, *Tayassu tajacu*, *Alouatta fusca*, *Puma concolor*, *Panthera onca*, *Leontopithecus chrysopygus* e *Myrmecophaga tridactyla*), aves (*Ara ararauna*, *Ara chloroptera*, *Laniisoma elegans*, *Spizaetus ornatos*, *Sarcoramphus papa* e *Amazona aestiva*), peixes (*Trichomycterus* sp. e *Hypostomus ancistroides*) répteis (*Tupinambis merianae*, *Bothrops alternatus*, *Eunectes murinus*, *Epicrates cenchria*, *Micrurus frontalis*) e anfíbios (*Bufo crucifer*, *Hyla* sp., *Phrynohyas venulosa*, *Scinax* sp., *Leptodactylus* sp., *Physalaemus cuvieri* e *Pseudis bolbodactyla*), (Faria 2006) o que aumenta a importância de conservação do local como refúgio natural (Figura 4).

Figura 4. Aspecto do sub-bosque de áreas mais conservadas do Parque Estadual Morro do Diabo (A, B), mico-leão-preto - *Leontopithecus chrysopygus* (C) e pegadas de grandes mamíferos na área (D, E). Fonte: Wilton Felipe Teixeira.

A coleta de dados foi realizada próxima à antiga estrada férrea, dentro do PEMD (Figura 5). Apesar de não ter ocorrido transporte no local, uma grande área foi devastada e ainda está em processo de recuperação (Figura 6). Devido à facilidade de acesso, no passado as coletas de sementes realizadas no PEMD para produção de mudas eram feitas neste local. A partir da Lei Nº 9.985, de julho de 2000 (SNUC), a atividade de coleta de sementes para produção de mudas foi cessada no PEMD, pois a lei permite apenas a coleta de material biológico para pesquisas científicas, sem autorização para comercialização (além do previsto em Resolução (SMA-SP 2008)). Para verificar a diversidade genética do material coletado para implantação de plantios, foram utilizadas para este estudo as mesmas árvores utilizadas como matrizes no passado. Foram coletadas folhas de 100 árvores adultas para caracterização da diversidade genética (Figura 5) e foram escolhidas 12 dessas para coleta de frutos (30 frutos por indivíduo) para o estudo do sistema reprodutivo.

Figura 5. Distribuição dos indivíduos de *Hymenaea courbaril* L. amostrados no Parque Estadual Morro do Diabo, Teodoro Sampaio – SP.

Figura 6. Aspecto da área de coleta de sementes do Parque Estadual Morro do Diabo. Sub-bosque mais conservado (A, B), presença de bromélias terrestres (C) e clareiras (D).

2.1.2. Reflorestamento Anaurilândia

O reflorestamento de Anaurilândia – MS (entre 22°21'13"S, 52°59'24"O e 22°21'28"S, 52°57'57"O) teve seu plantio realizado em 2001, foi realizado com espaçamento de 3 x 2 m e tem cerca de 210 ha. Sua porção norte está adjacente a uma pastagem, e há um plantio de banco de germoplasma, no qual não houve plantio *H. courbaril*, espécie foco deste estudo. À margem esquerda passa a rodovia MS-480, a porção a direita está às margens do Córrego Três Barras (que deságua no Rio Paraná) e a porção sul é adjacente a um fragmento florestal remanescente.

Figura 7. Distribuição dos indivíduos de *Hymenaea courbaril* L. na área em restauração de Anaurilândia – MS.

Apesar de esta área estar em outro estado, as condições edafoclimáticas da área são praticamente as mesmas das outras áreas de estudo. A coleta de sementes foi realizada em pequenas florestas isoladas no oeste do estado de São Paulo (comunicação pessoal de funcionários da antiga CESP) e a partir da metodologia de alta diversidade genética (Kageyama & Gandara 2000), respeitando a metodologia de coleta de sementes de pelos menos 12 matrizes (Vencovsky 1987). Nesta área foram coletadas folhas de 99 indivíduos plantados de jatobá, distribuídos por toda a área de estudo (Figura 7). No período da coleta a área estava com 14 anos de plantio e não foram encontrados indivíduos de *H. courbaril* em período reprodutivo.

O sub-bosque do plantio se apresenta heterogêneo, ou seja, áreas com regeneração natural diversa, algumas regiões com o predomínio de capixingui (*Croton floribundus* Spreng.), áreas sem regenerantes de espécies arbóreas, mas dominada por bromélias terrestres, por gramíneas ou sem regeneração alguma (Figura 8). Há diversidade de espécies plantadas, sendo que não há predomínio de uma espécie na área. Das espécies plantadas, além do jatobá, são encontradas: capixingui, sangra-d'água (*Croton urucurana* Baill.), amora branca (*Maclura tinctoria* (L.) D.Don ex Steud.), angico (*Anadenanthera* sp.), goiaba (*Psidium guajava* L.), entre outras. Na área foram encontrados rastros de anta (*Tapirus* sp.) e de felinos.

Figura 8. Aspectos do sub-bosque do plantio de Anaurilândia – MS. Área com regeneração de capixingui (A), sem regeneração natural (B), com regeneração diversa (C) e dominado por gramíneas (D).

2.1.3. Reflorestamento Rosana

O Reflorestamento de Rosana – SP (entre 22°33'52"S, 52°51'24"O e 22°35'19"S, 52°50'24"O) teve o plantio realizado entre 1988 e 1991, com área total de 300 ha (Figura 9). A porção sul está à margem do rio Paranapanema, próxima à Usina de Rosana e a porção oeste está próxima a rodovia PR-182. A área é circundada por pequenas propriedades com pastagem, e também apresentam culturas de café, mandioca e banana. O plantio foi realizado com sementes provenientes principalmente do PEMD priorizando alta diversidade genética (Kageyama & Gandara 2000) e respeitando a metodologia de coleta de sementes de pelos menos 12 matrizes (Vencovsky 1987).

Figura 9. Distribuição dos indivíduos de *Hymenaea courbaril* L. na área em restauração de Rosana – SP.

O plantio foi realizado de forma heterogênea, usando dois modelos: (1) proporção de 4:1 de espécies pioneiras e não pioneiras e (2) proporção de 3:2, das mesmas espécies (Souza & Batista 2004). Desta forma, a área apresenta algumas regiões com grande diversidade de espécies e outras com o predomínio de somente uma espécie, o espaçamento predominantemente foi de 3 x 2 m.

Na porção mais ao sul da área, onde foram coletadas as folhas de 125 indivíduos de *H. courbaril* neste plantio, os indivíduos plantados apresentam mais de 30 m de altura e há a formação de sub-bosque (Figura 10). Nas demais regiões do plantio não foram encontrados indivíduos da espécie de estudo. Segundo funcionários da CESP (comunicação pessoal), como o plantio foi um dos pioneiros no estado de São Paulo, e havia pouco conhecimento de como realizá-lo, foram feitos experimentos, com diferentes espaçamentos e diferentes espécies como angico (*Anadenanthera* sp.), embaúba (*Cecropia* sp.), ingá (*Inga* sp.). Nesta área pode-se ouvir bugio (*Alouatta* sp) e foram vistos pequenos mamíferos, principalmente roedores. No período da coleta de dados a área estava com 27 anos e não foram encontrados indivíduos de *H. courbaril* em período reprodutivo.

Figura 10. Aspectos do sub-bosque do plantio de Rosana - SP. Área com regeneração natural (A), sem regeneração (B), dominada por gramíneas (C) e por outras herbáceas (D).

2.2. Progenies

Os 420 frutos coletados de 12 matrizes no PEMD foram levados para o Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas Tropicais (LARGEA), no Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP). Estes foram numerados, medidos, pesados e foram abertos com auxílio de morsa, dos quais foram retiradas polpa e sementes. A polpa foi eliminada e as sementes de cada fruto foram contadas, numeradas, medidas, pesadas e lavadas. Após este processo, foram realizadas as escarificações mecânicas de 1.532 sementes viáveis, com auxílio de lixa nº 80. O tegumento da semente foi lixado até o endosperma, o suficiente para a penetração de água, de maneira que este não fosse danificado.

Em seguida cada semente foi alocada em um tubete de 280 ml, contendo substrato florestal, fibra de coco, adubação de base (P_2O_5) $1,5 \text{ kg/m}^3$ e composto com micro e macronutrientes 240 g/m^3 (Boro, Cobre, Manganês, Molibdênio e Zinco). Estes tubetes foram identificados com a numeração de sua procedência (matriz, fruto e semente). Foram então colocados em casa de vegetação, com nebulização, localizada no Viveiro do Departamento de Ciências Florestais - ESALQ-USP. Na casa de vegetação permaneceram por cerca de 15 dias, período para a germinação. Depois foram levadas para o viveiro, a pleno sol, para o seu desenvolvimento e rustificação, nesta etapa foram contabilizados aproximadamente 820 indivíduos.

No viveiro receberam três vezes por semana, adubação de cobertura (fertirrigação) contendo: cloreto de potássio ($0,12 \text{ g/L}$), sulfato de amônio ($0,35 \text{ g/L}$) e fosfato monoamônico ($0,05 \text{ g/L}$). Após o quarto mês de desenvolvimento, quando os indivíduos já apresentavam folhas definitivas, foram selecionados 360 indivíduos, procedentes das 12 matrizes, dos quais foram coletadas as folhas para a extração de DNA.

2.3. Extração e quantificação de DNA

Nas três áreas de estudo, com auxílio de um podão, foram coletadas folhas dos indivíduos georreferenciados (Figuras 5, 7 e 9). Todas as folhas quando coletadas foram armazenadas em sacos de papel com identificação da área de coleta e número do indivíduo. Estes sacos foram armazenados em caixas plásticas contendo sílica gel para melhor conservação do material. No LARGEA a extração do DNA (dos indivíduos coletados em campo e dos indivíduos em desenvolvimento no viveiro) foi feita de acordo com o protocolo desenvolvido por Inglis et al. (2016), na sequência foram adicionados $30 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão TE com RNase e deixado em banho-maria a 37°C por uma hora para

degradação de RNAs. Este material foi acondicionado a -20 °C para estoque, o qual foi quantificado e posteriormente diluído.

A quantificação do DNA das amostras foi realizada por meio da análise comparativa destas com amostras de DNA de concentração conhecida (DNA λ), 20, 100 e 300 ng/ μ L, submetidos à eletroforese (80 V e 20 mA) por 30 minutos em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (Figura 11). Quando não foi possível visualizar o DNA no gel de quantificação, foi realizada nova extração. Quando a concentração foi superior a 300 ng/ μ L, foi realizada uma diluição e nova quantificação.

Posteriormente todas as amostras foram diluídas a 2,5 ng/ μ L. Ao final destes processos verificou-se que a população Morro do Diabo ficou com 99 indivíduos e Rosana com 124 indivíduos, pois não foi possível extrair o DNA de um indivíduo de cada população, enquanto Anaurilândia teve todos seus 99 indivíduos genotipados.

Figura 11. Gel de quantificação de DNA corado com brometo de etídeo. Da esquerda para direita, DNA λ com concentrações de 20, 100 e 300 ng/ μ L, seguido por 13 amostras de DNA dos indivíduos do estudo.

2.4. Genotipagem

As amostras de DNA (2,5 ng/ μ L) foram genotipadas no Laboratório Didático de Genética da Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba (UFSCar - Sorocaba). Para tanto foram utilizados *primers* microssatélites nucleares desenvolvidos para *H. courbaril* pelo CENARGEN/EMBRAPA (Laboratório de Genética de Plantas do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia) (Ciampi et al. 2008). Foram testados 14 *primers*, dos quais somente oito geraram fragmentos de qualidade satisfatória para o estudo (Tabela 2).

O coquetel (15 μ L) para a reação da polimerase em cadeia (PCR) foi composto por 7,5 ng de DNA genômico, 7,5 μ L de Go Taq® Colorless Master Mix, 5 mM de MgCl₂, 0,2 μ M de cada *primer* e 2 μ L de água MiliQ autoclavada. As amplificações foram realizadas em termociclador utilizando o

seguinte protocolo: 96°C por dois minutos, 30 ciclos de 94 °C por um minuto, temperatura de hibridação 56 °C, por um minuto para todos os *primers*, 72 °C por um minuto e terminando com 72 °C por sete minutos.

Após a amplificação do DNA, os fragmentos foram separados no equipamento de eletroforese capilar *Fragment Analyzer™ Automated CE System* (Advanced Analytical Technologies Inc. [AATI], Ames, IA, USA) utilizando o Kit de reagentes 35-500 bp (DNF-900, Advanced Analytical Technologies Inc.). A análise dos resultados do *Fragment Analyzer™* foi realizada utilizando o software PROSize™ (versão 2.0), onde o tamanho dos alelos foi determinado comparando-os *ladder* de peso molecular entre 35 e 500 pares de bases (pb) e analisando os picos formados (Figura 12). Os fragmentos de diferentes tamanhos foram considerados como alelos distintos.

Tabela 2. Sequências dos oito locos de microssatélites nucleares utilizados para a genotipagem dos indivíduos de *Hymenaea courbaril* L., com tamanhos máximo e mínimo de fragmentos encontrados no presente estudo e número de acesso no Genbank (Ciampi et al. 2008).

Loco	Sequência 5'-3'	Tamanho dos fragmentos (pb)	Número de acesso
Hc12	F: TGTTCCAATTTATGTCCATGGTT R: TGGATGGTTGTGAAGAAAAGG	132 – 226	EU244702
Hc14	F: CATTCTGCCATCGGTAGGTT R: TCACCCAAACAGGAGTGAA	110 – 136	EU244703
Hc21	F: CGACCCATTTGAGAAGGAAA R: TTGATGTCTTCATAGCCTAAGTTCC	161 – 183	*
Hc34	F: CCAGCCCATGACGAAGT R: GGTGTCGTGTTGTGTATGGC	180 – 206	EU244707
Hc35	F: CTTGCACCTTTCACCCATTT R: CTCTTTGCTTCCCTCTCCCT	180 – 298	*
Hc40	F: CCTCTCTCCCAAATTCACGA R: TGCAATAGAATTTCCGAGGC	143 – 195	EU244708
Hc42	F: TGGCTAAAAGTTGGGAGGGT R: TTCCCCCTTTTCATGTTGTC	110 – 148	EU244709
Hc49	F: CCACCTCTCTCCACCCAATA R: TGCGGGAAGTCTTAATTTG	94 – 192	*

*Dados não publicados.

Figura 12. Picos formados de pares de bases (pb) de uma amostra de DNA analisada pelo PROSize™ (versão 2.0). LM e UM são marcadores internos de 35 e 500 pares de base respectivamente e os valores no eixo X são os tamanhos em pares de bases do *ladder*. Os picos com valores em azul são o genótipo para a amostra analisada (124 e 136 pb).

2.5. Análise de dados

2.5.1. Desequilíbrio de ligação

O teste de equilíbrio de ligação entre pares de locos foi realizado para verificar se os locos utilizados no estudo segregaram independentemente, e então serem utilizados para estimar os parâmetros genéticos das três populações. Para tanto foi utilizada a estatística G no programa FSTAT versão 2.9.3 (Goudet 2001) para as três áreas de estudo. A significância ($\alpha = 0,05$) foi avaliada após a correção de Bonferroni para comparações múltiplas.

2.5.2. Diversidade Genética

Para estimar o número de alelos totais das três áreas (k), número de alelos em cada área ($\hat{A}$) número de alelos raros ($\hat{A}_r$), número de alelos raros e privados ($\hat{A}_{rp}$), número de alelos privados ($\hat{A}_p$), a heterozigosidade observada ($\hat{H}_o$), a heterozigosidade esperada de acordo com o Equilíbrio de Hard-Weinberg ($\hat{H}_e = 1 - \sum p_i^2$) e o Índice de Fixação ($\hat{f}$), foi utilizado o pacote hierfstat (Goudet 2005) implementado no programa R (R Core Team 2016). Com o intuito de verificar a significância dos valores de $\hat{f}$ foram utilizadas 10.000 reamostragens *bootstrap* sobre locos ($\alpha = 0,05$). Para identificar se os valores foram influenciados por alelos nulos, estimou-se a frequência de alelos nulos com uso do algoritmo EM de Dempster et al. (1977) pelo programa FreeNA (Chapuis & Estoup 2007).

2.5.3. Estrutura genética populacional

Para a estimativa da divergência entre as áreas, foi realizada a análise par a par das áreas, no entanto, não foi utilizado o F_{ST} . Como as áreas de restauração foram implantadas a partir de uma grande população e a amostragem no parque é considerada amostragem de uma subpopulação, as diferenças entre as áreas foram estimadas a partir do G'_{ST} (global e entre pares), baseado no G_{ST} Nei (1973) modificado por Hedrick (2005), por meio da fórmula:

$$G'_{ST} = \frac{G_{ST}(1 + H_S)}{1 - H_S}$$

Onde H_S é a heterozigosidade esperada dentro de populações, segundo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A estrutura genética foi analisada por meio de uma abordagem Bayesiana com o programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000), para identificar visualmente possíveis diferenças entre as áreas estudadas. Foram testados de 1 a 10 agrupamentos K (*clusters*), a partir de 20 corridas para cada valor de K, admitindo um modelo com mistura, frequências alélicas correlacionadas, 10^6 burnings e 10^6 simulações de Monte Carlo de cadeias de Markov (MCMC). O valor de K mais provável foi determinado por meio dos valores de ΔK (Delta K) estimados como proposto por Evanno et al. (2005) com o programa STRUCTURE HERVESTER (Earl & VonHoldt 2012).

2.5.4. Estrutura genética espacial

Utilizando o programa SPAGeDi 1.5 (Hardy & Vekemans 2002) foram estimados os coeficientes de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) entre os indivíduos adultos de cada área, por Loiselle et al. (1995). Para a confecção do gráfico de distribuição espacial intrapopulacional foram consideradas dez classes de distância espacial, determinadas de zero a 1.000 metros. Para cada classe de distância, foram determinados os intervalos superior e inferior de confiança a 95% de rejeição da hipótese de ausência de coancestria, utilizando 10.000 permutações.

2.5.5. Sistema de reprodução

A taxa de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$), taxa de cruzamento unilocos ($\hat{t}_s$), taxa de cruzamento entre aparentados ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$), correlação de paternidade ($\hat{r}_{pm}$), correlação de autofecundação ($\hat{r}_s$) e o coeficiente de endogamia parental ($\hat{F}_p$), foram estimados utilizando o software MTLR 3.2 (Ritland 2002). O intervalo de confiança de 95% foi estimado com 10.000

bootstraps, utilizando modelo misto de cruzamento. Foram analisadas 30 progênies de cada uma das 12 matrizes, estas foram coletadas somente no PEMD, pois nas demais áreas de plantio não houve produção de sementes.

A partir destes valores foram calculados a taxa de autofecundação ($\hat{s} = 1 - \hat{t}_m$), a frequência de irmãos de autofecundação ($\hat{P}_{IA} = \hat{s}$), meios irmãos ($\hat{P}_{MI} = \hat{t}_m(1 - \hat{r}_{pm})$), irmãos completos ($\hat{P}_{IC} = \hat{t}_m\hat{r}_{pm}$) e irmãos de autofecundação e cruzamento ($\hat{P}_{AC} = 2\hat{s}\hat{t}_m$) (Sebbenn 2006). Ainda foram calculadas a coancestria dentro das progênies ($\hat{\Theta} = 0,125(1 + \hat{F}_p)[4\hat{s} + (\hat{t}_m^2 + \hat{s}\hat{t}_m\hat{r}_s(1 + \hat{r}_{pm}))]$) (Ritland 1989), o tamanho efetivo populacional ($\hat{N}_e = 0,5/\hat{\Theta}$) (Cockerham 1969), o número efetivo de doadores de pólen ($\hat{N}_{ep} = 1/\hat{r}_{pm}$) e o número de matrizes para a coleta de sementes com base no tamanho efetivo de referência ($\hat{m}_{(ref)} = \hat{N}_{e(ref)}/\hat{N}_e$) de 100 ($\hat{m}_{100}$), 500 ($\hat{m}_{500}$) e 1000 ($\hat{m}_{1000}$) (Sebbenn 2006).

3. RESULTADOS

3.1. Desequilíbrio de ligação

O teste de equilíbrio de ligação foi realizado para os indivíduos em cada uma das três populações estudadas. Os oito locos microssatélites utilizados neste trabalho não apresentaram desequilíbrio de ligação, desta forma, os locos segregam independentemente e podem ser utilizados para estimar os parâmetros genéticos para essas populações (Tabela 3).

Tabela 3. Desequilíbrio de ligação entre os oito locos de microssatélites nucleares de *Hymenaea courbaril* L., nas três áreas de estudo. O valor limite de significância após a correção de Bonferroni é 0,0005 ($\alpha = 0,05$).

Par de locos	Anaurilândia	Rosana	PEMD
Hc12 X Hc14	0,33631	0,10655	0,69048
Hc12 X Hc21	0,22202	0,04226	0,22560
Hc12 X Hc34	0,08036	0,09940	0,01786
Hc12 X Hc35	0,31786	0,02202	0,48095
Hc12 X Hc40	0,53155	0,01964	0,07440
Hc12 X Hc42	0,63333	0,09167	0,76488
Hc12 X Hc49	0,01310	0,22083	0,61964
Hc14 X Hc21	0,96607	0,09643	0,68214
Hc14 X Hc34	0,11190	0,05417	0,98095
Hc14 X Hc35	0,61429	0,03631	0,42619
Hc14 X Hc40	0,15238	0,14881	0,52024
Hc14 X Hc42	0,16548	0,83274	0,94345
Hc14 X Hc49	0,19464	0,31250	0,78690
Hc21 X Hc34	0,87381	0,17619	0,46071
Hc21 X Hc35	0,71190	0,10476	0,50417
Hc21 X Hc40	0,38155	0,19821	0,84762
Hc21 X Hc42	0,89167	0,40595	0,11131
Hc21 X Hc49	0,20893	0,03512	0,50179
Hc34 X Hc35	0,01250	0,02679	0,10000
Hc34 X Hc40	0,13869	0,02083	0,56369
Hc34 X Hc42	0,37381	0,68929	0,06667
Hc34 X Hc49	0,13988	0,09702	0,77381
Hc35 X Hc40	0,76548	0,39940	0,77619
Hc35 X Hc42	0,43631	0,29286	0,30476
Hc35 X Hc49	0,98333	0,02500	0,18214
Hc40 X Hc42	0,14345	0,28095	0,30536
Hc40 X Hc49	0,08155	0,00060	0,67500
Hc42 X Hc49	0,25714	0,33214	0,13869

3.2. Diversidade genética

Nas três áreas amostradas os indivíduos apresentaram elevado polimorfismo. Dos 117 alelos encontrados nos oito locos microssatélites nucleares, os maiores números de alelos foram encontrados para Hc12 e Hc40, com 20 e 21 alelos, respectivamente. As três áreas não diferiram estatisticamente quanto ao número de alelos e às riquezas alélicas (Kruskal-Wallis, $\alpha = 0,05$). A quantidade de alelos raros foi muito próxima para as três áreas, sendo que Anaurilândia foi a única que apresentou um alelo privado e não raro. (Tabela 4).

Tabela 4. Contagem de alelos para os oito locos de microssatélites nucleares de *Hymenaea courbaril* L.. Sendo: k : alelos totais, $\hat{A}$: número de alelos, $\hat{A}_r$: alelos raros, $\hat{A}_{rp}$: alelos raros e privados e SD: desvio padrão.

Loco	k	Aneurilândia ($n = 99$)			Rosana ($n = 124$)			PEMD ($n = 99$)		
		$\hat{A}$	$\hat{A}_r$	$\hat{A}_{rp}$	$\hat{A}$	$\hat{A}_r$	$\hat{A}_{rp}$	$\hat{A}$	$\hat{A}_r$	$\hat{A}_{rp}$
Hc12	20	12	10	1	14	13	2	10	8	3
Hc14	12	9	5	2	8	5	0	10	7	1
Hc21	10	9	5	2	6	1	0	8	3	1
Hc34	13	8	5	0	10	7	1	12	8	2
Hc35	16	9	5	0	16	12	4	11	6	0
Hc40	21	15	9	3	17	11	1	15	8	0
Hc42	13	8	3	0	10	7	0	13	7	2
Hc49	12	7	3	1	11	5	2	8	5	0
Média	14,63	9,63	5,63	1,13	11,50	7,63	1,25	10,88	6,50	1,13
SD	4,00	2,62	2,56	1,13	3,85	4,10	1,39	2,42	1,77	1,13
Total	117	78	46	10	92	61	10	87	52	9

A heterozigosidade observada ($\hat{H}_o$) e esperada ($\hat{H}_e$) apresentaram os menores valores para o loco Hc12, sendo os menores para PEMD. Os valores médios $\hat{H}_o$ e $\hat{H}_e$ para as três áreas estudadas foram muito próximos, mostrando uma diversidade semelhante entre elas. De maneira geral, as três apresentaram maiores valores de $\hat{H}_e$ em relação a $\hat{H}_o$ e, conseqüentemente, o índice de fixação ($\hat{f}$) apresentou valores positivos e significativos, demonstrando excesso de indivíduos homozigotos em relação ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5). As frequências de alelos nulos encontrados para cada uma das áreas e locos foram consideradas baixas não influenciando os valores de $\hat{H}_o$ (Tabela 6).

Tabela 5. Parâmetros genéticos calculados para os oito locos de microssatélites nucleares de *Hymenaea courbaril* L., sendo n : número de indivíduos de cada área, $\hat{H}_o$: heterozigosidade observada, $\hat{H}_e$: heterozigosidade esperada e $\hat{f}$: Índice de Fixação.

Loco	Aneurilândia ($n = 99$)			Rosana ($n = 124$)			PEMD ($n = 99$)		
	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{f}$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{f}$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{f}$
Hc12	0,302	0,301	-0,002	0,353	0,338	-0,044	0,244	0,271	0,098*
Hc14	0,414	0,705	0,413	0,564	0,719	0,215	0,404	0,699	0,422
Hc21	0,767	0,754	-0,018	0,844	0,759	-0,112	0,737	0,764	0,035*
Hc34	0,586	0,589	0,005	0,500	0,644	0,223	0,545	0,592	0,079*
Hc35	0,667	0,768	0,132	0,594	0,626	0,051*	0,596	0,752	0,208
Hc40	0,743	0,845	0,121	0,770	0,889	0,134	0,888	0,853	-0,041
Hc42	0,515	0,698	0,262	0,554	0,686	0,193	0,552	0,846	0,348
Hc49	0,616	0,675	0,087*	0,772	0,681	-0,133	0,727	0,621	-0,171
Média	0,576	0,667	0,136*	0,619	0,668	0,073*	0,587	0,675	0,131*
SD	0,160	0,166		0,165	0,157		0,202	0,188	

*Valores significativos ($\alpha = 0,05$).

Tabela 6. Frequência de alelos nulos em *Hymenaea courbaril* L. calculado para cada loco e área.

Loco	Anaurilândia (n = 99)	Rosana (n = 124)	PEMD (n = 99)
Hc12	0,020	0,013	0,045
Hc14	0,015	0,015	0,015
Hc21	0,001	0,000	0,041
Hc34	0,000	0,109	0,047
Hc35	0,053	0,015	0,091
Hc40	0,057	0,051	0,001
Hc42	0,098	0,080	0,160
Hc49	0,055	0,013	0,000

3.3. Estrutura genética populacional

A divergência global encontrada foi de $G'_{ST} = 0,121$. Entre as áreas Anaurilândia e Rosana a divergência foi de $G'_{ST} = 0,115$, entre Anaurilândia e PEMD $G'_{ST} = 0,122$ e entre Rosana e PEMD $G'_{ST} = 0,066$. De acordo com a análise de ΔK de Evanno et al. (2005), o número de agrupamentos que melhor caracteriza as três áreas de estudo é de $K = 2$ (Figura 13). Embora os dois conjuntos gênicos estejam presentes nas três populações, pode ser identificada maior semelhança entre os indivíduos da área de Rosana com o PEMD e maior diferença destas com Anaurilândia (Figura 14).

Figura 13. Resultado do valor de K mais provável a partir dos valores de ΔK (Delta K) estimados como proposto por Evanno et al. (2005) com o programa STRUCTURE HERVESTER (Earl & VonHoldt 2012).

Figura 14. Agrupamento dos indivíduos de *Hymenaea courbaril* L. das três áreas de estudo em dois *clusters*, estimado segundo Evanno et al. (2005).

3.4. Estrutura genética espacial

As três populações estudadas apresentaram estruturação genética espacial. Anaurilândia apresentou estruturação até 100 m com valores de parentesco máximo de $\hat{\theta}_{xy} = 0,14$, Rosana até 300 m com parentesco máximo de $\hat{\theta}_{xy} = 0,08$ e PEMD até 200 m com parentesco máximo de $\hat{\theta}_{xy} = 0,13$ (Figura 15).

Figura 15. Estrutura genética espacial de *Hymenaea courbaril* L., nas áreas estudadas. Sendo a linha contínua referente a estimativa do coeficiente de coancestria médio (Loiselle et al. 1995) e as linhas pontilhadas representam o intervalo de rejeição para a hipótese nula de ausência de coancestria (95%)

3.5. Sistema de reprodução

No evento reprodutivo estudado, as 12 árvores-mães amostradas no PEMD reproduziram-se predominantemente por cruzamentos (97,4%). Tanto a taxa média de cruzamento entre parentes ($\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,143$) como a correlação de paternidade ($\hat{r}_{pm} = 0,248$) foram elevadas, demonstrando a ocorrência de cruzamentos biparentais e de poucos doadores de pólen contribuindo para os cruzamentos ($\hat{N}_{ep} = 4,03$), isso é reforçado pelo valor de $\hat{r}_s > 0$, onde a endogamia que ocorre na população não ser totalmente proveniente de autofecundação e sim por cruzamento entre aparentados. Os amplos intervalos de confiança dos parâmetros de sistema reprodutivo, entretanto, evidenciam uma ampla variação entre famílias (Tabela 7).

Tabela 7. Sistema de cruzamento da população de *Hymenaea courbaril* L. do Parque Estadual Morro do Diabo. Valores e intervalo de confiança (10.000 bootstraps) para taxa de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$), taxa de cruzamento unilocos ($\hat{t}_s$), taxa de cruzamento entre aparentados ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$), correlação de paternidade ($\hat{r}_{pm}$), correlação de autofecundação ($\hat{r}_s$) e F parental ($\hat{F}_p$). Valores de taxa de autofecundação ($\hat{s}$), frequência de irmãos de autofecundação ($\hat{P}_{IA}$), meio irmãos ($\hat{P}_{MI}$), irmãos completos ($\hat{P}_{IC}$) e irmãos de autofecundação e cruzamento ($\hat{P}_{AC}$), coancestria dentro das progênes ($\hat{\Theta}$), tamanho efetivo populacional ($\hat{N}_e$), número efetivo de doadores de pólen ($\hat{N}_{ep}$) e o número de matrizes para a coleta de sementes com base no tamanho efetivo de referência de 100 ($\hat{m}_{100}$), 500 ($\hat{m}_{500}$) e 1000 ($\hat{m}_{1000}$).

Parâmetro	Valores	Intervalo de Confiança (95%)
$\hat{t}_m$	0,974	0,511 a 0,998
$\hat{t}_s$	0,831	0,476 a 0,928
$\hat{t}_m - \hat{t}_s$	0,143	0,025 a 0,243
$\hat{s}$	0,026	*
$\hat{r}_{pm}$	0,248	0,083 a 0,328
$\hat{r}_s$	0,175	0,020 a 0,917
$\hat{F}_p$	-0,145	-0,200 a -0,090
$\hat{P}_{IA}$	0,026	*
$\hat{P}_{MI}$	0,732	*
$\hat{P}_{IC}$	0,242	*
$\hat{P}_{AC}$	0,051	*
$\hat{\Theta}$	0,121	*
$\hat{N}_e$	4,13	*
$\hat{N}_{ep}$	4,03	*
$\hat{m}_{100}$	24	*
$\hat{m}_{500}$	121	*
$\hat{m}_{1000}$	242	*

*valor não estimado por MLTR

4. DISCUSSÃO

Os parâmetros de diversidade genética encontrados para o PEMD e os plantios de restauração neste estudo estão de acordo com a maioria dos trabalhos realizados com a espécie a partir de populações naturais em Floresta Estacional Semidecidual (Toledo 2005; Guidugli 2007) e Amazônica (Lacerda et al. 2008a; Carneiro et al. 2011; Silva et al. 2014). Na região do Pontal do Paranapanema, a espécie tem apresentado alta diversidade, porém em pequenos fragmentos florestais, foi evidenciada a diminuição da diversidade genética em decorrência do isolamento de populações remanescentes (Santos 2002; Kageyama et al. 2004; Toledo 2005). Baixa conectividade entre populações fragmentadas tem influenciado negativamente a diversidade genética das populações de espécies arbóreas em diversos biomas e aumentado os níveis de endogamia nos remanescentes florestais (Zucchi et al. 2003; Kageyama et al. 2004; Moraes et al. 2007; Moraes & Sebbenn 2011; Sebbenn et al. 2011; Tambarussi et al. 2016).

Em relação às áreas de restauração, a diversidade genética encontrada para *H. courbaril* neste estudo é superior à encontrada para *Centrolobium tomentosum* Guillem ex. Bentham (Sujii et al. 2017), *Inga vera* Will. (Cruz Neto et al. 2014), *Myroxylon peruiferum* L.f. (Schwarcz 2014) e *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (Bajay 2014) realizados em áreas de restauração florestal no mesmo bioma. Dentre estas espécies a única que apresentou diversidade genética satisfatória no plantio foi *C. tomentosum* (Sujii et al. 2017). Apesar de baixa diversidade no plantio de *I. vera* e *M. peruiferum*, causada pela coleta de sementes em poucas matrizes (Cruz Neto et al. 2014; Schwarcz 2014), os autores identificaram uma maior diversidade em indivíduos juvenis regenerantes na área, devido ao efetivo fluxo de pólen. A migração de propágulos para áreas de restauração pode amenizar o efeito fundador destas restaurações e aumentar o nível de diversidade local. Para situações em que o fluxo gênico não se estabelece com o tempo, como no caso de *P. gonoacantha*, são necessárias intervenções, para aumentar a diversidade e garantir a permanência da espécie na região (Bajay 2014).

Nas áreas estudadas, talvez não sejam necessárias intervenções futuras para a manutenção *H. courbaril* no local, pois os plantios apresentam a elevada diversidade genética compatível com florestas nativas da região, reflexo da metodologia utilizada durante implementação (Kageyama & Gandara 2000). Entretanto, há de se ressaltar o elevado grau de devastação florestal na região e o estado de conservação de alguns remanescentes. Tanto a distância longa entre remanescentes como a matriz agrícola pouco permeável à fauna dispersora de pólen e sementes, dificultam o fluxo gênico entre fragmentos e compromete a diversidade genética em longo prazo. Mesmo que os indivíduos estejam estabelecidos na área e com diversidade genética suficiente para manter uma população

viável, há necessidade de análise dos regenerantes após alguns eventos reprodutivos na área para avaliar se há conectividade efetiva entre as florestas remanescentes e implantadas da região.

A população de Anaurilândia, quando comparada as demais áreas, apresentou maior divergência (11,5% com Rosana e 12,2% com PEMD), confirmado pela estrutura genética populacional (Figura 14), o que pode ter contribuído para a maior divergência global entre as três áreas (12,1%). Acredita-se que isso tenha ocorrido porque as mudas utilizadas na área foram provenientes de outros fragmentos florestais da região do Pontal do Paranapanema, que não o PEMD, pois a coleta de sementes para produção comercial de mudas foi proibida no PEMD em 2000 com a publicação do SNUC. Sendo assim, a área de Anaurilândia, que foi implantada em 2001, teve sua diversidade local diferenciada da de Rosana e do PEMD. A coleta de sementes quando realizada em várias áreas naturais da região, aliada a alternância de áreas ao longo do tempo, confere maior diversidade genética aos indivíduos que serão plantados em áreas de restauração (Falk et al. 2001; Mori 2003). Esta alta diversidade foi também identificada pela baixa estruturação na área e valores baixos de coancestria. Por estes motivos, e pela distribuição ampla dos indivíduos na área e por estar adjacente a um fragmento remanescente, a população desta restauração tem grande potencial como fonte de sementes para novas implantações, respeitando a distância mínima de 100 m entre as matrizes para a coleta de sementes.

Rosana e o PEMD apresentaram a menor divergência (6,6%), possivelmente pela maioria dos indivíduos plantados na área serem provenientes de sementes coletadas no PEMD. Além disso, como o plantio foi implantado durante três anos, as mudas de diferentes eventos reprodutivos podem ter contribuído com o aumento da diversidade dos indivíduos plantados (Falk et al. 2001). Estes dados nos permitem ressaltar que a partir de uma rede de sementes, com *pool* genético distinto ou a partir de alguns eventos reprodutivos, há a possibilidade de serem recriadas áreas florestais, por meio de reflorestamentos, muito similares aos remanescentes florestais que ainda resistem, pelo menos geneticamente. Apesar da alta fragmentação do entorno, estas áreas podem receber fluxo gênico via pólen, e futuramente pode servir de fonte de semente para desenvolvimento de novos projetos de restauração. Entretanto, como a área apresentou estruturação genética espacial, apesar de baixa, recomenda-se que a coleta seja feita em matrizes distantes pelo menos 300 m, para que diminua a probabilidade de cruzamento entre indivíduos aparentados.

Assim como em outros trabalhos com *H. courbaril*, a população do PEMD apresenta cruzamento entre indivíduos aparentados (Santos 2002; Lacerda et al. 2008b; Carneiro et al. 2011), no entanto, o valor encontrado neste estudo ($\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,143$) foi superior em relação aos demais ($\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,014$ em Santos (2002), $\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,096$ em Lacerda et al. (2008b) e $\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,066$ em

Carneiro et al. (2011)). Ambientes contínuos de mata podem apresentar variação na genética populacional de acordo com os indivíduos selecionados, assim naturalmente se espera uma diferença entre os grupos estudados, mesmo que dentro de uma única floresta, dependendo de seu tamanho e número de indivíduos e populações efetivas que a área apresenta (Frankham 1996).

Porém, a taxa mais elevada de indivíduos aparentados pode ser em decorrência do baixo número de doadores de pólen que participaram do evento reprodutivo, e em consequência do comportamento dos polinizadores que forrageiam várias flores em uma mesma árvore antes de procurar outras, e preferencialmente forrageiam árvores mais próximas (Moraes et al. 2007; Moraes & Sebbenn 2011). Mesmo não sendo um grande problema este comportamento é intensificado pela fragmentação e pode alterar a taxa de cruzamento das espécies arbóreas principalmente quando se encontram isoladas. Apesar de ser considerada uma espécie auto-incompatível (Bawa 1974; Dunphy et al. 2004; Lacerda et al. 2008b). Estudos recentes têm evidenciado que pode haver autofecundação em *H. courbaril*, possivelmente por não funcionamento de controles pós-zigóticos em indivíduos mais isolados que tem a fertilização cruzada prejudicada (Feres et al. 2009; Carneiro et al. 2011). Este padrão de alteração do sistema reprodutivo por isolamento foi identificado em *Hymenaea stigonocarpa*, considerada também como auto-incompatível (Moraes et al. 2007; Moraes & Sebbenn 2011). Logo, nossos resultados mostram que os cruzamentos biparentais e o pequeno número de doadores de pólen e, em menor escala, as autofecundações, podem ter contribuído para os níveis elevados de endogamia na população do PEMD.

Embora tenha sido identificada endogamia no PEMD, a estruturação genética espacial foi baixa (Figura 15). Isso indica que, historicamente, as sementes, mesmo que provenientes de cruzamentos endogâmicos, estavam sendo efetivamente dispersas (Loiselle et al. 1995). Na área ainda são encontrados os principais agentes de dispersão da espécie (Kageyama et al. 2004), o que pode contribuir para manutenção da baixa estrutura genética espacial em gerações futuras. Além da efetividade da dispersão de sementes, a seleção natural pode contribuir para uma população de adultos de coancestria mais baixa. Sementes provenientes de indivíduos aparentados, quando altamente homozigotas, podem nem germinar, ou as plântulas e juvenis podem não se estabelecer (Falk et al. 2001; Sebbenn et al. 2011) em decorrência do efeito da depressão endogâmica.

Ao considerar os nossos resultados de *H. courbaril*, e a realidade da região do Pontal do Paranapanema, que apresenta uma vegetação remanescente escassa, altamente fragmentada, e que novas propostas de conservação, recuperação e manejo estão sendo discutidas para a região (SMA-SP 2012), recomendamos que novos plantios sejam realizados na região como forma de conectar os remanescentes e restaurações florestais de forma estrutural e funcional, nos aspectos ecológicos e genéticos, contribuindo para a conservação local e manutenção das áreas em longo prazo. Para

tanto, recomendamos que as áreas em processo de restauração sejam utilizadas como fonte de sementes. No entanto, para garantir a diversidade mínima inicial dos plantios futuros, são necessários estudos para avaliar geneticamente as sementes produzidas nestas áreas a fim de verificar o fluxo gênico via pólen com os remanescentes florestais do entorno, o número efetivo de doadores de pólen e consequentemente a diversidade genética destas progênies. Recomenda-se ainda que as coletas de sementes nas áreas em restauração sejam iniciadas apenas, quando a maioria dos indivíduos plantados alcançarem a maturidade reprodutiva, para garantir que as sementes coletadas apresentem elevada diversidade genética e baixos níveis de coancestria. Por fim, estudos com a população regenerante dentro destas áreas são necessários para avaliar a diversidade genética que está se estabelecendo na área, como forma de verificar se serão necessárias intervenções futuras ou se estas populações conseguirão manter a autossustentabilidade nestes plantios.

5. CONCLUSÕES

As áreas em processo de restauração estudadas apresentam diversidade compatível com a área florestal de referência. Isto se deve principalmente ao estabelecimento bem-sucedido de indivíduos provenientes de coleta de sementes realizada em pequenas áreas florestais da região, em número suficiente de matrizes que garantiram a diversidade mínima inicial dos plantios. Por meio destes resultados podemos identificar que é possível reconstituir, geneticamente, populações em áreas de restauração florestal, seguindo-se normas de coleta, como efetuado na época de implantação das áreas. Assim estas áreas têm grandes chances de se manterem autossustentáveis, sem a necessidade de futuras intervenções. E também podem ser utilizadas como fonte de sementes para futuros projetos de restauração florestal, desde que respeitadas as recomendações de coletas, pelas quais estas foram feitas e deve-se respeitar a distância mínima entre as matrizes de cada área.

REFERÊNCIAS

- Bajay MM (2014) Diversidade e estrutura genética de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. em áreas em processo de restauração florestal e remanescentes de Mata Atlântica.
- Bawa KS (1974) Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution* 28:85–

- Braido LMH, Tommaselli JTG (2012) Setorização de fatores ambientais – clima, solos e relevo para o planejamento ambiental e territorial na região do Pontal do Paranapanema – SP – Brasil. *Revista Geonorte* 3:1268–1282
- Brancalion PHS, Gandolfi S, Rodrigues RR (2009) Incorporação do conceito da diversidade genética na restauração ecológica. In: *Pacto para a restauração da Mata Atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal*. Rodrigues, RR, Brancalion, PHS, & Isernhagen, I, editors. Instituto BioAtlântica, São Paulo pp. 37–54.
- Buonamici A, Cavers S, Vendramin GG (2008) Microsatellite loci isolated from the tropical tree *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae). *Molecular Ecology Resources* 8:1020–1022
- Carneiro FS et al. (2011) Effects of selective logging on the mating system and pollen dispersal of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) in the Eastern Brazilian Amazon as revealed by microsatellite analysis. *Forest Ecology and Management* 262:1758–1765
- Carneiro FS et al. (2012) Mendelian inheritance, linkage and genotypic disequilibrium in microsatellite loci isolated from *Hymenaea courbaril* (Leguminosae). *Genetics and molecular research: GMR* 11:1942–1948
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24:621–631
- Ciampi AY et al. (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. *Molecular Ecology Resources* 8:1074–1077
- Cockerham CC (1969) Variance of gene frequencies. *Evolution* 23:72–84
- Cruz Neto O et al. (2014) Genetic and ecological outcomes of *Inga vera* subsp. *affinis* (Leguminosae) tree plantations in a fragmented tropical landscape. *PLoS ONE* 9:1–8
- Dean WA (1996) *A ferro e fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira*. Companhia das Letras, São Paulo, Brasil.
- Dempster AP, Laird NM, Rubin DB (1977) Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of Royal Statistical Society* 39:1–38
- Dunphy BK, Hamrick JL, Schwagerl J (2004) A comparison of direct and indirect measures of gene flow in the bat-pollinated tree *Hymenaea courbaril* in the dry forest life zone of southwestern Puerto Rico. *International Journal of Plant Sciences* 165:427–436
- Durigan G, Nogueira JCB (1990) Recomposição de matas ciliares. *IF Série Registros* 4:1–14

- Earl DA, VonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resource* 4:359–361
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611–2620
- Falk DA, Knapp EE, Guerrant EO (2001) An introduction to restoration genetics. *Society for Ecological Restoration* 30
- Faria HH (2006) Parque Estadual do Morro do Diabo: plano de manejo. 312
- Feres JM et al. (2009) Microsatellite diversity and effective population size in a germplasm bank of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Leguminosae), an endangered tropical tree: Recommendations for conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56:797–807
- Frankham R (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* 10:1500–1508
- Goudet J (2001) Fstat, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
- Goudet J (2005) Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology* 5:184–186
- Guidugli MC (2007) Estudos de estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de *Hymenaea corbaril* L. utilizando marcadores moleculares SSR e RAPD.
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) Spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology* 2:618–620
- Hedrick PW (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59:1633–1638
- Hobbs RJ et al. (2006) Novel ecosystems: Theoretical and management aspects of the new ecological world order. *Global Ecology and Biogeography* 15:1–7
- Hufford KM, Krauss SL, Veneklaas EJ (2012) Inbreeding and outbreeding depression in *Stylidium hispidum*: Implications for mixing seed sources for ecological restoration. *Ecology and Evolution* 2:2262–2273
- Inglis PW, Pappas M de CR, Grattapaglia D (2016) Protocolo de extração de DNA e RNA de alta qualidade para espécies ricas em compostos secundários. *Comunicado Técnico 204-Embrapa* 1–6
- IPÊ (2017) Instituto de Pesquisas Ecológicas - Projetos: Pontal do Paranapanema – SP. Disponível em: <http://www.ipe.org.br/projetos/pontal-do-paranapanema>. Acesso em julho de 2017.

- Kageyama P et al. (2004) Conservation of Mata Atlântica forest fragments in the State of São Paulo, Brazil. In: Vincet, B. et al. Challenges in managing forest genetic resources for livelihoods: examples from Argentina and Brazil. pp. 167–185.
- Kageyama PY et al. (2003) Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Scientia Forestalis* 64:93–107
- Kageyama PY, Gandara FB (2000) Recuperação de áreas ciliares. In: Matas ciliares: conservação e recuperação. Rodrigues, RR & Leitão-Filho, H de F, editors. Edusp, São Paulo pp. 249–269.
- Kronka FJN et al. (2005) Inventário florestal da vegetação natural do Estado de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente / Instituto Florestal / Imprensa Oficial
- Lacerda AEB, Kanashiro M, Sebbenn AM (2008a) Effects of Reduced Impact Logging on genetic diversity and spatial genetic structure of a *Hymenaea courbaril* population in the Brazilian Amazon Forest. *Forest Ecology and Management* 255:1034–1043
- Lacerda AEB, Kanashiro M, Sebbenn AM (2008b) Long-pollen movement and deviation of random mating in a low-density continuous population of a tropical tree *Hymenaea courbaril* in the Brazilian Amazon. *Biotropica* 40:462–470
- Loiselle BA et al. (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82:1420–1425
- Martins K et al. (2008) Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae - Caesalpinioideae) em fragmentos florestais do Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 31:61–69
- McKay JK et al. (2005) 'How local is local?' A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. *Restoration Ecology* 13:432–440
- Moraes MLT de, Sebbenn AM (2011) Pollen Dispersal Between Isolated Trees in the Brazilian Savannah: A Case Study of the Neotropical Tree *Hymenaea stigonocarpa*. *Biotropica* 43:192–199
- Moraes MLT, Kageyama PY, Sebbenn AM (2007) Sistema de reprodução em pequenas populações fragmentadas e em árvores isoladas de *Hymenaea stigonocarpa*. *Scientia Forestalis* 74:75–86
- Mori ES (2003) Genética de populações arbóreas: orientações básicas para seleção e marcação de matrizes. *Série Registros IF* 25:35–44
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70:3321–3323
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959

- R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reis A, Tres DR, Scariot EC (2007) Restauração na Floresta Ombrófila Mista através da sucessão natural. *Pesquisa Florestal Brasileira* 55:67–73
- Ritland K (1989) Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus* *Evolution* 43:848–859
- Ritland K (2002) Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity* 88:221–228
- Rodrigues ER, Monteiro R, Cullen Junior L (2010) Dinâmica inicial da composição florística de uma área restaurada na região do Pontal do Paranapanema, São Paulo, Brasil. *Revista Árvore* 34:853–861
- Rodrigues NB (2013) Variabilidade genética de populações de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne e *Dipteryx alata* Vogel em áreas nativas e em plantios de recuperação de áreas degradadas em Paracatu, MG.
- Rodrigues RR et al. (2011) Large-scale ecological restoration of high-diversity tropical forests in SE Brazil. *Forest Ecology and Management* 261:1605–1613
- Rodrigues RR, Lima RAF, et al. (2009) On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Conservation* 142:1242–1251
- Rodrigues RR, Brancalion PHS, Isernhagen I (2009) Pacto para a restauração ecológica da Mata Atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal. Instituto BioAtlântica
- Sampaio AB, Holl KD, Scariot A (2007) Regeneration of seasonal deciduous forest tree species in long-used pastures in central Brazil. *Biotropica* 39:655–659
- Santos JD dos (2002) Estudos ecológicos e genéticos numa paisagem fragmentada visando sua conectividade, no Pontal do Paranapanema - SP. Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’
- Schwarcz KD (2014) Viabilidade genética de restaurações florestais: Diversidade e estrutura genética em *Myroxylon peruiferum* L.f.
- Sebbenn AM et al. (2011) 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* 106:134–145
- Sebbenn AM (2002) Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. *Revista do Instituto Florestal* 14:115–132
- Sebbenn AM (2006) Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: Pomares de sementes de espécies nativas. Higa AR, Silva LD editors pp.193-198

- SER (2004) The SER International primer on ecological restoration. Society for Ecological Restoration International Science & Policy Working Group 1–13
- Silva SMM et al. (2014) Parâmetros genéticos para a conservação de *Hymenaea courbaril* L. na Amazônia Sul-Occidental. *Ciência Florestal* 24:87–95
- Siqueira MVBM et al. (2013) How can molecular ecology contribute to forest restoration? *Journal of Biotechnology and Biodiversity* 4:316–321
- SMA-SP (2008) Secretaria do Meio Ambiente do estado de São Paulo. Resolução SMA nº68. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/legislacao/resolucoes-sma/resolucao-sma-68-2008/>. Acesso em julho de 2017.
- SMA-SP (2012) Secretaria do Meio Ambiente do estado de São Paulo. Resolução SMA nº17. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/legislacao/resolucoes-sma/resolucao-sma-17-2012/>. Acesso em julho de 2017.
- SOS Mata Atlântica (2017) Arquivos em formato *shapefiles* para download. Disponível em: http://mapas.sosma.org.br/dados/solicitacao_mapas/. Acesso em junho de 2017.
- Souza FM de, Batista JLF (2004) Restoration of seasonal semideciduous forests in Brazil: Influence of age and restoration design on forest structure. *Forest Ecology and Management* 191:185–200
- Sujii PS et al. (2017) Recovery of genetic diversity levels of a Neotropical tree in Atlantic Forest restoration plantations. *Biological Conservation* 211:110–116
- Tambarussi E V et al. (2016) Several small: how inbreeding affects conservation of *Cariniana legalis* Mart. Kuntze (Lecythidaceae) the Brazilian Atlantic Forest's largest tree. *International Forestry Review* 18:502–510
- Toledo RM de (2005) Modelagem especial do fluxo de sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*), através de marcadores moleculares, na paisagem fragmentada do Pontal do Paranapanema, SP. Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'
- Veloso HP, Rangel Filho ALR, Lima JCA (1991) Classificação da Vegetação Brasileira Adaptada a um Sistema Universal.
- Vencovsky R (1987) Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas. *IPEF* 79–84
- Zanne AE, Chapman CA (2001) Expediting reforestation in tropical grasslands: Distance and isolation from seed sources in plantations. *Ecological Applications* 11:1610–1621
- Zimback L et al. (2011) Estrutura genética de peroba (*Aspidosperma polyneuron*) no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto Florestal* 23:265–277

Zucchi MI et al. (2003) Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genetics and Molecular Biology* 26:449–457

Capítulo 2:

DEPRESSÃO ENDOGÂMICA EM PROGÊNIES DE JATOBÁ (*Hymenaea courbaril* L.)

RESUMO

A depressão endogâmica diminui a adaptação dos indivíduos provenientes de autofecundação e cruzamentos entre aparentados. Para verificar os efeitos da depressão endogâmica sobre *Hymenaea courbaril* L., foram coletados 30 frutos de oito matrizes no Parque Estadual Morro do Diabo – Teodoro Sampaio – SP. Estes frutos e sementes foram medidos e pesados. As sementes foram colocadas em tubetes para germinar. Após o desenvolvimento destas, foram selecionadas 40 plântulas provenientes de cada uma das 8 matrizes, que foram genotipadas para oito locos microssatélites. Estas mudas também tiveram mensurados sua altura, diâmetro do colo e número de folhas, mensalmente, durante 15 meses. Os valores de coancestria, dos indivíduos foram estimados e divididos de acordo com o nível de coancestria: não aparentados (t_u), aparentados (t_r) e autofecundados (s). Foi verificada diferença entre as métricas das plantas de acordo com o nível de coancestria entre indivíduos. Foram estimados também os valores de depressão endogâmica (ID). Como resultado foi verificado que a quantidade de irmãos de autofecundação foi muito pequena (1,3%) e a maioria dos cruzamentos ocorreu entre indivíduos não aparentados (66,6%). Observamos depressão endogâmica por autofecundação no peso e tamanho dos frutos, no entanto para os demais caracteres o efeito foi ameno e/ou não ocorreu. O fato de as sementes terem sido coletadas em um fragmento grande e bem conservado deve ter contribuído para esse resultado. Soma-se a isso o fato da fragmentação na região ser muito recente, tempo insuficiente para ser detectado efeito de depressão endogâmica.

Palavras-chave: Autofecundação; Cruzamento entre aparentados; Produção de mudas; Viveiro

Inbreeding depression in *Hymenaea courbaril* L. seedlings

ABSTRACT

Inbreeding depression reduces the fitness of inbred individuals. To verify the effects of inbreeding depression in *Hymenaea courbaril* L., 30 fruits from eight seed trees were collected at Morro do Diabo State Park - Teodoro Sampaio - SP. These fruits and seeds were measured and weighed. The seeds were planted and established in a nursery. After germination, 40 seedlings from each of the eight seed trees were selected. These seedlings were genotyped with eight microsatellite loci. These seedlings had also measured their height, root-collar diameter and number of leaves, monthly, for 15 months. The pairwise coancestry values were estimated and three groups were separated according to the coancestry level: seedlings from outcrossing among unrelated individuals (t_u), outcrossing among related individuals (t_r), and selfing (s). We observed differences among the seedlings metrics. The amount of inbreeding depression (ID) was also estimated. As a result, the proportion of selfed seedlings was very small (1.3%) and most seedlings were from outcrossing among unrelated trees (66.6%). We observed inbreeding depression in selfing class for weight and size of fruits, however, the effect was insignificant or non-existent for the other characters. The fact that the seeds were collected in a large and preserved fragment may have contributed to this result. Forest fragmentation in this region is very recent, and probably the time to detect the inbreeding depression was insufficient.

Key-words: Crossing among relatives; Nursery; Seedling production; Selfing

1. INTRODUÇÃO

A extensa devastação florestal que tem ocorrido em todo mundo ocasionou a perda de mais de 30% da cobertura florestal original do planeta (Hansen et al. 2013). A constatação de que a redução e a fragmentação de habitat comprometem a manutenção da biodiversidade em florestas remanescentes (Saunders et al. 1991; Turner 1996; Fahrig 2003; Haddad et al. 2015) motivou a realização, ao longo das últimas décadas, de dezenas de trabalhos que objetivaram avaliar o estado de conservação genética das populações remanescentes com uso de marcadores moleculares. De acordo com a maioria deles, a fragmentação e a redução de habitat têm causado efeitos negativos na diversidade genética destas populações, como perda de diversidade genética por causa dos efeitos mais severos da deriva genética em populações pequenas e aumento da divergência genética devido à diminuição do fluxo gênico e à deriva genética (Slatkin 1985; Hall et al. 1996; Young et al. 1996; Fahrig 2003; Kageyama, Sebbenn, et al. 2003; Moraes et al. 2005; Zimback et al. 2011). A restrição do fluxo gênico e o isolamento reprodutivo das populações, associados ao menor número de indivíduos reprodutivos e à proximidade entre indivíduos aparentados dentro dos fragmentos florestais, pode resultar em aumento na quantidade e frequência cruzamentos relacionados, elevando a endogamia nas populações (Young et al. 1996; Sebbenn et al. 2000). Estudos realizados em remanescentes florestais da Mata Atlântica têm identificado níveis elevados endogamia em populações fragmentadas de espécies arbóreas (Sebbenn et al. 2003; Souza et al. 2004; Kageyama et al. 2004; Seoane et al. 2005; Martins et al. 2008; Sebbenn et al. 2011; Tarazi et al. 2013; Martins et al. 2015; Reis et al. 2015; Tambarussi et al. 2016; Araujo et al. 2017; Carvalho et al. 2017; Giombini et al. 2017). O efeito cumulativo da endogamia em sucessivas gerações pode levar a população à depressão endogâmica, colocando sua conservação em risco.

A depressão endogâmica é a redução da capacidade de adaptação, sobrevivência e reprodução (*fitness*) de uma espécie, causada pelo aumento da proporção de genótipos para alelos idênticos por descendência (IBD) (Charlesworth & Charlesworth 1987; Charlesworth & Willis 2009). A depressão endogâmica ocorre porque populações de espécies que se reproduzem predominantemente por cruzamentos, como a maioria das espécies arbóreas tropicais, apresentam níveis elevados de heterozigose. Nessas populações, alelos recessivos deletérios e letais (carga genética) são mantidos na população e mascarados nos genótipos heterozigotos. Cruzamentos entre indivíduos aparentados e autofecundações geram maior proporção de indivíduos homozigotos, aumentando dessa forma a probabilidade de expressão da carga genética (Charlesworth & Charlesworth 1987; Keller & Waller 2002). Genótipos homozigotos recessivos para alelos deletérios ou letais, em geral, apresentam menor vigor e maior mortalidade por causa da carga genética. Dessa

forma, os efeitos da depressão endogâmica geralmente são negativos dentro de uma população. Podem ocorrer durante todo o ciclo de vida da planta, desde a germinação, passando pelo desenvolvimento, estabelecimento e sobrevivência de indivíduos juvenis e adultos, como também influenciar sua fertilidade e produção de frutos (Sorensen & Miles 1982; Chaves et al. 2011; Rymer et al. 2015; Tambarussi et al. 2017). Estudos com espécies arbóreas nativas brasileiras ainda são escassos, mas têm apresentado valores consideráveis de depressão endogâmica dentro das populações, para tempo e porcentagem de germinação de sementes, sobrevivência e crescimento de plântulas e desenvolvimento de indivíduos adultos (Sebbenn et al. 2001; Chaves et al. 2011; Tambarussi et al. 2017). Estes estudos contribuem para o entendimento das consequências genéticas e fenotípicas da fragmentação e auxiliam em decisões sobre a manutenção e manejo de remanescentes florestais, bem como do uso desses fragmentos para coleta de sementes para restauração florestal.

A região do Pontal do Paranapanema, no extremo oeste do estado de São Paulo, era originalmente coberta por Floresta Estacional Semidecidual. A devastação das florestas da região teve início a partir da década de 1950, mas sofreu uma devastação rápida e voraz e, em um intervalo de apenas quinze anos, a cobertura florestal foi quase que totalmente substituída por pastagens (Dean, 1996). Atualmente, menos de 5% da área do Pontal é coberta por floresta nativa (Faria 2006), distribuída em pequenas áreas florestais esparsas. Estudos que buscaram avaliar os efeitos genéticos da fragmentação florestal na região do Pontal em algumas espécies arbóreas relatam o aumento da divergência genética entre populações regenerantes e níveis elevados de endogamia (Santos 2002; Kageyama et al. 2004; Toledo 2005; Martins et al. 2008). Esforços para a restauração têm sido realizados na área, para aumentar a conectividade entre remanescentes, visando a manutenção da diversidade (Kageyama et al. 2004). Porém, como a maior área de floresta remanescente é uma Unidade de Conservação de proteção integral – o Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD) – onde a coleta de sementes para uso comercial é proibida, a disponibilidade de remanescentes na região para marcação de matrizes e coleta de sementes é muito limitada. Além disso, como tanto as populações remanescentes disponíveis para coleta de sementes como populações no PEMD têm apresentado os efeitos negativos da fragmentação florestal, especialmente o aumento da endogamia (Santos 2002; Kageyama et al. 2004; Toledo 2005; Martins et al. 2008), há a preocupação de que a qualidade genética das sementes coletadas nos remanescentes da região seja inferior em decorrência da depressão endogâmica. Desta forma, ao utilizar essas áreas como fonte de semente para implantação de áreas de restauração há risco de menor viabilidade dos plantios.

Diante desse contexto, avaliar se há depressão endogâmica em sementes e mudas obtidas a partir de florestas da região do Pontal do Paranapanema se faz necessário. O jatobá, *Hymenaea*

courbaril L., é uma espécie que ocorre nesta região e tem sido utilizada em plantios de restauração florestal (Durigan & Nogueira 1990; Souza & Batista 2004; Sampaio et al. 2007). Populações remanescentes de jatobá no Pontal têm apresentado altos níveis de endogamia e maior divergência genética entre populações juvenis (Santos 2002; Kageyama et al. 2004; Toledo 2005). Além disso, progênies de polinização aberta recentemente coletadas no PEMD têm apresentado uma elevada proporção de cruzamentos relacionados (capítulo 1). Com base nessas informações, o presente estudo objetivou avaliar se progênies de jatobá com maior grau de parentesco apresentam menor vigor para características fenotípicas de sementes e mudas, tendo como hipótese que progênies provenientes de autofecundação e cruzamento entre indivíduos aparentados terão *fitness* e menor desenvolvimento, ou seja, menor altura, menor diâmetro do colo e menor quantidade de folhas. Nosso trabalho vem contribuir para a literatura ainda escassa sobre depressão endogâmica em populações naturais de espécies arbóreas tropicais, além de trazer recomendações para seleção de mudas da espécie para plantios de restauração florestal no Pontal do Paranapanema.

2. MATERIAL E MÉTODOS

No Parque Estadual Morro do Diabo – PEMD (entre 22°21'57"S, 52°23'13"O e 22°40'40"S, 52°09'28"O), localizado no município de Teodoro Sampaio - SP, foram selecionadas oito árvores adultas de jatobá, *Hymenaea courbaril* L., das quais foram coletados 30 frutos em cada. As matrizes escolhidas foram utilizadas no passado como fonte de sementes, pelo próprio PEMD, para a produção de mudas empregadas em projetos de restauração florestal (comunicação pessoal de funcionários do PEMD).

Os frutos foram levados para o Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas Tropicais (LARGEA), no Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), onde foram medidos e pesados. Depois de aberto, cada fruto teve suas sementes medidas, pesadas e identificadas. Após escarificação mecânica com lixa número 80, essas sementes foram alocadas em tubetes de 280ml com substrato florestal e levadas para casa de vegetação até sua germinação e depois transferidas para o viveiro. Em seguida foram separadas 40 plântulas de cada matriz, totalizando 320 indivíduos, que foram distribuídos em um delineamento de blocos completos casualizados, com três repetições. Estes indivíduos tiveram a altura mensurada, mensalmente, a partir do primeiro mês de experimento. O diâmetro do colo foi mensurado no primeiro mês e mensalmente a partir do sétimo. O número de folhas foi contado a partir do quarto mês. No terceiro mês, quando todos os indivíduos já tinham folhas definitivas, foi coletada uma folha

de cada indivíduo para a extração de DNA. Todas as medidas foram realizadas até o 15º mês de experimento.

O DNA das 320 plântulas foi extraído segundo o protocolo de Inglis et al. (2016) no LARGEA. A amplificação foi realizada utilizando oito *primers* desenvolvidos para a espécie: Hc12, Hc14, Hc34, Hc40 e Hc42 (Ciampi et al. 2008) e Hc21, Hc35 e Hc49 não publicados (detalhes no capítulo 1). Esta etapa e a seguinte foram realizadas no Laboratório Didático de Genética da Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba (UFSCar - Sorocaba). Os fragmentos foram separados no *Fragment Analyzer™ Automated CE System* (Advanced Analytical Technologies Inc. [AATI], Ames, IA, USA) utilizando o Kit de reagentes 35-500 bp (DNF-900, Advanced Analytical Technologies Inc.) e interpretados com o software PROSize™ (versão 2.0).

Utilizando o software SPAGeDi (Hardy & Vekemans 2002) foram estimados os valores de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) de todas as plântulas segundo Loiselle et al. (1995). Em seguida os indivíduos foram separados em três classes de coancestria, de acordo com os valores de $\hat{\theta}_{xy}$. Os pares de plântulas com valores negativos e nulos de $\hat{\theta}_{xy}$ não são parentes, enquanto que pares com níveis moderados a altos de $\hat{\theta}_{xy}$ são descendentes de cruzamentos entre parentes e autofecundações. Para definição das categorias, utilizamos os valores teóricos esperados para pares de indivíduos com diferentes graus de parentesco derivados por Cockerham & Weir (1984). Embora alguns autores tenham feito ressalvas sobre a comparação direta entre valores teóricos de coancestria e estimativas obtidas por marcadores moleculares (Rousset 2002), alguns trabalhos recentes têm mostrado resultados interessantes com uso desse procedimento (Bonatelli et al. 2015; Tambarussi et al. 2017).

As três classes de coancestria foram assim definidas: $\hat{\theta}_{xy} \leq 0$ foram considerados pares de indivíduos resultantes de cruzamentos entre não aparentados (t_u); $0,0625 \leq \hat{\theta}_{xy} \leq 0,25$ foram considerados indivíduos de cruzamento entre aparentados (que incluem parentes com graus de coancestria equivalente ao esperado para primos de primeiro grau, meios-irmãos e irmãos completos) (t_r) e $\hat{\theta}_{xy} \geq 0,5$ indivíduos oriundos de autofecundação (s) (Cockerham & Weir 1984). De acordo com esta separação, os valores de $\hat{\theta}_{xy}$ entre 0 e 0,0625 e entre 0,25 e 0,5 não entrariam nestas classes. Desta forma, foi feita uma divisão sistêmica entre os limites inferiores e superiores, classificados então da seguinte forma: $\hat{\theta}_{xy} \leq 0,031$ como t_u , $0,031 < \hat{\theta}_{xy} \leq 0,375$ como t_r e $\hat{\theta}_{xy} > 0,375$ como s .

Para cada par de indivíduos foi feita a média dos caracteres estudados (peso e tamanho de frutos; peso e tamanho de sementes; relação entre peso e comprimento de frutos e sementes; e medidas mensais de altura, diâmetro do colo e número de folhas das mudas). Em seguida, pelo fato

do número de pares em cada categoria (t_u , t_r e s) não serem semelhantes, foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$), para comparar seus valores.

Também foram estimados os valores de depressão endogâmica para indivíduos de autofecundação (ID_s), para indivíduos aparentados (ID_r) e para os de autofecundação e aparentados (ID_T) de acordo com as seguintes fórmulas (Tambarussi et al. 2017):

$$ID_s = 100. \left[1 - \left(\frac{\bar{x}_s}{\bar{x}_u} \right) \right]$$

$$ID_r = 100. \left[1 - \left(\frac{\bar{x}_r}{\bar{x}_u} \right) \right]$$

$$ID_T = 100. \left[1 - \left(\frac{\bar{x}_i}{\bar{x}_u} \right) \right]$$

Onde: $\bar{x}_s$ é o valor médio do caractere para indivíduos de autofecundação, $\bar{x}_r$ é o valor médio do caractere para indivíduos de cruzamento entre aparentados, $\bar{x}_i$ é o valor médio do caractere para indivíduos de autofecundação e de cruzamento entre aparentados e $\bar{x}_u$ é o valor médio do caractere para cruzamento entre indivíduos não aparentados.

3. RESULTADOS

Os pares de indivíduos de *H. courbaril* analisados, em sua maioria, são provenientes de cruzamento (98,7%), sendo 32,1% entre indivíduos aparentados e 66,6% de não aparentados, e a porcentagem proveniente de autofecundação foi de 1,3%.

Os frutos apresentaram menor peso e tamanho para indivíduos de autofecundação e consequentemente as menores relações de peso por comprimento. Contrariamente ao observado para os frutos, as sementes para indivíduos de autofecundação foram maiores e apresentaram maior peso. As diferenças em tamanhos e pesos de frutos e sementes entre indivíduos provenientes de cruzamento, aparentados e não aparentados, foram significativas, porém pequenas (Tabela 8).

Tabela 8. Valores médios para medidas de frutos e sementes de indivíduos de *Hymenaea courbaril* L., para cada classe de coancestria: indivíduos de autofecundação (s), indivíduos de cruzamento entre aparentados (t_r) e indivíduos de cruzamento entre não aparentados (t_u). Letras diferentes representam diferença estatística estimada por Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$).

Classes de coancestria	Pares	Fruto			Semente		
		Peso (g)	Comprimento (cm)	Relação g/cm	Peso (g)	Comprimento (mm)	Relação g/mm
s	660	85,55 b	12,09 c	6,90 b	3,66 a	23,58 a	0,15 a
t_r	16.194	98,51 a	12,81 a	7,50 a	3,47 c	22,70 c	0,15 a
t_u	33.549	97,54 a	12,76 b	7,45 a	3,50 b	22,83 b	0,15 a
Todos	50.403	97,69	12,76	7,46	3,50	22,80	0,15

A depressão endogâmica apresentou maiores valores para peso, relação peso por comprimento e comprimento dos frutos em indivíduos de autofecundação. Para as sementes os valores, embora menos expressivos, foram superiores em indivíduos de cruzamento entre aparentados (Tabela 9).

Tabela 9. Porcentagem de depressão endogâmica para medidas dos frutos e sementes de indivíduos de *Hymenaea courbaril* L.. Depressão endogâmica em indivíduos de autofecundação (ID_s), de cruzamento entre aparentados (ID_r) e para os de autofecundação e aparentados (ID_T).

	Fruto			Semente		
	Peso	Comprimento	Relação g/cm	Peso	Comprimento	Relação g/mm
ID_s	12,29	5,25	7,38	-4,42	-3,29	-1,47
ID_r	-0,99	-0,39	-0,67	0,88	0,54	0,37
ID_T	-0,47	-0,16	-0,40	0,67	0,39	0,30

Em geral, observou-se pouca ou nenhuma diferença entre as classes para os caracteres que mensuram o crescimento de mudas (Figura 16), o que resultou em estimativas pequenas de depressão endogâmica apenas para altura entre aqueles provenientes de autofecundação até o sexto mês de desenvolvimento (Figura 17). Para número de folhas, observou-se níveis baixos de depressão endogâmica para os indivíduos de autofecundação durante os meses avaliados, exceto para o quarto, sétimo e décimo quinto mês, em que foram maiores para indivíduos de cruzamento entre aparentados (Figura 17).

Figura 16. Valores médios de altura, diâmetro do colo e número de folhas dos indivíduos de *Hymenaea courbaril* L., em crescimento no viveiro durante 15 meses, para cada sistema de reprodução: indivíduos de autofecundação (s – preto), indivíduos de cruzamento entre aparentados (t_r – cinza) e indivíduos de cruzamento entre não aparentados (t_u – branco).

Figura 17. Porcentagem de depressão endogâmica para altura, diâmetro do colo e número de folhas dos indivíduos de *Hymenaea courbaril* L., em crescimento no viveiro durante 15 meses. Depressão endogâmica em indivíduos de autofecundação (ID_S – preto), de cruzamento entre aparentados (ID_r – cinza) e para os de autofecundação e aparentados (ID_T – branco).

4. DISCUSSÃO

O efeito da depressão endogâmica ocorre a diferentes intensidades de acordo com os estágios de desenvolvimento dos indivíduos e sob os diferentes caracteres (Charlesworth & Charlesworth 1987; Husband & Schemske 1996; Angeloni et al. 2011). Para os caracteres avaliados em *H. courbaril*, neste estudo, não houve efeito ou este foi pequeno, sendo o tamanho e peso dos frutos de indivíduos de autofecundação os mais afetados. Frutos mais leves e menores podem apresentar sementes menores, menor quantidade de sementes ou maior quantidade de sementes inviáveis em relação a frutos maiores e mais pesados. Em *H. courbaril*, frutos menores e mais leves apresentaram menor quantidade de sementes (dados não apresentados). Desta forma, o efeito estaria influenciando diretamente a produção de sementes da espécie, onde os efeitos da endogamia costumam ser mais evidentes (Husband & Schemske 1996).

As sementes de autofecundação foram as maiores e não apresentaram efeito de depressão endogâmica. Sementes formadas por autofecundação são mais propensas a perder sua viabilidade (Husband & Schemske 1996; Kittelson & Maron 2000), porém, isto não pode ser observado pois o trabalho foi realizado somente com sementes que germinaram. Possivelmente a depressão por endogamia agindo previamente deve ter expurgado as sementes mais endogâmicas (Byers & Waller 1999), que pelo controle pós-zigótico nem chegaram a germinar e acabaram não sendo analisadas pelo estudo. Além disso, a depressão endogâmica atua mais na germinação em si, como no tempo de emergência, e sobrevivência pós germinação (Chaves et al. 2011; Tambarussi et al. 2017), que não foram avaliados neste estudo.

A depressão endogâmica atuou com baixa intensidade no desenvolvimento das plântulas de *H. courbaril*, pelos valores encontrados no trabalho (Figura 17), diminuindo a detecção de seu efeito até os seis meses de idade, o que proporcionou pouca diferença fenotípica entre as mudas até os 15 meses. Para a maioria das espécies não é este padrão o encontrado, geralmente os indivíduos provenientes de autofecundação apresentam tamanho reduzido e menor sobrevivência em relação aos provenientes de fecundação cruzada (Hufford & Hamrick 2003; Chaves et al. 2011; Tambarussi et al. 2017).

Em locais onde não há limitação de recursos, como o viveiro, a tendência é haver menor efeito de depressão endogâmica, em relação a estudos realizados em áreas onde ocorrem estresses (Hull-Sanders et al. 2005; Angeloni et al. 2011). No entanto, se os indivíduos desenvolvidos em viveiro forem levados para campo, ambiente com maior potencial de seleção, podem apresentar maior taxa de mortalidade, menor crescimento e reprodução, por não estarem adaptados às adversidades (Falk et al. 2001). Em estágios mais avançados do desenvolvimento, como crescimento

(juvenis e adultos) e reprodução, a depressão endogâmica atua de forma mais intensa (Husband & Schemske 1996; Angeloni et al. 2011). Para outras espécies a depressão endogâmica tem mostrado diminuição no desenvolvimento dos indivíduos em campo. Breed et al. (2012) identificaram que progênies de *Swietenia macrophylla* King aos cinco anos apresentaram menor altura em indivíduos provenientes de autofecundação e cruzamento entre aparentados. Em plantio de *Cariniana legalis* aos 17 anos foi identificado diminuição de 20% da forma do fuste, de 68% do DAP, de 63% da altura e 90% do volume cilíndrico, devido a depressão endogâmica (Sebbenn et al. 2001).

A espécie de estudo, *H. courbaril*, tem dispersão de pólen e semente a longas distâncias (Carneiro et al. 2011), e o estudo foi realizado a partir de sementes coletadas em um grande fragmento florestal, ainda bem conservado (Faria 2006). Além disso, um estudo anterior mostrou que o PEMD tem capacidade de manter a diversidade genética desta espécie, por ter muitos indivíduos adultos remanescentes e fauna para dispersão de pólen e semente (Kageyama et al. 2004). Essas condições contribuíram para que as mudas desenvolvidas a partir da coleta de sementes no PEMD não apresentassem fortes efeitos de depressão endogâmica. A fraca depressão endogâmica, portanto, deve ter sido decorrente do fato de que o PEMD, apesar de estar numa região altamente fragmentada, ainda conserva grande extensão contínua de vegetação e as ações de devastação ocorreram recentemente (Dean 1996). O efeito da depressão endogâmica sobre as populações fragmentadas ocorre pelo acúmulo de endogamia e pode demorar algumas gerações para que seu efeito seja detectado (Lopez et al. 2009), razão pela qual a depressão endogâmica pode ainda não ter afetado as progênies coletadas no PEMD. No entanto, devido à escassez de remanescentes na região, as coletas de sementes para produção de mudas e implantação de áreas de restauração são necessariamente realizadas em florestas pequenas, pouco conservadas e isoladas na paisagem, condições que podem intensificar os efeitos de depressão endogâmica (Angeloni et al. 2011; Breed et al. 2012).

A população adulta apresentou uma estimativa elevada de índice de fixação ($\hat{f} = 0,131$) (capítulo 1). Esperava-se, portanto, maiores efeitos da depressão endogâmica. Isso pode não ter ocorrido por alguns motivos. Esse valor foi estimado para a população adulta, que foi estabelecida antes da fragmentação. Assim, por ser historicamente endogâmica, alelos que causariam depressão endogâmica podem ter sido eliminados por efeito da seleção natural durante o desenvolvimento da população. Outro fato é que $\hat{f}$ reflete a maior quantidade de homozigotos na população, que pode não ser reflexo direto de endogamia dentro da população (Holsinger & Weir 2009), mas consequência de alelos nulos, por exemplo. Somado a isso a depressão endogâmica atua mais fortemente em populações de pequeno tamanho (Reed & Frankham 2003), que não é o caso da população de estudo, como discutido anteriormente.

Devido ao alto grau de desmatamento na região do Pontal, e sabendo-se que as coletas de sementes para produção de mudas são realizadas em fragmentos florestais remanescentes (Rodrigues et al. 2004), que em sua maioria são pequenos e isolados, acredita-se que há maior chance de serem coletadas sementes com maior depressão endogâmica. Sendo assim, recomenda-se que as coletas sejam feitas no maior número de áreas florestais da região em que será implantado o plantio, e de preferência em florestas que estejam de alguma forma conectadas, ou o mais próximo possível de outros remanescentes, para amenizar os efeitos da depressão endogâmica no desenvolvimento destes indivíduos. Ademais, recomendamos que sejam respeitadas as demais recomendações sobre número de matrizes de coleta e distância entre elas.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, sementes de *Hymenaea courbaril* L. coletadas no Parque Estadual do Morro do Diabo não sofreram fortes efeitos de depressão endogâmica na fase inicial de desenvolvimento como visto em outras espécies, pelo menos quando realizado o plantio de progênies em ambiente controlado como o viveiro. Além disso, as progênies podem não ter apresentado efeito de depressão endogâmica por serem provenientes de uma área de grande extensão florestal e bem conservada, que é uma exceção no cenário florestal no estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS

- Angeloni F, Ouborg NJ, Leimu R (2011) Meta-analysis on the association of population size and life history with inbreeding depression in plants. *Biological Conservation* 144:35–43
- Araujo FL et al. (2017) Genetic diversity of *Casearia sylvestris* populations in remnants of the Atlantic Forest. *Genetics and Molecular Research* 16:1–7
- Bonatelli IAS, Carstens BC, Moraes EM (2015) Using next generation RAD sequencing to isolate multispecies microsatellites for *Pilosocereus* (Cactaceae). *PLoS ONE* 11:1–14
- Breed MF et al. (2012) Shifts in reproductive assurance strategies and inbreeding costs associated with habitat fragmentation in Central American mahogany. *Ecology Letters* 15:444–452
- Byers DL, Waller DM (1999) Do plant population purge their genetic load? Effects population size and mating history on inbreeding depression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30:479–513

- Carneiro FS et al. (2011) Effects of selective logging on the mating system and pollen dispersal of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) in the Eastern Brazilian Amazon as revealed by microsatellite analysis. *Forest Ecology and Management* 262:1758–1765
- Carvalho C da S et al. (2017) Climatic stability and contemporary human impacts affect the genetic diversity and conservation status of a tropical palm in the Atlantic Forest of Brazil. *Conservation Genetics* 18:467–478
- Charlesworth D, Charlesworth B (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 18:237–268
- Charlesworth D, Willis JH (2009) The Genetics of Inbreeding Depression. *Nature Reviews Genetics* 10:783–796
- Chaves LJ et al. (2011) Estimating inbreeding depression in natural plant populations using quantitative and molecular data. *Conservation Genetics* 12:569–576
- Ciampi AY et al. (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. *Molecular Ecology Resources* 8:1074–1077
- Cockerham CC, Weir BS (1984) Covariances of relatives stemming from a population undergoing mixed self and random mating. *Biometrics* 40:157–164
- Dean WA (1996) A ferro e fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira. Companhia das Letras, São Paulo, Brasil.
- Durigan G, Nogueira JCB (1990) Recomposição de matas ciliares. *IF Série Registros* 4:1–14
- Fahrig L (2003) Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34:487–515
- Falk DA, Knapp EE, Guerrant EO (2001) An introduction to restoration genetics. *Society for Ecological Restoration* 30
- Faria HH (2006) Parque Estadual do Morro do Diabo: plano de manejo. 312
- Giombini MI et al. (2017) Early genetic consequences of defaunation in a large-seeded vertebrate-dispersed palm (*Syagrus romanzoffiana*). *Heredity* 1–10
- Haddad NM et al. (2015) Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science Advances* 1–9
- Hall P, Walker S, Bawa K (1996) Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Pithecellobium elegans*. *Conservation Biology* 10:757–768

- Hansen MC et al. (2013) High-resolution global maps of 21st-century forest cover change. *Science* 342:850–853
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) Spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology* 2:618–620
- Holsinger KE, Weir BS (2009) Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. *Nature Reviews Genetics* 10:639–650
- Hufford KM, Hamrick JL (2003) Viability selection at three early life stages of the tropical tree, *Platypodium Elegans* (Fabaceae, Papilionoideae). *Evolution* 57:518–526
- Hull-Sanders HM, Eubanks MD, Carr DE (2005) Inbreeding depression and selfing rate of *Ipomoea hederacea* var. *integriuscula* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* 92:1871–1877
- Husband BC, Schemske DW (1996) Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution* 50:54–70
- Inglis PW, Pappas M de CR, Grattapaglia D (2016) Protocolo de extração de DNA e RNA de alta qualidade para espécies ricas em compostos secundários. Comunicado Técnico 204-Embrapa 1–6
- Kageyama P et al. (2004) Conservation of Mata Atlântica forest fragments in the State of São Paulo, Brazil. In: Vincet, B. et al. *Challenges in managing forest genetic resources for livelihoods: examples from Argentina and Brazil*. pp. 167–185.
- Kageyama PY et al. (2003) Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Scientia Forestalis* 64:93–107
- Keller L, Waller D (2002) Interbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution* 17:230–241
- Kittelson PM, Maron JL (2000) Outcrossing rate and inbreeding depression in the perennial yellow bush lupine, *Lupinus arboreus* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 87:652–660
- Loiselle BA et al. (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82:1420–1425
- Lopez S et al. (2009) Joint effects of inbreeding and local adaptation on the evolution of genetic load after fragmentation. *Conservation Biology* 23:1618–1627
- Martins K et al. (2008) Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae - Caesalpinioideae) em fragmentos florestais do Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botanica* 31:61–69
- Martins K et al. (2015) The role of very small fragments in conserving genetic diversity of a common tree in a hyper fragmented Brazilian Atlantic forest landscape. *Conservation Genetics* 17:509–520

- Moraes MLT, Kageyama PY, Sebbenn AM (2005) Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sob diferentes condições antrópicas. *Revista Árvore* 29:281–289
- Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* 17:230–237
- Reis TS et al. (2015) Elevation as a barrier: genetic structure for an Atlantic rain forest tree (*Bathysa australis*) in the Serra do Mar mountain range, SE Brazil. *Ecology and Evolution* 5:1919–1931
- Rodrigues ER, Moscolliato AV, Nogueira AC (2004) Viveiros ‘Agroflorestais’ em assentamentos de reforma agrária como instrumentos de recuperação ambiental: um estudo de caso no Pontal do Paranapanema. *Caderno da Biodiversidade* 4:1–8
- Rousset F (2002) Inbreeding and relatedness coefficients: what do they measure? *Heredity* 88:371–380
- Rymer PD et al. (2015) Remnant *Pachira quinata* pasture trees have greater opportunities to self and suffer reduced reproductive success due to inbreeding depression. *Heredity* 115:115–124
- Sampaio AB, Holl KD, Scariot A (2007) Regeneration of seasonal deciduous forest tree species in long-used pastures in central Brazil. *Biotropica* 39:655–659
- Santos JD dos (2002) Estudos ecológicos e genéticos numa paisagem fragmentada visando sua conectividade, no Pontal do Paranapanema - SP. Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’
- Saunders DA, Hobbs RJ, Margules CR (1991) Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* 5:18–32
- Sebbenn AM et al. (2001) Depressão por endogamia em populações de jequitibá-rosa. *Revista Instituto Forestal* 13:61–81
- Sebbenn AM et al. (2000) Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). *Scientia Forestalis* 58:127–143
- Sebbenn AM et al. (2011) 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* 106:134–145
- Sebbenn AM, Kageyama PY, Vencovsky R (2003) Conservação genética in situ e número de matrizes para a coleta de sementes em população de *Genipa americana* L. *Scientia Forestalis* 63:13–22
- Seoane CES et al. (2005) Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. *Revista do Instituto Florestal* 17:25–43

- Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:393–430
- Sorensen FC, Miles RS (1982) Inbreeding depression in height, height growth and survival of Douglas-fir, Ponderosa Pine, and Noble Fir to 10 years of age. *Forest Science* 28:283–292
- Souza FM de, Batista JLF (2004) Restoration of seasonal semideciduous forests in Brazil: Influence of age and restoration design on forest structure. *Forest Ecology and Management* 191:185–200
- Souza LMRI de, Kageyama PY, Sebbenn AM (2004) Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). *Scientia Forestalis* 65:70–79
- Tambarussi E V et al. (2016) Several small: how inbreeding affects conservation of *Cariniana legalis* Mart. Kuntze (Lecythidaceae) the Brazilian Atlantic Forest's largest tree. *International Forestry Review* 18:502–510
- Tambarussi EV et al. (2017) Inbreeding depression from selfing and mating between relatives in the Neotropical tree *Cariniana legalis* Mart. Kuntze. *Conservation Genetics* 18:225–234
- Tarazi R et al. (2013) Edge effects enhance selfing and seed harvesting efforts in the insect-pollinated Neotropical tree *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *Heredity* 110:578–585
- Toledo RM de (2005) Modelagem especial do fluxo de sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*), através de marcadores moleculares, na paisagem fragmentada do Pontal do Paranapanema, SP. Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'
- Turner IM (1996) Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. *Journal of Applied Ecology* 33:200–209
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution* 11:413–418
- Zimback L et al. (2011) Estrutura genética de peroba (*Aspidosperma polyneuron*) no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto Florestal* 23:265–277

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cuidado com a coleta de sementes realizada no passado para a implantação das áreas de Anaurilândia e Rosana foi importante para a diversidade destas áreas de restauração tendo em vista a diversidade genética encontrada em indivíduos de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) nas mesmas. Estas áreas, desta forma, podem manter-se geneticamente conservadas ao longo do tempo, e ainda serem fonte de sementes para novas implantações, se verificada também diversidade suficiente nas sementes produzidas e asseguradas as recomendações de coleta. Além disso, estas áreas podem servir como fonte de pólen e semente para outras áreas do entorno, aumentando a conectividade de populações remanescentes na região.

Mesmo a floresta na região do Pontal do Paranapanema estando muito fragmentada o Parque Estadual do Morro do Diabo consegue manter a diversidade em populações de *H. courbaril*. Embora os indivíduos amostrados no estudo apresentem valor elevado de homozigotidade, as progênies provenientes de polinização aberta não estão sofrendo com efeito da depressão endogâmica, verificado por seu desenvolvimento até 15 meses de experimento em viveiro.