



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA LUCAS CHAVES

ESTUDOS GENÉTICOS EM *Aspidosperma polyneuron* MÜLL.

ARG. E *Hymenaea courbaril* L

Londrina
2017

CAMILA LUCAS CHAVES

**ESTUDOS GENÉTICOS EM *Aspidosperma polyneuron* MÜLL.
ARG. E *Hymenaea courbaril* L**

Tese de doutorado submetida a banca examinadora
do programa de pós-graduação em Agronomia da
Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Paulo M. Ruas.

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre M. Sebbenn.

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Chaves, Camila Lucas.

Estudos genéticos em *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. e *Hymenaea courbaril* L. / Camila Lucas Chaves. - Londrina, 2017.
99 f. : il.

Orientador: Paulo Ruas.

Coorientador: Alexandre Magno Sebbenn.

Coorientador: Bernd Degen.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. herdabilidade de altura e diâmetro - Tese. 2. controle de madeira ilegal - Tese. 3. genética de populações - Tese. 4. apomixia - Tese. I. Ruas, Paulo. II. Magno Sebbenn, Alexandre. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CAMILA LUCAS CHAVES

**ESTUDOS GENÉTICOS EM *Aspidosperma polyneuron* MÜLL. ARG. E
Hymenaea courbaril L**

Tese de doutorado submetida a banca examinadora
do programa de pós-graduação em Agronomia da
Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mauricio Ruas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Edmilson Bianchini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. José Marcelo Domingues Torezan
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves
Universidade Estadual de Londrina – UEL

José Eduardo Lahoz da Silva Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr. José Antônio Pimenta
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 24 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa de Pós-graduação de Agronomia e a Capes pela concessão de bolsa. Agradeço e dedico este trabalho aos meus pais Zélia Ap. Lucas e Valdir N. Chaves por todo ensinamento e valores passados durante minha vida e por sempre estarem presentes me encorajando frente às dificuldades.

Agradeço a Paulo M. Ruas pela oportunidade de crescimento pessoal e suporte laboratorial da pesquisa com peroba-rosa. Agradeço a Alexandre M. Sebbenn pelas orientações na execução do trabalho, aos vários conselhos e pela oportunidade de partilhar de seu conhecimento e de sua pessoa cheia de personalidade e entusiasmo. Agradeço muito a Bernd Degen pela grande oportunidade de fazer intercâmbio no Thünen Institut, onde aprendi muitas coisas que vou levar para toda a vida, e onde tive a oportunidade de ter contato direto com a cultura alemã. Agradeço também as técnicas do laboratório Vivian Kuhlenkamp, Maike Paulini, e Susanne Bein, a pesquisadora Birte Pakull e Malte Mader e ao colega Christoph Rieckmann e seu amigo Athos e todos que direta ou indiretamente ajudaram no projeto.

Agradeço ao acolhimento e toda ajuda de Ingeborg Maurer e Doris Exter minha segunda família Alemã, a qual vou sempre lembrar com carinho.

Agradeço também aos técnicos José Cambuim por partilhar de seu conhecimento e experiência de campo que ajudaram a otimizar o trabalho de campo; Alexandre Marques pela ajuda com a transformação das coordenadas geográficas; aos pesquisadores Dr. Edmilson Bianchini e Dr. José Eduardo Lahoz pela partilha de conhecimentos sobre ecologia e pelo empréstimo de materiais de campo, a Dra. Ana Paula Gaino que pensou o projeto com a espécie peroba-rosa.

Agradeço ao Prof. Dr. José Marcelo Torezan e Alba Lúcia Cavalheiro por permitirem o uso do espaço e dos equipamentos do viveiro florestal.

Agradeço a grande ajuda nos trabalhos de campo de Adrivanio Baranoski, ao técnico do sequenciador Lucas Benício pelas inúmeras idas e vindas do sequenciador para minhas análises. Agradeço aos colegas e amigos de laboratório: Bruna Goetz, Camila Ronchi, Sara Godoy, Gabriela Navarro e Kátia Rocha.

CHAVES, Camila Lucas. **ESTUDOS GENÉTICOS EM *Aspidosperma polyneuron* MÜLL. ARG. E *Hymenaea courbaril* L.** 2017. 99 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A herdabilidade para diâmetro e altura em progênies de polinização aberta de uma população natural de *Aspidosperma polyneuron* foi determinada utilizando-se técnicas moleculares de microssatélites. A análise de diversidade genética mostrou um total de 129 (P1) e 120 (P2) distintos genótipos multilocus, o número total de alelos e heterozigosidade observada foi maior no plot 1 do que no plot 2. A heterozigosidade esperada foi similar e o índice de fixação foi significativo e diferente de zero em ambos os plots. As análises mostraram que a herdabilidade (h^2) para diâmetro (P1: $h^2=0,266$; P2: $h^2=0,086$) é maior que para altura (P1: $h^2=0,168$; P2: $h^2=0,042$). O diâmetro para indivíduos com algum grau de parentesco variou de 0,2 cm a 4,5 cm e a altura variou de 0,2 cm a 3,5 cm. Um banco de dados de referência genética para controle de exportação de *Hymenaea courbaril* foi desenvolvido utilizando-se SNPs cloroplastidiais e microssatélites. Usando o teste de auto atribuição o poder dos dados de referência genética, foram testados quanto a veracidade para julgar declarações de origem de populações e países de origem. Observouse forte diferenciação genética entre populações e países, com altos e confiáveis valores de auto atribuição para os países de origem (89 a 100%, com média de 96%), e para origem das populações (50 a 100%, com média de 89%). Os marcadores cloroplastidiais e nucleares mostraram acurácia e confiabilidade para um sistema de certificação genética de madeira.

Palavras-chave: Herdabilidade de altura e diâmetro. Controle de madeira ilegal. Genética de populações. Apomixia.

CHAVES, Camila Lucas. **Studies for *ASPIDOSPERMA POLYNEURON* Müll. Arg. AND *HYMENAEA COURBARIL* L.** 2017. 99 p. Thesis (Doctor's degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Diameter and height heritability in *Aspidosperma polyneuron* progenies in a natural population from open pollination was calculated using molecular techniques of microsatellites. Genetic diversity analysis displayed a total of 129 (P1) and 120 (P2) distinct multiloci genotypes, the total number of alleles and heterozygosity observed were greater in plot 1 than in plot 2. The expected heterozygosity was similar and the fixation index was significant and different of zero in both plots. Analysis indicated that heritability (h^2) for rcd (P1= 0.266; P2= 0.086) was higher than H trait (P1= 0.168; P2= 0.042). The diameter for relative individuals ranged of 0.2 cm to 4.5 cm and height ranged of 0.2 cm to 3.5 m. A genetic reference database for *Hymenaea courbaril* was developed using chloroplast SNPs and microsatellites markers. Using self-assignment tests, the power of the genetic reference data to judge on declarations on the population and country of origin has been tested. We observed a strong genetic differentiation among populations and countries leading to high and reliable self-assignment rates for the country of origin (89 to 100%; average of 96%) and for the population of origin (50 to 100%; average of 89%). Our results show that the nuclear and chloroplast gene markers are effective and reliable to be used for a genetic certification system.

Keywords: Heritability of height and diameter. Control of illegal timber. Genetics of populations. Apomixia.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	8
2.	REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1	FLORESTA ESTACIONAL SEMIDECIDUAL E A “PEROBA ROSA”	10
2.2	DIVERSIDADE GENÉTICA	12
2.3	SISTEMA DE REPRODUÇÃO	13
2.4	REPRODUÇÃO APOMÍTICA.....	17
2.5	FLUXO GÊNICO.....	21
2.6	ATRIBUIÇÃO DE PATERNIDADE	24
2.7	COANCESTRIA E ENDOGAMIA.....	28
2.8	HERDABILIDADE	30
2.9	<i>Hymenaea courbaril</i> L. (FABACEAE).....	32
2.10	EXPLORAÇÃO MADEIREIRA	35
2.11	RASTREABILIDADE DA MADEIRA	40
2.12	MARCADORES MOLECULARES.....	41
2.13	DNA BARCODE	41
3.0	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVOS GERAIS	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4.0	ARTIGO: Heritability to growth traits in natural population of facultative apomictic tree <i>Aspidosperma polyneuron</i>	45
5.0	ARTIGO: Verifying the geographic origin of <i>Hymenaea courbaril</i> L. timber from different countries and forest concessions using chloroplast and nuclear DNA gene markers	61
	BIBLIOGRAFIA	82

1. INTRODUÇÃO

As florestas têm importantes funções ambientais, sociais e econômicas, pela oferta de uma variedade de bens e serviços e por proporcionar abrigo á fauna, conservação dos recursos hídricos, produtos florestais madeireiros e não madeireiros, conservação da biodiversidade, do solo e estabilidade do clima. A área florestal no Brasil corresponde a 60,7% de florestas naturais e 0,8 de plantadas. A conservação e o manejo de nossas florestas para a produção racional de bens e serviços de forma sustentável são um desafio e também uma oportunidade para toda a sociedade (SFB/SNIF, 2016).

A importância das árvores como componente estrutural de ecossistemas florestais e seus recursos madeireiros e não madeireiros, atribuem a algumas espécies grande valor comercial, sendo estas extensivamente procuradas para corte. Os gêneros *Aspidosperma* spp. e *Hymenaea* spp. por exemplo, possuem várias espécies de grande valor comercial, devido à alta qualidade da madeira e algumas já foram inclusive incluídas na lista de espécies ameaçadas de extinção, tais como: *Aspidosperma album*, *A. macrocarpon*, *A. polyneuron*, *Hymenaea courbaril*, *H. parvifolia*, *H. oblongifolia* e *H. torrei* apontadas pela IUNC *Red List of Threatened species*.

Este trabalho teve como objetivo estudos genéticos de duas espécies florestais, *A. polyneuron* e *H. courbaril*. *Aspidosperma polyneuron* é uma espécie representativa principalmente da floresta estacional semidecidual do Norte do Paraná e Goiás onde alcança as maiores frequências. No passado foi intensamente explorada, e por proteção à espécie, sua comercialização foi proibida. O primeiro estudo apresentado aqui com *A. polyneuron* tem por objetivo entender os padrões de herdabilidade que são de grande importância para conservação da espécie, visto esta apresentar crescimento bastante lento, e mudanças nas médias de caracteres de crescimento podem influenciar na sua sobrevivência.

Populações naturais de espécies arbóreas vivem em ambientes variáveis, sendo afetadas por processos evolutivos como seleção, mutação, migração e deriva genética. A seleção natural é um dos principais fatores moldando a variabilidade genética adaptativa das populações. Para entender seus efeitos e necessário estudar populações em seus ambientes naturais. Isso permite entender o potencial da seleção natural moldando a variação fenotípica de caracteres de crescimentos que pode ser acessado por meio da

estimativa de herdabilidade. O coeficiente de herdabilidade mede quanto da variação fenotípica de caracteres quantitativos é determinada pela variação genética, indicando o potencial de alterar a média populacional pela seleção natural ou artificial. A herdabilidade é medida com base na variação genética e fenotípica de caracteres de indivíduos parentais, tais como meios-irmãos, irmãos completos, irmãos de autofecundação ou misturas destes. Em populações naturais, o parentesco entre pares de indivíduos pode ser estimado utilizando-se marcadores genéticos como os microssatélites. Assim, é possível selecionar pares de indivíduos que são parentes e juntamente com as medidas fenotípicas de caracteres de interesse estimar a herdabilidade.

A segunda espécie *Hymenaea courbaril* tem uma ampla distribuição, com ocorrências em grande parte do Brasil e alguns países da América do Sul. É uma espécie madeireira bastante explorada, tanto no mercado nacional como no internacional. Estudos para desenvolvimentos de marcadores específicos para rastreabilidade genética de madeira são ainda escassos, frente a quantidade de espécies exploradas economicamente e melhorias nos métodos são ainda necessários, com uma suficiente populações de referência, onde seja possível obter alta significância num teste de exclusão.

Esta espécie faz parte de um projeto piloto na Alemanha para controle de exportação de madeira ilegal de espécies tropicais advindas da floresta Amazônica. O objetivo do trabalho foi criar um banco de dados com marcas genéticas específicas de amostras de *H. courbaril* do Brasil, Peru, Bolívia e Guiana Francesa, como referência para o rastreamento genético de origem da madeira. Essa pesquisa científica tem em vista combater o mercado ilegal de madeira, e com isso diminuir também os impactos ambientais, sociais e econômicos causados pelo mercado ilegal. Para tal se faz necessário a criação de um rigoroso controle que pode ser feito por meio de análises genéticas tais como os marcadores moleculares *single nucleotide polymorphism* (SNPs) e microssatélites aqui utilizados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FLORESTA ESTACIONAL SEMIDECIDUAL E A “PEROBA ROSA”

A floresta Atlântica engloba uma diversidade de conjuntos de ecossistemas florestais com estrutura e composição florística bastante diferenciadas, segundo as características climáticas e geográficas de cada domínio fitogeográfico (IBGE, 1992). A Floresta Estacional Semidecidual ou Floresta Tropical Subcaducifolia (VELOSO; RANGEL-FILHO; LIMA, 1991), também chamada por Rizzini (1963) de Floresta Mesofítica ou ainda Floresta Latifoliada Semidecidual por Azevedo (1959), é uma fitofisionomia intrínseca do bioma Mata Atlântica, constituindo uma formação transicional entre Floresta da Costa e formações florestais de interior.

Esta formação florestal é condicionada por duas sazonalidades climáticas. Uma estação tropical com intensas chuvas de verão, seguida por estação seca. Uma segunda estação subtropical sem períodos secos, mas seca fisiológica causada pelo frio do inverno com temperaturas médias de 15°C (IBGE, 1992).

A composição vegetacional da floresta estacional semidecidual é caracterizada ainda, pela ausência de coníferas e presença de indivíduos arbóreos os quais perdem as folhas (caducifólios) durante o inverno ou estação seca. A porcentagem total de indivíduos caducifólios varia de 20 a 50% do conjunto florestal (IBGE, 1992).

A floresta estacional semidecidual é mais homogênea quando comparada com a Floresta Ombrófila, no entanto, é uma das mais ricas no país em quantidade de madeira por unidade de área. O solo derivado do basalto compreende um grupo vegetacional caracterizado no estrato superior principalmente pelas espécies “figueira-branca” (*Ficus insipida*), “rabo-de-mico” (*Lonchocarpus muehlbergianus*), “angico-vermelho” (*Paraptadenia rigida*), “aguai” (*Crysophyllum gonocarpum*), “canelão” (*Ocotea cf. acutifolia*), “sobrasil” (*Colubrina glandulosa*), “canela-de-veado” (*Helietta apiculata*) e “jerivá” (*Syagrus romanzoffiana*) (LEITE; KLEIN, 1990).

No estrato médio são frequentes as espécies: “canela-preta” (*Nectandra megapotamica*), “guajuvira” (*Patagonula americana*), “cangerana” (*Cabranea canjerana*), “cedro” (*Cedrela fissilis*) e “palmiteiro” (*Euterpe edulis*); e no estrato inferior são comuns as espécies “cincho” (*Sorocea bonplandii*), “laranjeira-do-mato” (*Actinostemon concolor*), “jaborandi” (*Pilocarpus pennatifolius*), “pau-de-junta” (*Piper*

gaudichaudianum) e “catiguá” (*Trichilia elegans*) (LEITE; KLEIN, 1990).

As florestas situadas no solo do arenito Caiuá, no oeste e noroeste do Paraná e sudoeste do Mato Grosso do Sul, eram visivelmente dominadas por *A. polyneuron*, perfazendo cerca de 30 a 60% da cobertura do estrato emergente (LEITE et al., 1986), assim como as florestas situadas em solos de origem basáltica no norte do Paraná, dominando cerca de 60 a 80% da cobertura do estrato emergente (KLEIN, 1985).

Aspidosperma polyneuron tem ocorrência na Floresta Estacional Semidecidual (VELOSO; RANGEL-FILHO; LIMA, 1991), na Floresta Estacional Decidual, na Floresta Ombrófila Densa, na Floresta Amazônica, no extremo Norte do Mato Grosso (CHIMELO et al., 1976), e em pequena escala na Floresta Ombrófila Mista no Sul do Paraná onde ocorre em menor densidade (GALVÃO; KUNIYOSHI; RODERJAN, 1989). Ocorre também esporadicamente na Caatinga de Minas Gerais (BRANDÃO; GAVILANES, 1994), no Pantanal do Mato-Grosso e na Floresta de Tabuleiros (NASCIMENTO; SILVA; ARAGÃO, 1996).

Peroba-rosa é uma arbórea perene, esciófita, secundária tardia ou climax tolerante a sombra, podendo alcançar até 50 m de altura e 390 cm de DAP na fase adulta e longevidade que pode exceder 1200 anos de idade. Seu tronco é cilíndrico, reto ou levemente tortuoso, casca externa cinza ou marron clara, áspera, profundamente fissurada longitudinalmente e casca interna rósea, da qual surgiu o nome “peroba-rosa”. As folhas são simples, alternas, variam de oblongas a obovado elípticas, muitas vezes lustrosas na face superior, com ápice arredondado e margens inteiras, acima de 8 cm de comprimento e 3 cm de largura, membranosas ou subcoriáceas com veias secundárias paralelas (CARVALHO, 2004).

O florescimento no estado do Paraná ocorre de novembro a dezembro, com flores hermafroditas, tubulares, cor creme, numerosas e pequenas em panículas curtas polinizadas por mariposas (CARVALHO, 2004), tem reprodução sexual e assexual (RAMOS, 2012). Peroba-rosa não floresce anualmente, produzindo grande quantidade de sementes a cada 2 a 4 anos. A assincronia de florescimento é relatada por Soares-Silva; Barroso (1992) de 116 árvores amostradas somente três árvores frutificaram (com pequenos frutos) em um ano de estudo. Em plantações tem sido visto florescimento e frutificação por volta dos 20 anos de idade (CARVALHO, 1994).

A frutificação ocorre de julho a outubro com frutos deiscentes, elipsoides, sésseis, geralmente achatados, com 2,5 a 6 cm de comprimento e 1-2 cm de largura,

com uma crista proeminente e castanha, contendo de 2-5 sementes por frutos. As sementes são aladas, facilitando a dispersão anemocórica, não possuem dormência, com perda de viabilidade em seis meses quando estocadas em laboratório (CARVALHO, 1994; 2004). Devido à poliembrião *A. polyneuron* produz grande quantidade de embriões, variando amplamente em número. Souza; Moscheta (1987) encontraram de 1 a 24 embriões por semente e Ramos (2012) encontrou 18 poliembriônicos em 74 sementes.

Aspidosperma polyneuron é a espécie de maior valor econômico dentro do gênero *Aspidosperma* (CARVALHO, 1994), principalmente pela qualidade da madeira, moderadamente pesada (densidade de 0.79 g/cm³), dura, compacta, com superfície opaca e áspera. Tem uso quase irrestrito na carpintaria (CARVALHO, 1994; LORENZI, 1998), usada na construção de vigas, caibros, molduras de portas, rodapés, esquadrias, pisos, escadas e móveis pesados e recomendada também para reflorestamentos mistos para a recuperação de áreas degradadas em áreas de preservação permanente (LORENZI, 1998).

2.2 DIVERSIDADE GENÉTICA

A diversidade genética é mensurada como a quantidade de variação genética mantida dentro e entre populações (HAMRICK, 1983). Populações naturais refletem a adaptação ambiental das forças evolutivas e estas adaptações podem ser vistas como o produto da diversidade genética. A distribuição da diversidade genética é influenciada pelo tipo de reprodução, sistema de reprodução, tamanho populacional, distribuição espacial e fluxo gênico (SEBBENN, 2006). Espécies alógamas tem alta variação genética dentro de populações e menor entre populações, enquanto espécies autógamas tem baixa variação dentro e alta entre populações. A divergência ou homogeneidade nas populações depende da quantidade de fluxo gênico (ELLSTRAND, 2014).

A estrutura de populações é uma não aleatoriedade na distribuição de alelos e genótipos dentro de espécies. Em geral, espécies arbóreas não têm alelos e genótipos distribuídos aleatoriamente dentro de populações (HAMRICK, 1983), sendo o fluxo de pólen e sementes o principal determinante da estrutura genética, diversidade e composição dessas espécies (DOW; ASHLEY, 1996; DICK et al., 2008). Há um balanço dinâmico entre fatores de diferenciação (mutação, deriva genética e seleção) e

fatores de homogeneização (migração e fluxo gênico). A relativa importância de cada fator deve variar de acordo com o ambiente e as diferenças no tamanho populacional ao longo das faixas de distribuição das espécies (SOLÉ-CAVA, 2001).

A estrutura de populações em grupos reduzidos ou isolados tem um impacto na diversidade genética, com aumento de endogamia (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002) e cruzamentos entre parentais se o pólen é disperso em altas frequências sobre curtas distâncias (SEBBEN et al., 2011). Corte seletivo e fragmentação de florestas podem reduzir a densidade de árvores, mudando o padrão de cruzamento, aumentando a probabilidade de endogamia (JENNINGS et al., 2001) e diminuindo a diversidade genética por meio de gargalos genéticos. Por outro lado, efeito fundador, deriva e fluxo gênico restrito podem aumentar o isolamento populacional e a diferenciação entre populações (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996).

Análises de diversidade genética intrapopulacional são realizadas geralmente por interpretação dos valores de heterozigosidade observada e esperada (NEI, 1973), porcentagem de locos polimórficos, número médio de alelos por loco, índice de fixação (BERG; HAMRICK, 1997) e riqueza alélica (CABALLERO; RODRIGUEZ-RAMILO; FERNANDEZ, 2010). Estes parâmetros são importantes para perspectivas de conservação em longo prazo, fornecendo uma visão sobre o número de alelos que limitam as respostas seletivas. A riqueza alélica pode ser mais sensível a efeitos de gargalos genéticos do que a heterozigosidade, refletindo melhor flutuações do passado no tamanho populacional (COURNUET; LUIKART 1996; LUIKART et al., 1998).

Espécies arbóreas são perenes e possuem geralmente longa vida, tornando difícil a detecção de efeitos da redução populacional. Estudos em adultos e progênes podem ajudar a esclarecer os efeitos ecológicos e genéticos nas populações. A diversidade genética pode ser derivada de adultos dentro de um sítio e da vizinhança reprodutiva de doadores de pólen e dispersores de sementes (HONNAY et al., 2008; AYRE et al., 2009), também de regenerantes, sementes (AGUILAR et al., 2008), e banco de plântulas e sementes (AYRE et al., 2010). Assim estudos são necessários para entender a diversidade genética, dentro dos padrões de fluxo gênico e sistema de reprodução de espécies arbóreas (SEBBEN et al., 2011).

2.3 SISTEMA DE REPRODUÇÃO

A reprodução de angiospermas ocorre por meios sexuais e assexuais. Reprodução assexual incluem mecanismos os quais produzem plantas clones ou progênies idênticas à planta maternal. Na reprodução sexual há diferentes sistemas de reprodução, tais como autogamia, na qual ocorre autofertilização ou polinização de pólen da mesma flor, alogamia com fertilização cruzada ou polinização com pólen de outra flor, sistema misto onde há cruzamento e autofecundação na mesma planta (FRYXEL, 1957). Alogamia resulta em maior taxa de cruzamento e autogamia resultam em maior endogamia (FINKELDEY, 2005). O sistema de reprodução define como a recombinação da variabilidade genética passará de uma geração a outra (BROWN, 1989; MORI et al., 2013) por fluxo gênico e processos de fertilização.

O arranjo dos órgãos sexuais nas plantas pode facilitar ou não a autofecundação e o cruzamento. Plantas podem ser classificadas como espécies dióicas (flores unissexuais em diferentes indivíduos), monóicas (flores unissexuais no mesmo indivíduo), hermafroditas (flores bissexuais no mesmo indivíduo), e polígamas (flores unissexuais e bissexuais no mesmo indivíduo) (JUDD et al., 2009). Espécies polígamas são ainda subdivididas em ginodióicas (flores bissexuais e flores unissexuais femininas) e androdióicas (flores bissexuais e flores unissexuais masculinas), no entanto ambas são raras (FINKELDEY, 2005).

Plantas bissexuais em muitos casos têm gametas masculinos em maior número do que gametas femininos, e podem produzir uma prole com diferentes quantidades de machos e fêmeas. Um desbalanço na estrutura sexual durante a reprodução pode influenciar no modo de herança do sexo como seleção gamética favorecendo um sexo, diferente alocação de recursos para as progênies de machos e fêmeas, apomixia e outros meios de propagação não sexual, maturidade precoce de plantas masculinas, diferentes frequências de florescimento em plantas masculinas e femininas e diferença de sobrevivência de plantas machos e fêmeas (FINKELDEY, 2005).

De acordo com Bawa; Opler (1975) em climas temperados a maioria das espécies arbóreas são monóicas, enquanto em florestas tropicais somente poucas espécies são monóicas, sendo dominadas por espécies hermafroditas, dióicas e trióicas; ginodióicas e androdióicas são raras. Plantas ginodióicas e androdióicas representam 7% e flores unissexuais e bissexuais 10%. A frequência dos tipos sexuais em uma floresta está relacionada principalmente com o tipo de polinização. Espécies monóicas

são mais frequentemente polinizadas pelo vento, mas isso não é uma regra, enquanto que hermafroditas são frequentemente polinizadas por animais (FINKELDEY, 2005).

Plantas hermafroditas e monóicas podem facilitar a autofecundação se não há algum tipo de barreira, física, genética ou temporal (BAWA, 1980). Enquanto que plantas dióicas contribuem para redução da taxa de autofecundação, devido à uma disjunção espacial entre indivíduos reprodutivos, diferenças temporais entre maturidade de órgãos sexuais, tais como quando estigmas são receptivos antes da liberação do pólen em flores bissexuais ou espécies monóicas (protogínicas), ou quando o pólen é liberado das anteras antes da receptividade dos estigmas (protândricas) (JUDD et al., 2009).

O arranjo de estames e estigmas e o movimento de polinizadores podem também limitar a autofertilização, assim como a autoincompatibilidade ou inabilidade de plantas bissexuais gerarem zigotos com seu próprio pólen. O principal modo de reprodução em plantas é por herança biparental. No entanto, herança uniparental com reprodução por autofertilização, vegetativa e apomixia é relativamente comum, com cerca de 20 a 25% de autofertilização (JUDD et al., 2009) e 15% de apomixia (DALL'AGNOL; SCHIFINO-WITTMANN, 2005). A autoincompatibilidade é também frequente em florestas tropicais. Bawa (1974) e Bawa; Perry; Beach (1985) encontraram mais do que 80% de autoincompatibilidade em hermafroditas nas florestas úmidas e secas da Costa Rica. Este mecanismo pode ajudar a reduzir a taxa de autofecundação.

As espécies dependem fortemente da biologia polínica e do sistema de compatibilidade (BARRET, 1995) para ter sucesso reprodutivo. O sucesso reprodutivo nas espécies está relacionado à sua habilidade de produzir progênes na ausência de polinizadores (autofecundação), atrair polinizadores e transferência de pólen suficiente pelos polinizadores para maximizar a produção de sementes e evitar limitação de pólen (HARMON-THREATT et al., 2009).

A polinização está diretamente ligada ao tamanho da vizinhança reprodutiva, conexão de populações e fragmentação de habitat. Em espécies arbóreas florestais a redução da densidade, seguida por distúrbios ambientais são observadas frequentes mudanças no padrão de cruzamento e comportamento de polinizadores (LOWE et al. 2005; DICK et al. 2008; ECKERT et al. 2010), assim como fragmentações podem ter efeitos positivos ou negativos na transferência polínica (TOWNSEND; LEVEY, 2005).

Com a redução do tamanho populacional de espécies arbóreas é esperada uma redução na abundância de polinizadores residentes, atração de polinizadores migrantes entre populações e um aumento na taxa de autofertilização com diminuição da disponibilidade de polinizadores (GHAZOUL, 2005). Maior densidade local de espécies arbóreas florescendo podem atrair desproporcionalmente mais polinizadores, resultando em uma maior frequência de polinização (KATO; HIURA, 1999). Um aumento na densidade local de arbóreas também pode aumentar a competição local de polinizadores (WARD; JOHNSON; ZALUCKI, 2013). Assim como o tamanho das árvores está relacionado à quantidade de exposição floral, a disponibilidade de recursos provavelmente também possa afetar a taxa de polinização e produção de sementes (SETSUKO; NAGAMITSU; TOMARU, 2013).

O sistema de reprodução tem sido identificado como o principal fator que influencia a estrutura genética. Em espécies arbóreas tropicais, o padrão de reprodução é complexo, refletindo a influência de fatores genéticos e ecológicos, tais como número de indivíduos adultos reprodutivos, intensidade e assincronia de florescimento, mecanismos de autoincompatibilidade, comportamento de forrageamento de polinizadores e dispersores, aborto de frutos jovens (LEMES et al., 2007), fecundidade e quantidade de pólen (BARRET, 1995).

As taxas de reprodução eram investigadas geralmente por análise de progênies com marcadores morfológicos conhecidos, sendo substituídos mais tarde pelos marcadores bioquímicos isoenzimáticos (BAWA, 1976). No entanto, marcadores isoenzimáticos carecem de um nível de variabilidade requerido para atribuições parentais em plantas (CHAKRABORTY et al., 1988), sendo substituídos por marcadores genéticos, como os microssatélites que possuem alta variabilidade e herança codominante, promovendo uma melhor distinção e inferência parental (RITLAND, 1996; BURCZYK, LEWANDOWSKI, CHALUPKA, 2004).

O sistema de reprodução é basicamente estipulado pela análise das taxas de autofecundação (s) e cruzamento (t), sendo um o complemento do outro e em plantas são classificados como espécies de cruzamento ($t \geq 80\%$; $s < 20\%$), espécies de autofecundação ($s \geq 80\%$; $t < 20\%$) e espécies com sistema misto ($20\% \leq t \leq 80\%$) (GOODWILLIE; KALISK; ECKERT, 2005).

Em arbóreas o sistema de reprodução tem sido estudado por modelos, como o modelo de reprodução misto (RITLAND; JAIN, 1981), o modelo de cruzamentos

correlacionados (RITLAND, 1989), o modelo de vizinhança (BURCZYK et al., 2006), pela taxa efetiva de autofecundação e cruzamento parentais (SCHOEN; CLEGG, 1984), entre outros. Outra abordagem para taxa de cruzamento é também dada pela análise do coeficiente de endogamia ($F = s/(2-s)$) (DAVID et al., 2007).

O modelo de vizinhança estima o fluxo gênico de pólen e sementes por autofecundação e cruzamento, dentro e fora da vizinhança, requerendo uma amostragem de toda a progênie e todos os potenciais machos e fêmeas em reprodução (BURCZYK et al., 2006). Enquanto o modelo misto e o modelo de cruzamentos correlacionados são mais amplamente utilizadas devido a sua predominância por um sistema misto de cruzamentos multiparentais e biparentais em espécies arbóreas de polinização aberta, produzindo diferentes graus de parentesco, como meios-irmãos, irmãos-completos, irmãos de autofecundação, entre outros (RITLAND, 1986, 2002; SEBBENN, 2006).

Os parâmetros inferidos pelo sistema de reprodução podem ser utilizados para então estimar a coancestria e tamanho efetivo dentro de progênies, de fundamental importância para determinar um número de árvores matrizes com fins de coleta de sementes para pomar de sementes e melhoramento de plantas, também para utilização em restauração de áreas degradadas, planos de manejo e de importância para detectar áreas prioritárias de conservação (MORI et al., 2013).

2.4 REPRODUÇÃO APOMÍTICA

A reprodução assexual pode ser de forma vegetativa ou apomítica, onde o processo de mitose ocorre em células somáticas. Em apomíticos ocorre a formação de sementes e há uma parcial participação dos gametas, resultando progênies idênticas à planta materna ou um clone (CAVALLI, 2003; RAVEN et al., 2007). No entanto, a recombinação genética pode ocorrer durante a reprodução apomítica em plantas que mostram sinapse parcial e meiose restitucional, resultando em diferentes progênies da planta mãe, geralmente plantas que mostram apomixia facultativa (RICHARDS, 1997).

A apomixia é sinônimo de pseudogamia, na qual o endosperma se desenvolve somente após fertilização, enquanto o embrião se desenvolve partenogeneticamente (NOGLER 1984). A reprodução sexual tem uma sequência de eventos que devem ser completos para produção de sementes viáveis, e a ausência de um destes passos pode causar aborto ou sementes inviáveis (KOLTUNOW, 1993).

Em angiospermas há inicialmente a diferenciação da célula mãe megasporo do núcleo, seguido pela produção de megasporo por meiose (megasporogênese), seleção de megasporo, desenvolvimento do saco embrionário por processos de mitose (megagametogênese), maturação do saco embrionário, dupla fertilização e formação do endosperma e embrião. Em apomíticos a ausência de um destes passos pode ocorrer e ainda produzir sementes viáveis, o endosperma pode requerer fertilização, uma minoria de apomíticos não depende de fertilização (KOLTUNOW, 1993).

A apomixia provavelmente é uma consequência de uma desregulação na reprodução sexual, embora o ponto de desregulação possa variar e ser responsável pelo desenvolvimento de diferentes fenótipos (KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003). Pode haver múltiplos tipos de apomíticos em uma mesma família, gênero e espécie e muitas vezes genótipos individuais podem ser interpretados como um resultado de sobreposição de gerações ou uma via de desenvolvimento intersectada, estando sujeitas a efeitos genéticos e ambientais (OZIAS-AKINS, 2006).

Há vários tipos de apomíticos englobados em dois principais casos e vários tipos de apomíticos não são encontrados na natureza. A apomixia esporofítica ou embrionia adventícia ocorre quando um embrião se desenvolve da célula somática dos tecidos do óvulo sem redução meiótica e pode coexistir com o processo sexual, enquanto que na apomixia gametofítica o embrião se desenvolve em um saco embrionário por partenogênese sem fertilização e em muitos casos o processo sexual é afetado (KOLTUNOW, 1993; BERTAHND, 2001; OZIAS-AKINS, 2006; JUDD et al., 2009). Ambos os tipos de desenvolvimento determinam a variabilidade genética das progênes.

A ampla variação de expressão apomítica sugere um gene dominante, em um ou múltiplos locos com segregação independente para monocotiledôneas e dicotiledôneas (ASKER 1980; ASKER; JERLING, 1992). A expressão apomítica está sob um complexo controle de locos ainda não conhecidos, mas o atual modelo considera quatro genes reguladores (PORCEDDU et al., 2002; MATZK et al., 2005).

Os mecanismos que regulam a apomixia estão limitados por poliploidia, baixa fertilização e fatores tais como interações epistáticas, genes modificadores, distorções na segregação, supressão de recombinação, entre outros (HANNA, 1995; OZIAS-AKINS; VAN DIJK, 2007).

A maioria das plantas com apomixia gametofítica é poliplóide, no entanto, na embriônia adventícia são comumente diplóides (ASKER; JERLING, 1992). Progênies apomíticas podem ter diferentes níveis de ploidia do genótipo maternal por adição e/ou ter o mesmo nível de ploidia depois de submetidos a um ciclo de recombinação (BERTHAND, 2001). Reprodução apomítica tem um sistema favorecendo mudanças para altos ou baixos níveis de ploidia, resultantes de fertilização sem redução ou com redução cromossômica. Quando a apomixia é ativada, a sexualidade não é eliminada em apomíticos facultativos, mas distribuída sobre várias gerações (BERTHAND, 2001).

Processos sexuais e apomíticos podem coexistir no mesmo óvulo, havendo uma alta taxa de óvulos contendo ambos os sacos embrionários sexuais e apomíticos. No entanto, o desenvolvimento do saco embrionário sexual é frequentemente finalizado em muitos apomíticos e o processo de produção sexual é degenerado (NOGLER 1984; ASKER; JERLING, 1992). Se apomíticos iniciam a diferenciação tarde, quando a formação do megagametófito é relativamente avançada, ambos os tipos de sacos embrionários podem coexistir. Por outro lado, se a apomixia começar antes é mais provável que o processo sexual seja inibido. Nesse processo não está claro ainda se a diferenciação apomítica inibe o desenvolvimento sexual (NOGLER, 1984), pois essa relação entre apomixia e reprodução sexual é completamente desconhecida (BICKNELL; KOLTUNOW, 2004).

Apomíticos facultativos variam com as mudanças ambientais, tais como flutuações sazonais associadas com fotoperíodo no desenvolvimento do florescimento, comprimento do dia, intensidade de luz, temperatura, tipo de solo e nível de fertilidade, causando mudanças no embrião sexual e na incidência e frequência de apomíticos (KOLTUNOW, 1993). A apomixia é associada também com a história de vida das plantas, e fornece informações sobre a natureza e possível papel ecológico deste fenômeno, que é frequentemente associado com a expressão de autoincompatibilidade, dioiccia, heterostilia e limitada autofertilização, como uma tentativa da própria planta de reter tais mecanismos apomíticos (ASKER; JERLING 1992).

A maioria dos apomíticos produz pólen viável. Defeitos na meiose do desenvolvimento gametofítico não são estendidos automaticamente para funções ou formação de gametófitos masculinos. A presença de pólen viável fornece a possibilidade de fertilização e a macho esterilidade não é amplamente dispersa entre

apomíticos, porque genes de esterilidade são incapazes de se dispersar entre apomíticos (BICKNELL; KOLTUNOW, 2004; KARASAWA, 2009).

Espécies apomíticas são em maioria perenes e frequentemente usam o mecanismo de reprodução vegetativa e sexual. A combinação de apomíticos e divisão vegetativa têm permitido uma multiplicação de plantas com o mesmo genoma maternal e persistência através de longos períodos, conduzindo à formação de numerosos tipos morfológicos distintos na ocupação de áreas perturbadas e/ou também onde há curtas estações de crescimento, tais como nas regiões árticas e alpinas ou onde outras barreiras operam para inibir o sucesso de cruzamento de indivíduos compatíveis como entre indivíduos amplamente dispersos dentro de florestas tropicais (ASKER; JERLING, 1992).

Há várias vantagens da reprodução apomítica como sucesso reprodutivo na ausência de polinização, reprodução clonal com sementes, baixo custo de meiose para geração de gametas, alta fixação genotípica e disseminação de genes extremamente adaptados (genótipos pouco adaptados são eliminados sob seleção). Por outro lado, apomíticos são incapazes de evitar mutações desvantajosas e tem ausência de recombinação e segregação, restringindo o nicho populacional (KARASAWA, 2009).

Em angiospermas cerca de 300 espécies e 35 famílias tem sido descrita como apomíticas, 75% dentro das famílias Gramineae, Asteraceae, Rosaceae e Rutaceae. Apomíticos não são distribuídos uniformemente entre as famílias. Para a família Apocynaceae é relatada a embriônia adventícia (ASKER; JERLING, 1992) e para *A. polyneuron* é conhecida a presença de apomixia e mecanismos de poliembriônia (SOUZA; MOSCHETA, 1992; RAMOS, 2012). Ramos (2012) encontrou 55,7% de semestres poliembriônicas obtidos de três árvores matrizes, verificando que há uma carência de estudos sobre genética de populações como um todo para apomíticos principalmente para espécies arbóreas.

A diversidade genética em populações apomíticas mostra muitas diferenças, com populações monomórficas, polimórficas com variação disjunta e genótipos distintos e polimórficos com variação discreta. Em *Tripsacum* foram encontradas populações silvestres com indivíduos diplóides sexuais e apomíticos tetraplóides coexistindo juntos; a diversidade genética nestas populações foram distribuídas entre 54 diferentes diplóides, seis clones triploides (11 plantas), e 18 clones tetraplóides (83 plantas). Não há genótipos amplamente difundidos nestas populações, mas novos

genótipos da mesma espécie são encontrados e a dispersão de genótipos que se mantiveram dentro de uma distância de 50 a 100 m são bastante altas.

2.5 FLUXO GÊNICO

O sistema genético é um complexo aparato usado pelas populações para assegurar sua contínua existência e determinar a organização e transmissão da informação genética nas populações (RIEGER; MICHAELIS; GREEN, 1976). Como a informação genética deve ser passada depende do sistema sexual, fluxo gênico, sistema de fertilização, compatibilidade e recombinação (FINKELDEY, 2005).

O fluxo gênico tem um importante papel como recurso primário de variação genética e manutenção de populações (MAYR, 1963; HEUERTZ et al., 2003), e juntamente com o sistema de reprodução afeta a endogamia, a estrutura de família e o tamanho efetivo populacional (SAVOLAINEN; PYHAJARVI; KNURR, 2007). Plantas podem realizar fluxo gênico pelo movimento de pólen e dispersão de sementes e propágulos (ELLSTRAND, 2003; FINKELDEY, 2005). A migração de pólen e sementes de uma população para outra ajuda a aumentar a variação e homogeneizar as populações (FINKELDEY, 2005).

Muitas espécies de plantas desenvolvem mecanismos para facilitar o transporte de pólen e sementes, permitindo polinização cruzada entre plantas amplamente dispersas (ASHTON, 1969). Em florestas temperadas o vento é o meio mais frequente de dispersão de pólen e sementes. Plantas anemófilas têm grãos de pólen geralmente pequenos, leves e ocos, permitindo a flutuação e dispersão, que ocorre geralmente em períodos de baixa precipitação e no qual as folhas caem. As sementes anemocóricas também são leves e tem estruturas que ajudam na flutuação (JUDD et al., 2009). Nas florestas tropicais 50 a 90% das árvores e arbustos tem dispersão zoocórica produzindo frutos carnosos ou sementes ariladas (FLEMING; BREITWISCH; WHITESIDES, 1987; HOWE; SMALLWOOD, 1982).

Com períodos de precipitação elevada e uniformemente distribuída ao longo do ano, as florestas tropicais têm predominância de dispersão por vertebrados. Quando o nível de sazonalidade aumenta e diminui a precipitação, o ambiente florestal seca e vetores abióticos como vento e gravidade se tornam mais importantes (GRIZ; MACHADO, 2002; VICENTE; SANTOS; TABARELLI, 2003). Possivelmente, a

razão para a existência de um grande número de agentes bióticos e abióticos nos ambientes de florestas tropicais é devido à riqueza de animais e plantas e biomas com espécies de diferentes estruturas de tamanho (PIANKA, 1982; GENTRY, 1983). Nas florestas tropicais o estrato arbóreo pode ter relação com a síndrome de dispersão de propágulos (GIEHL et al., 2007).

Os diferentes comportamentos entre classes de animais polinizadores, determina parcialmente as distâncias de dispersão de pólen, variando entre regiões e estratos da floresta (DICK et al., 2008). A alta variação temporal na dispersão de pólen juntamente com a estrutura reprodutiva a cada ano permite uma variação na área efetiva de vizinhança polínica e tamanho efetivo populacional (BRAGA; COLLEVATTI, 2011). Assincronia de florescimento, variação na produção de pólen entre árvores e comportamento de polinizadores também influenciam o cruzamento e fluxo de pólen (CLOUTIER et al., 2007; DICK et al., 2008), e consequentemente na formação de frutos e na dispersão de sementes. Espécies arbóreas como um todo tem alta sincronia de florescimento, permitindo curtas distâncias de dispersão de pólen entre vizinhos. Por outro lado, a assincronia de florescimento de plantas vizinhas pode promover uma longa distância de dispersão de pólen (AUGSPURGER, 1980; WHITE; BOSHIER, 2000).

Braga; Collevatti (2011) estudaram a variação temporal na dispersão de pólen de *Tabebuia aurea* dentro de um fragmento de 40 ha e encontraram diferenças significativas. No primeiro ano a média foi de 266,43 m com um máximo de 1651 m de dispersão polínica, e no segundo ano a média foi de 388,36 m com um máximo de 2484 m. Tani et al. (2009) estudaram por dois anos as espécies *Shorea leprosula* e *S. parvifolia*, ambas hermafroditas, polinizadas por pequenos insetos e mostraram que a maioria dos doadores de pólen para ambas as espécies tiveram uma dispersão polínica até 100 m da árvore mãe. A dispersão a longas distâncias excedeu 700 m para *S. leprosula*, a alta frequência de dispersão de pólen ocorreu a distâncias variando de 250 a 450 m para *S. parvifolia*. Durante duas estações de florescimento de 40 a 46,2% dos adultos de *S. leprosula* e 45,8% e 22,9% dos adultos de *S. parvifolia* floriram em ambos os anos. O número de progênies analisadas no primeiro ano para as duas espécies foi menor do que no segundo ano, com altas taxas de dispersão de pólen de fora do plot e autofertilização para ambas as espécies. Os autores concluíram que a magnitude do florescimento em geral possivelmente afeta a dinâmica e o comportamento de polinizadores, assim como os padrões de reprodução (TANI et al., 2009).

A fragmentação florestal e corte seletivo podem também diminuir o tamanho efetivo populacional, causando ruptura nos processos ecológicos e genéticos. Isolamento populacional pode conduzir a uma redução de visitantes florais devido ao declínio da riqueza e abundância de polinizadores, mudanças na composição de espécies e limitação no movimento de pólen e sementes entre fragmentos (DICK; ETCHELECU; AUSTERLITZ, 2003; BRAGA; COLLEVATTI, 2011). A conservação de fragmentos de florestas tropicais depende da capacidade dos animais que vivem nas florestas e plantas de persistirem neles, apesar dos gargalos genéticos, exploração e estocasticidade demográfica (LANDE 1988; LAURANCE; COCHRANE; BERGEN, 2001).

A dispersão de sementes não influencia diretamente o sistema de reprodução como a dispersão de pólen, mas é crucial para a vizinhança de plantas geneticamente relacionadas, tamanho populacional e migração (FINKELDEY, 2005). As taxas de produção de sementes aumentam com o tamanho populacional e o tamanho de vizinhança reprodutiva. Estes são também relacionados com a riqueza de recursos florais na população que poderiam aumentar a abundância de polinizadores, conduzindo a um aumento na produção de sementes (SETSUKO; NAGAMITSU; TOMARU, 2013).

Assim como existem diferentes vetores de polinização (bióticos e abióticos) para a dispersão de pólen nas plantas, há também diferentes vetores de dispersão de sementes. O principal meio é a dispersão por animais (zoocórica) e por vento (anemocórica), entre outros vetores, tais como por autocoria, hidrocoria, antropocoria. Sementes anemocóricas são leves para uma dispersão eficiente pelo vento e muitas espécies desenvolvem estruturas especiais como asas ou plumas para aumentar as distâncias de dispersão (FINKELDEY, 2005).

Zoocoria é considerada a dispersão mais eficiente devido a vários animais procurarem recursos a longas distâncias, como também muitas sementes zoocóricas possuem estruturas de adesão, espinhos e ganchos que ajudam na dispersão (JUDD, et al., 2009). Stefanello et al (2010) encontraram uma dispersão de sementes de 86% via zoocoria, 10% anemocoria, 3% autocoria e 1% barocoria nas florestas sazonais alagadas. Em Floresta Ombrófila Mista, Negrini et al. (2012) encontraram 80,5% de zoocoria, 16,1% anemocoria e 3,4% de autocória. Das espécies zoocóricas 41,3% ocupam o estrato superior, 37,5% o estrato médio e 2,5% o estrato inferior. Enquanto

das espécies anemocóricas 10% ocupando o estrato superior e 5% o estrato médio e para espécies autocóricas 2,5% ocupam o estrato superior e 1,3% o estrato médio.

Yamamoto; Kinoshita; Martins (2007) encontraram para a floresta semidecidual, diferentes árvores com frutos e flores durante todo o ano, com predominância ao longo de quase todo o ano de zoocoria (61,6%) e no final da estação seca um predomínio por anemocoria (27,1%) e autocoria (11,3%). Houve predominância de espécies anemocóricas no estrato superior e zoocórica nos estratos médio e inferior.

A eficiência no fluxo gênico por pólen e sementes por diferentes métodos de dispersão tem consequências para o tamanho efetivo populacional. Zoocoria e zoofilia geralmente resultam na dispersão de sementes e pólen a longas distâncias, mas dependem do comportamento dos dispersores, enquanto a barocoria de pequenas sementes e anemocoria depende da direção do vento, tamanho da unidade de dispersão e eficiência da estrutura de vôo. O tamanho populacional é crucial para a estrutura genética espacial e variação genética dentro e entre populações (FINKELDEY, 2005).

2.6 ATRIBUIÇÃO DE PATERNIDADE

Conhecimento de herança, parentesco e variação através das gerações em populações naturais é importante porque fornece informações sobre as taxas e direção evolutivas, o sistema de reprodução, fluxo gênico, seleção natural e estratégias de conservação da variabilidade genética (DICKERSON, 1955; LANDE, 1979).

Estes estudos eram geralmente baseados na observação das variações fenotípicas na progênie de pais conhecidos. Um exemplo foram os experimentos de Mendel em 1866 envolvendo polinização cruzada controlada e observação da segregação em sementes de ervilha. No entanto, numa floresta tropical isto se torna bastante complexo porque a receptividade e viabilidade polínica acontecem geralmente em curtos períodos, existem ainda espécies de florescimento assíncrono e irregular e as árvores são frequentemente bastante altas e muitas vezes somente os ramos superiores florescem. Portanto, vários métodos de análise genética têm sido sugeridos, os quais permitem inferir os parâmetros genéticos acima citados em populações nas quais não é possível se ter uma polinização controlada (FINKELDEY, 2005).

Identificação da prole por atribuição de paternidade é uma forma direta de retrazar o caminho de dispersão do grão de pólen (ASHLEY, 2010). A paternidade em populações naturais iniciou com a utilização das isoenzimas (ELLSTRAND, 1984; MEAGLER; THOMPSON, 1986), mas o baixo polimorfismo das proteínas dificultava a determinação dos pares de parentais. A descoberta do DNA *fingerprinting* e os marcadores codominantes com análises multialélicas foram um grande ganho para as análises genéticas, juntamente com o desenvolvimento de métodos estatísticos (JEFFREYS et al., 1985; JONES et al., 2010).

Vários métodos foram determinados para estimar a paternidade por meio da dispersão de pólen e sementes. Jones et al. (2010) descreveram seis diferentes categorias de estimativas dos parâmetros: por exclusão, alocação categórica, alocação fracional, completa probabilidade de parentesco, reconstrução parental e reconstrução de irmãos. A técnica apropriada depende do tipo de amostra que pode ser obtida, do tamanho populacional e da reprodução.

A técnica de exclusão usa incompatibilidade entre parentais e prole para rejeitar a hipótese de um particular par parental-prole (regra de herança mendeliana). A prole deve partilhar no mínimo um alelo por loco para um marcador codominante, se há uma falha o parental é eliminado da análise. Poucos estudos têm usado a estimativa de exclusão, devido ao método ter uma fraca restrição de exclusão por erros de genotipagem, alelos nulos e mutações que poderiam resultar em falsas exclusões (JONES; ARDREN, 2003; JONES et al., 2010).

Alocação categórica é o método mais comumente utilizado em análises de paternidade, quando a completa exclusão não é possível. Este método escolhe um único parental mais provável de um grupo de possíveis parentais não excluídos. Essa abordagem é baseada em escores de verossimilhança derivados dos genótipos e pode ser aplicado quando um parental é conhecido a priori para a prole local ou quando nenhum dos parentais é conhecido. Estas aplicações requerem diferentes equações de probabilidade (MEAGHER; THOMPSON 1986; MARSHALL et al. 1998; JONES; ARDREN, 2003; JONES et al., 2010).

Alocação fracional é similar à alocação categórica. A principal diferença é que a alocação categórica atribui toda a prole ao macho mais provável e a atribuição fracionária atribui parcialmente a prole para cada candidato parental não excluído, dividindo uma prole entre todos os possíveis machos compatíveis (MEAGHER;

THOMPSON 1986; MARSHALL et al. 1998; JONES; ARDREN, 2003; JONES et al., 2010).

Completo parentesco, reconstrução parental e reconstrução de irmãos são técnicas que dependem dos dados amostrais. A análise de reconstrução completa de parentesco estima o padrão de parentesco em um modelo *framework* com simultâneas estimativas em nível populacional de outras variáveis de interesse em abordagem bayesiana. Reconstrução parental usa o genótipo da prole de irmãos completos e meio irmãos e toda a prole partilha no mínimo um parental para reconstrução do genótipo parental. A técnica é baseada em parcimônia, máxima probabilidade ou abordagens bayesianas, então, a reconstrução genotípica pode ser comparada com os genótipos dos candidatos parentais para atribuição de parentesco (JONES; ARDREN, 2003; JONES et al., 2010; HARRISON et al. 2013).

A reconstrução de irmãos é similar à reconstrução parental, no entanto, um grupo de progênes pode ser amostrado da população, mas grupos de famílias não podem ser identificados a priori, embora a amostra seja conhecida por conter muitos irmãos completos e meio irmãos. Então, se usa o genótipo na amostra para dividir os indivíduos em grupos de irmãos completos e meio irmãos. O algoritmo usa um padrão de parentesco ou técnicas de máxima probabilidade para grupos dentro de diferentes classes de parentesco e depois realiza a atribuição parental (JONES; ARDREN, 2003; JONES et al., 2010; HARRISON et al. 2013).

O parentesco é completamente interconectado com o sistema de reprodução, fluxo gênico, tamanho da vizinhança reprodutiva, estrutura genética espacial, conectividade de populações, entre outras. O genótipo maternal pode ser avaliado se sementes são coletadas diretamente da árvore mãe e o parente paterno identificado entre um pool de candidatos para entender o processo de polinização ou mesmo conhecer o genótipo paterno e maternal (ASHLEY, 2010).

Estudos de parentesco podem descrever somente a dispersão dentro de uma determinada área. Assim, a taxa de dispersão de pólen e de sementes e a imigração são uma porcentagem das sementes e juvenis ou plântulas amostrados dentro dessa área. A fração de sementes que não pode ser partilhada por nenhum pai local, mas por plantas de outra população devido ao fluxo gênico são consideradas migrantes (ASHLEY, 2010).

Pensava-se que o pólen era dissipado rapidamente no ar e era esperado que a maioria da polinização fosse entre indivíduos vizinhos com uma frequência de polinização declinando rapidamente com a distância (EHRLICH; RAVEN, 1969; ELLSTRAND, 1992). No entanto, muitos estudos mostram que a distância de dispersão de pólen não cai rapidamente com a distância da árvore fonte, mas o pólen vem de fontes distantes da planta maternal (DOW; ASHLEY, 1996; 1998; TARAZI et al., 2013).

Um exemplo é o estudo realizado por Dow; Ashley (1996, 1998) na análise de paternidade de *Quercus macrocarpa*, uma espécie com polinização por vento e monóica, onde se encontraram altos níveis de fluxo gênico, pois 62% de todas as bolotas foram fertilizadas por árvores de fora da área amostral (5 ha), e o pólen viajou no mínimo 100 m. Houve evidente de reprodução não aleatória na população, com bolotas fertilizadas por árvores vizinhas compreendendo menos de 24% do total amostrado, concluindo-se que as árvores vizinhas podem ter uma vantagem a curtas distâncias, mas esse efeito diminui a cerca de 45 m da árvore materna.

Alto nível de fluxo polínico foi encontrado também para *Araucaria angustifolia* (dióica com polinização por vento) com distância de até 2006 m, onde 14% do pólen foram de árvores adjacentes ao fragmento (5,4 ha), e 6% foram fertilizadas por pólen de fora da área amostral. A distância média de polinização foi de 83 m, variando de 11 a 287 m e a dispersão de sementes mostrou curtas distâncias sem sementes imigrantes (BITTENCOURT, SEBBENN, 2007).

Para árvores polinizadas por insetos tem sido detectada uma significativa quantidade de fluxo polínico de fora da parcela, pela análise de paternidade e frequente fluxo polínico a longas distâncias excedendo os 100 m ou mesmo 1000 m (GENG et al., 2008; TANI et al., 2009). Para *Copaifera langsdorfii* uma espécie arbórea tropical hermafrodita, polinizada por insetos, a dispersão de pólen foi de 95% dentro e 5% fora do fragmento (4,8 ha), enquanto a dispersão de sementes ocorreu 100% dentro do fragmento, com baixa taxa de cruzamentos endogâmicos, e distância de dispersão de pólen variando de 4,9 a 229 m (SEBBENN et al., 2011). Ainda para a mesma espécie, Tarazi et al. (2013) encontraram 36% de dispersão de pólen dentro da parcela, a distância de dispersão de pólen ocorreu até 300 m dentro da parcela e a área efetiva de vizinhança polínica foi de 5,3 ha e a atividade de forrageamento de pólen é ampla na savana.

Contrastando com as informações acima, Geng et al. (2008) encontraram baixa dispersão de pólen para *Kandelia candel*, aproximadamente 30% de fora da área amostral (0,55 ha). A análise de paternidade indicou que árvores próximas tiveram polinização significativamente superior e distribuição leptocurtica dentro da parcela, com uma média de dispersão de pólen de 15,2 m e 97,3% dentro de uma distância menor do que 50 m.

Fluxo polínico parece ter consistentemente maior restrição somente em espécies com taxas muito altas de autofecundação (GOLENBERG, 1987). O fluxo gênico pode variar consideravelmente com o genótipo da planta, vetor, densidade da espécie e entre estações (LEVIN; KERSTER 1969; TONSOR, 1985; PEAKALL, 1989; CAMPBELL; WASER 1989), mudando também as taxas de cruzamento, autofecundação e cruzamentos correlacionados. Isso demonstra que as taxas de fluxo gênico variam mais do que uma ordem de magnitude entre populações de uma espécie (ELLSTRAND, 1992) e a estimativa média do coeficiente de parentesco diminui linearmente com o logaritmo da distância geográfica. Desvios do parentesco a curtas distâncias dependem fortemente da contribuição relativa da dispersão de pólen e sementes (ROUSSET, 1997, 2000; HEUERTZ et al., 2003).

2.7 COANCESTRIA E ENDOGAMIA

A coancestria (θ) é caracterizada como a probabilidade de identidade por descendência de um par de genes em um mesmo loco escolhido aleatoriamente em uma população (REYNOLD; WEIR; COCKERHAM, 1983), ou a probabilidade de que um gene escolhido aleatoriamente em um indivíduo seja idêntico por descendência a um gene homólogo escolhido aleatoriamente em outro indivíduo ou a média de todos os possíveis parentescos em uma população (LINDGREN; MULLIN, 1998). Cockerham (1967) introduziu a coancestria de grupo como a probabilidade de se amostrar aleatoriamente dois alelos homólogos em um pool gênico de um grupo e estes serem idênticos por descendência.

Coeficiente de coancestria é análogo à correlação de paternidade (r) e coeficiente de endogamia (f) em espécies monoicas. A correlação de paternidade é a correlação entre parentes, e como a coancestria tem efeito aditivo, aumentando com aumento do nível de parentesco, um exemplo é o cruzamento de irmãos completos onde

$r=1/4$, para meio irmãos $r=1/8$ e para primos em primeiro grau $r=1/16$ (JACQUARD, 1974). A coancestria e o coeficiente de parentesco são relatados como a identidade por descendência de um mesmo gene em dois diferentes indivíduos, enquanto o coeficiente de endogamia é a probabilidade de amostragem de dois alelos de um mesmo gene em um mesmo indivíduo (WRIGH, 1922; COCKERHAM, 1967). Essas diferenças permitem uma inferência de identidade em nível individual e populacional.

O coeficiente de endogamia deve aumentar com autofecundação e cruzamentos entre parentes (SEBBENN; SEOANE, 2005). Wright (1922) desenvolveu a inferência do coeficiente de endogamia $\frac{1}{2}(1 + f_o) \times 100$, onde f_o é a endogamia na progênie. Para populações descritas pelo modelo misto e modelo de correlação (vide sistema de reprodução), este pode ser calculado pela autofecundação, como $F_s = 0,5s(1 + F_p)$, onde s é a autofecundação e F_p o coeficiente de endogamia advinda do cruzamento entre parentais, este também pode ser estimado pelo cruzamento entre parentais $F_{cp} = (1 - s)\theta_{xy} = t\theta_{xy}$, então a endogamia na prole é $F_o = 0,5s(1 + F_p) + t\theta_{xy}$ ou $F_p = F_s + F_{cp}$, e destes podemos também inferir os valores de coancestria θ_{xy} por isolamento (SEBBENN, 2006).

O coeficiente de parentesco e coancestria tornam-se bastante complexos quando há pedigrees com várias gerações e muitos indivíduos com sobreposição de gerações. Assim, nós podemos ter vários níveis de coancestria em progênies de polinização aberta, monóicas e de sistema misto, tais como a coancestria de irmãos completos $\theta_{IC} = 0,25(1 + F_p + 2\theta_p)$, irmãos de autofecundação $\theta_{IA} = 0,5(1 + F_m)$, meio irmãos $\theta_{MI} = 0,125(1 + F_p + 6\theta_p)$ e irmãos de autofecundação e de cruzamento $\theta_{AC} = 0,5(1 + F_p + 2\theta_p)$, resultantes de cruzamentos entre indivíduos não parentes (RITLAND, 1989).

A coancestria média em progênies de polinização aberta é a correlação média entre os pesos específicos de parentesco pela proporção ou frequência de cada tipo parental, onde progênies dentro de cada tipo parental tem um mesmo grau de correlação, assim temos $\theta = \theta_{IA}P_{IA} + \theta_{IC}P_{IC} + \theta_{MI}P_{MI} + \theta_{AC}P_{AC}$ (SQUILLACE 1974; RITLAND, 1989; LINDGREN; MULLIN, 1998). A coancestria não requer equilíbrio de endogamia e pode diferir entre gerações (LINDGREN; MULLIN, 1998).

Os parâmetros de correlação do sistema de reprodução são uma função do processo de polinização, por exemplo, visitas sistemáticas de polinizadores em uma mesma árvore, e esses efeitos podem ser investigados também pela covariância genética entre irmãos. Para prole de um mesmo fruto, o aumento da correlação de autofecundação ou parentesco aumenta os abortos seletivos de frutos, mas reduz o aborto seletivo de óvulos dentro de frutos, dependendo do nível de correlação de autofecundação e paternidade e seus componentes de variância genética (RITLAND, 1989).

A intensidade de endogamia e deriva genética depende do tamanho populacional (N_e), e este é um fator do processo de seleção e reprodução de cada espécie (WANG, 1997). O tamanho efetivo populacional é definido como o tamanho ótimo nos quais uma população aumenta sua variância por mudanças nas frequências gênicas e endogamia em uma população idealizada (diferentes gerações, tamanhos constantes, reprodução aleatória, incluindo autofecundação) (CABALLERO, 1994), ou seja, é o número de genótipos amostrados em uma população referência (panmítica) na qual é esperado experimentar o mesmo desvio das frequências gênicas de uma população referência (LINDGREN; MULLIN, 1998).

É importante entender que populações panmíticas tem uma certa taxa de autofecundação e cruzamentos entre parentais que pode ser predita como uma função da reprodução e tática de seleção (LINDGREN; GEA; JEFFERSON, 1997), assim o número status N_s é metade do grupo de coancestria $N_s = \frac{0,5}{\theta}$, (LINDGREN; MULLIN, 1998). O número status tem muitos usos, como para descrever a diversidade genética ou a probabilidade de gametas únicos e não idênticos por descendência $(1 - \theta)$, a probabilidade de perda de alelos raros, ambas as características de interesse no manejo a longo tempo. Este é também utilizado em ciclos de seleção para monitorar ganho e perda de variabilidade, no manejo de pomares de sementes, para tomada de decisões de quais e quantas árvores utilizar em pomares de sementes, para avaliar as consequências da contaminação de pólen, entre outros (LINDGREN; GEA; JEFFERSON, 1997; LINDGREN; MULLIN, 1998).

2.8 HERDABILIDADE

A herdabilidade é a proporção de variâncias genéticas sobre a variância fenotípica total, ou a parte herdável da variabilidade. A herança genética é alterada pelo efeito do ambiente, e com o aumento da variabilidade proporcionada pelo ambiente, a seleção de genótipos torna-se mais difícil (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2016). Quanto maior a herdabilidade, maior o controle genético do caráter. O coeficiente de herdabilidade varia de 0 a 1, valores iguais a zero, indica ausência de controle genético de um caráter, então, a média populacional pode ser alterada apenas atuando sobre o ambiente; valores maiores que zero, indicam a presença de controle genético de um caráter, neste caso a média populacional pode ser alterada pela seleção de genótipos com características desejáveis (FALCONER, 1987).

O conhecimento da herdabilidade de características específicas, sob condições naturais tem dois interesses relevantes. O primeiro é a resposta genética para seleção, ou as mudanças de médias fenotípicas entre gerações, que é determinada pelo produto da hereditariedade sob intensiva seleção fenotípica (FALCONER, 1989). O segundo é a manutenção da variação poligênica que faz previsões específicas, sobre os níveis de hereditariedade (BARKER; TOHMAS, 1987).

As estimativas de herdabilidade podem variar segundo a característica em análise, o método de estimação, a diversidade, taxa de endogamia, tamanho amostral, características do ambiente considerado, unidade experimental, precisão na condução do experimento e coleta de dados (BORÉM; MIRANDA, 2009).

O método de segregação de progênes de polinização aberta é particularmente usado para florestas tropicais, onde se torna difícil ou impossível o cruzamento controlado, permitindo uma correta identificação do modo de herança. Consiste da observação de progênes segregantes advindas de sementes de árvores heterozigotas para putativos locos codominantes (GILLET; HATTEMER, 1989).

A estimativa da herdabilidade em populações naturais pode ser calculada também pela covariância entre o coeficiente de parentesco e a semelhança fenotípica entre caracteres quantitativos dos indivíduos (BESSEGA et al., 2011). A covariância ou correlação entre os fenótipos são relativos e podem ser analisados em termos de covariâncias entre seus respectivos componentes que são: hereditariedade ou valores genotípicos, ambientes e interação das variâncias ou valores entre parentais (COCKERHAM, 1954).

A maior limitação dessa abordagem é a necessidade de um nível significativo de médias e variâncias de parentesco entre indivíduos. Considerando que plantas são sedentárias e apresentam dispersão passiva de sementes, com tendência a formar estruturas espaciais de parentais ou isolamento por distância, há dois fatores juntamente com a similaridade genética de indivíduos parentes, que podem contribuir para aumento da correlação de fenótipos. Primeiro, indivíduos próximos que partilham as mesmas condições ambientais, inflam a correlação fenotípica, e esse efeito pode ser reduzido pelo aumento da distância. Segundo, a endogamia e reprodução vegetativa também aumentam a correlação fenotípica entre indivíduos. Esses fatores devem ser levados em consideração para análise de “herdabilidade em campo” (WRIGHT, 1946).

Características controladas por poucos locos apresentam alta herdabilidade, enquanto caracteres quantitativos apresentam baixa herdabilidade. Para *Copaifa langsdorffii* a altura e DAP apresentaram baixa herdabilidade e forte influência ambiental (KUBOTA, 2014). Para *Schizolobium parahyba* houve também forte influência ambiental, com valores de herdabilidade maiores para altura (0,01 a 0,39) do que para o DAP (0,01 a 0,13) e altas correlações genotípicas entre os caracteres (CHINELATO, 2011).

Enquanto para *Pinus* spp. e outras coníferas e *Eucalyptus* spp. e outras angiospermas as características altura, diâmetro, volume, ramificação e tronco reto a herdabilidade apresentou valor médio de 0,4, mostrando valores geralmente entre 0,1 a 0,3 (CORNELIUS, 1994). Em *Eucalyptus tereticornis* a herdabilidade de DAP e altura foram de 0,31 e 0,30 respectivamente, com alta correlação genética para DAP, altura e volume (MACEDO et al., 2013). Estudos de herdabilidade e parentesco em populações naturais de *A. polyneuron* são inexistentes e carecem de muitos estudos, no sentido de entender a herança de caracteres quantitativos em condições naturais.

2.9 *Hymenaea courbaril* L. (FABACEAE)

O gênero *Hymenaea* é predominantemente neotropical, com 13 espécies ocorrendo no Brasil (KODAMA; SARTORI, 2007). As espécies de *Hymenaea* tem larga utilização no setor florestal e na medicina popular. No Brasil, as espécies de maior expressão econômica e medicinal são *H. courbaril*, *H. stigonocarpa* e *H. mauritiana* (CIPRIANO et al., 2014).

Hymenaea courbaril é uma das espécies conhecidas popularmente como jatobá. Devido às semelhanças morfológicas algumas espécies do gênero são também comercializadas na Bacia Amazônica como *H. courbaril*, sendo elas: *H. parvifolia*, *H. oblongifolia*, *H. intermedia* e *H. reticulata* (MELO; MENDES, 2005).

A madeira do jatobá tem ótima qualidade e está entre as de maior valor no mercado madeireiro, e é mais intensamente explorada na Amazônia Brasileira (LACERDA, 2007). É utilizada na construção civil, marcenaria, peças torneadas, instrumentos musicais, pisos laminados, assoalhos e tacos, canoas. A resina extraída de sua casca é usada como verniz vegetal, combustível, incenso, polimento e impermeabilizador (LEE; LANGENHEIM, 1975, MELO; MENDES, 2005; COSTA; SOUZA; SOUZA, 2011).

A casca e a seiva são utilizadas na fitoterapia popular para diversos fins. Estudos mostram potencial quimio preventivo (ABDEL-KADER et al., 2002), atividade antibacteriana e antifúngica (MARTINS et al., 2010), potencial alelopático na germinação de sementes de ipê-rosa (OLIVEIRA et al., 2012), antibiótico contra *Staphylococcus aureus* (ALEIXO et al., 2013), atividades miorelaxante, antioxidante e antiinflamatória (BEZERRA, 2013), tratamento de hemoptises, hematúria, diarreia disentérica, cólicas ventrais e o vinho do jatobá retirado do caule, é ainda um potente fortificante para os músculos e ossos (BONTEMPO, 2000).

A polpa do fruto é comestível, utilizada para fazer farinha, doces e bebidas além de ser apreciada pela fauna e as sementes são utilizadas para confecção de jóias e artesanatos. Pode ser utilizada também em sistemas agroflorestais, monoculturas, em restauração de áreas degradadas e arborização (MELO; MENDES, 2005).

Sua distribuição vai desde o sul do México até grande parte da América do Sul, incluindo o Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Guiana, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia. No Brasil, ocorre do Norte até o Sudeste e é encontrada em altitudes de até 900 m acima do nível do mar, em solos arenosos e argilosos bem drenados de terra firme e em várzeas altas, mas raramente em campos abertos. Cresce bem também em zonas úmidas com precipitação anual entre 1.500 e 3.000 mm (MELO; MENDES, 2009). (LACERDA, 2007).

Atinge altura entre 30 a 45 m e diâmetro à altura do peito (DAP) maiores que 1 m. O fuste é cilíndrico, normalmente reto e de copa ampla. Casca externa acinzentada a castanho-acinzentada, casca interna grossa, de cor avermelhada a marrom-clara e

alburno branco-amarelado, exsuda resina transparente (COSTA; SOUZA; SOUZA, 2011). As folhas são compostas, alternas, pecioladas, bifoliolada, coriáceas, falciformes ou ovais, com base desigual. Inflorescência em panículas terminais, com flores hermafroditas, de cor branca a creme. Frutos do tipo legume indeiscente, lenhoso, de cor verde quando imaturo e marrom escuro quando maduro, com 8 a 15 cm de comprimento e de sabor adocicado. Apresenta entre 2 a 6 sementes por fruto, envoltas por uma farinha comestível de grande valor nutritivo, consumida pela população e por animais roedores (PRANCE; SILVA, 1975; CARVALHO-FILHO et al., 2003; GORCHOV et al., 2004).

Espécie alógama com polinização predominante por morcegos e mamíferos (LEE; LANGENHEIM, 1975), suas flores são melíferas, produzindo néctar e mel de alta qualidade (BOBROWIEC; CARVALHO; OLIVEIRA, 2000). Apresenta mecanismos de autoincompatibilidade (BAWA, 1974; LACERDA, 2007), é considerada supra anual, semidecidual, com primeiros eventos reprodutivos registrados entre os 8 a 12 anos de idade.

Floresce entre agosto a novembro e frutifica entre fevereiro a setembro na Amazônia Central (COSTA; SOUZA; SOUZA, 2011). A árvore adulta tem capacidade de produção média de 800 até 2000 frutos. Dispersão autocórica e zoocórica principalmente grandes mamíferos como: anta (*Tapirus terrestris*), paca (*Agouti paca*), cutia (*Dasyprocta azarae*) e macaco-prego (*Cebus apella nigrinus*) (GIBBS; OLIVEIRA; BIANCHI, 1999; DUMPHY; HAMRICK; SCHWAGERL, 2004).

O jatobá é uma espécie secundária tardia a climax, exigente á luz, característica de interior de floresta. As sementes se desenvolvem melhor com 50 a 80% de sombreamento (LIMA; ZANELLA; CASTRO, 2010). Crescimento lento a moderado, estima-se uma rotação de 30 a 60 anos para produção de madeira. A espécie apresenta uma baixa densidade populacional com <1 árvore/ha e distribuição irregular (LACERDA; KANASHIRO; SEBBENN, 2008; COSTA; SOUZA; SOUZA, 2011).

Atualmente o corte seletivo permite exploração de árvores com $DAP \geq 50$ cm, no entanto a espécie inicia florescimento com cerca de 49 cm de DAP e apresenta considerável variação em termos de porcentagem de árvores férteis por ano (90,9%/2002, 47,6%/2003) e com o intenso corte seletivo (>90%), um pequeno número de indivíduos reprodutivos são deixados (LACERDA, 2007).

2.10 EXPLORAÇÃO MADEIREIRA

O Brasil possui a segunda maior área florestal do mundo com aproximadamente 463,2 milhões de hectares ou 54,4% do território brasileiro, ficando atrás apenas da Rússia. Deste total 456,1 milhões de hectares são de florestas naturais concentradas em maior parte na região amazônica e 7,1 milhões de hectares são de florestas plantadas, principalmente com espécies de *Pinus* e *Eucalyptus* concentradas em sua maioria na região Sul e Sudeste do país (SFB/SNIF, 2016).

Nas florestas naturais estima-se que existam pelo menos 7.880 espécies florestais arbóreas nativas, o que representa somente 80% do total existente conhecido (FAO, 2005). Hubbell et al. (2008) apontam só na floresta Amazônica cerca de 11.120 espécies arbóreas, enquanto a IUNC aponta mais de 15,000 espécies arbóreas.

A biodiversidade do Brasil está atrelada a diversidade de biomas, o que o classifica como um dos países mais ricos em biodiversidade. No entanto, 38% da vegetação nativa do país já foi destruída. A floresta Atlântica com seu histórico de ocupação e colonização tem 88% de sua área devastada, seguida pelos Pampas com 64%, o Cerrado com 49%, a Caatinga 46%, o Pantanal 15% e a floresta Amazônica com 15% (SFB/SNIF, 2016). De acordo com Soares-Filho et al., (2006, 2013), a Amazônia perdeu cerca de 12% de sua extensão original, com uma projeção de perdas até 2050, entre 9 a 18%. Steege et al., (2015) estimam que até 2050 cerca de 40% da Amazônia seja destruída.

O desmatamento na Amazônia varia entre estados. Os estados do Amapá, Amazonas e Roraima apresentam 3, 4 e 5% respectivamente, enquanto Rondônia e Maranhão atingem percentuais de 36%, o Pará 22%, Mato Grosso 25%, Tocantins 13% e Acre 15% (IBGE, 2012). A floresta Amazônica tem um importante papel no setor florestal de nativas, fornecendo produtos florestais madeireiros e não madeireiros. Esta atividade está entre as principais da região norte, juntamente com a pecuária e a mineração industrial (PEREIRA & LENTINI, 2010).

Nos anos de 2011 a 2013, 89% da madeira destinada ao uso industrial e 32% destinada ao uso como combustível eram provenientes da Amazônia Legal, enquanto das demais áreas do país 11% eram destinadas a indústria e 68% para combustível (SFB/SNIF, 2016), com pelo menos 36% de madeira provenientes de corte ilegal (PEREIRA et al., 2010).

Fazeres (2014) aponta uma série de problemas na política florestal do país, com programas e estratégias governamentais que desincentivam o desenvolvimento do setor, tais como taxas tributárias punitivas para atividades florestais, burocracia excessiva para aprovação de planos de manejo florestal, dificuldades de crédito para uso sustentável de recursos florestais, e em contrapartida as políticas brasileiras incentivam outros setores, tais como agropecuária e hidrelétricas, ou seja, incentivam a substituição das florestas por atividades consideradas economicamente mais produtivas.

Com a crescente demanda de exportação, a exploração madeireira tornou-se uma grande ameaça para a sobrevivência das florestas e da fauna, além de ser responsável por 20% das emissões globais de CO₂, processos de desertificação e erosão do solo, fenômenos climáticos extremos e implicações sociais, políticas e econômicas que comprometem o desenvolvimento social (FAZERES, 2014).

O percentual de madeira extraída de forma ilegal nas florestas tropicais, tais como na Amazônia, África Central, Ásia e Rússia estão entre 50 a 90% (INTERPOL, 2015). Isso corresponde a 5 milhões de hectares anuais, mais do que 100 milhões m³/ano (LAWSON & MACFAUL, 2010). Ou seja, mais de 40 milhões de hectares de florestas foram depredados no mundo e grande parte em países tropicais de alta biodiversidade.

O mercado ilegal de madeira cria produtos com preços extremamente baixos, desestabilizando o mercado legal (GRAY, 2002), e lucra entre 30 a 100 bilhões de dólares anualmente, enquanto o mercado legal e o governo têm perdas de aproximadamente 15 bilhões anuais. Só o estado do Pará que apresenta a maior taxa de extração de nativas, tem uma sonegação de impostos de 477 milhões de reais (FAZERES, 2014).

A União Européia que importa substancial e crescente quantidade de madeira de várias regiões, adotou em 2003 o Plano de Ação que propõe um conjunto de medidas que apoiam e forçam governos e mercados a adotar leis florestais de gestão sustentável de florestas, negociando somente com países que produzem e exportam madeira legal com licença FLEGT. Em dezembro de 2010 foi criado ainda o regulamento (No. 995/2010), que proíbe o mercado ilegal de madeira e requisita garantias de legalidade (DEGEN et al., 2013).

Baseado na certificação florestal, com manejo sustentável de 8% de áreas florestais nativas sugere-se uma redução global de corte ilegal de 22% desde o ano 2002

(INTERPOL, 2015). No entanto, se constata que as atividades ilegais estão em todas as etapas do processo de certificação, desde o corte, a certificação, transporte, processamento e exportação do produto. Assim, se faz necessário eficientes e acurados métodos para confirmar madeiras de origem suspeita, aumentando a cooperação entre países produtores e consumidores de madeira legalizada (TNAH et al., 2009).

O Brasil é o maior exportador de madeira da América do Sul, com exportação de 55% de toda a madeira e produtos florestais madeireiros e 2,7% da exportação global. Os principais produtos madeireiros exportados pelo Brasil em 2012 foram: madeira em polpa (52%), papel (22%), molduras (6%), móveis (5%), madeira compensada/folheada (5%), serrada (4%) e caixilhos (2%) (SFB/SNIF, 2016).

Espécies nativas com maior qualidade de madeira, tem particular interesse no mercado e são intensamente exploradas e comercializadas (LACERDA, KANASHIRO, SEBBENN, 2008), entre elas estão espécies como *Hymenaea courbaril*, *Bromimum utile*, *Dinizia excelsa*, *Erismia uncinatum*, *Dipteryx odorata*, *Goupia glabra*, *Parkia* spp., *Apuleia leiocarpa*, *Handroanthus* spp., *H. guayacan*, *H. serratifolius*, *Manilkara huberi*, *M. bidentata*, *Bowdichis* spp., *B. nítida*, *B. virgilioides*, *Bagassa guyanensis* e *Couratari tauari* (TRAFFIC, 2015).

O controle de exploração de arbóreas nativas é extremamente importante para manter a diversidade das populações quesito primordial à adaptação e evolução das espécies. O combate a ilegalidade é também a condição para que o país possa exportar madeira para importantes mercados compradores, como Estados Unidos e Europa, que adotam instrumentos comerciais de controle de origem do produto (ADEODATO et al., 2011). Os grandes centros de consumo estão diretamente ligados a oferta de madeira clandestina e também são a chave para o controle do desmatamento e mudanças climáticas. A pressão global é forte, no sentido de tornar a floresta mais valorizada e lucrativa para que os estoques sejam conservados para o futuro.

Em outras partes do mundo como a Europa e Ásia, onde o aproveitamento econômico é mais antigo, os esforços são no sentido de reflorestar e recuperar estragos do passado, para sustentar a produção. A alta taxa de desmatamento mostra o cenário para atender a demanda mundial por energia, madeira e outros produtos originários das florestas (ADEODATO et al., 2011). Vários países têm protegido suas florestas para assegurar a provisão de água e reduzir a degradação que atinge um quarto dos solos do

planeta, das 105 maiores cidades do mundo, 35 são abastecidas por bacias hidrográficas contendo florestas (CDB, 1992).

2.11 RASTREABILIDADE DA MADEIRA

Madeira é uma commodity internacional, e por consequência, o consumo de madeira em uma parte do mundo influencia a atividade de corte em outras partes do mundo. O potencial do comércio internacional de madeira tem levado a um corte insustentável que conduziu para o desenvolvimento dos sistemas de certificação, tais como FSC (*Forest Stewardship Council*), PEFC (*Programme for the Endorsement of Forest Certification*) (LAWSON; MACFAUL, 2010), CERFLOR (Programa Brasileiro de Certificação Florestal) reconhecido internacionalmente pelo PEFC desde 2002, entre outros (SFB/SNIF, 2016).

O sistema de certificação florestal deve assegurar aos consumidores que a madeira comprada é originária de um sistema sustentável, ou seja, ecologicamente correto, socialmente justo e economicamente viável (SFB/SNIF, 2016). A maioria das áreas florestais certificadas estão localizadas na América do Norte e Europa, onde problemas com desflorestamento e corte ilegal são menores comparados com as florestas tropicais (LAWSON; MACFAUL, 2010). No Brasil as políticas de certificação começaram a ser implantadas em 1994 (SFB/SNIF, 2016).

Vários métodos têm sido usados para rastreamento de madeira, tais como técnicas anatômicas, isotópicas e de espectrometria, aplicadas na identificação de gênero, espécies e origem geográfica. No entanto são limitados pela discrepância entre indivíduos, tecidos e influências ambientais (PEREZ-COELLO; SANZ; BABEZUDO, 1997; DURAND et al., 1999; TNAH et al., 2009). Com o advento das tecnologias moleculares e sequenciamento de última geração, análises genéticas têm conduzido a rápidos avanços no suporte e rastreamento de origem de madeira importada, esclarecendo potenciais mercadorias de origem ilegal (NIELSEN; KJAER, 2008).

Muitas técnicas baseadas em DNA estão disponíveis, usando tanto sequências como também fragmentos de DNA. As sequências são baseadas na comparação da sequência atual em regiões selecionadas de DNA entre indivíduos. Enquanto os fragmentos são baseados na comparação do tamanho de fragmentos de DNA formados por corte com enzimas de restrição e amplificadores específicos ou universais (*primers*),

desse modo sequências são marcadores menos variáveis do que fragmentos (NIELSEN; KJAER, 2008).

Marcadores de DNA tem diferentes características que os fazem mais ou menos usados em termos de rastreabilidade de madeira. Muitos marcadores são universais, ou seja, amplificam entre as espécies, enquanto outros são espécie específicos. O DNA utilizado também é importante, se cloroplastidial (*cpDNA*) ou mitocondrial (*mDNA*) com herança maternal, ou se nuclear com herança biparental. O *cpDNA* e *mDNA* mostram forte estrutura geográfica, mas baixa variação, em contraste com o nuclear que mostra menor estrutura geográfica mas alta variação (NIELSEN; KJAER, 2008).

O rastreamento da origem geográfica da madeira requer amostragem e genotipagem de uma população referencial, ao longo da área de distribuição da espécie em estudo. A possibilidade de detecção é altamente dependente do tamanho amostral, número de marcadores polimórficos e da divergência genética da população referencial (NIELSEN; KJAER, 2008). Com isso pode ser difícil rastrear a origem geográfica de um indivíduo da sua população original, no entanto, as técnicas moleculares têm mostrado sucesso na distinção da origem geográfica.

Estudos com diferentes marcadores tem mostrado sucesso na identificação da origem geográfica de espécies arbóreas tropicais, como por exemplo, os marcadores *Single Sequence Repeat* (SSR) amplificados para *Swietenia macrophylla* King listada no *Convention on International Trade in Endangered Species* (CITES), espécie de alto valor madeireiro e extremamente explorada, mostrou significativa diferenciação entre populações da América do Sul e da América Central (DEGEN et al., 2013).

O *short tandem repeat* (STR) aplicado na espécie *Neobalanocarpus heimii* (King) P.S.Ashton, mostrou regiões conservadas, com um banco de dados capaz de fornecer evidências como prova para processos judiciais contra madeireiros ilegais na península da Malásia (TNAH et al., 2010). Ainda para a mesma espécie, utilizando marcadores cloroplastidiais Tnah et al. (2009), obtiveram resultados que mostraram claramente que somente norte e sul da Península da Malásia foram distinguíveis. Assim esse conjunto de banco de dados poderia somente ser usado para determinar madeira de origem desconhecida em nível regional.

O DNA barcode é um novo e bem estabelecido método, que tem mostrado substancial benefícios e o CITES tem se utilizado desse sistema para identificação de

espécies. Essa técnica poderia também se mostrar relevante para distinguir a origem geográfica de espécies de alto valor comercial, que são falsamente declaradas (NIELSEN; KJAER, 2008).

2.12 MARCADORES MOLECULARES

Marcador molecular pode ser considerado qualquer molécula, como metabólitos, proteínas, sequências de DNA, de RNA, entre outros, que apresentem variações em quantidade, formando uma estrutura entre indivíduos. As variações que estas moléculas apresentam, deve ser específico para um único indivíduo ou grupo (JÚNIOR, 2009). Diferentes marcadores têm sido identificados, no entanto, somente alguns deles tem ganhado considerável importância prática para genética florestal (FINKELDEY, 2005).

Isoenzimas foram marcadores intensamente utilizados em estudos de espécies arbóreas tropicais nos anos 70 (HAMRICK; LOVELESS, 1986). No entanto foram substituídos mais tarde pelos marcadores genéticos, que mostram maior variação, são herdáveis e podem ser obtidos em todos os estágios ontogênicos e tecidos, portanto, difere das isoenzimas que podem ter diferenças entre fases ontogênicas e tecidos e apresentam menor variação que marcadores genéticos. Aplicações importantes podem ser listadas para os marcadores genéticos em arbóreas: como na identificação de híbridos e clones; mensuração da diversidade genética dentro e entre populações; na investigação do sistema de reprodução e fluxo gênico; em experimentos de seleção, práticas de manejo florestal e mudanças ambientais e na identificação de *Quantitative Trait Loci* (FINKELDEY, 2005).

Com o advento das tecnologia modernas na genética e biologia molecular, surgiram diversos tipos de marcadores de DNA, alguns deles são os *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Sequence-Characterized Amplified Regions* (SCAR), *Restriction Fragment Length Polymorphism DNA* (RFLP), DNA Satélite, Minissatélites ou *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR), Microsatélites ou *short tandem repeats* ou *short sequence repeats* (STRs ou SSR). A característica para escolha de marcadores para estudos de arbóreas é a variação genética e o sistema de detecção (JÚNIOR, 2009).

Marcadores dominantes são mais utilizados em plantas principalmente para estudos taxonômicos. Alguns exemplos de marcadores dominantes são os Amplificação de Fragmentos Polimórficos de Comprimento (AFLP), onde a variação é acessada utilizando-se enzimas de cortes de restrição e uma determinada banda pode ser presente ou ausente e a variação genética pode ser estudada por DNA nuclear ou plastidial (KRAWCZAK; SCHMIDTKE, 1994). Já a técnica de RAPD amplifica fragmentos de DNA utilizando primers curtos de geralmente 10 nucleotídeos, de sequência aleatória (WILLIAMS et al., 1990).

Dos marcadores codominantes os microssatélites são os mais utilizados para estudos genéticos de arbóreas, se destacando principalmente por apresentar alto conteúdo de informações (JÚNIOR, 2009), expressão codominante e multialelismo. São encontrados em muitos genomas, principalmente eucariotos, com segmentos polimórficos pequenos suficientes para serem detectados por reação de PCR - *Polymerase Chain Reaction* (FERREIRA; GATTAPAGLIA, 1998). Os microssatélites são formados por pequenas sequências de nucleotídeos de 2 a 6pb, que ocorrem em forma de unidades repetitivas (ELLEGREN, 2004).

Marcadores baseados em sequências gênicas, como os utilizados na genômica funcional tem sido estimulado para estudo de sequência de genes específicos, particularmente úteis em estudos de seleção assistida, diversidade funcional e avaliação de germoplasma. Entre estes os Nucleotide Binding Site (NBS), Leucine Rich Repeat (LRR) e as tecnologias com chip de DNA baseados em hibridização entre sondas e sequências complementares de DNA tem se destacado (SICARD et al., 1999). A aplicação da última técnica inclui também diagnose de mutações, detecção de polimorfismo, descoberta de genes, estudo de expressão gênica e mapeamento genético (RAMSAY, 1998). Outro tipo de marcador são as sequências de polimorfismos de nucleotídeo (SNP), fontes abundantes de variação genética, gerados por substituição de uma única base, de grande interesse para estudos filogenéticos de evolução dentro de espécies (WOLTERS et al., 2000), mapeamento genético e principalmente na diferenciação de alelos do mesmo gene (QUIRINO, 2003). Embora se tenha uma grande quantidade de marcadores genéticos moleculares a análise está baseada em marcas em comum ou que diferenciam espécies ou grupos ou características.

2.13 DNA BARCODE

Várias aplicações tem sido atribuídas ao DNA barcode, como na identificação de espécies (HEBERT et al., 2003; LI et al., 2015), subespécies, cultivares, morfo-tipos, mutantes, espécies complexas e clones facilmente diagnosticados com técnicas moleculares barcode (DNABarCoding, 2015). Assim como em estudos de associação (ZHU et al., 2008), filogenética e evolução (CRAMER et al., 2008), diversidade genética (KAWUKI et al., 2009), marcadores assistidos por seleção (HAYASHI et al., 2004), mapeamento genético (ROSTOKS et al., 2005), propriedade de direitos intelectuais (STEWART, 2005), análises forenses em crimes ambientais (MILDENHALL, 2006), suporte para segurança alimentar e qualidade e pureza de alimentos (GALIMBERTI et al., 2012; HUXLEY-JONES et al., 2012) e estudos de ecologia e genômica ambiental (VALENTINI et al., 2009). No controle de pestes na agricultura, monitoramento, identificação de vetores de doenças, monitoramento da qualidade da água, sustentabilidade de recursos naturais e espécies em ameaça de extinção (DNABarCoding, 2015).

O barcode abrange técnicas que consistem na obtenção de um padrão de sequências curtas de DNA como ferramenta para identificação de espécies, em posições estabelecidas do genoma ou de um gene bem conhecido (DNABarCoding, 2015). E sua premissa é a universalidade para o taxum de interesse, sendo também essencial para discriminação de taxa, que as distâncias interespecíficas sejam maiores que as distâncias intraespecíficas (MEYER; PAULAY, 2005).

Entre as técnicas utilizadas como barcode constam os *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), os quais foram criados baseados no código de barras universal que emprega 10 números alternados em 11 posições para gerar 100 bilhões de identificadores únicos. No barcode temos quatro possibilidades de nucleotídeos em cada posição, com uma cadeia de sítios mais longa que 11 posições, assim uma combinação de apenas 15 posições de nucleotídeos, criaria mais de um bilhão de códigos únicos, número muito maior que o de espécies conhecidas (HEBERT et al., 2003).

Os SNPs podem ser denominados como diferenças pontuais entre pares de bases de diferentes sequências alinhadas (CONSORTIUM, 2003), ou mais especificamente substituição de uma base nucleotídica no DNA, que pode surgir por incorporação incorreta de base durante a replicação de DNA ou por modificações químicas de uma base.

As mutações de substituição podem ser trocas de bases de mesma natureza química como também entre duas purinas (A e G) ou duas pirimidinas (C e T), denominadas de transições; ou de bases de natureza química diferentes entre purinas e pirimidinas, denominadas de transversões (BROOKES, 1999). As alterações de bases que não acarretam alterações no aminoácido são denominadas de silenciosas ou neutras, por não apresentarem nenhum efeito na descendência (LEWIN et al., 2000).

Outras mutações que constam também como SNPs são os indels ou inserções e deleções. Estes podem ser alterações de uma única base ou trechos de dois ou mais nucleotídeos presentes ou ausentes no DNA (ALHO, 2004; PHILLIPS, 2007). Assim para distinção dos SNPs em relação as mutações raras e erros de incorporação de bases, assume-se que para um dado loco, o alelo menos frequente tenha uma abundância acima de 1% (BROOKES, 1999).

Os polimorfismos de única base ocorrem em alta densidade em plantas e podem ser encontrados tanto em regiões codificadoras como em regiões não codificadoras, transcritas ou não traduzidas e promotoras (RAFALSKI, 2002). A densidade varia dependendo se a espécie é autógena ou alógama, da diversidade genética e da região analisada, de forma geral são relatados cerca de um SNP a cada 100-300 pb (GUPTA; ROY; PRASAD, 2001).

Para animais foi desenvolvido o barcode universal utilizando o gene citocromo oxidase 1 “CO1” (KRESS et al., 2005). Já em vegetais nenhum dos locos disponíveis podem ser utilizados para todas as espécies, no entanto as regiões cloroplastidiais *matK* e *rbcL* tem sido utilizadas para diversos taxa (DNABarCoding, 2015). O genoma cloroplastidial é menor comparado ao nuclear e apresenta maior divergência interespecífica e menor divergência intraespecífica (HEBERT et al., 2004).

Vários métodos com DNA cloroplastidial e nuclear são reportados em plantas, utilizando regiões de sequências expressas (EST) (BARBAZUK et al., 2007), amplicons (BUNDOCK et al., 2009), gene espaçadores (ITS), redução genômica baseada em enzimas de restrição combinadas juntamente com as tecnologias de sequenciamento de última geração (DESCHAMPS; CAMPBELL, 2009; LI et al., 2015).

3.0 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERIAS

Estudo das espécies arbóreas *Aspidosperma polyneuron* e *Hymenaea courbaril*, tendo por finalidade para *A. polyneuron* entender os padrões de herdabilidade e para a espécie *Hymenaea courbaril* a rastreabilidade de origem da madeira.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Entender os padrões de herdabilidade de *A. polyneuron*;
- Mensurar as médias de caracteres de crescimento e como estes podem influenciar na sobrevivência de *A. polyneuron*;
- Criar um banco de dados de marcas genéticas específicas para *H. courbaril*;
- Aplicar as marcas em populações de *H. courbaril* de áreas de concessão florestal de quatro países;
- Verificar a acurácia do método para rastreabilidade de origem da madeira utilizando o banco de dados de marcas genéticas de *H. courbaril*.

4.0 ARTIGO

Heritability to growth traits in natural population of facultative apomictic tree *Aspidosperma polyneuron*

Authors: Camila L. Chaves^{1*}, Alexandre M. Sebbenn², Adrivanio Baranoski³, Paulo M. Ruas^{1,3}

Addresses:

¹ Universidade Estadual de Londrina, Departamento Agronomia, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, 9 km 380, Campus Universitário, C.P. 10011, CEP 86057970, Londrina, PR, Brazil.

²Instituto Florestal de São Paulo, C.P. 1322, CEP 01059-970, São Paulo, SP, Brazil.

³ Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, 12 km 380, Campus Universitário, C.P. 10011, CEP 86057970, Londrina, PR, Brazil.

Corresponding author: Camila Lucas Chaves, Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Agronomia, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, 9 km 380, Campus Universitário, C.P. 10011, CEP 86057970, Londrina, PR, Brazil. e-mail: kmila2252@yahoo.com.br. Phone: +55 43988417495

Keywords: Apomixis; microsatellite loci; *in situ* breeding; propagule dispersal; natural selection; tree breeding; tropical tree.

Running title: Heritability in *Aspidosperma polyneuron*

Word count for main text: 3,010

Abstract

The heritability coefficient is an important parameter in natural populations, because it indicates the level of genetic control on quantitative traits, and the capacity that natural and artificial selection have to change the mean of populations. However, a low number of studies have investigated the heritability of growth traits in tree species from natural populations. Total height (H) and diameter at ground level (dgl) heritability was quantified for juveniles of an *Aspidosperma polyneuron* natural population, using seven microsatellite loci. Two plots (P1, P2) of 0.25 ha were established in a conserved area of Seasonal Semideciduous Atlantic Forest remnant. All juveniles found within plots were mapped, the H and dgl were measured. Heritability was calculated by regression for pairwise differences in traits between juveniles on their pairwise relatedness using microsatellites loci. Growth traits has higher environmental control than genetic control. Analysis indicated that heritability (h^2) for dgl (P1= 0.266; P2= 0.086) was higher than H trait (P1= 0.168; P2= 0.042). Herdability without apomicts for dgl (P1= 0.264; P2= 0.087) and H (P1= 0.170; P2= 0.050) had similar values. P1 has greater chance to respond to natural and artificial selection than P2. Heritability difference of traits between plots was attributed to environmental difference, high inbreeding and regeneration between plots. Diameter for relative individuals ranged from 0.2 to 4.5 cm and height ranged from 0.2 to 3.5 m. Heritability coefficient is underestimated by apomicts. However, apomicts showed the best performer, reaching higher diameter and height class interval. Thus, apomict is an option for natural and artificial selection of fitness individuals.

Introduction

Aspidosperma polyneuron Müll. Arg. is a Neotropical tree with economic and ecological value. The timber has a high quality and that is why these species were intensively exploited in the past, for their wood, presently, it is classified as in danger of extinction by the IUCN Red List of Threatened Species (Version 2015-4). Species with high economic value as *A. polyneuron* increases biological values of forests and has special importance in environmental reforestation and tree improvement programs (Demesure et al. 2000). The species are distributed in Brazilian, Argentina, Bolivia, Colombia, Paraguay, Peru and Venezuela. As an emerging species reaching up to 50 m in height and 390 cm in diameter at breast height (dbh), occupying the canopy of the forest, permitting the establishment of others species, and may live for up to 1,200 years. Reproduction starts between 20 to 30 years of age, when the tree height is higher than 8.6 m and dbh is larger than 10 cm (Carvalho 2003) and seeds producing many extra embryos due to polyembryony (Ramos 2012). This species is facultative apomictic (Chaves et al. 2017, submitted). Apomixis creates descents genetically identical to their mother (clones), through seed originated from embryos derived exclusively from cells of the maternal ovule tissues (Koltunow 1993). This process makes possible the survival of many genotypes, which are vigorous and well adapted to the mother surrounding areas (Stebbins 1950).

Tree improvement programs are based on selection of the best genotypes to be the parents of the next improved generation, resulting in genetic gains like high grow, adaptation, timber quality and resistance to diseases and pest (Namkoong 1979). The success of the selection depends on the genetic variability and genetic control of the interested traits (heritability coefficient) and selection intensity (Namkoong 1979). High genetic variability, heritability and intensity of selection will result in high genetic gains (Falconer and Mackay 1996). Heritabilities are in general estimated in progeny tests, based on seedlings originates from open-pollination or hand pollinations, planted in trials with environmental control (i.e. homogeneous soil, spacing, luminosity, altitude). The heritability of economic growth traits may also be estimated in natural populations, if genetic markers are used to reconstruct the relatedness among the individuals sampled. This will permit us to know the level of genetic control and to make inferences about how natural and artificial selection are affecting these traits. The knowledge of heritability for specific traits, under natural conditions has two-fold interests: First, the

genetic response to the selection or changes in phenotype mean of the traits among generations (Falconer and Mackay 1996); Second, the maintenance of variation makes specific predictions about levels of variation in natural populations (Barker and Thomas 1987).

Height and dbh traits estimated in progeny tests, generally have shown low heritability for many tree species (< 0.5), being affected by genetic variability, age of individuals, environmental and estimate methods (Namkoong 1979; Zobel and Talbert 1984; Eldridge et al. 1993). However, studies of heritability for economic growth traits like height and dbh in natural populations are still lacking, for example, facultative apomictic trees of *A. polyneuron*. Heritability in natural populations can be calculated by covariance between relatedness and phenotypes similarity of quantitative traits (Bessega et al. 2011). Molecular advances have permitted development of techniques to estimate the heritability in natural populations (Mousseau et al. 1998). For example, microsatellite marker has high variability and codominant inheritance, provide a robust distinction to estimate relatedness (Ashley and Down 1994). However, to estimate heritability in natural populations is not an easy task, especially in tropical forest trees due to its complexity, like unknown relatedness, individuals with different ages and the environmental heterogeneity, resulting in different degrees of relatedness and competition, difficulting the estimates (Mousseau et al. 1998). The restriction of this approach has the necessity of significant degree of means and variances of relatedness. Tree species have sedentary life and generally restricted seed dispersal pattern, resulting in intrapopulation spatial genetic structure |(SGS) due to regeneration of near-neighbor to mother, favoring heritability estimates. There are two other factors besides genetic similarity of relatedness that may contribute to the increase of phenotype correlation: i) individuals that share the same environmental conditions can inflate the phenotypic correlation, which is reduced by increasing distance; ii) sharing of inbreeding, combined with inbreeding depression and asexual reproduction (Ritland 1996).

The aim of this research was to estimate heritability of growth traits in juveniles of *A. polyneuron* using microsatellite loci to know the strength of natural selections, the potential of *in situ* genetic improvement. We also aimed to seek trends to heritability coefficient of the height and diameter traits and the influence of apomixis individuals on the traits and estimates.

Materials and Methods

Study area and sampling

The study was carried out in the “Mata dos Godoy” conservation area (23°27' S and 51°15' W, 700 m altitude), located in Northern Paraná State, South of Brazil. This conservation area is one of the last remnants of the Seasonal Semideciduous Atlantic Forest in Paraná State, Brazil. It includes a legally protected area of about 681 ha and it is one of the best preserved forest fragments that have not been subjected to selective logging and any other anthropogenic influences (Torezan et al. 2005). The climate is humid subtropical with hot summers and no defined dry season. The average temperature during the hottest months (December to February) is 28° C, during the coldest months (June to August) the temperature ranges from 16 to 17° C, and annual rainfall ranges from 1400 to 1,600 mm (Köppen 1948). Two plots (P1 and P2) of 0.25 ha (50 x 50 m) were established in the area, where all juvenile individuals found were mapped using GPS (Garmin Colorado 300, Olathe, KS, USA) and leaf tissues are sampled to DNA extraction. Total height (H) and diameter at ground level (dgl) was measured using caliper and tape-measure. Juveniles are not reproductive individuals or with diameter at breast height lower than 10 cm (Carvalho 2003). Study areas of both plots have the same history, but showing differences: P1 is a mature forest with old trees, a closed canopy, and a well-defined understory. P2 was visibly different, mainly because of the large number of lianas and clearings.

DNA extraction and microsatellite analysis

DNA extraction from juvenile samples was carried out using the protocol described by Doyle and Doyle (1990). DNA analyses were based on seven microsatellite loci (Apn20, Apn21, Apn22, Apn23, Apn24, Apn26, and Apn27) developed by Ramos et al. (2011).

Analysis of genetic diversity

The presence of apomictic juvenile individuals was investigated in each plot, using the program CERVUS 3.0 (Kalinowski et al. 2007). The genetic diversity and inbreeding was estimated for unique multilocus genotypes (non-apomictic) in each plot, using the FSTAT software (Goudet 1995). The following indices were calculated: total

number of alleles over all loci (k), observed heterozygosity (H_o), and expected heterozygosity at Hardy-Weinberg equilibrium (H_e). Inbreeding was estimated using the fixation index (F) and statistical significance was tested using Monte Carlo permutations of alleles among individuals and a sequential Bonferroni correction for multiple comparisons (95%, $\alpha= 0.05$).

Classifying intervals for traits

All juveniles were classified in height and dgl intervals, trying to represent all existing classes measured, and frequency distribution was calculated for both apomixis and non-apomixis. Kolmogorov-Smirnov test was used to prove the concordance level between accumulated distribution for a set of sample and an expected theoretical cumulative distribution. The test was implemented in BioEstat 5.0 (Ayres and Ayres 2007).

Analysis of heritability

The heritability estimates were based on juvenile individuals of unknown relationship, probably resulted from different reproductive events. The heritability estimates were carried out between distant juveniles of up to 43 m, the distance was the highest frequency of related juveniles probably located in the plots, as indicated by previous analysis of intrapopulation spatial genetic structure (Chaves et al. 2017, submitted). Pairwise estimates or coancestry showing negative values were excluded from the analyses because of absence of relationship. The heritability was estimated based on the joint measurement of the phenotypic similarity from a quantitative trait of the i -th pair of individuals (Ritland 1996). The traits were transformed using z distribution by:

$$z_i = \frac{(Y_i - U)}{SD},$$

where z_i is the transformed value of trait in the individual i , Y_i is the untransformed value of the trait in individual i , U and SD is the mean and standard deviations of the trait, respectively. The phenotypic similarity (Z_i) for trait i between pairwise individuals was calculated by:

$$Z_i = \frac{(Y_i - U)(Y_i' - U)}{V}$$

where Y_i is the trait value in the first individual and Y_i' is the trait value in the second; V and U are the sample variance and mean of the trait in the population, respectively (Ritland 1996). Heritability coefficient was manually calculated by regression for pairwise differences in traits between juveniles on their pairwise relatedness,

$$h^2 = \frac{C_{Z_i} \theta}{2V\theta}$$

where C_{Z_i} is the sample covariance between phenotypic similarity (Z_i) and pairwise relatedness (θ_{xy}), and V_i is the sample variance of the relatedness among all pairwise individuals (Ritland 1996). We estimated the pairwise relatedness using the coancestry coefficient (θ_{xy}) as describe by Loiselle et al. (1995) and the 95% confidence error interval by Jackknife resampling among loci, implemented in SPAGEDI 1.3 software (Hardy and Vekemans 2002). We opted for Loiselle et al. (1995) estimator of relatedness because our juveniles sampled in P2 present inbreeding (0.399) (Chaves et al. 2017, submitted), and this estimator does not assume Hardy-Weinberg equilibrium. As heritability estimates requires that individuals are related, only pairs of individuals expected to be related, here with the minimum coancestry of 0.1 were used. Following Ismail et al. (2014), we only considered as related individuals when the coancestry was at least 0.1.

Results

We detected that out of the 401 and 166 juveniles sampled in P1 and P2, respectively, 129 and 120 juveniles presented distinct multilocus genotypes. Diameter for both apomictic and no-apomictic individuals ranged from 0.2 to 17 cm, and for relative individuals used in heritability analysis it ranged from 0.2 to 4.5 cm. While the H for overall apomictic individuals ranging from 0.3 cm to 8 m and no-apomixis from 0.25 cm to 8.36 m, however, for the relative individuals the height ranged from 0.2 cm to 3.5 m. Although apomixis stand out in some classes, especially beyond 3 m of H and 3 cm of dgl, the most of individuals were originated from sexual reproduction. The frequency distribution for dgl and H (Figure 1) intervals in apomixis and non-apomixis juveniles have an asymmetric distribution curve, the adherence test of concordance

between distributions were significant ($P < 0.05$); showing difference between distributions.

Excluding apomitics, the total number of alleles (k) and observed heterozygosity (H_o) were higher in plot-1 ($k = 57$, $H_o = 0.483$) than in plot-2 ($k = 45$, $H_o = 0.384$). The expected heterozygosity was similar in plot-1 ($H_e = 0.622$) and in plot-2 ($H_e = 0.644$). The fixation index (F) was significantly greater ($P < 0.05$) than zero for juveniles of the plot-1 (0.223) and plot2 (0.403).

The number of pairwise coancestry comparisons within distance class ranging from 0 to 43 m in both plots was 27,587 in P1 and 4,906 in P2 (Table 1). The mean pairwise coancestry coefficient was similar in P1 (0.253) and P2 (0.255). Heritability to dgl and H were higher in P1 (dgl= 0.266, H= 0.168) than in P2 (dgl= 0.086, H= 0.042). Heritability coefficient increase when apomictic individuals were excluded from analysis in both P1 (dgl= 0.264, H= 0.170) and in P2 (dgl= 0.087, H= 0.050). The dgl trait showed higher genetic control than H.

Discussion

Heritability estimates indicate that dgl and H are under genetic control and despite a low heritability (ranging from 0.042 to 0.226), there is a possibility of change the mean population of these traits by artificial selection. The curve to *A. polyneuron* approaches normal distribution, specially, for dgl (Figure 1), pointing out that great numbers of individuals are in the first classes of regeneration and only a small proportion reaches adult stages. Populational bottleneck occurs over 1 m of H and 1.6 cm of dgl, which it can be related to seedling bank and recruitment to specific environmental conditions. Although mating among facultative apomicts coupled with wide hybridization, increases genetic diversity and the adaptive potential (Hörandl and Paun 2007), apomixis permits a high adaptation to the same environmental conditions of the mother parents and are also unable to avoid unfavorable mutations because recombination and segregation can be absent, which leads to disadvantages for poorly adapted individuals (Koltunow 1993).

Our results showed that the genetic control measured by heritability differed between the traits, being stronger to dgl than H in both plots. Genetic control differs extensively between growth traits in tree populations (Bradshaw and Stettled 1995;

Cornelius 1994). Diameter has been detected in general as more heritable than height (Kremer 1992), like we detected for dgl and H in *A. polyneuron*. The same heritability pattern was seen also in progeny test for *Sorbus torminalis* (dgl= 0.22; H= 0.17) (Tabandeh et al. 2007). However, estimates of heritability in natural populations of the tropical tree *Copaifera langsdorffii*, showed in general for juveniles lower values for dbh (0.03-0.08) than for H (0.07-0.10) (Kubota et al. 2015). Similar result was detected for *Schizolobium parahyba*, where the heritability for dbh ranged from 0.01 to 0.13 and for H ranged from 0.01 to 0.39 (Chinelato et al. 2014). An explanation of 67 articles about heritability estimates for six traits (height, diameter, volume, straightness, morphological/structural and branching traits) in *Pinus* spp., other conifers, *Eucalyptus* spp. and other broadleaf suggested that heritability is usually less than 0.4, frequently ranging from 0.1 to 0.3, or tending to range between weakly to moderate heritability (Cornelius 1994). The evidence is that H and straightness tend to have higher heritability than diameter and volume, but it was seen already as specific species, not a pattern (Cornelius 1994). The heritability for growth traits in *A. polyneuron* is in accordance with the explanation of the studies above.

The heritability for P2 has lower value than P1. The difference between plots probably is result of larger numbers individuals in P1 than in P2, which are adapted specifically to local conditions. The environmental differences between plots, as the presence of lianas and clearings in P2 can be influenced the establishment of individuals, because *A. polyneuron* is a semi heliophile species or shadow tolerant (Carvalho 2003). Considering also that tree growth is a product of genes and environmental interactions, and for every individual this can be different. Even if it is the same genome, environmental conditions are heterogeneous, influencing the heritability. Several non-genetic factors play a dominant role in early growth and can obscure heritable differences, and usually large number of unlinked genes with a small effect on the phenotype control growth (Callaham 1962). The result of this research may also have been influenced by differences in the tree ages, whereas also that most individuals are in first classes or early ages and studies has shown that phenotypic and additive genetic variances increase with age for both diameter and height traits.

The predominance of apomixis in higher classes of traits suggesting the best performance to apomicts, although apomixis underestimated the heritability analysis, because the same genome reduces the covariance for the traits (Table 1). The rate

between apomictic and non-apomictic is more irregular in the early classes (Figure 1). The polyembryony related to the species producing large number of embryos and increasing the concentration of individuals in the first growth classes or the early ages, influencing also the heritability. Emerging species have commonly an irregular structure, due to infrequent recruitment events, flowering asynchrony and clearing dependence to growing development (Killen et al. 1998). The best apomictic genotypes would be potential candidates of seed sources, producing a uniform progeny, building up of large populations with genetically similar individuals (Stebbins 1950), and it is a way of genetic fixation, potentially offering the capability of indefinite multiplication of heterotic genetic combinations (Berthaud 2001).

The heritability is environmentally specific for populations and can be affected by genetical and environmental variation and also by their interaction. Due to that, the heritability may change in same population with plant growing or being different among populations, as we observed between P1 and P2. The low heritability for dgl and H in P2 than P1 is probably originated from the fact that P2 presents a high inbreeding rate and a smaller number of juveniles than P1. A second point is that new alleles that come into the population by way of migration, mutation or variants that contribute to the genetic or environmental variance (Visscher et al. 2008). As seen in the studied area, there is a high probability of long-distance seed and pollen dispersal and migration (Chaves et al. 2017, submitted). Coupled with the point that apomictic are unable to avoid unfavorable mutations (Koltunow 1993), all dynamic factors acting in natural populations, influencing the genetic variation and, consequently the heritability over time and subpopulations of the species in the study plots.

Knowledge of heritability level in local populations allowing prediction of genetic effects of various silvicultural practices involving natural regeneration, management and seed collections (Kremer 1992). The environmental effect is higher than the genetic effect controlling dgl and H in *A. polyneuron*. Then, changes in the mean of trait values of plots by natural or artificial selection presents low potential, especially in P2, where there is high inbreeding and a lower proportion of apomicts. Apomixis favors a selection of individuals with high performance through the establishment of highly adapted individuals, specifically to local conditions and immediate fixation of superior genotypes, creating identical plants independent of the heterozygosity level (Koltunow et al. 1995). Thus, the possibility of superior genotypes

with desirable characteristics increase and the selection of vigorous individuals are possible by analysis of juveniles with a best genotypes performance.

Conclusion

Our study, based on genetic markers and quantitative traits in a natural population showed that the growth traits dgl and H have genetic control, but environmental control is stronger than genetic control. Juveniles presents high genetic control for dgl than for height. Furthermore, the genetic control of the traits is higher in the plot with the highest proportion of apomictic individuals, indicating the importance of such reproduction strategy for population adaptation and survival. Finally, considering the low magnitude of the heritability values, *in situ* genetic breeding or the increase in the means of the studied traits could be due to selection of the highest individuals, but the changes in mean population will be low.

Acknowledgements

Alexandre M. Sebbenn is the recipient of a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Camila L. Chaves would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for PhD funding.

Literature cited

- Ashley MV, Dow BD (1994) The use of microsatellite analysis in population biology: background, methods and potential applications. In: Schierwater BSB, Wagner GP, Desalle R. *Molecular Ecology and Evolution: approaches and Applications*. Birkhauser Verlag. 185–201p.
- Ayres M, Ayres JrM, Ayres DL, Santos AS (2007) *BioEstat*. Versão 5.0, Sociedade Civil Mamirauá, MCT – CNPq, Belém, Pará, Brasil.
- Barker JS, Thomas RH (1987) A quantitative genetic perspective on adaptive evolution. In: Loeschcke V. (ed.). *Genetic constraints on adaptive Evolution*. Springer-Verlag. 3–23p.
- Berthaud J (2001) Apomixis and the management of genetic diversity. In: Savidan Y, Carman JG, Dresselhaus T. *The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering*. El Batán: CIMMYT. 8-23p.

- Bessega C, Saidman BO, Darquier MR, Ewens M, Felker P, Vilarde JC (2011) Accuracy of dominant markers for estimation of relatedness and heritability in an experimental stand of *Prosopis alba* (Leguminosae). *Tree Genetics & Genomes* 7: 103–115.
- Bradshaw HD, Stettled RF (1995) Molecular genetics of growth and development in *Populus*. IV. Mapping QTLs with large effects on growth, form and phenology traits in a forest tree. *Genetics* 139: 963–973.
- Callahan RZ (1962) Geographic variability in growth of forest trees. In: Kozlowski TT. *Tree growth*. Ronald Press Company. 311-325p.
- Carvalho PER (2003) Espécies arbóreas brasileiras. Embrapa Informação Tecnológica e Embrapa Florestas, Brasília, p.1039.
- Chaves CL, Sebbenn AM, Baranoski A, Goetz BD, Gaino APSC, Ruas CF, Ruas PM (2016) Gene dispersal via seeds and pollen and their effects on genetic structure in the facultative-apomictic Neotropical tree species *Aspidosperma polyneuron*. *Tree Genetics & Genomes* (submitted).
- Chinelato FCS, Moraes CB, Carignato A, Tambarussi EV, Zimback L, Palomino EC, Mori ES (2014) Genetic variability in guapuruvu *Schizolobium parahyba* progênies. *Scientia Agropecuaria* 5: 71–76.
- Cornelius J (1994) Heritabilities and additive genetic coefficients of variation in forest trees. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 372–379.
- Demesure B, Guerroue BL, Lucchi G, Part D, Petit RJ (2000) Genetic variability of a scattered temperate forest tree: *Sorbus torminalis*. L. *Annals of Forest Science*. 57:63-71.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Eldridge K, Davidson J, Harwood C, van Wyk G (1993) *Eucalypt domestication and breeding*. Clarendon Press. 288 p.
- Falconer DS, Mackay TFC (1996) *Introduction to quantitative genetics*. Longman. 464p.
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate *F*-statistics. *Heredity* 86:485–486.
- Hardy O, Vekemans X (2002) SPAGEDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* 2:618–620.

- Hörandl E, Paun O (2007) Patterns and sources of genetic diversity in apomictic plants: implications for evolutionary potentials In: *Apomixis: Evolution, Mechanisms and Perspectives*. eds. Horandl E, Grossniklaus U, Van Dijk PJ, Sharbel T. International Association for Plant Taxonomy. 169–194p.
- Ismail SA, Ghazoul J, Ravikanth G, Uma Shaanker R, Kushalappa CG, Kettle CJ (2014) Fragmentation genetics of *Vateria indica*: implications for management of forest genetic resources of an endemic dipterocarp. *Conservation Genetics* 15:533–545.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16:1099–1106.
- Killen, T.J., Jardim, A. Mamani, F. e Rojas, N. 1998. Diversity, composition and structure of a tropical semideciduous forest in the Chaquitanía region of Santa Cruz, Bolivia. *Journal of Tropical Ecology* 14: 803-827.
- Koltunow AM (1993) Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell* 5: 1425-1437.
- Koltunow AM, Bicknell RA, Chaudhury AM (1995) Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology* 108: 1345-1352.
- Köppen W (1948) *Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra*. México: Fondo de Cultura Económica.
- Kremer A (1992) Predictions of age-age correlations of total height based on serial correlations between height increments in Maritime pine (*Pinus pinaster* AIT.). *Theoretical and Applied Genetics* 85: 152–158.
- Kubota TYK, Silva ECB, Moraes MLT, Tarazi R, Sebbenn AM (2015) Herdabilidade em caracteres de crescimento de populações fragmentadas da espécie arbórea *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *Scientia Forestalis* 43: 235–242.
- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82:1420–1425.
- Mousseau TA, Ritland K, Heath DD (1998) A novel method for estimating heritability using molecular markers. *Heredity* 80: 218–224.

- Namkoong G (1979). Introduction to quantitative genetics in forestry. Washington, United States Forest Service, Technical Bulletin, 1588p.
- Ramos R (2012) Sistema de cruzamento, fluxo de pólen e isolamento genético de *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. em um fragmento localizado no interior de São Paulo. PhD Theses. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brazil.
- Ramos RF, Monteiro M, Zucchi MI, Pinheiro JB, Martinez CA, Mestriner MA, Alzete-Marin AL (2011) Microsatellite markers for *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae), an endangered tropical tree species. American Journal of Botany 98:300–302.
- Ritland, K (1996) A marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations. Evolution 50: 1062–1073.
- Stebbins GL (1950) Variation and Evolution in Plants. New York: Columbia University Press.
- Tabandeh A, Tabari M, Nadoushan HM, Espahbodi K (2007) Heritability of SOME Characteristics of *Sorbus torminalis* Seedling. Pakistan Journal of Biological Sciences 10: 2760–2763.
- Torezan JMD, Souza RF, Ruas PM, Ruas CF, Camargo EH, Vanzela ALL (2005) Genetic variability of pre and pos-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). Brazilian Achieves of Biology and Technology 48:171–180.
- Visscher PM, Hill WG, Wray NR (2008) Fundamental concepts in genetics: heritability in the genomics era concepts and misconceptions. Nature Reviews Genetics 9: 255–266.
- Zobel B, Talbert J (1984) Applied forest tree improvement. New York: John Wiley. 505p.

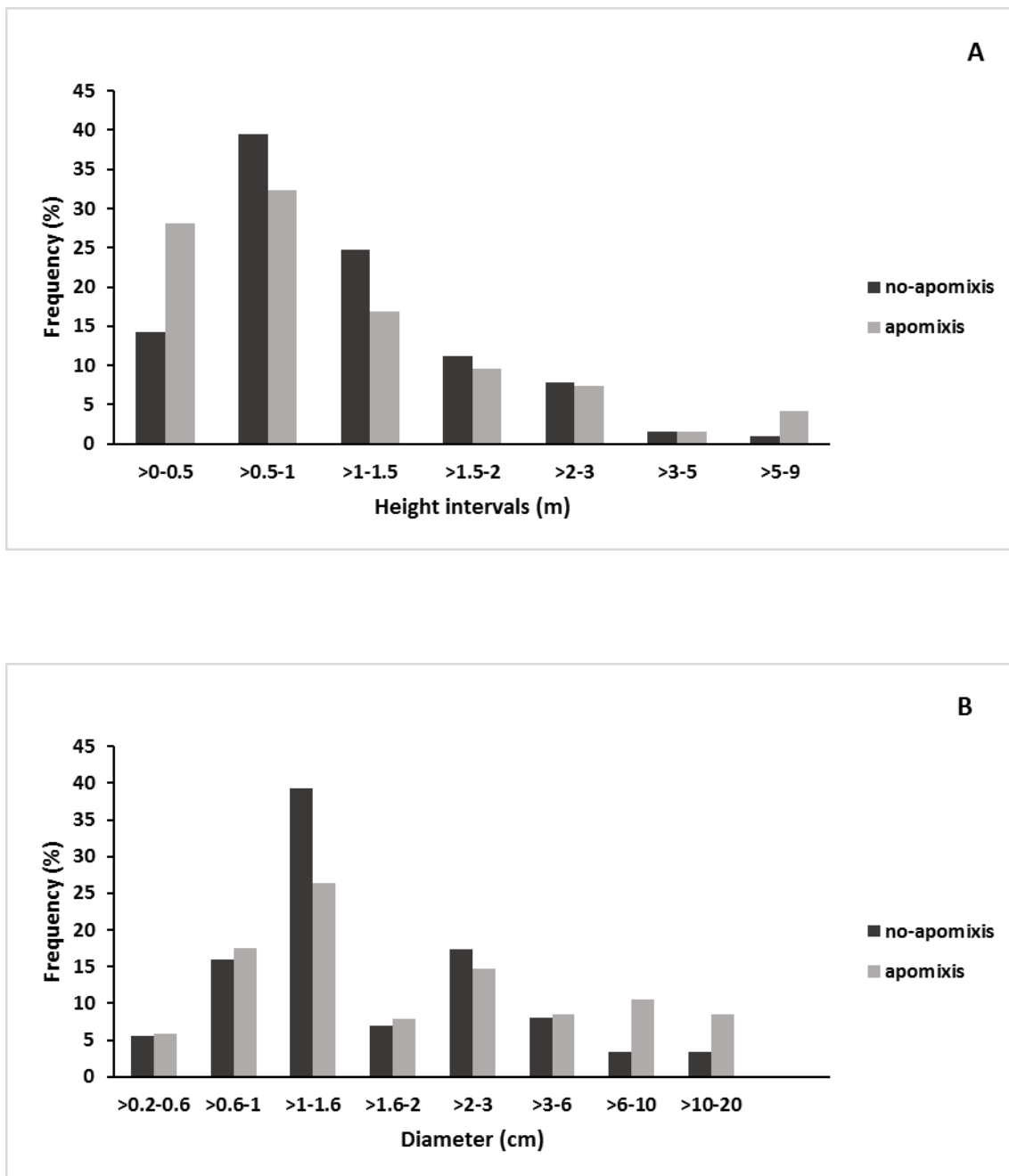


Figure 1. Frequency distribution of non-apomictic and apomictic individuals of *Aspidosperma polyneuron* in different class intervals for height (A) and diameter at ground level (B).

Table 1. Estimates of heritability coefficient (h^2) for juveniles of *Aspidosperma polyneuron* distant until 43 m to the traits diameter at ground level (dgl) and total height (H) in the plots (P1 and P2).

Trait	NP	θ (95% CI)	h_A^2	h_B^2
P1: rcd	27587	0.253 (0.251-0.255)	0.266	0.264
P1: H	27587	0.253 (0.251-0.255)	0.168	0.170
P2: rcd	4906	0.255 (0.251-0.260)	0.086	0.087
P2: H	4906	0.255 (0.251-0.260)	0.042	0.050

CI is the 95% confidence interval; NP is the number of pairwise individuals used to estimates; θ is the mean coancestry coefficient; h_A^2 and h_B^2 are the heritability calculated with all individuals (apomictic and no-apomictic) and without apomictic individuals, respectively.

ARTIGO 5.0

Title: Verifying the geographic origin of *Hymenaea courbaril* L. timber from different countries and forest concessions using chloroplast and nuclear DNA gene markers

Authors: CL Chaves^a, B Degen^{b*}, B Pakull^b, M Mader^b, E. Honorio^c, P Ruas^d, N. Tyskland^e, AM Sebbenn^f

Addresses:

^a State University of Londrina, Agronomy Department, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 km 380, Campus Universitário, C.P. 10011, CEP 86057970, Londrina, PR, Brazil.

^b Thünen Institut für Forstgenetik, Sieker Landstrasse 2, D-22927, Grosshansdorf, Germany

^c Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), Av. José A. Quiñones km 2.5, Iquitos, Peru

^d State University of Londrina, Department of Biology, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 km 380, Campus Universitário, C.P. 10011, CEP 86057970, Londrina, PR, Brazil.

^e INRA - UMR 0745 ECOFOG "Ecologie des Forêts de Guyane" Campus agronomique, Avenue de France, BP 709 - 97387 KOUROU Cedex, French Guiana

^f Instituto Florestal de São Paulo, CP 1322, São Paulo, SP, 01059-970, Brazil;

*Corresponding author: Bernd Degen, Thünen Institut für Forstgenetik, Sieker Landstrasse 2, D-22927, Grosshansdorf, Germany; Phone +49-(0)4102696101, bernd.degen@thuenen.de

Keywords: illegal logging, forensics, microsatellites, timber tracking, tropical trees, SNPs.

Running title: DNA fingerprinting for *Hymenaea* spp. origin control

Abstract

Deforestation - reinforced by illegal logging - is a serious problem in many tropical regions and causes pervasive environmental and economic damage. Existing laws which intend to reduce illegal logging need efficient, fraud resistant control methods. We developed a genetic reference database for *Hymenaea courbaril*, an important, high value timber species from the Neotropics. The data set can be used for controls on declarations of wood origin. Samples from 318 *Hymenaea* trees from 12 populations in Brazil, Bolivia, Peru and French Guiana have been collected and genotyped on ten nuclear microsatellites, 33 chloroplast SNPs and one chloroplast indel marker. The chloroplast gene markers have been developed using next generation DNA sequencing techniques. Using self-assignment tests, the power of the genetic reference data to judge on declarations on the population and country of origin has been tested. We observed a strong genetic differentiation among populations and countries leading to high and reliable self-assignment rates for the country of origin between 89 to 100% (average of 96%) and for the population of origin between 50 to 100% (average of 89%). Our results show that the nuclear and chloroplast gene markers are effective and reliable to be used for a genetic certification system and can provide Brazilian and international authorities with an effective and reliable tool for controlling the legality of timber.

1. Introduction

Illegal logging significantly contributes to deforestation, biodiversity loss and economic problems [http://wwf.panda.org/about_our_earth/deforestation/deforestation_causes/illegal_logging/]. Illegally traded timber creates extremely low-priced products, which destabilize legal markets (Gray 2002), and lead to losses in profits of around 30 to 100 billion dollars per year. Between 50 to 90% of the timber from tropical forests in the Amazon Basin, Central Africa, South-East Asia, and from temperate and boreal forests of the Russian Federation are estimated to be illegal. Such illegal timber corresponds to five million hectares or more than 100 million m³ of illegal timber per year (Lawson & MacFaul 2010). In Brazil, illegal logging is a multidimensional problem, due to widespread corruption and fraud in the forest sector. In 2013, about 75% of timber harvested from natural forest originated from illegal logging (Chatham House 2015).

One of the most valuable, intensely harvested, traded, and probably most impacted group of timber species in the Amazon tropical forest of Brazil is the genus *Hymenaea* L. (Lacerda et al. 2008b). *Hymenaea* wood is used in furniture and flooring. The bark and resin are harvested as drug for various diseases as well as an essential ingredient of traditional Amazonian/Guianese alcoholic drinks. Moreover, the resin can be used as varnish, fuel, incense, and for waterproofing purposes.

Hymenaea courbaril and related species are intensely harvested for timber production because of its high quality timber and large dimensions, with individual trees reaching heights greater than 50 m and dbh-values (diameter at breast height) of over 3 m (Lacerda et al. 2008a). In the Brazilian Amazon usually during logging operations up to 90% of all *H. courbaril* trees above 50 cm of dbh are harvested (Sebbenn et al. 2008; Lacerda et al. 2013), and other similar species of the genus (*H. parvifolia*, *H. oblongifolia*, *H. intermedia* and *H. reticulate*) are logged and traded under the name *H. courbaril* (Melo & Mendes 2005). In 2003, *H. courbaril* represented 4% of all traded timber from the Amazon region. It represents one of the most lucrative species for export and FSC-certified *Hymenaea* wood was traded in 2008 for prices around 850 €/m³ (<http://www.sisflor.org.br/download/boletim01.pdf>). US imports of *H. courbaril* wood exceeded \$40 million in 2008 (www.fas.usda.gov/ustrade).

In the meantime several laws and regulations such as the EU timber regulation, the US Lacey act and the Australian prohibition bill have been enacted in order to reduce the amount of illegally timber imported into the EU, US and Australia (Lowe et al. 2016).

In Brazil, the forest management is addressed by law since 1965 (Brazilian Forest Code 4.771/1965, article 14), however only in 1995 it was regulated (Pereira et al. 2010). Certification policies have been implemented since 1994 by the Forest Stewardship Council International (FSC).

However, illegal activities can occur at all operating stages, i.e. the logging, certification process, transport, processing, and export of timber products. Local government policies are responsible for approving and monitoring the forest management practices and timber trade in Latin America. But inconsistencies among countries in forest management policies, impractical laws, and insufficient institutional capacity to enforce them, mean that in some countries illegal logging practices exceed legally permitted forest activities (<http://www.tft-earth.org/wp-content/uploads/2013/02/The-Timber-Trade-Action-Plan-Project-2005-2013-Eng1.pdf>). Therefore, efficient and accurate methods to verify and confirm the reported timber species and origin are necessary, to reduce the import of illegally sourced timber and strengthen legal timber trade and the cooperation between producer and consumer countries (Dormontt et al. 2015).

Timber tracking methods based only on documentation are sensitive to manipulation and forging. Forest management plans, operation licenses, and the volume and declaration of transported cargo cannot be controlled thoroughly, and also liable manipulation (Fanzeres 2014). The use of wood anatomical, isotopic, and spectrometric methods is limited due to variations in tissue type, age or environmental influences on wood composition (Pe et al. 1997; Durand et al. 1999; Tnah et al. 2009).

DNA is a fundamental part of life and thus, also present in wood. DNA based methods have successfully been applied to identify tree species (Höltken et al. 2012) , to track the country of origin (Degen et al. 2013), to verify the forest concession from which it was issued (Jolivet & Degen 2012) and to track individual trees (Lowe et al. 2010). Thus, molecular methods that allow correct identification of tree species and the

tracking of timber origin are essential for controls on the legality of timber by public authorities, industry and trading companies (Lowe et al. 2016).

Due to their small size, single nucleotide polymorphisms (SNPs), are the best types of gene markers to be used on degraded DNA, such as that present inside timber. SNPs can be developed for chloroplast (cpDNA), mitochondrial (mtDNA) and nuclear DNA (Pakull et al. 2016).

Chloroplast (cp) genomes are maternally inherited in most angiosperms, they show low mutation and recombination rates. Therefore, the intraspecific genetic variation of cpDNA is lower than interspecific variation, allowing species identification based on cpDNA markers. Moreover, these characteristics lead to the fact that concerning the intraspecific variation, cpDNA markers are geographically more structured than nuclear DNA markers (Nielsen & Kjær 2008), though at small geographical scales the variation of cpDNA markers might be too low for individual identification (Jolivet & Degen 2012). In these cases, nuclear DNA markers can be used for population assignment (Degen et al. 2013) or DNA fingerprinting of individual trees to track them (Tnah et al. 2009).

In this study, we have used both chloroplast and nuclear DNA gene markers, to create a genetic reference database to control the population and country of origin for the high value timber species *H. courbaril*.

2. Materials and methods

2.1. Study species

The genus *Hymenaea* is a pantropical genus of the legume family and includes 16 described species. *Hymenaea courbaril* is a tropical tree species with a wide distribution area, occurring naturally from Southern Brazil up to Mexico, including the Antilles (Lacerda et al. 2008b; Souza et al. 2014). Flowering occurs when the tree reaches a diameter at breast height (dbh) of 50 cm (Lacerda et al. 2008b). The hermaphroditic flowers are pollinated by bats (Maués 2006). A self-incompatibility system has been observed (Gibbs et al. 1999). For that reason, reproduction occurs by outcrossing, but deviations from random mating, caused by mating among relatives, have been observed (Dunphy et al. 2004; Lacerda et al. 2008a; Carneiro et al. 2011). A small proportion of

seeds are dispersed on long distances by vertebrates, but the majority of fruits remain close to the mother trees (Bawa 1974; Justiniano & Fredericksen 2000; Lacerda et al. 2008a). The high proportion of seeds remaining near to mother trees is thought to be the reason for small scale spatial genetic structure detected for up to 400 m (Lacerda et al. 2008b). Generally, *H. courbaril* shows low population density (< 1 tree/ha) and slow growth rate. Tree size varies widely and has been directly related to occupied habitat; in tropical forest individuals reach heights up to 65 m, while in savannahs and semi-arid forests the mature trees might grow up to a height of a few meters only.

2.2. Sampling

Cambium or leave samples from adult trees were collected and the GPS coordinates of all sampled trees were recorded. In total 318 individuals trees from 12 populations in the four countries Bolivia, Brazil, French Guiana and Peru were sampled (table 1, figure 1). The minimum sample size per population was 20 individuals. After sampling, all collected plant material was stored and dried in silica gel. All samples were registered in a database at the Thünen Institute (SampleDataBase, Grosshansdorf, Germany).

No.	Aberration name	Name of the population	Country	Lon	Lat	N
1	Cobija	Cobija, Camino a Porvenir	Bolivia	-11.391	-69.051	26
2	Rurrenabaque	Rurrenabaque, El Paraiso	Bolivia	-14.143	-67.890	29
3	Esec_Macaraca	ESEC DE MARACÃ	Brazil	3.365	-61.435	26
4	Flona Amapa	Flona Amapa	Brazil	0.735	-51.388	21
5	Flona_de_Tapajos	Plona de Tapajos	Brazil	-2.866	-54.918	21
6	Flona_do_Jamari	Área - AMATA - Flona do Jamari	Brazil	-9.390	-62.923	34
7	Resex_Tapajos	Resex Tapajos - Arapins	Brazil	-3.078	-55.277	30
8	Xapuri_Acre	Resex Chico Mendes - Xapuri	Brazil	-10.521	-68.606	23
9	Awala	Awala	French Guiana	5.745	-53.935	20
10	Guatemala	Guatemala	French Guiana	5.117	-52.616	32
11	Iracoubo	Iracoubo	French Guiana	5.426	-53.079	26
12	Jenaro_Herrera_R C	Dpto. Loreto, Dist. Jenaro Herrera	Peru	-4.900	-73.646	30

Table 1: Information on the sampled of *Hymenaea courbaril* populations (Lon = longitude, Lat = latitude, N= sample size)

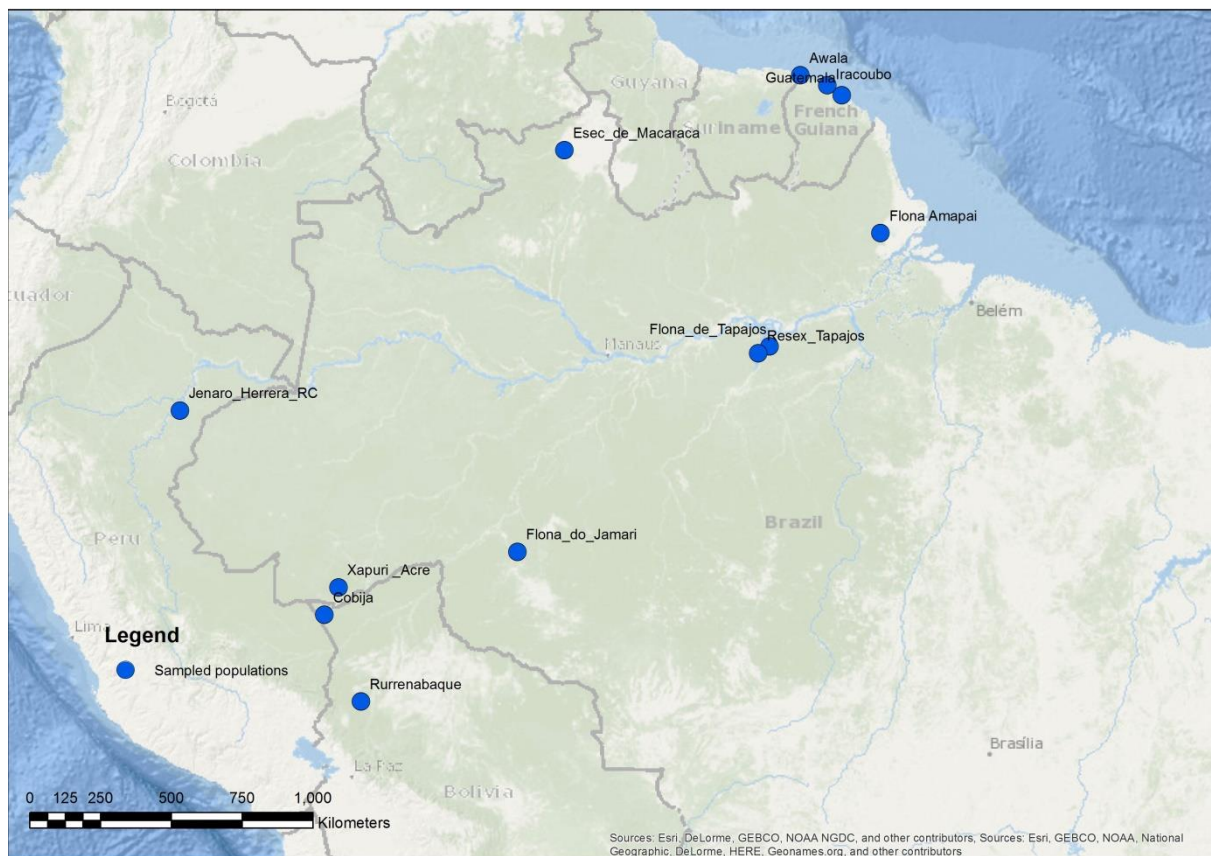


Figure 1: Map showing the geographic localization of the sampled *Hymenaea courbaril* populations

2.3. DNA extraction

DNA extraction was carried out in three laboratories: Thünen Institute of Forest Genetics, Grosshansdorf, Germany; LGPS II- Genetic Population and Sylviculture Laboratory, Universidade do Estado de São Paulo, Ilha Solteira, Brazil; and IIAP- Peruvian Amazon Research Institute, Iquitos, Peru. Total genomic DNA was extracted from leaves and cambium using a modified version of the ATMAB standard protocol (Dumolin et al. 1995). DNA quality and integrity were evaluated on 1% agarose gel electrophoresis with 1x TAE as running buffer (Sambrook et al. 1989), stained with Roti[®]-GelStain (Roth, Karlsruhe, Germany) and visualized by UV illumination. DNA concentration was measured using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Samples with good DNA quantity and quality on were further quantified with a Qubit[®] 3.0 Fluorometer (Invitrogen, USA).

2.4. Gene marker development

Chloroplast SNP identification was based on low coverage MiSeq genome sequencing (Straub et al. 2012). A total of ten individuals/samples of *H. courbaril* sampled from French Guiana (Guatemala (2 individuals) and Iracoubo), Honduras (Comayagua), Brazil (Parauapebas and Amazonas) and Bolivia (Cobija (2 individuals) and Rurrenabaque (2 individuals)) were used for sequencing. These individuals were chosen based on high DNA quality and quantity and their different countries and regions of origin. To eliminate misidentified individuals from other species, parts of the *rbcL* and *tRNA^{Leu}* genes (primers: *rbcL_Hymenaea_for*: “actcctgactatgaaaccaaagatactg”, *rbcL_Hymenaea_rev*: “cttcaaaaaggtctaagggataagctac”; *tRNA^{Leu}_Hymenaea_for*: “cagagaaaccctggaattaacaatgggc”; *tRNA^{Leu}_Hymenaea_rev*: “gtattgacatgtggagcgggactctatc”) were PCR amplified from all chosen individuals and Sanger sequenced (StarSeq, Mainz, Germany) following standard protocols.

Library generation and sequencing on the Illumina MiSeq v3 (2x300bp paired-end reads) was done by Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany). All ten individuals were sequenced on a single flow cell. CLC Genomics Workbench (v8.5.1; CLC bio, Aarhus, Denmark) was used for data processing. An individual from Iracoubo in French Guiana (HYCOU_12_2) was selected as reference individual. Chloroplast contigs were identified by selection of contigs with high/medium read coverage and subsequent blast

verification, resulting in 12 chloroplast reference contigs with a total length of 133,768bp. Trimmed reads of each individual were mapped to the reference contigs and SNPs/Indels were called using basic variant detection.

A total of 290 SNPs and Indels were identified in the *H. coubaril* chloroplast genome. 34 of these were selected for further analysis, due to the following criteria: no other SNP present within at least 50bp on both sides of a selected SNP, sufficient sequence coverage and different patterns of allele distribution within the different individuals used for sequencing.

These 34 markers were used for a MassARRAY®iPLEX™ based screening of the 318 individuals, listed under 2.2.

2.6. SSR analyses

Microsatellite analysis was carried out using ten microsatellite loci: Hc_14, Hc_17, Hc_33, Hc_40 (Ciampi et al. 2008); and Hym_2, Hym_3, Hym_4, Hym_5, Hym_6 and Hym_7 (Buonamici et al. 2008). Forward primers were labelled with different fluorescent dyes. PCR reactions were carried out using standard PCR conditions. Primer labels, reagent concentrations, and annealing temperatures are given in table 2. The markers Hym_2, Hym_3, Hym_5, Hym_6 and Hym_7 were amplified in a multiplex-PCR. PCR products were analysed on an ABI Prism 3730 sequencer (Applied Biosciences/Thermo Fisher, Darmstadt, Germany). Fragment were sized in GeneMarker 2.6.4 software (Soft Genetics LLC).

Marker	Labeling dye	Annealing temp	Primer concentration
HC_14	VIC	58°C	0.3 µM
HC_17	PET	55°C	0.3 µM
HC_33	NED	55°C	0.4 µM
HC_40	NED	50°C	0.1 µM
Hym_2	VIC	50°C	0.2 µM
Hym_3	NED	50°C	0.2 µM
Hym_4	PET	50°C	0.2 µM
Hym_5	6-FAM	50°C	0.3 µM
Hym_6	PET	50°C	0.2 µM
Hym_7	NED	50°C	0.2 µM

Table 2: Information on the nuclear microsatellites for *Hymenaea courbaril*

2.7. Data analysis

Genetic diversity / heterozygosity

As a measure for genetic diversity (effective number of alleles), we computed the mean allelic diversity v of each population and country (Gregorius 1987). The mean fixation index F_{IS} within each population or country (Wright 1978), was calculated as an indicator for the departure from Hardy-Weinberg expectations.

Genetic differentiation

Based on gene pool distances, the complementary compositional differentiation δ among the gene pools of the groups has been computed, defined as the mean gene pool distance between each group (population / country) G_r and its complement \overline{G}_r , where \overline{G}_r consists of all individuals that do not belong to group r (Gregorius 1987).

For comparison, we also calculated the commonly used Wright's F_{ST} (Wright 1978) which is a measure of fixation (monomorphism) and not of the difference among groups (Gregorius et al. 2007).

Genetic assignment

We used three different methods to assign individual to its population and country of origin: a) a Frequency method (Cornuet et al. 1999), b) a Bayesian method (Rannala &

Mountain 1997), and a recently developed nearest neighbour classification (Degen et al. 2017). The first two methods are based on the estimation of allele / haplotype frequencies in each of the alternative groups (populations or countries). The new nearest neighbour approach is based on the genetic distance between individuals and assigns an individual to that population or country with the highest proportion of genetically most similar individuals (nearest neighbours). This method is less sensitive to overlapping sources of genetic differentiation among the groups (populations or countries), such as genic differences among closely-related species, phylogeographic lineages, and isolation by distance, and thus operates better even for suboptimal grouping of individuals. For the individual assignment we used the 10 nuclear microsatellites and we aggregated the cpDNA markers to multilocus haplotypes.

As an indicator of the performance of our genetic reference data, we computed the proportion of correctly assigned individuals in self-assignments tests (Cornuet et al. 1999). Here the individuals of the reference data were self-classified to the sampled groups (populations and countries) using the leave-one-out approach (Efron 1983). For the frequency and the Bayesian approaches, we applied the self-assignment routine implemented in the program GeneClass 2.0 (Piry et al. 2004). For the nearest neighbour approach we used the program GeoAssign (Degen et al. 2017).

3. Results

3.1 Genetic diversity and genetic differentiation

The effective number of alleles per locus and population (v) was relative small and varied from 1.46 to 8.16 for the nSSRs (table 3). At some loci (HC_40, HC_14, HC_33) we detected a strong excess of homozygotes compared to Hardy-Weinberg-Proportions, shown by a high and positive fixation index (F_{IS}). The allele variation of the 34 cp-gene markers led to the detection of 14 different multilocus haplotypes. The population fixation (F_{ST}) and genetic differentiation (δ) was quite high (table 3). The highest F_{ST} and δ was observed for the cp-haplotypes. For some of the cp-haplotypes (H1, H3, H4) there is a clear spatial structure, whereas other cp-haplotypes (H13, H14) did not show any clear structure (figure 2).

Locus	%_Data	V	F_{IS}	F_{ST}	Δ
HC_40	82.66	4.875	0.225	0.215	0.597
HC_14	95.77	2.065	0.462	0.337	0.402
HC_17	88.46	4.243	0.093	0.180	0.552
HC_33	96.37	1.463	0.733	0.598	0.464
Hym_5	89.86	8.169	0.177	0.113	0.743
Hym_2	93.38	3.323	0.070	0.155	0.429
Hym_7	97.33	1.613	0.097	0.199	0.221
Hym_3	95.53	4.808	0.101	0.191	0.575
Hym_4	95.24	2.526	0.177	0.310	0.545
Hym_6	92.74	3.584	-0.011	0.143	0.423
cp_haplotypes	97.03	1.724		0.608	0.850

Table 3: Proportion of complete genotypes (%_Data), effective number of alleles/haplotypes (v), fixation index within populations (F_{IS}), population Fixation (F_{ST}) and genetic differentiation among all populations (δ), using nuclear and chloroplastial DNA in *Hymenaea courbaril* species.

3.2 Genetic assignment

The three different assignment methods provided quite similar, high self-assignment percentages of on average 88%, 89% and 90% correct assigned individuals for each population (table 4). The success rate was depending on the assignment method. In 7-8 out of 12 populations it reached values of 90% and better. Relative weak values with 65% or less were observed for the population “Awala” in French Guiana. For the population “Flona Amapa” which showed a relative high fixation index (F_{IS}), the nearest neighbours approach led to significant higher self-assignment rates compared to the other two methods.

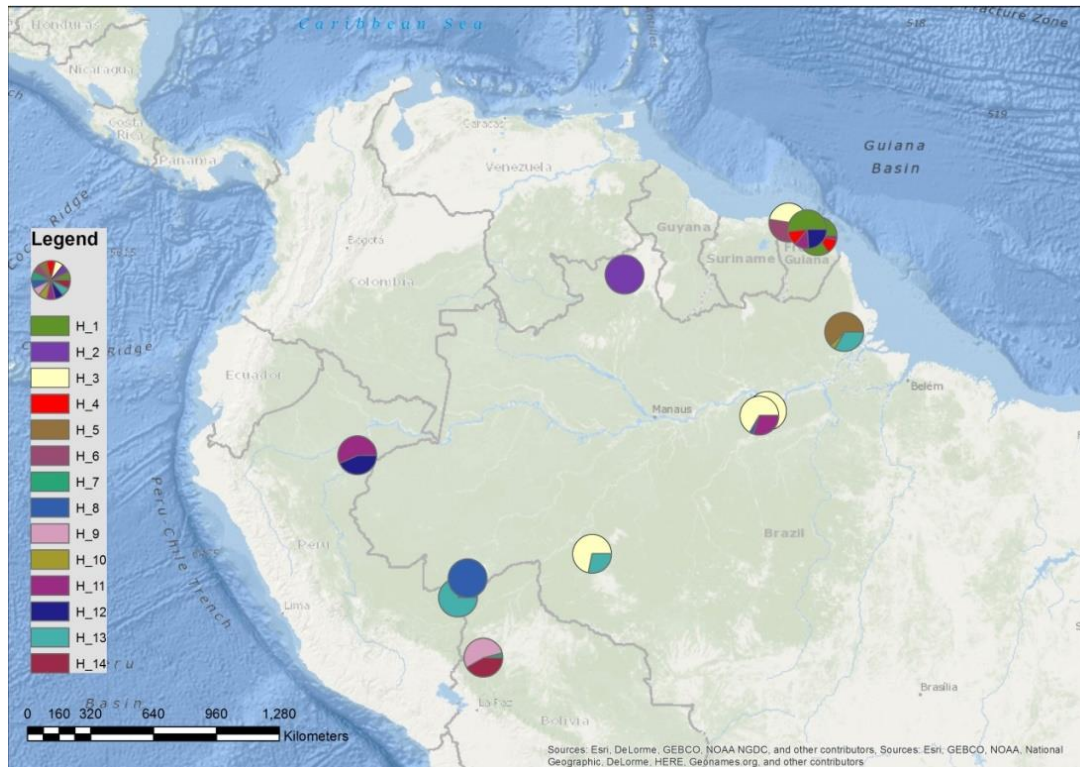


Figure 2: Spatial distribution of cp-haplotypes for *Hymenaea courbaril*

Population	F_{IS} (nSSRs)	δ (all loci)	Correct assigned individuals (%)		
			Bayesian method	Frequency method	Nearest neighbours (P=1)
Cobija	0.194	0.631	88	88	81
Rurrenabaque	0.133	0.499	96	100	100
Xapuri_Acre	0.129	0.535	100	100	95
Flona_do_Jamari	0.481	0.477	75	75	75
Flona_Amapa	0.300	0.512	86	86	95
Flona_de_Tapajos	-0.007	0.623	100	100	100
Resex_Tapajos	0.204	0.538	100	100	93
Awala	0.239	0.415	56	63	50
Guatemala	0.100	0.487	81	81	81
Iracoubo	0.051	0.477	92	92	84
Jenaro_Herrera_RC	0.056	0.501	93	93	100
Esec_de_Macaraca	0.150	0.633	100	100	100
Mean	0.169	0.527	89	90	88

Table 4: Results of the self-assignment tests to *Hymenaea courbaril* populations of origin, for all individuals with at least 80% data availability, information on the mean fixation index (F_{IS}) and genetic differentiation (δ).

Even better success rates were observed for the self-assignment tests, when working with the data aggregated on the country level (table 5). Here, average success percentages varied between 96 and 97%. All samples were correctly assigned with all three methods in French Guiana and Peru. Values of around 90% were observed for Brazil. There was a negative correlation of the assignment success with the inbreeding coefficient (F_{IS}) and a positive correlation with the genetic differentiation (δ).

Country	F_{IS} (nSSRs)	δ (all loci)	Correct assigned individuals (%)		
			Bayesian method	Frequency method	Nearest neighbours (P=1)
Bolivia	0.331	0.501	96	96	92
Brazil	0.386	0.446	90	89	91
French Guiana	0.144	0.520	100	100	100
Peru	0.150	0.622	100	100	100
Mean	0.253	0.522	97	96	96

Table 5: Results of the self-assignment tests for country of origin for all *Hymenaea courbaril* individuals with at least 80% data availability, information on the mean fixation index (F_{IS}) and genetic differentiation (δ).

4. Discussion

4.1 Diversity, heterozygosity and genetic differentiation

A significant intraspecific variability is necessary to verify the geographic origin of individuals, low variability is a factor that can limit the discriminating power to differentiate between populations (Tnah et al. 2009). Our study displayed moderate levels of genetic diversity for *H. courbaril*, although there is an excess of homozygotes. Similar levels of genetic diversity were also found in others studies for *H. courbaril* var. *stilbocarpa*, *H. courbaril* var. *courbaril* and *H. stigonocarpa* from Brazil and Panamá

(Lacerda et al. 2008a; Ramos et al. 2009). The observed excess of homozygotes varied quite strong among loci, populations, and countries. Variation in homozygosity levels among different loci can be explained by different levels of null alleles or by the Wahlund-effect (Wahlund 1928). Variation in homozygosity levels among different populations and countries could be explained by different levels of inbreeding or sub-population structure (Wahlund-effect).

Moreover, the extend of genetic differentiation among the different groups (sampling locations, countries) is very important for the success of genetic assignment (Ogden & Linacre 2015). For both types of loci (nSSRs, cpSNPs), we found strong and significant genetic differentiation among populations (nSSRs: F_{ST} = 0.11-0.59; δ =0.221-0.74; cp-haplotypes: F_{ST} = 0.60, δ =0.85). The values were a bit smaller for the genetic differentiation among countries, but still very high. For other tropical tree species smaller values for genetic differentiation among populations were found for nuclear microsatellites (e.g. *Entandrophragma cylindricum* F_{ST} = 0.053 (Jolivet & Degen 2012)).

4.2 Genetic structure at cp-haplotypes

We found a total of 14 different cp-haplotypes and strong and significant genetic differentiation among populations. Only three out of 12 populations were fixed to a single cp-haplotype.

Another phylogeographic study for *H. courbaril* var. *stilbocarpa* found a total of 18 haplotypes. Thirteen of these haplotypes were present in one population exclusively (Ramos et al. 2009). Together with individuals from other species of the same genus (*H. stigonocarpa*, *H. aurea* and *H. reticulata*), the authors identified a total of 40 haplotypes. Moreover, they found that *H. courbaril* var. *stilbocarpa* and *H. stigonocarpa* show very similar genetic haplotype networks. It was suggested that *H. courbaril*, *H. stigonocarpa* and *H. martiana* constitute a monophyletic group in which *H. courbaril* corresponded to the parental genetic stock (Lee & Langenheim 1975, de Sa Dechoum 2004). Possible misidentifications in the field mean that we cannot exclude that we may have a mixture of different *Hymenaea* species in our reference sample collection. Nevertheless, this did not influence the success of the geographic

assignments. Especially the new assignment method of nearest neighbours is robust against biases due to species mixtures (Degen et al. 2017).

4.3 Genetic assignment and practical application

The analysis of the presented genetic reference data led to relatively high success rates for self-assignment tests on the level of population (89% on average) or country of origin (96% on average). For *Swietenia macrophylla* Degen et al. (2013), working with a nSSR-data set, found assignment percentages of 82% at the country level and 71% at the population level. Working with SNP data of *Entandrophragma cylindricum* (Sapelli), the assignment percentages on country level varied between 66% to 74% , depending on the assignment method (Degen et al. 2017). For *Quercus robur* (pedunculate oak) in Germany the assignment success at population level was 65%, based on nSSR data (Degen et al. 2010). Compared to these assignment reference databases, the *Hymenaea* reference database presented here, represents a robust assignment tool available to timber companies or governmental agencies to test and validate origin declarations. It would be desirable for the timber sector to add such genetic controls as an independent audit on top of paper-based proofs of the chain of custody (Lowe et al. 2016).

5. Outlook

The results presented here are part of the activities carried out within an international cooperative project on the development of genetic reference databases for timber tracking of tropical trees (LargeScale project: <https://www.thuenen.de/en/fg/projects/current-projects/largescale/>). As part of the LargeScale project, we have carried out sampling of more than 800 *Hymenaea* individuals in various additional sampling locations. Similar to other studies looking at different *Khaya* species in Africa (Pakull et al. 2016), we are currently screening a large set of nuclear SNPs for *Hymenaea*. In doing so, we expect to create an even more comprehensive genetic database, enabling geographic tracking at a continental level based on genetic markers. Compared to nuclear SSRs, smaller nuclear SNPs are less sensitive to amplification failure due to DNA degradation in wood. Moreover, we are collecting morphologically described material from six different *Hymenaea* species in Brazil. These samples will be analysed using the same gene marker set, which will

hopefully help to get more insights into the taxonomical situation in the genus *Hymenaea*.

6. Acknowledgements

The German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) that supported the work and Brazilian Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for PhD funding. We thank Vivian Kuhlenkamp, Maike Paulini and Susanne Bein for their excellent technical assistance.

Reference

- Bawa KS (1974) Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution*, 85-92.
- Buonamici A, Cavers S, Vendramin G (2008) Microsatellite loci isolated from the tropical tree *Hymenaea courbaril* L.(Fabaceae). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1020-1022.
- Carneiro F, Lacerda A, Lemes M, Gribel R, Kanashiro M, Wadt L, Sebbenn A (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.
- Chatham House Report (2015) Tackling Illegal Logging and the Related Trade What Progress and Where Next?. Available at ISBN 978 1 78413 065 7.
- Ciampi A, Azevedo V, Gaiotto F, Ramos A, Lovato M (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.
- Cornuet J-M, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M (1999) New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, 153, 1989-2000.
- de Sa Dechoum M (2004) Crescimento inicial, alocação de recursos e fotossíntese em plantas das espécies vicariantes: *Hymenaea courbaril* var *stilbocarpa* (Hayne)

Lee & Lang.(jatoba) e *Hymenaea stigonocarpa* Mart.(jatoba-do-cerrado)(Leguminosae-Caesalpinioideae).

- Degen B, Blanc-Jolivet C, Stierand K, Gillet E (2017) A nearest neighbour approach by genetic distance to the assignment of individual trees to geographic origin. *Forensic Science International: Genetics*, 27, 132-141.
- Degen B, Hoeltken A, Rogge M (2010) Use of DNA-Fingerprints to Control the Origin of Forest Reproductive Material. *Silvae Genetica*, 59, 268-273.
- Degen B, Ward S, Lemes M, Navarro C, Cavers S, Sebbenn A (2013) Verifying the geographic origin of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) with DNA-fingerprints. *Forensic Science International: Genetics*, 7, 55-62.
- Dormontt EE, Boner M, Braun B, Breulmann G, Degen B, Espinoza E, Gardner S, Guillery P, Hermanson JC, Koch G, Lee SL, Kanashiro M, Rimbawanto A, Thomas D, Wiedenhoef AC, Yin YF, Zahnen J, Lowe AJ (2015) Forensic timber identification: It's time to integrate disciplines to combat illegal logging. *Biological Conservation*, 191, 790-798.
- Dumolin S, Demesure B, Petit R (1995) Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics*, 91, 1253-1256.
- 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.
- Durand SR, Shelley PH, Antweiler RC, Taylor HE (1999) Trees, chemistry, and prehistory in the American Southwest. *Journal of Archaeological Science*, 26, 185-203.
- Efron B (1983) Estimating the error rate of a prediction rule: improvement on cross-validation. *Journal of the American Statistical Association*, 78, 316-331.
- Fanzeres A (2014) Elementos, dados e fatos para análise da Governança Florestal e situação da produção e comércio de madeira legal no Brasil. TRAFFIC, Cambridge.
- Gibbs PE, Oliveira PE, Bianchi MB (1999) Postzygotic control of selfing in *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae-Caesalpinioideae), a bat-pollinated tree of the Brazilian cerrados. *International Journal of Plant Sciences*, 160, 72-78.

- Gray JA (2002) Forest concession policies and revenue systems: country experience and policy changes for sustainable tropical forestry. World Bank Publications.
- Gregorius H-R (1987) The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation. *Theoretical and Applied Genetics*, 74, 397-401.
- Gregorius H, Degen B, König A (2007) Problems in the Analysis of Genetic Differentiation Among Populations--A Case Study in *Quercus robur*. *Silvae Genetica*, 56, 190-199.
- Höltken AM, Schröder H, Wischniewski N, Degen B, Magel E, Fladung M (2012) Development of DNA-based methods to identify CITES-protected timber species: a case study in the Meliaceae family. *Holzforschung*, 66, 97-104.
- Jolivet C, Degen B (2012) Use of DNA fingerprints to control the origin of sapelli timber (*Entandrophragma cylindricum*) at the forest concession level in Cameroon. *Forensic Science International-Genetics*, 6, 487-493.
- Justiniano MJ, Fredericksen TS (2000) Phenology of tree species in Bolivian dry forests. *Biotropica*, 32, 276-281.
- 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 EA, 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.
- Lacerda AEB, Nimmo ER, Sebbenn AM (2013) Modeling the long-term impacts of logging on genetic diversity and demography of *Hymenaea courbaril*. *Forest Science*, 59: 15–26.
- Lawson S, MacFaul L (2010) Illegal logging and related trade: Indicators of the global response. Chatham House London.
- Lee Y-T, Langenheim JH (1975) Systematics of the genus *Hymenaea* L.(Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). University of California Press.
- Lowe A, Wong K, Tiong Y, Iyerh S, Chew F (2010) A DNA Method to Verify the Integrity of Timber Supply Chains; Confirming the Legal Sourcing of Merbau Timber From Logging Concession to Sawmill. *Silvae Genetica*, 59, 263.

- Lowe AJ, Dormontt EE, Bowie MJ, Degen B, Gardner S, Thomas D, Clarke C, Rimbawanto A, Wiedenhoft A, Yin Y (2016) Opportunities for Improved Transparency in the Timber Trade through Scientific Verification. *BioScience*, 66, 990-998.
- Maués MM (2006) Estratégias reprodutivas de espécies arbóreas e a sua importância para o manejo e conservação florestal: Floresta Nacional do Tapajós (Belterra-PA).
- Melo MGG, Mendes AMS (2005) Jatobá *Hymenaea courbaril* L. Informativo Técnico, Rede de Sementes da Amazônia, n9, 2p.
- Nielsen L, Kjær E (2008) Tracing timber from forest to consumer with DNA markers. Danish Ministry of the Environment, Forest and Nature Agency. ISBN 978-87-7279-815-8, <http://curis.ku.dk/ws/files/8102944/TracingTimber.pdf> (accessed 30.10.2013).
- Ogden R, Linacre A (2015) Wildlife forensic science: A review of genetic geographic origin assignment. *Forensic Science International: Genetics*.
- Pakull B, Mader M, Kersten B, Ekue MRM, Dipelet UGB, Paulini M, Bouda ZHN, Degen B (2016) Development of nuclear, chloroplast and mitochondrial SNP markers for *Khaya* sp. *Conservation Genetics and Resource*, 8, 283-297.
- Pe M, Sanz J, Cabezudo M (1997) Analysis of volatile components of oak wood by solvent extraction and direct thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 778, 427-434.
- Pereira D, Santos D, Vedoveto MGJ, Veríssimo A (2010) Fatos florestais da Amazônia. Belém: IMAZON.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, 95, 536-539.
- Ramos ACS, De Lemos-Filho JP, Lovato MB (2009) Phylogeographical structure of the neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. *Journal of Heredity*, 100, 206-216.
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 9197-9201.

- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual/J. Sambrook, EF Fritsch, T. Maniatis.
- Sebbenn AM, Degen B, Azevedo VCR, Silva MB, Lacerda AEB, Ciampi AY, Kanashiro M, Carneiro FS, Thompson I (2008) Modelling the long-term impacts of selective logging on genetic diversity and demographic structure of four tropical tree species in the Amazon Forest. *Forest Ecology and Management*, 254(2): 335-349.
- Souza IM, Funch LS, de Queiroz LP (2014) Morphological analyses suggest a new taxonomic circumscription for *Hymenaea courbaril* L.(Leguminosae, Caesalpinoideae). *PhytoKeys*, 38, 101-118.
- Straub SC, Parks M, Weitemier K, Fishbein M, Cronn RC, Liston A (2012) Navigating the tip of the genomic iceberg: Next-generation sequencing for plant systematics. *American Journal of Botany*, 99, 349-364.
- Tnah LH, Lee SL, Ng KK, Tani N, Bhassu S, Othman RY (2009) Geographical traceability of an important tropical timber (*Neobalanocarpus heimii*) inferred from chloroplast DNA. *Forest Ecology and Management*, 258, 1918-1923.
- Wahlund S (1928) Composition of populations and correlation appearances viewed in relation to the studies of inheritance. *Hereditas*, 11, 65-106.
- Wright S (1978) Evolution and the genetics of populations: a treatise in four volumes: Vol. 4: variability within and among natural populations. University of Chicago Press.

BIBLIOGRAFIA

- ABDEL-KADER, M.; BERGER, J.M.; SLEBODNICK, C.; MALONE, S.; WISSE, J.H. et. al. Isolamento e configuração absoluta de ent-Diterpenos Halimane de *Hymenaea courbaril* da floresta tropical Suriname. **Journal of Natural Products** 65: 11-15, 2002.
- ADEODATO, S.; MONZONI, M.; BETIOL, L.S.; VILLELA, M. **Madeira de Ponta a Ponta: o caminho desde a floresta até o consumo**. São Paulo, FGV RAE. 2011.130p.
- AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOCO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology** 17: 5177–5188, 2008.
- ALEIXO, A.A.; CAMARGOS, V.N.; ANDRADE, A.C.S.P.; SANTOS, M.; CARVALHO, R.S.; MIRANDA, V.C.; et al. Propriedades antibióticas dos extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Hymenaea courbaril* (*Fabaceae*), frente ao isolado clínico meticiclina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Biochemistry and Biotechnology Reports** 2: 85-88, 2013.
- ALHO, C.S. **Projeto genoma humano**. In: Genômica. 1. ed. São Paulo, ATHENEU, 2004. 71-103p.
- ASHTON, P.S. Speciation among tropical forest trees: some deductions in the light of recent evidence. **Biology Journal of Linnaeus Society** 1: 155-196, 1969.
- ASKER, S. Gametophytic apomixis: elements and genetic regulation. **Heredity** 93(2): 277-293, 1980.
- ASKER, SE; JELING, L. **Apomixis in Plants**. Boca Raton: CRC Press Inc. 1992. 298p.
- ASHLEY, M.V. Plant parentage, pollination and dispersal: how DNA microsatellites have altered the landscape. **Critical Reviews in Plant Sciences** 29:148–161, 2010.
- AUGSPURGER, C.K. Mass-flowering of a tropical shrub (*Hybanthus prunifolius*): influence on pollinator attraction and movement. **Evolution** 34(3): 475-488, 1980.
- AZEVEDO, L.H. **Tipos de vegetação: atlas do Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1959. 58p.
- AYRE, D.; O'BRIEN, E.; OTTEWELL, K.; WHELAN, R. The accumulation of genetic diversity within a canopy-stored seed bank. **Molecular Ecology** 19(13): 2640-2650, 2010.
- BARBAZUK, W.B.; EMRICH, S.J.; CHEN, H.D.; LI, L.; SCHNABLE, P.S. SNP discovery via 454 transcriptome sequencing. **Plant Journal** 51:910–918, 2007.

BARKER, J.S.F.; THOMAS, R.H. A quantitative genetic perspective on adaptive evolution. In: V. LOESCHCKE. **Genetic constraints on adaptive evolution**. Springer-Verlag. 1987. 3-23p.

BARRET, S.C.H. Mating-system evolution in flowering plants: micro and macroevolutionary approaches. **Acta Botanica Neerlandica** 44(4): 385-402, 1995.

BAWA, K.S. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. **Evolution** 28: 95-92, 1974.

BAWA, K.S.; OPLER, P.A. Dioecism in tropical forest trees. **Evolution** 29: 167-179, 1975.

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

BAWA, K.S. Evolution of dioecy in flowering plants. **Annual Review Ecology Systematic** 11:15-39, 1980.

BAWA, K.S.; PERRY, D.R.; BEACH, J.H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees: 1- sexual systems and incompatibility mechanisms. **American Journal of Botany** 72(3): 331-345, 1985.

BERG, E.E.; HAMRICK, J.L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal of Forest Research** 27(3): 415-424, 1997.

BERTAHND, J. Apomixis and the management of genetic diversity. In: SAVIDAN, Y.; CARMAN, J.G.; DRESSELHAUS, T. **The flowering of Apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. Mexico, European Commission OC VI. 2001. 257p.

BESSEGA, C.; SAIDMAN, B. O.; DARQUIER, M. R.; EWENS, M.; FELKER, P.; VILARDI, J. C. Accuracy of dominant markers for estimation of relatedness and heritability in an experimental stand of *Prosopis alba* (Leguminosae). **Tree Genetics & Genomes** 7: 103-115, 2011.

BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. Introdução ao Melhoramento de Plantas. In: BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. Melhoramento de Plantas. Disponível em www.bespa.agrarias.ufpr.br, pp.1-9. Acessado em 2016.

BEZERRA, G.P. **Estudo farmacológico bioquímico guiado pela atividade miorrelaxante do extrato etanólico das cascas do caule de *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá)**. 2013. 219p. Dissertação. (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Mestrado). Universidade Federal do Ceará, UFC, 2013.

BICKNELL, R.A.; KOLTUNOW, A.M. Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums. **The Plant Cell** 16: 228-245, 2004.

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

BOBROWIEC, P.E.; CARVALHO, D.A.; OLIVEIRA, P.E. Biologia reprodutiva de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee et Langenheim (Leguminosae-Caesalpinioidea) em Uberlândia - MG. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 2000, Brasília. **Resumos**. Brasília: Sociedade Botânica do Brasil, 2000, 154p.

BONTEMPO, M. **Medicina natural**. São Paulo: Nova Cultural. 2000. 584p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 5. ed. Viçosa, Ed. UFV. 2009. 529p.

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

BRANDÃO, M.; GAVILANES, M.L. Elementos arbóreos ocorrentes no domínio da Caatinga, no Estado de Minas Gerais e seus empregos. **Informe Agropecuário** 17(181): 34-42, 1994.

BROOKES, A.J. The essence of SNP. **Gene** 234: 177-186, 1999.

BROWN, A.H.D. Genetic characterization of plant mating system. In: AHD Brown, MT Clegg, AL Kahler eds. **Plant Population, Genetics, Breeding and Genetic Resources**. Sinauer Associates.1989. pp.145-62.

BUNDOCK, P.C.; ELIOTT, F.G.; ABLETT, G.; BENSON, A.D.; CASU, R.E.; AITKEN, K.S.; HENRY, R.J. Targeted single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in a highly polyploid plant species using 454 sequencing. **Plant Biotechnology Journal** 7: 347–354, 2009.

BURCZYK, J.; LEWANDOWSKI, A.; CHALUPKA, W. Local pollen dispersal and distant gene flow in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). **Forest Ecology and Management** 197: 39-48, 2004.

BURCZYK, J.; ADAMS, W.T.; BIRKES, D.S.; CHYBICKI, I.J. Using Genetic Markers to Directly Estimate Gene Flow and Reproductive Success Parameters in Plants on the Basis of Naturally Regenerated Seedlings. **Genetics** 173: 363-372, 2006.

CABALLERO, A. Developments in the prediction of effective population size. **Heredity** 73:657–679, 1994.

CABALLERO, A.; RODRIGUEZ-RAMILO, S.T.; FERNANDEZ, V.A.J. Management of genetic diversity of subdivided populations in conservation programmes. **Conservation Genetic** 11: 409-419, 2010.

- CAMPBELL, D.R.; WASER, N.M. Variation in pollen flow within and among populations of *Ipornopsis* aggregate. **Evolution** 43: 1444-1455, 1989.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira**. Colombo: Embrapa. 1994. 640p.
- CARVALHO FILHO, J.L.S.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BLANK, A.F.; RANGEL, M.S. A. Produção de mudas de Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes ambientes, recipientes e composição de substratos. **Cerne** 9: 109-118, 2003.
- CARVALHO, P.E.R. Peroba-Rosa – *Aspidosperma polyneuron*. **Circular técnica** 96. Colombo: Embrapa. 2004. pp. 1-12.
- CAVALLI, S.S. Apomixia: um método de reprodução assexual. In. FREITAS, L.B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. 2003. 41-55p.
- CDB (Convenção sobre Diversidade Biológica). Decreto nº 2.519, de 16 de março de 1998. Promulga a Convenção sobre Diversidade Biológica, assinada no Rio de Janeiro, em 05 de junho de 1992. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, 1998.
- CHAKRABORTY, R.; MEAGHERT, T.R.; SMOUSES, P.E. Parentage analysis with genetic markers in natural populations. The Expected proportion of offspring with unambiguous paternity. **Genetics** 118: 527-536, 1988.
- CHIMELO, J.P.; MAINIERI, C.; NAHUZ, M.A.R.; PESSOA, A.L. Madeiras do Município de Aripuanã, Estado de Mato Grosso: I - caracterização anatômica e aplicações. **Acta Amazônica** 6(4): 94-105, 1976.
- CHINELATO, F.C.S. **Variabilidade genética em progênies de guapuruvu *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake**. 2011. 45p. Tese Agronomia. Universidade Estadual de São Paulo, Campus de Botucatu-SP, 2011.
- CIPRIANO, J.; MARTINS, L.; DEUS, M.S.M.; PERON, A.P. O gênero *Hymenaea* e suas espécies mais importantes do ponto de vista econômico e medicinal para o Brasil. **Caderno de Pesquisa, série Biologia** 26(2): 41-50.
- CLOUTIER, D.; HARDY, O.J.; CARON, H.; CIAMPI, A.Y.; DEGEN, B.; KANASHIRO, M.; SCHOEN, D.J. Low inbreeding and high pollen dispersal distances in populations of two Amazonian forest tree species. **Biotropica** 39(3): 406–415, 2007.
- COCKERHAM, C.C. An extension of the concept of partitioning hereditary variance for analysis of covariances among relatives when epistasis is present. **Genetics** 39: 859-882, 1954.
- COCKERHAM, C.C. Group inbreeding and coancestry. **Genetics** 56: 89-104, 1967.
- CONSORTIUM, I.H. The international hapmap project. **Nature** 426(6968): 789-796, 2003.

CORNELIUS, J. Heritabilities and additive genetic coefficients of variation in forest trees. **Canadian Journal of Forest Research** 24: 372-379, 1994.

CORNUET, J.M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics** 144: 2001–2014, 1996.

COSTA, W.S.; SOUZA, A.L.; SOUZA, P.B. Ecologia, Manejo, Silvicultura e Tecnologia de Espécies Nativas da Mata Atlântica. **Espécies Nativas da Mata Atlântica**. n°2, 2011. 21p.

CRAMER, E.R.A.; STENZLER, L.; TALABA, A.L.; MAKAREWICH, C.A.; VEHRENCAMP, S.L.; LOVETTE, I.J. Isolation and characterization of SNP variation at 90 anonymous loci in the banded wren (*Thryothorus pleurostictus*). **Conservation Genetic** 9: 1657-1660, 2008.

DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Revista Brasileira de Agrociências** 11(2): 127-133, 2005.

DAVID, P.; PUJOL, B.; VIARD, F.; CASTELLAS, V.; GOUDET, J. Reliable selfing rate estimates from imperfect population data. **Molecular Ecology** 16: 2474-2487, 2007.

DEGEN, B.; WARD, S.E.; LEMES, M.R.; NAVARRO, C.; CAVERS, S.; SEBBENN, A.M. Verifying the geographic origin of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) with DNA-fingerprints. *Forensic Science International*: **Genetics** 7: 55-62, 2013.

DESCHAMPS, S.; CAMPBELL, M.A. Utilization of next-generation sequencing platforms in plant genomics and genetic variant discovery. **Molecular Breeding** 25: 553-570, 2009.

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

DICK, C.W.; HARDY, O.J.; JONES, F.A.; PETIT, R.J. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. **Tropical Plantarum Biology** 1: 20–33, 2008.

DICKERSON, G.E. Genetic slippage in response to selection for multiple objectives. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantities Biology** 20: 213-244, 1955.

DNABarcoding. Acessível em: <http://www.barcodeoflife.org/>

DOW, B.D.; ASHLEY, M.V. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. **Heredity** 89: 62-70, 1998.

DOW, B.D., ASHLEY, M.V. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. **Molecular Ecology** 5: 615–627, 1996.

DUMPHY, B.K.; HAMRICK, J.L.; SCHWAGERL, J. A comparison of direct and indirect measures of gene flow in the bat-pollinated tree *Hymenaea courbaril* in the dry forest Life zone of southwestern Puerto Rico. **Internacional Journal of Plant Sciences** 165: 427-436, 2004.

DURAND, S.R.; SHELLEY, P.H.; ANTWEILER, R.C.; TAYLOR, H.E. Trees, chemistry and prehistory in the American Southwest. **Journal of Archaeological Science** 26: 185-203, 1999.

ECKERT, A.J.; BOWER, A.D.; GONZALEZ-MARTINEZ, S.C.; WEGRZYN, J.L.; COOP, G.; NEALE, D.B. Back to nature: ecological genomics of loblolly pine (*Pinus taeda*, Pinaceae). **Molecular Ecology** 19: 3789-3805, 2010.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics** 5: 435-445. 2004.

EHRlich, P.R.; RAVEN, P.H. Differentiation of populations. **Science** 165: 12287-11232, 1969.

ELLSTRAND, N.C. Multiple paternity within the fruits of the wild radish, *Raphanus sativus*. **American Naturalist** 123: 819-828, 1984.

ELLSTRAND, N.C. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. **Oikos** 63: 77-86, 1992.

ELLSTRAND, N.C. Current knowledge of gene flow in plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** 358: 1163-1170, 2003.

ELLSTRAND, N.C. Is gene flow the most important evolutionary force in plants? **American Journal of Botany** 101(5): 1–17, 2014.

EPPERSON, B.K. Multilocus estimation of genetic structure within populations. **Theoretical Population Biology** 65: 227–237, 2004.

FACHIM, E.; GUARIM, V.L.M.S. Conservação da biodiversidade: espécies da flora de Mato Grosso. **Acta Botanica Brasilica** 9(2): 281-287, 1995.

FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1987, 279 p.

FALCONER, D.S. **An introduction to quantitative genetics**. Longman and Wiley, New York. 1989. 384p.

FAZERES, A. **Elementos, dados e fatos para análise da Governança Florestal e situação da produção e comércio de madeira legal no Brasil**. TRAFFIC. Cambridge. 2014. 84p.

FERREIRA, W.C.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 1998. 220p.

FINKELDEY, R. **An Introduction to Tropical Forest Genetics**. Lecture Notes. Georg-August University Göttingen, Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, 2005. 241p.

FLEMING, T.H., BREITWISCH, R.; WHITESIDES, G.H. Patterns of tropical vertebrate frugivore diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics** 18: 91-109, 1987.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Global Forest Resources Assessment, Country Reports, Brazil**. Rome: FAO, 2005. 104p.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge University Press, Cambridge, 2002. 617p.

FRYXEL, P. Mode of reproduction of higher plants. **Botanical Review** 23: 135-233, 1957.

GALIMBERTI, A.; De MATTIA, F.; LOSA, A.; BRUNI, I.; FEDERICI, S.; CASIRAGHI, M.; MARTELOS, S.; LABRA, M. DNA barcoding as a new tool for food traceability. **Food Research International** 50: 55-63, 2012.

GALVÃO, F.; KUNIYOSHI, Y.S.; RODERJAN, C.V. Levantamento fitossociológico das principais associações arbóreas da Floresta Nacional de Irati-PR. **Floresta** 19(1/2): 30-49, 1989.

GENG, Q.A.; IAN, C.L.; GOTO, S.; TAO, J.I.; KIMURA, M.; ISLAM, M.S.; HOGETSU, T. Mating system, pollen and propagules dispersal, and spatial genetic structure in a high-density population of the mangrove tree *Kandelia candel*. **Molecular Ecology** 17: 4724-4739, 2008.

GENTRY, A.H. Dispersal ecology and diversity in neotropical forest communities. **Sonderband Naturwissenschaftlicher Verein Hamburg** 7: 303-314, 1983.

GHAZOUL, J. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. **Biology Review** 80(3): 413-443, 2005.

GIBBS, P.E.; OLIVEIRA, P.E.; BIANCHI, M.B. Postzygotic control of selfing in *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae-Caesalpinioideae), a bat-pollinated tree of the Brazilian Cerrados. **International Journal of Plant Sciences** 160: 1-7, 1999.

GIEHL, E.L.H.; ATHAYDE, E.A.; BUDKE, J.C.; GESING, J.P.A.; EINSIGER, S.M.; CANTO-DOROW, T.S. Espectro e distribuição vertical das estratégias de dispersão de diásporos do componente arbóreo em uma floresta estacional no sul do Brasil. **Acta Botanica Brasílica** 21: 137-145, 2007.

GILLET, E. and HATTEMER, H.H. Genetic analysis of isozyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity** 63: 135-141, 1989.

GOLENBERG, E.M. Estimation of gene flow and genetic neighborhood size by indirect methods in a selfing annual, *Triticum dicoccoides*. **Evolution** 41: 1326-1334, 1987.

GOODWILLIE, C.; KALISZ, S.; ECKERT, C.G. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: Occurrence, Theoretical Explanations, and Empirical Evidence. **Annual Review Ecology Evolution and Systematic** 36:47-79, 2005.

GORCHOV, D.L.; PALMEIRIM, J.M.; JARAMILLO, M.; ASCORRA, C.F. Dispersal of seeds of *Hymenaea courbaril* (Fabaceae) in a logged rain forest in the Peruvian Amazonian. **Acta Amazônica** 34: 251-259, 2004.

GRAY, J.A. **Forest Concession Policies and Revenue Systems: Country Experience and Policy Changes for Sustainable Tropical Forestry**. World Bank Technical Papers. Janeiro, 2002. Disponível em: <http://elibrary.worldbank.org/doi/abs/10.1596/0-8213-5170-2>. Acessado em: Fevereiro de 2016.

GRIZ, L.M.S.; MACHADO, I.C.S. Aspectos morfológicos e síndromes de dispersão de frutos e sementes na Reserva Ecológica de Dois Irmãos. In: MACHADO, I.C.; LOPES, A.V.; PÔRTO, K.C. (orgs.). **Reserva Ecológica de Dois Irmãos: Estudos em um Remanescente de Mata Atlântica em área urbana (Recife-Pernambuco-Brasil)**. Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 1998. 197-224p.

GUPTA, P.K.; ROY, J.K.; PRASAD, M. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science** 80(4): 4524-535, 2001.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.H.; MACBYDE, B.; THOMAS, L. **Genetics and conservation**. Menlo Park 1983. 335-348p.

HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. **Biotropica** 18: 201-207, 1986.

HANNA, W.W. Use of apomixis in cultivar development. **Advances in Agronomy** 54: 333-350, 1995.

HARMON-THREATT, N.A.; BURNS, J.H.; SHEMYAKINA, L.A.; KNIGHT, T.M. Breeding system and pollination ecology of introduced plants compared to their native relatives. **American Journal of Botany** 96(8): 1544-1550. 2009.

HARRISON, H.B.; SAENZ-AGUDELO, P.; PLANES, S.; JONES, G.P.; BERUMEN, M.L. R relative accuracy of three common methods of parentage analysis in natural populations. **Molecular Ecology** 22: 1158-1170, 2013.

HAYASHI, K.; HASHIMOTO, N.; DAIGEN, M.; ASHIKAWA, I. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus. **Theoretical Applied Genetics** 108: 1212-1220, 2004.

HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences** 270: 313-321, 2003.

HEBERT, P.D.N.; PENTON, E.H.; BURNS, J.M.; JANZEN, D.H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 101: 14812-14817, 2004.

HEUERTZ, M.; VEKEMANS, X.; HAUSMAN, J.F.; PALADA, M.; HARDY, O.J. Estimating seed vs. pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. **Molecular Ecology** 12: 2483-2495, 2003.

HONNAY, O.; BOSSUYT, B.; JACQUEMYN, H.; SHIMONO, A.; UCHIYAMA, K. Can a seed bank maintain the genetic variation in the above ground plant population? **Oikos** 117: 1-5, 2008.

HOWE, H.F.; SMALLWOOD, J. Ecology of seed dispersal. **Annual Review of Ecology and Systematics** 13: 201-228, 1982.

HUBBELL, S.P.; HE, F.; CONDIT, R.; BORDA-DE-AGUA, L.; KELLNER, J., STEEGE, TER H. How many tree species are there in the Amazon and how many of them will go extinct? **PNAS** 105: 11498–11504, 2008.

HUXLEY-JONES, E.; SHAW, J.L.; FLETCHER, C.; PARNELL, J.; WATTS, P.C. Use of DNA barcoding to reveal species composition of convenience seafood. **Conservation Biology** 26: 367-371, 2012.

IBGE. 2012. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. Disponível em: ftp://geoftp.ibge.gov.br/documentos/recursos_naturais/indicadores_desenvolvimento_sustentavel/2012/ids2012.pdf. Acessado em: 10/08/2016.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual técnico da vegetação brasileira** (Manuais Técnicos em Geociências, 1). Rio de Janeiro, 1992. 92p.

INTERPOL - International Criminal Police Organization. **Project LEAF** (Law Enforcement Assistance for Forests) is an INTERPOL/ United Nations Environment Programme (UNEP) consortium initiative against illegal logging and related crimes. Disponível em: <http://www.interpol.int/Crime-areas/Environmental-crime/Projects/Project-Leaf>. Acessado em: 12/12/2015.

JACQUARD, A. **The genetic structure of populations**. Berlin, Springer Verlag, 1974. 569p.

JHA, S.; DICK, C.W. Native bees mediate long-distance pollen dispersal in a shade coffee landscape mosaic. **PNAS** 107(31): 13760-13764, 2010.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature** 314: 67-73, 1985.

JENNINGS, S.B.; BROWN, N.D.; BOSHIER, D.H.; WHITMORE, T.C.; LOPES, J.C. Ecology provides a pragmatic solution to maintenance of genetic diversity in sustainably managed tropical rain forest. **Forest Ecology and Management** 154(1-2): 1-10, 2001.

JONES, A.G.; ARDREN, W.R. Methods of parentage analysis in natural populations. **Molecular Ecology** 12: 2511-2523, 2003.

JONES, A.G.; SMALL, C.M.; PACZOLT, K.A.; RATTERMAN, N.L. A practical guide to methods of parentage analysis. **Molecular Ecology Resources** 10: 6-30, 2010.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed. 2009. 632p.

JÚNIOR, H.J. **Desenvolvimento de um sistema baseado em marcadores moleculares de DNA do tipo microssatélites para identificação de variedades de cana-de-açúcar**. 2009. 111p. Dissertação de Mestrado Biologia Funcional e Molecular. Instituto de Biologia- Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP.

KARASAWA, M.M.G. **Diversidade Reprodutiva de Plantas**. Marínes Marli Gniech Karasawa. – Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética-SBG, 2009. 113p.

KATO, E.; HIURA, T: Fruit set in *Styrax obassia* (Styracaceae): the effect of light availability, display size, and local floral density. **American Journal of Botany** 86(4): 495-501, 1999.

KAWUKI, R.S.; FERGUSON, M.; LABUSCHAGNE, M.; HERSELMAN, L.; KIM, D.J. Identification, characterisation and application of single nucleotide polymorphisms for diversity assessment in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Molecular Breeding** 23: 669-684, 2009.

KLEIN, R.M. A vegetação florestal. In: BIGARELLA, J.J. **Visão integrada da problemática da erosão**. Curitiba: ADEA / IBGE, 1985. 71-91p.

KODAMA, M.T.; SARTORI, A.L.B. Caracterização morfológica de plântulas de *Hymenaea stigonocarpa* var. *stigonocarpa* Mart. ex Hayne, *H. stigonocarpa* Hayne var. *brevipetiolata* N. Mattos e *H. courbaril* L. **Revista Brasileira de Biociências** 5: 663-665, 2007.

KOLTUNOW, A.M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The plant cell** 5: 1425-1437, 1993.

KOLTUNOW, A.M.; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis: a developmental perspective. **Annual Review Plant Biology** 54: 547-574, 2003.

KRAWCZAK, M.; SCHMIDTKE, J. **DNA-Fingerprinting**. Heidelberg, etc: Spektrum Akademischer Verlag. 1994.

KRESS, W.J.; WURDACK, K.J.; ZIMMER, E.A.; WEIGT, L.A.; JANZEN, D.H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **PNS** 102(23): 8369-8374, 2005.

KUBOTA, T.Y.K. **Herdabilidade em caracteres de crescimento de populações fragmentadas da espécie arbórea *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae)**. 2014. 34p. Tese Agronomia. Universidade Estadual de São Paulo, Campus de Ilha Solteira-SP, 2014.

LACERDA, A.E.B., M. KANASHIRO, A.M. SEBBENN. Effects of selective 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, 2008.

LACERDA, A.E.B.; KANASHIRO, M.; SEBBENN, A.M. 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(4): 462-470, 2008.

LANDE, R. Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain: body size allometry. **Evolution** 33: 402-416, 1979.

LANDE, R. Genetics and demography in biological conservation. **Science** 241: 1455-1460, 1988.

LAURANCE, W.F.; COCHRANE, M.A.; BERGEN, S. et al. The future of the Brazilian Amazon. **Science** 291: 438-439, 2001.

LAWSON, S.; MACFAUL, L. **Illegal logging and related trade**. Indicators of the Global Response. Chatham House. 2010. 154p.

LEE, Y.T.; LANGENHEIM J.H. Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). **University of California Publications in Botany** 69: 1-109, 1975.

LEITE, P.F.; KLEIN, R.M.; PASTORE, U.; COURA NETO, A.B. **A vegetação da área de influência do reservatório da Usina Hidrelétrica de Ilha Grande (PR/MS)**, levantamento na escala 1:250.000. Brasília: IBGE, 1986. 52p.

LEITE, P.F.; KLEIN, R.M. Vegetação. In: **Geografia do Brasil: Região Sul**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro. 2: 113-150, 1990.

LEMES, M.R.; GRATTAPAGLIA, D.; GROGAN, J.; PROCTOR, J.; GRIGEL, R. Flexible mating system in a logged population of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae): implications for the management of a threatened neotropical tree species. **Plant Ecology** 192(2): 169-179, 2007.

- LEVIN, D.A.; KERSTER, H.W. Density-dependent gene dispersal in *Liatris*. **The American Naturalist** 103: 61-74, 1969.
- LEWIN, B. **Genes VII**. Oxford: Oxford University Press. 2000. 955p.
- LI, X.; YANG, Y.; ROBERT, J.H.; MAURIZIO, R.; WANG, Y.; SHILIN, C. Plant DNA barcoding: from gene to genome. **Biological Reviews** 90: 157-166, 2015.
- LIMA, A.L.S.; ZANELLA, F.; CASTRO, L.D.M. Crescimento de *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee et Lang. e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Leguminosae) sob diferentes níveis de sombreamento. **Acta Amazonica** 40: 43-48, 2010.
- LINDGREN, D.; GEA, L.D.; JEFFERSON, P.A. Status number for measuring genetic diversity. **Forest Genetics** 4: 69-76, 1997.
- LINDGREN, D.; MULLIN, T.J. Relatedness and status number in seed orchard crops. **Canadian Journal of Forest Research** 28: 276-283, 1998.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum v.2. 1998. 368p.
- LOWE, A.J.; BOSCHER, D.; WARD, M.; BACLES, C.F.E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation, reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity** 95: 255-273, 2005.
- LUIKART, G.; ALLENDORF, F.; CORNUET, J.M.; SHERWIN, W. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Heredity** 89: 238-247, 1998.
- MACEDO, H.R.; FREITAS, M.L.M.; MORAES, M.L.T.; ZANATA, M.; SEBBENN, A.M. Variação, herdabilidade e ganhos genéticos em progênes de *Eucalyptus tereticornis* aos 25 anos de idade em Batatais-SP. **Scientia Forestalis** 41(100): 533-540, 2013.
- MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology** 7: 639-655, 1998.
- MARTINS, C.H.G.; SOUZA, F.R.; FONSECA, C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; AMBROSIO, S.R.; CUNHA, W.R. Determinação *in vitro* da Atividade Antibacteriana dos Extratos Brutos da Casca e Polpa Farinácea de *Hymenaea courbaril* L. **Investigação** 43: 10-37, 2010.
- MAYR, E. **Animal species and evolution**. Harvard University Press, Boston, Massachusetts, USA. 1963. 811p.

MEAGHER, T.R.; THOMPSON, E.A. The relationship between single and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. **Theoretical Population Biology** 29: 87-106, 1986.

MELO, M.G.G.; MENDES, A.M.S. **Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia. Jatobá: *Hymenaea courbaril* L.** Universidade do Estado do Amazonas, Manaus-AM, n°9, 2005. 2p.

MEYER, C.P.; PAULAY, G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. **PLOS Biology** 3: e422, 2005.

MILDENHALL, D. *Hypericum* pollen determines the presence of burglars at the scene of a crime: an example of forensic palynology. **Forensic Science International** 163: 231-235, 2006.

MORI, E.S.; SEBBENN, A.M.; TAMBARUSSI, E.V.; GURIES, R.P. Sistema de reprodução em populações naturais de *Peltophorum dubium*. **Scientia Forestalis** 41(99): 307-317, 2013.

NASCIMENTO, M.T.; SILVA, G.C.; ARAGÃO, L.E.O.C. Estrutura e composição florística de um remanescente de mata de tabuleiro na região norte fluminense. In: **Congresso Nacional de Botânica**, 47, Nova Friburgo. Resumos. Rio de Janeiro: Sociedade Botânica do Brasil, 1996. 2008p.

NEGRINI, M.; AGUIAR, M.D.; VIEIRA, C.T.; SILVA, A.C.; HIGUCHI, P. Dispersão, distribuição espacial e estratificação vertical da comunidade arbórea em um fragmento florestal no Planalto Catarinense. **Revista Arvore** 36(5): 919-929, 2012.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceeding Natural Academy of Science** 70: 3321-3323, 1973.

NIELSEN, L.R. & KJÆR, E.D. **Tracing timber from forest to consumer with DNA markers.** Electronic publication: www.skovognatur.dk/udgivelser. Danish Ministry of the Environment, Forest and Nature Agency, 2008. 40p.

NOGLER, G.A. Gametophytic apomixis. In: JOHRI, B.M. (ed). **Embriology of Angiosperms**. Springer-Verlag, 1984. 475-518p.

OLIVEIRA, J.S.; NUNES, H.B.; RIBAS, S.A.A.; OLIVEIRA, M.A.B.B. Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do cerrado. **Revista de Biologia e Ciências da Terra** 12: 7-11, 2012.

OZIAS-AKINS P.; VAN DIJK P.J. Mendelian genetics of apomixis in plants. **Annual Review Genetics** 41: 509-37, 2007.

OZIAS-AKINS, P. Apomixis: developmental characteristics and genetics. **Critical Reviews Plant Sciences** 25:199-214, 2006.

PEAKALL, R. A new technique for monitoring pollen flow in orchids. **Oecologia** 79: 361-365, 1989.

PEREIRA, D.; D. SANTOS; M. VEDOVETO; J. GUIMARÃES; A. VERÍSSIMO. **Fatos Florestais**. Imazon, Belém, PA. 2010. 122p.

PEREIRA, D.; LENTINI, M. Guia SAMFLOR: **Sistema de Apoio ao Manejo Florestal**. Belém: Imazon, 2010. 68p.

PEREZ-COELLO, M.S.; SANZ, J.; BABEZUDO, M.D. Analysis of volatile components of oak wood by solvent extraction and direct thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 778: 427-434, 1997.

PHILLIPS, C. Online resources for SNP analysis: a review and route map. **Molecular Biotechnology** 35(1): 65-97, 2007.

PIANKA, E.R. **Ecología evolutiva**. Universidad de Texas. Austin. 1982. 365p.

PORCEDDU, A.; ALBERTINI, E.; BARCACCIA, G.; MARCONI, G.; BERTOLI, F.; VERONESI, F. Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two way pseudotestcross strategy based on AFLP and SAMPL markers. **Theoretical and Applied Genetics** 104: 273-280, 2002.

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

QUIRINO, M.S. **Polimorfismo de sequência nucleotídica em fragmentos genômicos de cana-de-açúcar homólogos a genes de resistência**. 2003. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Current Opinion in Plant Biology** 5:94–100, 2002.

RAMOS, R.F. **Sistema de cruzamento, fluxo de pólen e isolamento genético de *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. Em um fragmento localizado no interior de São Paulo**. 2012. 181p. Tese de doutorado (Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, 2012.

RAMSAY, G. DNA chips: State-of-the art. **Nature Biotechnology**, 16:40-44, 1998.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal** 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007. 830p.

REYNOLDS, J.; WEIR B. S.; COCKERHAM, C.C. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. **Genetics** 105: 767-779, 1983.

RICHARDS, A.J. **Plant Breeding Systems**, 2nd ed. (London: Chapman and Hall), 1997.

- RIEGER, R.; MICHAELIS, A.; GREEN, M.M. **Glossary of Genetics and Cytogenetics: Classical and Molecular**. New York: Springer. 1976. 652p.
- RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Heredity** 47(1): 35-52, 1981.
- RITLAND, K. Joint Maximum Likelihood Estimation of Genetic and Mating Structure Using Open-Pollinated Progenies. **Biometrics** 42: 25-43, 1986.
- RITLAND, K. Correlated mating in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution** 43(4): 848-859, 1989.
- RITLAND, K. A marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations. **Evolution** 50(3): 1062-1073, 1996.
- RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity** 88: 221–228, 2002.
- RIZZINI, C.T. Nota prévia sobre a divisão fitogeográfica (florístico-sociológica) do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia** 25: 3-64, 1963.
- ROSTOKS, N.; MUDIE, S.; CARDLE, L.; RUSSELL, J.; et al. Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. **Molecular Genetics Genomics** 274: 515-527, 2005.
- ROUSSET, F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F -statistics under isolation by distance. **Genetics** 145, 1219-1228, 1997.
- ROUSSET, F. Genetic differentiation between individuals. **Journal of Evolutionary Biology** 13: 58-62, 2000.
- SAVOLAINEN, O., PYHAJARVI, T.; KNURR, T. Gene flow and local adaptation in trees. **Annual Review Ecological Evolution** 38: 595–619, 2007.
- SCHOEN, D.J.; CLEGG, M.T. Estimating of mating system parameters when outcrossing events are correlated. **Proceeding of the National Academy of Science** 81: 5258-5262, 1984.
- SEBBENN, A.M.; SEONE, C.E.S. Estimativa de tamanho efetivo de endogamia por marcadores genéticos. **Árvore** 29: 1-7, 2005.
- SEBBENN, A.M. Sistemas de reprodução em espécies tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: HIGA, A.R.; SILVA, L.D. (coord.). **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. FUPEF, Curitiba, 2006. 93-138p.
- SEBBENN, A.M.; CARVALHO, A.C.M.; FREITAS, M.L.M. et al. 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, 2011.

SFB - Serviço Florestal Brasileiro. SNIF - Sistema Nacional de Informações Florestais. Produção Florestal. Brasília, DF. Disponível em: <http://www.florestal.gov.br/snif/producao-florestal> Acessado em: 17/08/2016.

SICARD, D; WOO, S.S.; ARRYO-GARCIA, R.; OCHOA, O.; NGUYEN, D.; KOROL, A.; NEVO, E. MICHELMORE, R. Molecular diversity at the major cluster of disease resistance genes in cultivated and wild *Lactuca* spp. **Theoretical and Applied Genetics** 99: 405-418, 1999.

SIQUEIRA, A.C.M.F.; NOGUEIRA, J.C.B. Essências brasileiras e sua conservação genética no Instituto Florestal de São Paulo. In: **Congresso Nacional sobre essências nativas**, 2, 1992, São Paulo. Anais. São Paulo: Instituto Florestal. 1992. 1187p.

SLAVOV, G.T.; LEONARDI, S.; BURCZYK, J.; ADAMS, T.; STRAUSS, S.H.; DIFAZIO, S.P. Extensive pollen flow in two ecologically contrasting populations of *Populus trichocarpa*. **Molecular Ecology** 18: 357-373, 2009.

SOARES-SILVA, L.H.; BARROSO, G.M. Fitossociologia do estrato arbóreo da floresta na porção norte do Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina-PR, Brasil. **Anais 8º Congresso SBSP**. 1992. 101-112p.

SOARES-FILHO, B.S.; NEPSTAD, D.C.; CURRAN, L. M.; CERQUEIRA, G.C., et al. Modelling conservation in the Amazon basin. **Nature** 440: 520–523, 2006.

SOARES-FILHO, B.S.; NEPSTAD, D.C.; CURRAN, L. M.; VOLL, E., et al. **LBA-ECO LC-14 Modeled Deforestation Scenarios, Amazon Basin: 2002-2050** (Oak Ridge National Laboratory Distributed Active Archive Center, Oak Ridge, TN, 2013). Disponível em: http://daac.ornl.gov/LBA/guides/LC14_Amazon_Scenarios.html. Acessado em 10/08/2016.

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

SOUZA, L.A.; MOSCHETA, I.S. Morfo-anatômica do desenvolvimento do fruto e da plântula de *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). In: **Congresso Nacional de Botânica**, São Paulo. Resumos. São Paulo: Sociedade Botânica do Brasil / Universidade de São Paulo, 1992. 345p.

SQUILLACE, A.E. Average Genetic Correlations Among Offspring From Open-Pollinated Forest Trees. **Silvae Genetic** 23(5): 149-156, 1974.

STEEGE, H.T. et al., Estimating the global conservation status of more than 15,000 Amazonian tree species. **Science Advances** 1: 1-10, 2015.

STEFANELLO, D.; IVANAUSKAS, N.M.; MARTINS, S.V.; KUNZ, S.H. Síndromes de dispersão de diásporos das espécies de trechos de vegetação ciliar do rio das Pacas, Querência- MT. **Acta Amazonica** 40(1): 141-150, 2010.

STEWART, C.N.Jr. Monitoring the presence and expression of transgenes in living plants. **Trends in Plant Science** 10: 390-396, 2005.

TANI, N.; TSUMARA, Y.; KADO, T.; TAGUCHI, et al. Paternity analysis-based inference of pollen dispersal patterns, male fecundity variation and influence of flowering tree density and general flowering magnitude in two dipterocarp species. **Annals of Botany** 104: 1421-1434, 2009.

TARAZI, R.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOVSKY, R. Long distance dispersal in a fire and livestock protected savanna. **Ecology and Evolution** 3(4): 1003-1015, 2013.

TNAH, L.H.; LEE, S.L.; NG, K.K.S.; TANI, N.; BHASSU, S.; OTHMAN, R.Y. Geographical traceability of an important tropical timber (*Neobalanocarpus heimii*) inferred from chloroplast DNA. **Forest Ecology and Management** 258: 1918-1923, 2009.

TNAH, L.H.; LEE, S.L.; NG, K.K.S.; FARIDAH, Q.Z.; FARIDAH-HANUM, I. Forensic DNA profiling of tropical timber species in Peninsular Malaysia. **Forest Ecology and Management** 259: 1436-1446, 2010.

TONSOR, S.J. Intrapopulational variation in pollen-mediated gene flow in *Plantago ianceolata* L. **Evolution** 39: 775-782, 1985.

TOWNSEND, P.A.; LEVEY, D.J. An experimental test of whether habitat corridors affect pollen transfer. **Ecology** 86(2): 466-475, 2005.

TRAFFIC. **Brazil Brief Document**. Disponível em: <http://www.illegal-logging.info/sites/default/files/Brazil%20timber%20November2013.pdf>. Acessado em dezembro de 2015.

VALENTINI, A., MIQUEL, C., NAWAZ, M.A., BELLEMAIN, E.; et al. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. **Molecular Ecology Resources** 9: 51-60, 2009.

VELOSO, H.P.; RANGEL FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro. 1991.123p.

VICENTE, A.; SANTOS, A.M.M.; TABARELLI, M. Variação no modo de dispersão de espécies lenhosas em um gradiente de precipitação entre floresta seca e úmida no Nordeste do Brasil. In: LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (orgs.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2003. 565-592p.

WANG, J. More efficient breeding systems for controlling inbreeding and effective size in animal populations. **Heredity** 79: 591-599, 1997.

WARD, M.; JOHNSON, S.; ZALUCKI, M. When bigger is not better: intraspecific competition for pollination increases with population size in invasive milkweeds. **Oecologia** 171: 883-891, 2013.

WHITE, G.M.; BOSHIER, D.H. Fragmentation in Central American dry forests: genetic impacts on *Swietenia humilis* (Meliaceae). In: YOUNG, A.G.; CLARKE, G.M. (eds). **Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations**. Cambridge, UK. 2000. 293–311p.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18: 6531-6535, 1990.

WOLTERS, P.; POWELL, W.; LABUDAH, E.; SNAPE, J.; HENDERSON, K. Nucleotide diversity at homeologous loci in wheat. In: Plant and animal genome conference, 8, 2000, San Diego. **Abstracts...** San Diego: [s.n.], 2000. 103p.

WRIGHT, S. Coefficients of inbreeding and relationship. **The American Naturalist** 56(645): 330-338, 1922.

WRIGHT, S.W. Isolation by distance under diverse systems of mating. **Genetics** 31:39-59, 1946.

YAMAMOTO, L.F.; KINOSHITA, L.S.; MARTINS, F.R. Síndromes de polinização e de dispersão em fragmentos da Floresta Estacional Semidecídua Montana, SP, Brasil. **Acta Botânica Brasiliensis** 21(3): 553-573, 2007.

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

ZHU, C.; GORE, M.; BUCKLER, E.S.; YU, J. Status and prospects of association mapping in plants. **Plant Genomic** 1: 5–20, 2008.