

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Erythrina velutina* Willd.**

MARÍLIA FREITAS DE VASCONCELOS MELO

**SÃO CRISTÓVÃO
2010**

MARÍLIA FREITAS DE VASCONCELOS MELO

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA GENÉTICA DE POPULAÇÕES
NATURAIS DE *Erythrina velutina* Willd.**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração Biotecnologia em Recursos Naturais.

Orientadora
Profa. Renata Silva-Mann

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE-BRASIL
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

M528d Melo, Marília Freitas de Vasconcelos
Diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Erythrina velutina* Willd / Marília Freitas de Vasconcelos Melo. – São Cristóvão, 2010.
38 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Recursos Naturais) – Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2010.

Orientador: Profª Drª Renata Silva-Mann

1. Biotecnologia. 2. Genética- Populações naturais. 3. *Erythrina velutina* Willd. I. Título.

CDU 601.4:630*12

MARÍLIA FREITAS DE VASCONCELOS MELO

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS
DE *Erythrina velutina* Willd.**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração Biotecnologia em Recursos Naturais.

APROVADA em 09 de julho de 2010

Profa. Dra. Dulcinéia de Carvalho - UFLA

Profa. Dra. Ana Veruska Cruz da Silva – EMBRAPA Tabuleiros Costeiros

Profa. Dra. Renata Silva-Mann
UFS
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE-BRASIL

Quem passou a vida em brancas nuvens
E em plácido repouso adormeceu,
Quem não sentiu o frio da desgraça,
Quem passou pela vida e não sofreu
Foi espectro de homem, não foi homem,
Só passou pela vida, não viveu.

Francisco Octaviano

Aos meus pais, Antônio Ferreira e Maria Freitas,
Dedico

AGRADECIMENTOS

Sem dúvida, se cheguei até aqui eu não estive sozinha! Sendo assim, gostaria de aproveitar esse momento para agradecer a todos aqueles que estiveram comigo durante essa caminhada.

Inicialmente, agradeço a Deus pelo dom da vida, pelo amor incondicional e pela feliz oportunidade de estar vivendo esse momento.

Aos meus pais, Antônio Ferreira e Maria Freitas, por terem me dado condições de chegar até aqui, e mais que isso, por serem a minha fonte de amor e companheirismo.

Aos meus irmãos Orlando, Júnior, Anderson, Alan e Maíra, pela convivência em harmonia, que muitas vezes se torna a alegria do meu dia-a-dia.

As minhas sobrinhas Mariana, Maria Eduarda e Anna Cecília, que em sua inocência e com apenas um sorriso, conseguem transmitir toda a energia que eu preciso para continuar a minha caminhada.

A Universidade Federal de Sergipe, instituição onde tive a oportunidade de adquirir toda a bagagem profissional que hoje possuo.

A minha orientadora Profa. Dra. Renata Silva-Mann, por mais uma oportunidade de trabalharmos juntas e por todos os conhecimentos transmitidos.

A minha amiga, Sheila Valéria, por todo apoio no desenvolvimento do meu trabalho, pelos momentos de descontração e principalmente pela amizade.

As amigadas conquistadas no decorrer desse período, e que faço questão de levar por toda a vida, Kícia, Daniela, Micaele, Aline e em especial, a minha amiga, Jéssica Vasconcelos, pessoa que com seu jeitinho meigo e repleto de encanto, fez toda diferença nessa minha trajetória.

Ao Prof. Dr. Edilson Divino de Araújo, por todo o conhecimento transmitido para a realização das minhas análises, de forma bastante clara e agradável.

A Profa. Dra. Ana Veruska, pela disposição em me ajudar sempre que solicitada e pela companhia também nos momentos de diversão.

A Capes, pela concessão da Bolsa.

E, enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução desse trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Perda e Fragmentação de habitats e diversidade genética em populações florestais naturais	2
2.2. Biotecnologia e Genética da Conservação	2
2.3. Ferramentas empregadas na quantificação da diversidade genética	3
2.3.1. Marcadores genéticos	3
2.3.1.1. Marcadores de DNA	4
2.3.1.1.1. RAPD	4
2.3.1.1.2. Marcadores Isoenzimáticos	5
2.4. Parâmetros avaliados no estudo da diversidade genética	6
2.5. Estrutura genética espacial	7
2.6. Espécie	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Localização e Identificação das populações	10
3.2. Caracterização das Áreas de estudo	10
3.2.1. Baixo São Francisco Sergipano	10
3.2.2. Município de Pinhão-SE	10
3.3. Coleta do material vegetal	11
3.4. Extração do DNA	11
3.4.1. Reações de RAPD	12
3.4.2. Análise dos dados	13
3.4.2.1. Número ótimo de fragmentos amplificados	13
3.4.2.2. Similaridade genética	13
3.4.2.3. Estrutura genética	14
3.5. Reações de isoenzimas	15
3.5.1. Interpretação do zimograma	15
3.5.2. Variabilidade genética da população	16
3.5.2.1. Estimativas das freqüências alélicas	16
3.5.2.2. Estimativa dos índices de diversidade e estrutura genética	16
3.6. Estrutura genética espacial	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Reações de RAPD	19
4.1.1. Número ótimo de fragmentos amplificados	20
4.1.2. Similaridade genética	21
4.1.3. Estrutura genética	23
4.2. Reações isoenzimáticas	24
4.3. Estrutura genética espacial	26
5. CONCLUSÕES	27
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
ANEXOS	36

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Locais de ocorrência do Mulungu (<i>Erythrina velutina</i> Willd.), no Brasil. UFS, São Cristóvão, 2010.	8
Figura 2 Produtos de amplificação de RAPD gerados com o oligonucleotídio IDT 11 em indivíduos de <i>Erythrina velutina</i> de ocorrência no Baixo São Francisco Sergipano. UFS, São Cristóvão, SE, 2010.	13
Figura 3 Coeficiente de correlação (r) e número de bandas obtidas para 20 indivíduos de <i>Erythrina velutina</i> Willd. localizados no Baixo São Francisco Sergipano e no Município de Pinhão/SE, Bioma Caatinga. UFS, São Cristóvão, 2010.	21
Figura 4 Estimativa da similaridade genética entre indivíduos de duas populações de <i>Erythrina velutina</i> Willd. definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base nas médias obtidas com o Índice de Jaccard. UFS, São Cristóvão, 2010.	22

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RAPD empregando <i>Erythrina velutina</i> Willd. UFS, São Cristóvão, 2010.	12
Tabela 2 Sistemas enzimáticos testados, suas siglas e códigos universais. UFS, São Cristóvão, 2010.	15
Tabela 3 Número de fragmentos amplificados para cada oligonucleotídeo testado nos 40 indivíduos de <i>Erythrina velutina</i> Willd. estudados. UFS, São Cristóvão, 2010.	19
Tabela 4 Estimativa de parâmetros genéticos populacionais utilizando marcadores RAPD, para 2 populações de <i>Erythrina velutina</i> Willd., estando uma localizada no Baixo São Francisco Sergipano (Local 1) e outra localizada no município de Pinhão/SE (Local 2). UFS, São Cristóvão, 2010.	23
Tabela 5 Estimativa de parâmetros genéticos populacionais de mulungu (<i>Erythrina velutina</i> Willd.), em 2 populações, sendo uma localizada no Baixo São Francisco Sergipano (Local 1) e outra no Município de Pinhão/SE (Local 2). UFS, São Cristóvão-SE, 2010.	24
Tabela 6 Locos enzimáticos analisados, número de alelos e frequência alélica média observada nos 40 indivíduos de <i>Erythrina velutina</i> Willd., coletados no Baixo São Francisco Sergipano e no Município de Pinhão/SE. UFS, São Cristóvão-SE, 2010.	25
Tabela 7 Estimativa de parâmetros genéticos populacionais utilizando marcadores isoenzimáticos, para 2 populações de <i>Erythrina velutina</i> Willd., estando uma localizada no Baixo São Francisco Sergipano (Local 1) e outra localizada no município de Pinhão/SE (Local 2). UFS, São Cristóvão, 2010.	25

RESUMO

MELO, Marília Freitas de Vasconcelos. **Diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Erythrina velutina* Willd.** Sergipe: UFS, 2010. 38p. (Dissertação - Mestrado em Biotecnologia)

Um estudo baseado em marcadores de DNA e isoenzimáticos foi realizado para avaliar a diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Erythrina velutina* Willd., visando à prospecção monitorada da variabilidade genética, para fins de seleção das matrizes mais divergentes, em duas populações naturais do estado de Sergipe. Foram amostradas folhas jovens de vinte indivíduos em cada população. Um total de vinte oligonucleotídeos decâmeros de sequência arbitrária e 15 sistemas enzimáticos foram testados. Na análise de RAPD, a população do Baixo São Francisco Sergipano originou 134 locos, sendo 100 polimórficos e a população do município de Pinhão, 143 locos, sendo 112 polimórficos. Observou-se para a estrutura genética da população do município de Pinhão maior número de alelos observados e efetivos, o que implica numa maior heterozigiosidade. A heterozigiosidade média observada foi maior que a esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que indica um excesso de heterozigotos e pode ser confirmado pelo valor negativo do índice de fixação de Wright (-0,2304). Em relação à diversidade genética entre populações (*Fst* e *Gst*) os valores foram similares para os dois marcadores. Sugere-se o uso dos indivíduos M1, M7, M11 e M14 do Baixo São Francisco Sergipano; e dos indivíduos M5, M6, M12 e M19 do município de Pinhão como os mais divergentes para futuros estudos químicos, bioquímicos e farmacológicos.

Palavras-chaves: parâmetros genéticos, heterozigiosidade, diversidade

Orientadora: Renata Silva-Mann - UFS

ABSTRACT

MELO, Marília Freitas de Vasconcelos Melo. **Genetic diversity and structure of natural populations of *Erythrina velutina* Willd.** Sergipe: UFS, 2010. 38p. (Dissertation – Master Science in Biotechnology).

A study based in DNA and isozyme markers was carried out to evaluate the diversity and genetic structures of natural populations of *Erythrina velutina* Willd., aiming monitored prospection of the genetic variability for two populations from the Atlantic Forest (Santana do São Francisco-SE) and Caatinga (Pinhão-SE) Biomes. Young leaves of twenty individuals per population were sampled from each population. Primers of ten arbitrary bases sequence and fifteen enzymatic systems were used. In RAPD analysis, the population from Atlantic Forest Biome originated 100 polymorphic loci and population from Caatinga Biome, 112 loci. It was observed that the genetic structure for population from Caatinga present higher number of observed and effectives alleles, which implicate in a higher heterozigosity. The observed average heterozygosity was higher than the expected heterozygosity by Hardy-Weinberg, which indicate a excess of heterozygotes, and this value might be confirmed by negative value of the Wright's fixation index (-0.5098). In relation to genetic diversity between populations (*Fst* and *Gst*) the values were similar for both markers. The results suggest the use of M1, M7, M11 and M14 individuals from Atlantic Forest Biome; and the M5, M6, M18 and M19 individuals from Caatinga Biome as most divergent for future chemical, biochemical and pharmacological studies.

Keywords: genetic parameters, heterozygosity, diversity

Guideline: Renata Silva-Mann – UFS

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas naturais vêm sofrendo drasticamente com a atividade humana, e esta ação devastadora traz alterações irreversíveis às espécies predominantes nestes ambientes. A fragmentação dos habitats propicia além da extinção, o declínio das populações, uma vez que as tornam vulneráveis à depressão endogâmica e à mudança genética (PINTO *et al.*, 2004).

Diante desse cenário percebe-se a necessidade eminente de estudos sobre ecologia e genética de populações naturais, para o conhecimento da estrutura genética das mesmas e, conseqüentemente, para o entendimento dos processos ecológicos de ocorrência na população, que vêm promover o delineamento de estratégias de conservação, melhoramento e manejo sustentável com atividades para a definição do tamanho de reservas, uso das espécies, recuperação de áreas degradadas e coleta de sementes para plantios com espécies nativas (KAGEYAMA *et al.*, 2003).

São inúmeras as espécies que necessitam de estudos nessa linha, no entanto, algumas devem ser priorizadas devido às suas particularidades. Um exemplo prático faz referência ao estudo da espécie *Erythrina velutina* Willd., conhecida vulgarmente como mulungu, que tem despertado grande interesse para a pesquisa, uma vez que esta apresenta propriedades medicinais de grande importância (CARVALHO, 2008).

Contudo, a definição de genótipos potenciais para as pesquisas ainda é muito incipiente, uma vez que a espécie apresenta uma grande plasticidade ecológica comprovada pela presença de indivíduos em diferentes regiões, ocorrendo na Caatinga e em áreas ripárias de Mata Atlântica, como o Baixo São Francisco Sergipano, o que sugere diversidade genética entre indivíduos e populações, uma vez que a diferenciação entre espécies é fundamentada tanto por fatores genéticos como ambientais.

Vale também ressaltar, que essa espécie está sendo utilizada de forma multidisciplinar pelo projeto RENORBIO-CNPq. Neste projeto ações em farmacologia, taxonomia, expressão gênica e no caso desta pesquisa, a caracterização genética via marcadores moleculares de indivíduos e populações, poderá auxiliar na seleção de potenciais indivíduos, e conseqüente, conservação destes para uso em processos biotecnológicos.

Assim, as ferramentas biotecnológicas são fundamentais em pesquisas, com o uso dos marcadores moleculares (bioquímicos e de DNA), que têm sido amplamente utilizados na caracterização genética de populações naturais de plantas e animais. Além disso, também por permitirem a obtenção de um grande número de informações com um esforço relativamente pequeno (HILLIS *et al.*, 1996, FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998, ALFENAS *et al.*, 1998), obtendo resultados confiáveis, de forma rápida e custo acessível.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi quantificar a diversidade genética e avaliar a estrutura genética em duas populações naturais de mulungu por meio de marcadores de RAPD e isoenzimas, visando à indicação de indivíduos prioritários para estudos de farmacologia, manejo de populações naturais e recuperação de áreas degradadas, para fins de conservação da espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PERDA E FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS E DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES FLORESTAIS NATURAIS

A diversidade biológica está se deteriorando, principalmente com o aumento da taxa de extinção de espécies, devido ao impacto das atividades humanas; ação esta que desequilibra e desestabiliza os ecossistemas. Portanto, para conservação genética de uma espécie é necessário o conhecimento da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de suas populações (LACERDA & KAGEYAMA, 2003).

No Brasil, como em outros países tropicais, uma exploração indiscriminada vem ocorrendo em florestas nativas, em virtude da explosão demográfica e expansão das fronteiras agrícolas. Este tipo de exploração, aliado ao desconhecimento das exigências culturais, da biologia reprodutiva, da regeneração e do padrão de distribuição genética das diferentes espécies florestais nativas, têm ocasionado deterioração da base genética, comprometendo o patrimônio dos ecossistemas. Além da exploração predatória, a perda e a fragmentação dos habitats podem acarretar a extinção de populações locais e ainda levar à perdas da biodiversidade e mudanças na distribuição e abundância das espécies devido à descontinuidade da vegetação original, acarretando impedimentos para a migração, restrição do tamanho das populações e acréscimo dos efeitos de borda (PINTO & CARVALHO, 2004).

Diante disso, são imprescindíveis estudos genéticos em nível populacional das espécies que compõem tais ecossistemas, de modo que sejam estabelecidas estratégias de conservação genética, sobretudo em áreas perturbadas, procurando reunir subsídios que contribuam para a conservação *in situ*.

O estudo da variação genética em populações naturais de uma espécie considera, basicamente, a quantificação dos níveis de variabilidade dentro das populações e a caracterização da estrutura genética entre populações (CONTE, 2004). A preservação da diversidade genética se tornou objetivo da maioria dos programas de conservação e conhecer a distribuição desta diversidade dentro e entre populações naturais é o primeiro passo (CAVALLARI, 2004). O conhecimento do modo como a variação genética de uma espécie está distribuída em suas populações é essencial para a sua manutenção (REIS, 1999), como também, de acordo com Lacerda *et al.* (2001), para o estabelecimento de formas de exploração econômica.

2.2. BIOTECNOLOGIA E GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO

A biotecnologia é vista, como um produto da atividade humana relacionada com a exploração dos recursos naturais. Com certeza, grande parte do progresso biotecnológico se deve ao descobrimento e utilização de produtos e processos naturais, atualmente evidenciados pelos megaprojetos de bioprospecção nas regiões tropicais, que geram vários produtos de origem industrial (BORÉM & SANTOS, 2001).

Esse enorme valor da biodiversidade, é que tem levado à regulamentação do acesso ao patrimônio genético em países megadiversos como o Brasil, a fim de controlar a biopirataria (BORÉM & SANTOS, 2001). No entanto, atualmente vários procedimentos biotecnológicos têm sido aplicados à minimização do impacto antrópico à biodiversidade, destacando entre essas atitudes a aplicação da genética da conservação, que diagnostica e monitora processos relacionados com a conservação e manejo (SANTOS & REDONDO, 2003).

A manutenção da diversidade genética é um dos principais focos da biologia da conservação, já que é ela que fornece o potencial adaptativo/evolutivo de uma espécie. Por esse motivo, o conhecimento da composição alélica de uma espécie, e de como ela está organizada (estruturada) em suas populações, é fundamental para as ações de manejo e conservação. Por outro lado é importante entender se a estruturação genética encontrada é uma característica natural da espécie estudada ou é resultado da presença de barreiras físicas causadas pelo homem, como no caso de fragmentação do habitat (GALETTI *et al.*, 2008).

Para isso, a genética da conservação utiliza ferramentas biotecnológicas, para a caracterização e, conseqüente, preservação da biodiversidade. Esses instrumentos permitem quantificar a diversidade genética, que se caracteriza pelo conjunto de todas as variantes existentes no genoma de uma espécie (SANTOS & REDONDO, 2003), e entre genomas de espécies diferentes.

2.3. FERRAMENTAS EMPREGADAS NA QUANTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA

Desde antes da descoberta do código genético e da molécula de DNA, a genética fascina o homem levando-o a uma busca infinita de questões. Com o passar do tempo, técnicas foram aprimoradas no sentido de desvendar os mecanismos genéticos presentes nos complexos sistemas dos seres vivos (MARTINELLI, 2001).

Uma dessas técnicas se refere aos marcadores moleculares que são definidos por Ferreira & Grattapaglia (1998) como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondendo a regiões expressas ou não do genoma). A seqüência de nucleotídeos e a função de um marcador molecular podem ou não ser conhecidas. Ao se verificar o seu comportamento de acordo com as leis básicas de herança de Mendel, um marcador molecular pode ser adicionalmente definido como marcador genético.

2.3.1. Marcadores Genéticos

Os estudos genéticos em populações naturais de espécies arbóreas tropicais, baseados em marcadores genéticos, iniciaram-se na Malásia (GAN *et al.*, 1981), porém tiveram grande avanço nas florestas neotropicais do Panamá (HAMRICK & LOVELESS, 1986), da Costa Rica (BAWA & O' MALLEY, 1987) e do Brasil (HERRIITT, 1991; MORAES, 1993; PAIVA *et al.*, 1994).

Estes marcadores genéticos apresentam diversas aplicações na conservação genética dos recursos florestais, por meio da mensuração da diversidade genética, estimativa da taxa de fluxo gênico ou migração, caracterização do sistema de reprodução, análise de paternidade, avaliação da eficiência do pomar de sementes, estudos filogenéticos e taxonômicos, podendo ser mensuradas diferenças genéticas em populações naturais e manejadas (GLAUBTIZ & MORAN, 2000).

Esses marcadores podem ser morfológicos, citológicos, fisiológicos e moleculares. Um marcador morfológico é um fenótipo de fácil identificação, valendo ressaltar que para ser um marcador é necessário que ele esteja intimamente ligado a um gene de interesse. A grande limitação do marcador morfológico é a sua ocorrência em número reduzido e, conseqüentemente, não ser suficiente para marcar alelos de interesse de vários genes da espécie (RAMALHO *et al.*, 2000). Outro aspecto a se considerar é que os marcadores

morfológicos nem sempre apresentam alta herdabilidade, portanto, sofrem grande influência ambiental. O mesmo pode ser dito para o marcador fisiológico.

Em relação aos marcadores moleculares estes têm sido usados com sucesso na análise genética de plantas e na caracterização da variabilidade contida em bancos de germoplasma, bem como em populações naturais.

2.3.1.1. Marcadores de DNA

Os marcadores de DNA apresentam vantagens uma vez que podem ser obtidos em grande número e não sofrem influência de fatores ambientais. Tais técnicas permitem fazer distinção diretamente em nível de DNA e ainda contribuem para avaliar a variabilidade genética dentro do conjunto gênico de espécies cultivadas e não cultivadas, assim como avaliar a diversidade disponível *in situ* e em bancos de germoplasma.

Como exemplo da eficiência desse método, pode-se citar o trabalho de Salla *et al.* (2002), onde os marcadores moleculares foram utilizados na análise de variabilidade genética de 24 acessos de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal de Londrina, onde foram analisados utilizando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*- Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) e marcadores microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats* – Sequências Simples Repetidas). Um total de 164 e 73 marcadores foram obtidos com oligonucleotídeos de RAPD e SSR. Os marcadores obtidos foram analisados, usando o método de agrupamentos UPGMA, sendo detectado maior polimorfismo entre acessos com oligonucleotídeos de RAPD. A análise dos resultados revelou a alta variabilidade contida na coleção, permitindo associar o grau de similaridade genética obtido por marcadores de DNA com caracteres morfológicos compartilhados entre os acessos.

Um outro exemplo que pode ser citado foi o estudo realizado por Santana *et al.* (2008) em população do Baixo São Francisco Sergipano com a espécie *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. empregando marcadores moleculares RAPD. A diversidade genética encontrada em oito indivíduos desta população remanescente permitiu a definição de estratégias de coleta de sementes. O valor médio de diversidade genética entre as matrizes foi de 49%, variando de 33 a 85%.

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), desde a concepção dos marcadores baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia de Polimerase), esta tecnologia causou uma verdadeira revolução, tanto na biologia quanto nas áreas aplicadas, envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais domésticos. E essa revolução se deve a facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR, que a torna particularmente poderosa para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo.

Essa técnica possui inúmeras derivações, e dentre elas é importante ressaltar a tecnologia do RAPD.

2.3.1.1.1. RAPD

Wesh & McClelland (1990) e Williams *et al.* (1990) introduziram uma técnica que se baseia na detecção de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), usando oligonucleotídeos de dez bases, que detectam polimorfismos mesmo na ausência de informações da sequência específica de nucleotídeos do DNA alvo (BORGES *et al.*, 2000).

Além das grandes vantagens dessa técnica já citadas anteriormente, têm-se ainda: o custo relativamente reduzido, em relação a outras técnicas moleculares, e a aplicabilidade

imediate a qualquer tipo de organismo. Não envolve a utilização de pessoal altamente especializado e não emprega radioatividade. A técnica também não exige sequenciamento de nucleotídeos, nem desenho de oligonucleotídeos específicos e não requer o desenvolvimento prévio de bibliotecas de sondas específicas para o organismo de interesse (BORÉM & CAIXETA, 2006).

Esta alta acessibilidade confere à técnica uma boa aceitação para análises relacionadas à: diferenciação de linhagens, estimativa de variabilidade em bancos de germoplasma, estudo de estrutura genética de populações, estimativa de parâmetros genéticos, entre outras (GARAY & DIAS, 2001), principalmente quando se refere às espécies nativas, pois apesar da falta de informações genéticas sobre essas espécies é possível a utilização de marcadores moleculares de DNA de sequências arbitrárias.

2.3.1.1.2. Marcadores Isoenzimáticos

O termo isoenzima, também encontrado na literatura como isozima, foi introduzido por Market & Moller (1959), para designar formas moleculares múltiplas de enzimas, que ocorrem em um mesmo organismo e em membros de mesma espécie. Esses autores concluíram que os organismos geralmente sintetizam formas moleculares múltiplas de enzimas com a mesma especificidade enzimática (BORÉM & CAIXETA, 2006).

Ainda segundo esses autores, as isoenzimas podem ser produtos de diferentes sítios genéticos e podem ser geradas ainda, pela duplicação do gene, com mutações subsequentes nos locos.

Desde a sua resolução pelos métodos histoquímicos, a principal aplicação das isoenzimas é em estudos de diversidade genética e evolução, o que têm sido extremamente importante para as investigações sobre variação intra-específica, genética de populações, evolução e mapeamento genético, já realizados em centenas de espécies. Apesar de estar sendo utilizada em vários programas de melhoramento, o reduzido número de sistemas enzimáticos polimórficos impõe limitações variáveis, dependendo do objetivo do estudo ou da atividade (FDGV/CCA.UFSC, 2005). Diante disso, tem-se tentado trabalhar com o máximo número de sistemas visando à obtenção de dados consistentes.

As isoenzimas apresentam diferentes mobilidades em um campo elétrico, devido às diferenças de sequência de DNA que as codificam. Os padrões de bandas de dois indivíduos assumem que estas diferenças possuem base genética e são herdáveis (ALFENAS, 1998).

Com o objetivo de avaliar a diversidade genética de população de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) e suas progênies em arboreto, foram realizados estudos por meio de marcadores isoenzimáticos. Foi constatado um alto índice de endogamia e coancestria nas árvores adultas do arboreto, supondo-se que os resultados obtidos foram consequência do efeito de deriva genética gerada pelo processo de implantação da população (NETO *et al.*, 2005).

Em outro estudo, duas populações de *Xylopia brasiliensis* Sprengel foram analisadas por meio da eletroforese de isoenzimas, visando determinar os níveis de variabilidade genética mantidos entre e dentro das populações, sua estrutura genética, fluxo gênico e tamanho efetivo. A análise empregando sete sistemas enzimáticos permitiu a identificação de uma baixa diversidade genética, o que contribuiu para a definição da área de conservação *in situ* de 10,08 hectares (PINTO & CARVALHO, 2004).

De acordo com Caixeta *et al.* (2006) a propriedade mais expressiva das isoenzimas como marcadores genéticos é a herança mendeliana simples, com co-dominância entre alelos, na maioria dos locos. As outras vantagens são: é uma técnica relativamente barata e operacionalmente acessível; a determinação genotípica dos locos pode ser feita em qualquer parte da planta; mesmo sendo de número limitado, vários locos isoenzimáticos podem ser

analisados simultaneamente; não são detectados efeitos deletérios, epistáticos ou pleiotrópicos associados aos alelos isoenzimáticos. Por causa dessas vantagens, apesar da existência de marcadores genéticos mais modernos e informativos, as isoenzimas continuam sendo muito utilizadas em análises genéticas que não demandam ampla amostragem do genoma.

2.4. PARÂMETROS AVALIADOS NO ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA

Os parâmetros genéticos populacionais estimados com base em marcadores podem ser utilizados para diversos fins. Quando o objetivo é a conservação e caracterização genética de espécies que estão inseridas em biomas que devem ser preservados, estes parâmetros podem ser úteis na detecção de populações que apresentem diferentes magnitudes de variabilidade genética e que, portanto, requerem diferentes estratégias para sua conservação *in situ* ou *ex situ* (AVISE & HAMRICK, 1996; NEWTON *et al.* 1999).

Quando, por outro lado, o interesse for a domesticação da espécie e sua utilização econômica, estes parâmetros podem auxiliar na definição de programas de coleta visando à seleção de apenas parte da variabilidade que seja de interesse para o melhorista (BORÉM, 1998), ou no caso deste estudo, na identificação da variabilidade que pode ser útil em estudos farmacológicos ou químicos.

Os dados moleculares podem ser utilizados para melhor compreender a dinâmica dos alelos nas populações de uma determinada espécie, fornecendo subsídios para o maior entendimento dos processos micro-evolutivos, que estão atuando na diferenciação destas populações (REIS, 1996; AVISE, 2000). Estas informações, aliadas aos conhecimentos da história de vida e de características ecológicas da espécie, permitem conhecer parte da sua biologia, bem como da sua interação com outras espécies do bioma, no qual ela está inserida (TELLES *et al.*, 2003).

Os parâmetros mais utilizados para estimar a diversidade genética em populações naturais e as alterações decorrentes da ação antrópica, são: número médio de alelos por loco (\hat{A}), heterozigosidade esperada ou diversidade gênica (\hat{H}_e); heterozigosidade observada (\hat{H}_o) e índice de fixação (\hat{f}) (BERG & HAMRICK, 1997). Entre estes parâmetros, \hat{A} e \hat{H}_e são muito influenciados pela deriva genética, em razão dos alelos raros (com frequência inferior a 0,05) não serem retidos em pequenas amostras. Porém, para inferir se a diversidade genética em uma população será mantida em longo prazo, apenas a quantificação da riqueza alélica (\hat{A}) é insuficiente. Para esse tipo de inferência, é necessária a análise comparativa de \hat{A} e \hat{H}_e , especialmente porque o valor de \hat{H}_e é influenciado tanto pelo número de alelos como pela distribuição de suas frequências relativas (RAPOSO *et al.*, 2007).

Outros parâmetros utilizados se referem ao Índice de diversidade de Nei (1973), em que se utilizam frequências gênicas (frequências de alelos), permitindo a partição hierárquica da diversidade em seus componentes entre e dentro das unidades experimentais e, índice de Shannon, que mede o grau de certeza em se prever a proximidade genética entre indivíduos, entre e dentro das populações. Quanto menor o valor do índice de Shannon menor será a diversidade da amostra, logo, a diversidade tende a ser mais alta quanto maior o valor do índice.

São vários os trabalhos publicados com espécies arbóreas que fazem uso desses parâmetros. Como exemplo, pode-se citar os trabalhos realizados por Pinto *et al.* (2004), desenvolvendo pesquisa com *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpiniaceae); Defavari *et al.* (2009) trabalhando com *Hymenaea stagnocarpa* Mart. Ex. Hayne (Fabaceae); Gois *et al.* (2009), em estudo desenvolvido com *Spondias lutea* L. (Anacardiaceae) e Gonçalves *et al.* (2010) com *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae).

2.5. ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL

A variabilidade genética de uma espécie estrutura-se no espaço e no tempo, podendo ser observada em populações geograficamente distintas. A distribuição espacial dos genótipos em populações é parte integrante dos processos genéticos populacionais (EPPERSON & ALLARD, 1989).

O estudo dos padrões de distribuição espacial é hoje uma das ferramentas mais utilizadas para entender o comportamento de diversos fenômenos (ANJOS *et al.*, 1998). Em ciências florestais, uma grande aplicação está no estudo da distribuição espacial de árvores, principalmente daquelas do seu ambiente natural. O conhecimento do padrão de distribuição espacial pode fornecer informações sobre a ecologia, subsidiar a definição de estratégias de manejo e/ou conservação, auxiliar em processos de amostragem ou simplesmente esclarecer a estrutura genética de uma espécie (ANJOS, 1998).

Essa distribuição espacial das plantas, dentro de uma população, pode ser considerada um dos fatores que influenciam o sistema de cruzamento que, com a dispersão de pólen e sementes, pode desempenhar grande efeito na estrutura espacial da variabilidade genética. Além disso, a estrutura genética espacial também é influenciada por processos micro-evolutivos e demográficos em curtos e longos prazos (EPPERSON, 2003).

O padrão espacial ou a estrutura da diversidade genética dentro de populações é um componente importante dos processos genético-ecológicos e evolucionários de populações naturais de plantas. O conhecimento da estrutura genética espacial pode melhorar a eficiência da amostragem para maximizar a diversidade gênica ou minimizar os cruzamentos endogâmicos (EPPERSON, 1990).

Essa distribuição espacial de genótipos pode ser quantificada, utilizando-se a análise de autocorrelação espacial. Essa análise, de acordo com Legendre (1993), pode ser definida com a propriedade de variáveis assumirem valores, em pares de localidades separadas por uma certa distância, mais similares (correlação positiva) ou menos similares (correlação negativa) do que seria esperado pela associação aleatória dos pares observados.

Um exemplo prático disso, se refere ao trabalho realizado por Telles *et al.* (2001) onde esse teste foi aplicado com o objetivo de comparar as matrizes de similaridade genética e de distribuição geográfica entre dez subpopulações de *Eugenia dysenterica* DC. nativas da região sudeste do Estado de Goiás. Estes testes sugeriram que o principal fator determinando a divergência genética é a distribuição geográfica das subpopulações, em um modelo na qual existe um balanço entre deriva genética atuando dentro das subpopulações e fluxo gênico em curtas distâncias ligando as subpopulações.

2.6. ESPÉCIE

O gênero *Erythrina* ocorre nas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo. Possui cerca de 110 espécies, das quais 70 são nativas da América (EPAMIG, 1993; VASCONCELOS *et al.*, 2003). O nome *Erythrina*, do grego “erythros”, significa “vermelho” em alusão à cor de suas flores. São empregadas como ornamentais e sombreadoras das lavouras de café e cacau (EPAMIG, 1993).

As plantas do gênero *Erythrina* são conhecidas por produzirem alcalóides, flavonóides e isoflavonóides. Estas plantas representam a principal fonte de alcalóides tetracíclicos, sendo que estes possuem atividade semelhante ao curare causando paralisia muscular (AMER *et al.*, 1991; DECKER *et al.*, 1995). Dentro deste gênero uma das espécies

mais estudadas pelas suas propriedades medicinais é a *Erythrina velutina* Willd., vulgarmente conhecida como mulungu.

O mulungu, também conhecido como suinã, bico-de-papagaio, canivete, corticeira e sananduva, pertencente à família Fabaceae (Leguminosae- Papilionidae) é uma árvore de grande resistência à seca, apresentando rusticidade e rápido crescimento, podendo ser usada para recuperação de áreas degradadas. Na época da floração, que ocorre entre os meses de setembro/outubro, a árvore apresenta-se, no semi-árido, desfolhada, porém, completamente florida, proporcionando, dentro do contexto da paisagem seca, um quadro de explosão de vida, sendo registrada, com frequência, a presença de diversas aves para se alimentar, não só do néctar, mas também, de partes da própria planta. Sua madeira é leve e pouco resistente a agentes agressivos, com expressiva utilização no artesanato para confecção de tamancos, brinquedos, caixotes, dentre outros (LORENZI & MATOS, 2002).

Assim como é conhecido na região nordeste, de acordo com Carvalho (2008), o mulungu, ocorre de forma natural, no Brasil, nas seguintes Unidades da Federação: Bahia, Ceará, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (Figura 1).

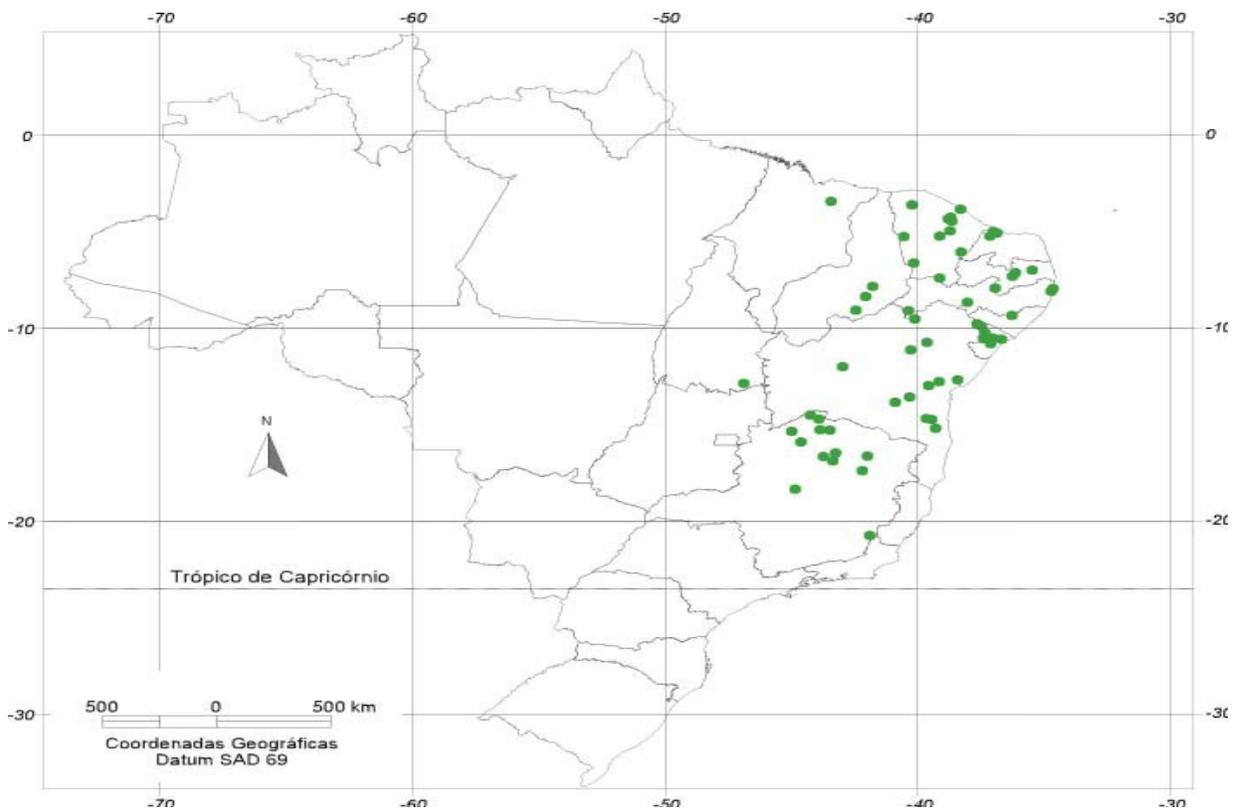


Figura 1. Locais de ocorrência do Mulungu (*Erythrina velutina* Willd.), no Brasil. UFS, São Cristóvão, 2010.

É uma espécie hermafrodita e possui como vetor de polinização a abelha-européia ou africanizada – *Apis mellifera* – e as abelhas mamangavas (*Xylocopa* spp.). A dispersão de seus frutos e sementes é anemocórica (pelo vento) e zocórica, principalmente por aves. Essa espécie é classificada em seu grupo ecológico sucessional como pioneira, ocorrendo preferencialmente nas formações secundárias, apresentando dispersão bastante irregular e descontínua (CARVALHO, 2008).

Essa espécie nativa da flora brasileira tem sido utilizada na medicina popular e em alguns fármacos. São atribuídas às infusões da casca propriedades sudorífica, calmante, emoliente, peitoral e do seu fruto seco ação anestésica local que é usado na forma de cigarro odontológico, embora a eficácia e segurança de seu uso ainda não tenham sido confirmadas cientificamente (LORENZI & MATOS, 2002). Dantas *et al.* (2004) evidenciaram que o extrato aquoso das folhas de mulungu em baixas doses interferiu em processos mnemônicos e, em doses maiores agiu como sedativo e bloqueador neuromuscular periférico.

São vários os trabalhos realizados com essa espécie. Dentre esses, pode-se citar o realizado por Santos *et al.* (2007), com o objetivo de avaliar o efeito do extrato aquoso das folhas de *Erythrina vellutina* (AE) sobre ducto deferente de rato. Esses autores tiveram como conclusão que o efeito inibitório do AE pode ser devido a uma interação pré-sináptica com canais de K⁺ dependentes de ATP em neurônios simpáticos de ducto deferente de rato.

Outro se refere ao trabalho realizado por Lima *et al.* (2008) com o objetivo de estudar os efeitos comportamentais e neuroquímicos da espécie através dos produtos do seu fracionamento, enfatizando suas atividades no sistema nervoso central, de forma a contribuir para a validação desta espécie largamente utilizada na medicina popular no país.

Além desses, tem o trabalho realizado por Filho *et al.* (2009), onde o objetivo foi determinar a influência dos estresses abióticos (hídrico e térmico) sobre a atividade e o perfil de metabólitos do mulungu. Os resultados sugerem o indivíduo M4, sendo que este corresponde ao indivíduo M1 da região do Baixo São Francisco Sergipano trabalhado nesse estudo, na presença de estresse por restrição hídrica e altas temperaturas produz maior teor de metabólitos ativos, sendo *a priori* a mais indicada para o desenvolvimento do fitoterápico.

Diante dos conhecimentos que se tem sobre o uso farmacológico e a plasticidade ecológica da espécie, principalmente pela sua ocorrência em biomas distintos como na Mata Atlântica e Caatinga, que a expõe à restrição de água e alta temperatura; percebe-se a importância de se estudar a diversidade e estrutura genética desses indivíduos em nível populacional, sob o ponto de vista ecológico e ainda, na identificação de genótipos divergentes que poderão ser empregados como matéria-prima com potencial uso biotecnológico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LOCALIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES

As populações estudadas distam entre si, 155 Km e são representadas pelo Baixo São Francisco Sergipano (Local 1) e pelo Município de Pinhão/SE (Local 2).

O Local 1 é caracterizado por uma área de 100ha (10 km por 10m de extensão), de mata ciliar no Baixo São Francisco Sergipano, entre os municípios de Neópolis (S 10°18'39" e W 36°34'56") e Santana do São Francisco (S 10°15'55" e W 36°38'15"), onde foram identificados vinte (20) indivíduos de mulungu. No Local 2, localizado no município de Pinhão/SE (S10°33'50" e W37°42'47"), também foram identificados vinte (20) indivíduos.

Cada indivíduo foi georreferenciado utilizando para isso aparelho GPS modelo Garmin 12, e as coordenadas usadas para análise de correlação espacial, coleta frequente de material biológico e monitoramento quanto à presença e a produção de sementes dos indivíduos.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

3.2.1. Baixo São Francisco Sergipano

O município de Santana do São Francisco, inserido no Baixo São Francisco Sergipano, está situado na região nordeste do Estado de Sergipe, limitando-se a norte com o Estado de Alagoas e a sul, leste e oeste com Neópolis. Este município está localizado às margens do rio São Francisco Sergipano. Sendo assim, de acordo com o código florestal (Lei n. 4.777, de 15 de setembro de 1965) as áreas que margeiam os rios são consideradas Áreas de Preservação Permanente (APP), visando à proteção da biodiversidade e qualidade das águas. Nessa região, as áreas de mata ciliar apresentam-se bastante degradadas, uma vez que a estrada que liga os municípios vizinhos passa por dentro da APP, com trechos de aproximadamente 6 metros das margens do rio, além de moradias e agricultura de subsistência e pastagens.

Como reflexo, a região apresenta uma vegetação descontínua e pouco densa, sendo que essas características propiciam o afugentamento da fauna, colaborando para o rompimento dos processos ecológicos naturais, como troca de pólen entre espécies vegetais, ocasionando assim, modificações na estrutura genética das espécies arbóreas da região e facilidade de exploração com o uso da madeira pelas comunidades locais do que ainda resta da vegetação.

O município apresenta clima do tipo megatérmico seco a sub-úmido, temperatura média no ano de 26°C, precipitação pluviométrica média anual de 1.200mm e período chuvoso de março a agosto. O relevo está caracterizado por feições dissecadas nas formas de colinas, cristas e superfícies tabulares com bordas erosivas. O solo é do tipo Podzólico Vermelho Amarelo, com uma vegetação de Mata, Capoeira, Cerrado e Pastagem (SERGIPE.SEPLANTEC/SUPES, 1997/2000).

3.2.2. Município de Pinhão-SE

O município de Pinhão está localizado entre os rios Vaza Barris e Sergipe, no extremo oeste do Estado de Sergipe, limitando-se com o município de Carira ao norte, Frei Paulo e Pedra Mole a leste, Simão Dias ao sul e o Estado da Bahia a oeste.

A situação da vegetação nessa área não é diferente da encontrada no Baixo São Francisco Sergipano, sendo vastamente fragmentada, identificando-se poucos indivíduos que servem para o sombreamento de animais.

O município está inserido no polígono das secas, com um clima do tipo megatérmico seco e sub-úmido, temperatura média anual de 24°C, precipitação pluviométrica média no ano de 800mm e período chuvoso de março a agosto. O relevo é de superfície pediplanada e dissecada, com formas de colinas e tabuleiros, com aprofundamento de drenagem de muito fraca a fraca. Os solos são Litólicos Eutróficos, Cambisol, Podzólico Vermelho Amarelo equivalente Eutrófico, com uma vegetação de Capoeira e Caatinga (SERGIPE.SEPLANTEC/SUPES, 1997/2000).

3.3. COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal, constituído de folhas jovens, utilizado para a realização das análises de RAPD e isoenzimas foi coletado dos 20 indivíduos de mulungu, os únicos encontrados em cada área de estudo. A coleta foi realizada com o auxílio de podão devido à altura das árvores.

Em seguida, o material foi identificado, acondicionado em gaze, mantido a baixas temperaturas e transportado ao Laboratório de Culturas de Tecidos e Melhoramento Vegetal – Setor de Genética Molecular do Departamento de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Sergipe (UFS), onde foi mantido em freezer (-20°C) até o momento da sua extração.

3.4. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA foi baseada no método descrito por Nienhuis *et al.* (1995), com modificações. Foram utilizados, aproximadamente 2g de folhas jovens para a extração de DNA. Essas folhas foram maceradas em almofariz contendo 10 mL de tampão CTAB [Cetil trimetil brometo de amônio 2%; Cloreto de sódio (NaCl) 1,4mM; Tris 1mM pH 8,0; Polivinilpirrolidona (PVP) 1%] e 20µL de β-mercaptoetanol. Posteriormente esse material foi transferido para um tubo de ensaio e posto em banho-maria a 65°C por 30 minutos.

Após o período de incubação, as amostras passaram por um processo de purificação, em que 1.000µL de cada amostra foram colocados em microtubos contendo 1.000µL da mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). As amostras foram homogeneizadas por meio de lentas inversões e centrifugadas a 7.000 XG por 30 min.

O sobrenadante obtido foi coletado e removido, com o auxílio de uma micropipeta, para um microtubo contendo 1.000µL de álcool:acetato de amônia (triplicata). As amostras foram mantidas em *freezer* por 48 horas para a precipitação do DNA, e logo após centrifugadas a 7.000 XG por 10 minutos, para a então formação do precipitado. Em seguida o álcool:acetato de amônia foi descartado e substituído por álcool 70% e centrifugado por 10 minutos a 4.000 XG para aumentar a sedimentação do DNA. A partir de então, a fase líquida foi descartada e o precipitado colocado para secar em temperatura ambiente. Depois de seco, este foi dissolvido em 100µL de TE (Tris HCL 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM) e transferido para um novo microtubo.

A quantificação do DNA extraído foi realizada em gel de agarose a 1% [(1,0g de agarose; 100mL de Tris – Borato - EDTA(TBE) 0,5X)]. Alíquotas do DNA foram aplicadas nas canaletas do gel ao lado de uma série de concentrações conhecidas de DNA (20-200ng), sendo a concentração das amostras estimada por comparação. Os géis foram submetidos à eletroforese por 1 hora e 30 minutos, em seguida corado em brometo de etídio

(0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e estimada pela intensidade de bandas, visualizadas através da luz ultravioleta.

3.4.1. REAÇÕES DE RAPD

Após a extração do DNA se deu início as reações de RAPD. O coquetel de reagentes para cada matriz foi composto por 2,92 μL de água ultra pura; 1,30 μL de tampão 10X; 1 μL de cloreto de magnésio (25mM); 1,04 μL de dNTPs; 1,04 μL de BSA (Soro Albumina Bovina); 0,2 μL da enzima *Taq* polimerase; 2,5 μL do oligonucleotídeo e 3 μL do DNA de trabalho. Foram testados 20 oligonucleotídeos (Tabela 1) da marca IDT (“Integrated DNA Technologies”) em cada um dos indivíduos estudados/população.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RAPD empregando *Erythrina velutina* Willd. UFS, São Cristóvão, 2010.

Oligonucleotídeos	Sequência 5' – 3'
01	CAG GCC CTT C
02	TGC CGA GCT G
03	GTT TCG CTC C
04	TGA TCC CTG G
05	TTC GAG CCA G
06	GTG AGG CGT C
07	ACC GCG AAG G
08	GGA CCC AAC C
09	CCC AAG GTC C
10	GGT GCG GGA A
11	ACG GAT CCT G
12	GAG GAT CCC T
13	CTA CGG AGG A
14	GGC ACT GAG G
15	GGT CGG AGA A
16	TCG GAC GTG A
17	ACC TGG ACA C
18	GGA GGA GAG G
19	CCC GGC ATA A
20	AAA GTT GGG A

O programa de amplificação do DNA consistiu de uma temperatura inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos que envolvem temperaturas de 94°C por 1 minuto, 36°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto. A amplificação se deu em termociclador Uniscience Biometra Tpersonal, utilizando microtubos de 200 μL , contendo 13 μL do coquetel. As amplificações foram feitas aleatorizando-se as amostras, de forma a evitar falsa estruturação.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese (Figura 2), realizada a 110 V, em gel de agarose a 1%. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal, contendo tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5X em quantidade suficiente para deixar o gel

submerso. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio ($0,5\mu\text{g.mL}^{-1}$) por 10 a 15 minutos e os produtos da amplificação visualizados sob luz ultravioleta.

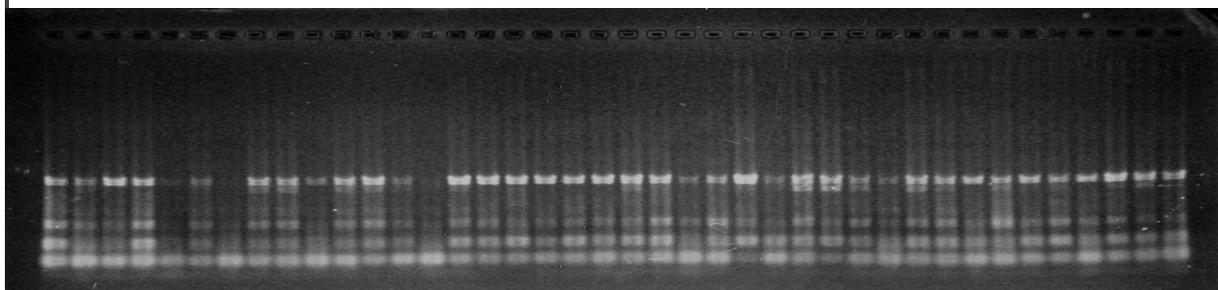


Figura 2. Produtos de amplificação de RAPD gerados com o oligonucleotídeo IDT 11 em indivíduos de *Erythrina velutina* de ocorrência no Baixo São Francisco Sergipano. UFS, São Cristóvão, SE, 2010.

3.4.2. Análise dos dados

Na avaliação dos géis, a presença (1) e a ausência (0) de fragmentos amplificados foram usadas para a construção de matrizes binárias, que foram empregadas nas análises.

3.4.2.1. Número ótimo de fragmentos amplificados

O número ótimo de fragmentos amplificados foi analisado utilizando-se o software GENES (CRUZ, 2007). Nesta análise foram obtidas as estimativas de correlação de valores da matriz de similaridade, a soma de quadrados dos desvios em relação às re-amostragens e o valor de estresse (E), que indica o ajuste entre a matriz original e a matriz simulada. O número de bandas foi considerado ideal quando o estresse assumiu valor inferior a 0,05 (KRUSKAL, 1964).

$$S_{ji} = \frac{a}{a + b + c}$$

3.4.2.2. Similaridade genética

A similaridade genética (S_{ji}) entre os indivíduos de mulungu foi calculada pelo coeficiente de similaridade de Jaccard empregando o programa NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 2001), com base na seguinte expressão:

Onde, a representa a presença de bandas em ambos os genótipos, b representa a presença de banda no primeiro genótipo e ausência no segundo e c a presença no segundo e ausência no primeiro.

Com a matriz binária calculou-se a porcentagem de polimorfismo obtido com cada oligonucleotídeo utilizado por meio da fórmula:

$$P = \frac{nbp}{nbt} \times 100$$

Onde:

P = porcentagem de polimorfismo (ou taxa de polimorfismo);

nbp = número de fragmentos polimórficos;

nbt = número de fragmentos total.

Os erros associados a cada similaridade foram estimados segundo Skroch, Tivang e Nienhuis (1992), pelas seguintes expressões:

$$V = ns(1-s)/(n-1)$$

$$\text{Erro padrão estimado} = (V/n)^{1/2}$$

em que:

V : variância da similaridade genética entre cada par de progênies;

s : similaridade genética entre cada par de progênies;

n : número total de bandas utilizadas na estimativa da similaridade genética.

A representação simplificada das similaridades foi feita por meio da construção de um dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA (ROHLF, 2001).

Os indivíduos geneticamente diferentes foram identificados nos dendrogramas a partir da estimativa do valor mínimo de similaridade, acima do qual os indivíduos são semelhantes, ou o valor máximo significativo de similaridade (Sg^m) (CASTANHEIRA, 2001). O (Sg^m) foi estimado por meio do teste t , no nível de 1% de probabilidade. Sendo representado no dendrograma por meio da linha de corte.

$$Sg_m = 1 - \left(t - \bar{Ssg}_{ij} \right)$$

Em que:

t = o valor tabelado de t com $n-2$ graus de liberdade;

\bar{Ssg}_{ij} = erro médio das comparações consideradas nos dendrogramas

Analisou-se também, a consistência de cada agrupamento (coeficiente de correlação cofenética) por meio do teste Z de Mantel no programa NTSYS-pc 2.1 (ROHLF, 2001). Esse dado possibilita avaliar o desempenho da análise de agrupamento, em função da obtida, ou seja, se os grupos indicados para representar a classe de dissimilaridade podem ser considerados uma boa representação dos dados originais.

Em análise de agrupamento, diversos autores, entre eles Bussab *et al.* (1990), sugerem que um valor de coeficiente de correlação cofenética (cf) em torno de 0,8 pode ser considerado um bom ajuste.

3.4.2.3. Estrutura genética

Para a análise da estrutura genética populacional foi utilizado o programa POPGENE versão 1.31 (YEH *et al.*, 1997), utilizando parâmetros para dados diplóides dominantes. Dessa forma, esse programa pressupõe, para os cálculos das estimativas das frequências alélicas, que os locos estejam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram estimados:

- Número de alelos observados (n_a),
- Número de alelos efetivos (n_e),
- Diversidade gênica de Nei (\hat{H}_e) (1973),
- Porcentagem de locos polimórficos ($P\%$),
- Heterozigosidade total (H_T),
- Heterozigosidade média dentro de populações (H_S)
- Diversidade entre populações (D_{ST})

$$D_{ST}=H_T-H_S$$

- Coeficiente de divergência genética entre populações (G_{ST}).

$$G_{ST}=D_{ST}/H_T$$

- Índice de Shannon (I)

3.5. REAÇÕES DE ISOENZIMAS

Para a extração de isoenzimas, 200 mg de folhas jovens foram maceradas com 0,5 mg de PVP (polivinilpirrolidona) e 1,5 mL da solução tampão de extração nº 1, de acordo com Alfenas *et al.* (1991), modificado pela ausência de DIECA.

A eletroforese utilizada foi a vertical, empregando gel de poliacrilamida em sistema descontínuo, sendo o gel de concentração de 4,5% e o gel de separação de 7,5%. Este processo se deu a 150 V, com duração aproximada de 3,5 horas, à temperatura de 4°C, sendo utilizado para o sistema tampão gel-eletrodo, Tris-Glicina pH 8,9. Esses procedimentos seguiram a metodologia descrita por Alfenas *et al.* (1991). Ao término da corrida, os géis foram revelados para 15 sistemas enzimáticos (Tabela 2) e em seguida, feita a interpretação das bandas no gel.

Tabela 2. Sistemas enzimáticos testados, suas siglas e códigos universais. UFS, São Cristóvão, 2010.

Álcool desidrogenase	ADH- EC 1.1.1.1
Esterase	EST- EC 3.1.1.1
Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Desidrogenase	NADPH- EC 1.6.99.1
Glucose desidrogenase	GLUDH- EC 1.1.1.47
Isocitrato desidrogenase	IDH- EC 1.1.1.42
Malato desidrogenase	MDH- EC 1.1.1.37
Superóxido dismutase	SOD- EC 1.15.1.1
Manitol Desidrogenase	MADH- EC 1.1.1.67
B-galactose desidrogenase	GLDH- EC 1.1.1.48
Glucose-6-fosfato desidrogenase	G6PDH – EC 1.1.1.49
Glutamato oxaloacetato transaminase	GOT- EC 2.6.1.1

Peroxidase
Xiquimato desidrogenase
Fosfatase alcalina
Sorbitol desidrogenase

PO- EC 1.11.1.7
SKDH – EC 1.1.1.25
AKP- EC 3.1.3.1
SDH – EC 1.1.1.14

3.5.1. Interpretação do Zimograma

A interpretação dos zimogramas permite a determinação dos genótipos de cada indivíduo, e ainda estimar vários parâmetros que caracterizarão a variabilidade genética da população e a sua estrutura genética. Por meio da interpretação dos zimogramas obteve-se as frequências alélicas para cada loco. A partir dessas frequências, estimou-se o índice de diversidade segundo Brown & Weir (1983) e Nei (1987).

3.5.2. Variabilidade Genética da População

3.5.2.1. Estimativas das frequências alélicas

As frequências alélicas descrevem a variação para um loco e foram obtidas pela contagem direta do número de alelos por loco, dividida pelo número total de alelos no loco:

$$\hat{P}_i = \frac{n_i}{n}$$

Sendo:

\hat{P}_i = frequência de alelo i

n_i = número de ocorrência do alelo i

n = número total de alelos amostrados

3.5.2.2. Estimativa dos índices de diversidade e estrutura genética

A partir das frequências alélicas foram obtidos os índices de diversidade genética: heterozigosidade média observada (\hat{H}_o); heterozigosidade média esperada (\hat{H}_e); porcentagem de locos polimórficos (P); número médio de alelos por loco (A); índice de fixação de Wright (\hat{f}). A estrutura genética foi obtida pelo índice de fixação para a média das populações (Fis), índice de fixação para o conjunto das populações (Fit) e divergência genética entre populações (Fst), estimativas obtidas por meio do programa Popgene 1.31, desenvolvido por Yeh *et al.* (1997).

a) Heterozigosidade média observada (\hat{H}_o)

A heterozigosidade observada (\hat{H}_o) é uma medida de menor valor para comparação de diversidade genética, devido a esta ser afetada pela endogamia e outros processos evolutivos (deriva genética, mutação e seleção), violando a suposição do EHW (Equilíbrio de Hardy-Weinberg) (BERG & HAMRICK, 1997).

A heterozigidade observada para cada loco foi obtida pela razão entre o número total de heterozigotos e o número de indivíduos. Para a sua obtenção, as proporções obtidas para cada loco foram somadas e divididas pelo número total de locos polimórficos:

$$\hat{H}_o = 1 - \sum p_{ij}$$

Sendo:

p_{ij} = freqüência dos genótipos homozigotos.

b) Heterozigidade esperada (\hat{H}_e)

A heterozigidade esperada segundo princípios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (\hat{H}_e) mede a proporção esperada de locos heterozigotos por indivíduos com base nas freqüências alélicas da amostra populacional. Esse índice resume a diversidade genética de uma amostra em termos de número e freqüência de alelos.

A heterozigidade esperada foi estimada para cada loco, conforme Nei (1978):

$$\hat{H}_e = 2n \left[\frac{1 - \sum \hat{p}_i^2}{2n - 1} \right]$$

Sendo:

n : número de indivíduos amostrados na população em questão.

c) Porcentagem de locos polimórficos (P)

Um loco é considerado polimórfico quando a freqüência de seu alelo mais comum não ultrapassar 0,95. Para determinar esta medida de polimorfismo, foram testados vários sistemas enzimáticos. Dessa forma, P foi obtido pela média aritmética do número de locos polimórficos pelo número total de locos.

d) Número de alelos por loco em cada população (\hat{A})

O número médio de alelos por locos (\hat{A}) é uma medida de riqueza alélica dentro dos locos. Contudo, igualmente como P , esta estatística também é dependente do tamanho da amostra, ou seja, do número de indivíduos e de locos avaliados. Amostras de poucos indivíduos tendem a não conter alelos de baixa freqüência, causando uma subestimativa da riqueza alélica existente dentro dos locos.

O número médio de alelos por loco (\hat{A}) em cada população foi obtido pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos.

e) Índice de fixação de Wright

O parâmetro utilizado para medir o grau de fixação gênica resultante da endogamia é o coeficiente de F de Wright (1951), sendo estimado ao nível de locos e média entre locos, de acordo com Vencovsky (1994), pelas relações:

- Para nível de loco

$$\hat{f} = 1 - \left(\frac{\hat{H}_o}{\hat{H}_e} \right)$$

- Para média ponderada entre locos

$$\hat{f} = 1 - \left(\frac{\sum \hat{H}_o}{\sum \hat{H}_e} \right)$$

f) Índice de fixação para a média das populações (*Fis*)

g) Índice de fixação para o conjunto das populações (*Fit*)

h) Divergência genética entre populações (*Fst*)

3.6. ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL

Para essa análise, a matriz de distância genética foi comparada à matriz de distribuição geográfica pelo Teste de Mantel, tendo como objetivo verificar a existência de associação entre essas. O teste de Mantel foi realizado por meio do programa NTSYS (ROHLF, 2001) utilizando 5.000 permutações aleatórias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. REAÇÕES DE RAPD

As reações de amplificação dos fragmentos de DNA, utilizando oligonucleotídeos RAPD, geraram 134 fragmentos, sendo 100 polimorficos, o que corresponde a uma porcentagem de polimorfismo de 74,63% no Local 1 e 143 fragmentos, sendo 112 polimórficos, o que corresponde a uma porcentagem de 78,32% no Local 2.

Fazendo uma análise geral para os 40 indivíduos testados, foi observado que o oligonucleotídeo IDT 6 foi o que apresentou menor número de fragmentos amplificados (1), já o maior número (16) foi observado para o oligonucleotídeo IDT 15 (Tabela 3).

Tabela 3. Número de fragmentos amplificados para cada oligonucleotídeo testado nos 40 indivíduos de *Erythrina velutina* Willd. estudados. UFS, São Cristóvão, 2010.

Oligonucleotídeos	Nº Total de fragmentos amplificados	Nº de fragmentos polimórficas
IDT 1	10	7
IDT 2	6	6
IDT 3	7	6
IDT 4	6	4
IDT 5	8	8
IDT 6	1	1
IDT 7	5	5
IDT 8	6	1
IDT 9	11	7
IDT 10	5	2
IDT 11	10	8
IDT 12	7	6
IDT 13	4	4
IDT 14	8	8
IDT 15	16	16
IDT 16	9	9
IDT 17	6	6
IDT 18	9	8
IDT 19	6	6
IDT 20	4	4

4.1.1. Número ótimo de fragmentos amplificados

Observou-se que houve uma relação diretamente proporcional entre o número de fragmentos analisados e a magnitude de correlação dos valores da matriz de similaridade original obtida a partir de reamostragens com diferentes número de fragmentos amplificados.

Para a população amostrada do Baixo São Francisco Sergipano houve consistência dos dados a partir 85 fragmentos amplificados, quando a correlação (r) atingiu 0,9811 e o valor de estresse (E) de 0,0489. Para a população amostrada do Município de Pinhão houve consistência a partir de 87 fragmentos amplificados, quando a correlação (r) atingiu 0,9396 e o valor de estresse (E) 0,0463 (Figura 3). Esses valores estão de acordo com o valor informado por Colombo *et al.* (2000), onde o intervalo entre 50 a 100 fragmentos é suficiente para estimar relações genéticas entre e dentro de populações de espécies vegetais.

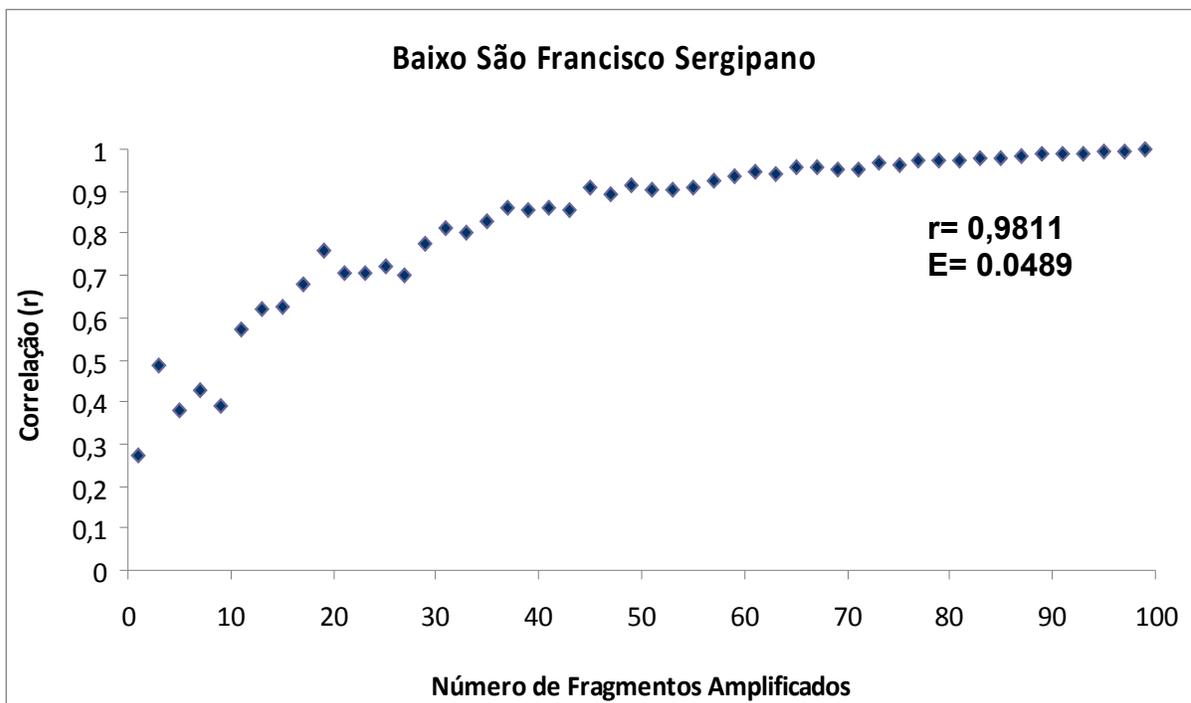


Figura 3. Cont.

... Continua...

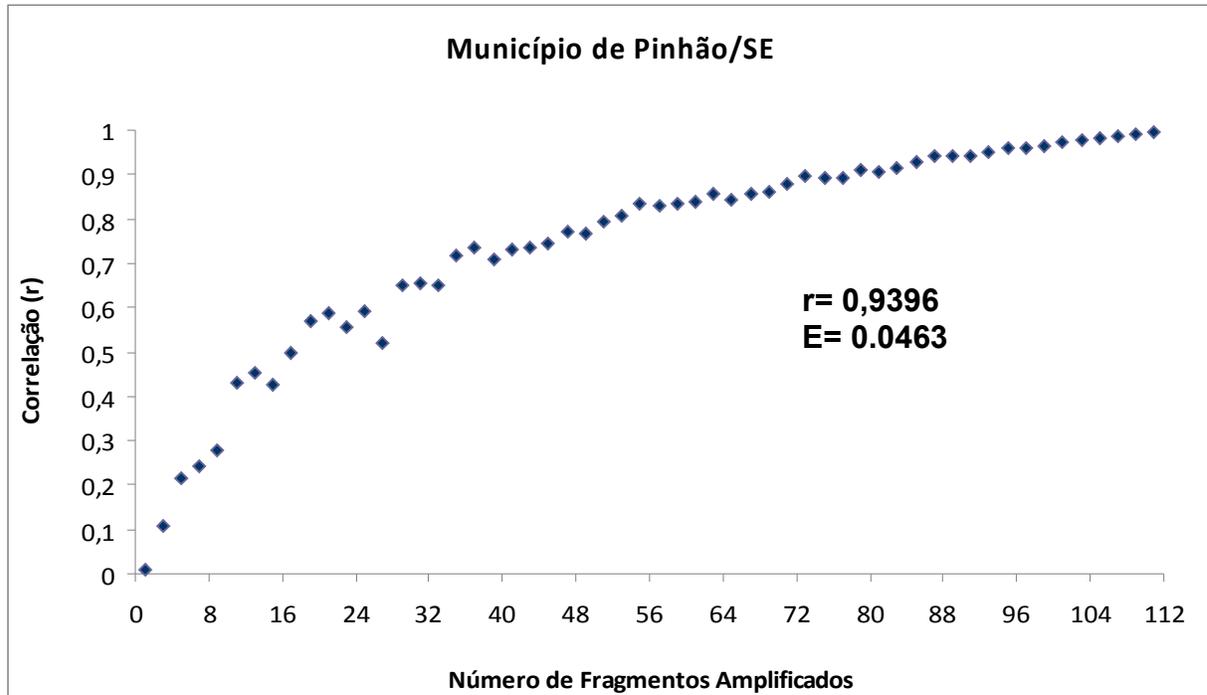


Figura 3. Coeficiente de correlação (r) e número de bandas obtidas para 20 indivíduos de *Erythrina velutina* Willd. localizados no Baixo São Francisco Sergipano e no Município de Pinhão/SE. UFS, São Cristóvão, 2010.

4.1.2. Similaridade genética

Com o objetivo de analisar a divergência genética entre os indivíduos de cada população, foi construída uma matriz de similaridade para cada uma das duas populações.

Para a população do Baixo São Francisco (Local 1), os pares de indivíduos M6 e M12 (73,92%) e M9 e M12 (73,33%) apresentaram maior similaridade genética. E os que apresentaram menor similaridade foram os indivíduos M1 e M7, com 23,81% (Anexo 1A). A similaridade genética média para essa região foi de 48,88%.

Em relação a população do município de Pinhão-SE (Local 2), os pares de indivíduos M1 e M8 (75,64%) e M8 e M13 (75,29%) foram os mais similares, enquanto o par de indivíduos M6 e M12 foram os menos similares, com 41,46% (Anexo 2A), com uma similaridade genética média de 58,90%.

Com base no limiar mínimo de similaridade, sendo este de 83% para ambas as populações, todos os indivíduos foram considerados divergentes, uma vez que os pares de indivíduos mais próximos geneticamente apresentam-se a esquerda da linha de corte, ou seja, abaixo dos valores mínimos de similaridades encontrados (Figura 4).

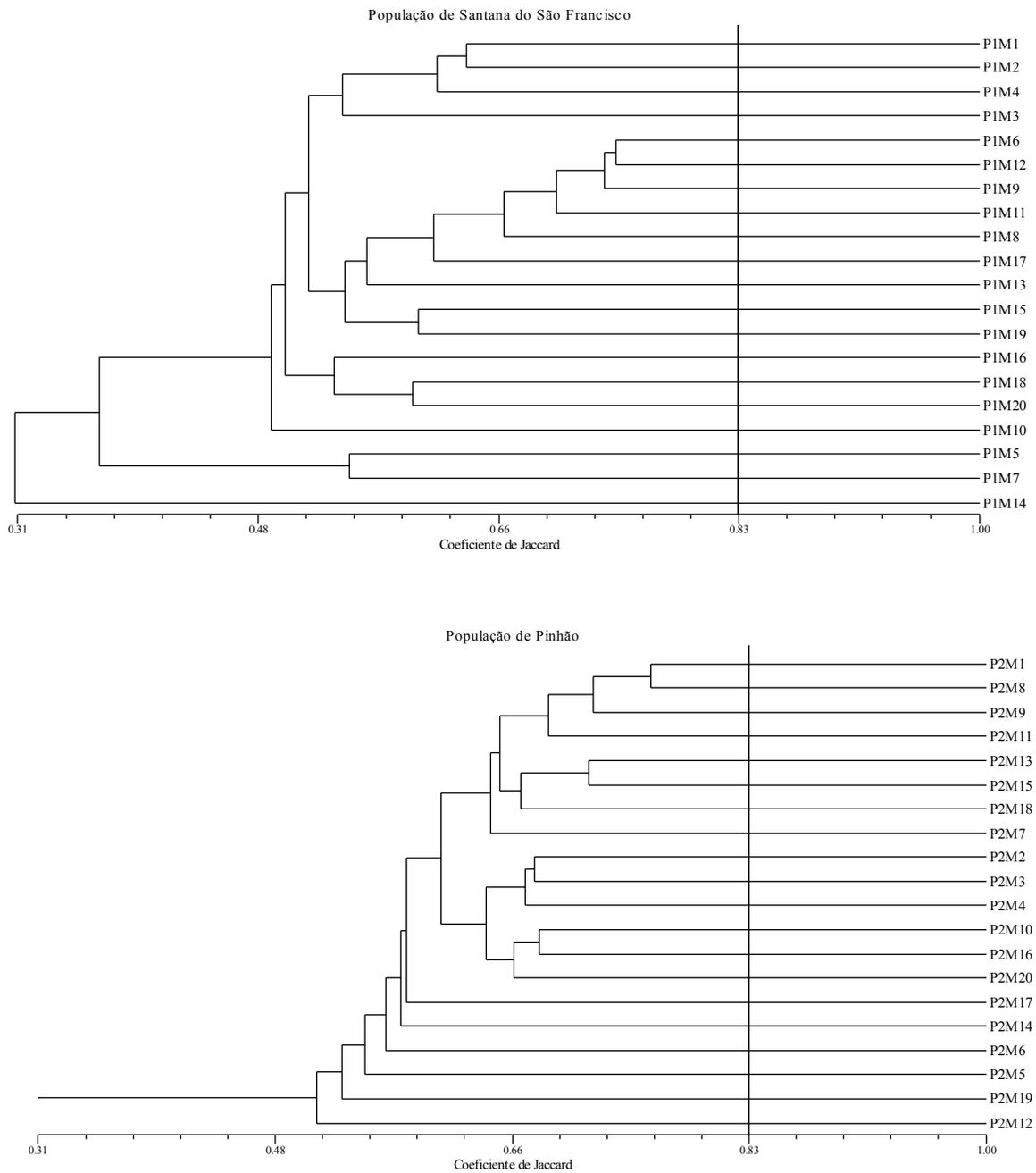


Figura 4. Estimativa da similaridade genética entre indivíduos de duas populações de *Erythrina velutina* Willd. definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base nas médias obtidas com o Índice de Jaccard. UFS, São Cristóvão, 2010.

Com base no coeficiente de correlação cofenética (*cf*) pode-se afirmar que os agrupamentos representam com confiabilidade as matrizes de similaridade genética, uma vez que o valor encontrado para o Local 1 foi de 0,9 e para a população do Local 2 foi de 0,8.

4.1.3. Estrutura genética

A partir da análise dos parâmetros genéticos não foram observadas diferenças significativas entre as duas populações (Tabela 4). Entretanto, observou-se uma maior divergência genética entre indivíduos do Município de Pinhão-SE ($H_e = 0,30$), evidenciado pelo maior número de alelos observados (1,90) que vem corroborar para uma maior heteroziguidade, e, conseqüentemente, maior polimorfismo na população (90,24%).

Tabela 4. Estimativa de parâmetros genéticos populacionais utilizando marcadores RAPD, para 2 populações de *Erythrina velutina* Willd., estando uma localizada no Baixo São Francisco Sergipano (Local 1) e outra localizada no município de Pinhão/SE (Local 2). UFS, São Cristóvão, 2010.

Populações Parâmetros	Local 1		Local 2		Todas as populações	
	Média	s	Média	s	Média	s
<i>na</i>	1,81	0,39	1,90	0,30	2,00	0,00
<i>ne</i>	1,50	0,38	1,50	0,33	1,65	0,31
\hat{H}_e	0,28	0,19	0,30	0,16	0,37	0,13
<i>P%</i>	81,30	*	90,24	*	*	*
<i>I</i>	0,42	0,26	0,45	0,30	0,55	0,16

na: número de alelos observados; *ne*: número efetivo de alelos; \hat{H}_e : diversidade gênica de Nei; *P%*: porcentagem de locos polimórficos; *s*: desvio padrão; *I*: índice de Shannon

Sebbenn (1997) e Maltez (1997) em trabalho realizado com *Genipa americana* L. e *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. encontraram valores de 50% para ambas as populações, e consideraram alto polimorfismo, o que indica que as populações estudadas ainda não se apresentam em fase de isolamento.

Na análise da diversidade genética de Nei (\hat{H}_e) observou-se valores de 0,28 a 0,30 para as populações dos Locais 1 e 2. Esse maior índice na população situada no Local 2 pode ser explicado pela maior ocorrência do número de alelos observados nessa população. A média da diversidade genética de Nei (H_e) observada nas populações de mulungu foi de 0,37 (Tabela 4), e comparados com outros estudos, os valores encontrados são próximos aos relatados em outras espécies arbóreas, como para *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae), onde o \hat{H}_e variou de 0,27 a 0,33, estando estas populações em área de Reserva Florestal e Estação Ecológica (ZIMBACK *et al.*, 2004) e para *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae), o \hat{H}_e médio foi de 0,28, em áreas fragmentadas (TOREZAN *et al.*, 2005).

Somando-se a este, os valores obtidos na análise do índice de Shannon, para as populações de mulungu pode-se inferir acerca de uma média diversidade genética dentro de cada população analisada, principalmente para a população situada no Local 2, que apresenta índice de 0,45 (Tabela 4), uma vez que o referido índice varia de 0 a 1, e quanto mais próximo de zero, mais baixa é a diversidade genética (ESTOPA *et al.*, 2006). Podendo-se observar na análise das médias das duas populações que o valor do índice de Shannon apresenta um acréscimo bastante viável, o que vem contribuir para a necessidade da conservação das duas populações de mulungu, pois estas apresentam alelos efetivos diferenciados em cada população, aumentando assim a base genética da espécie.

Na análise da estrutura genética das populações observou-se que os valores de heteroziguidade total (H_T) foi de 0,30 (Tabela 5), sendo este valor, próximo ao observado para espécies nativas arbóreas de angiospermas e gimnospermas (0,22), em uma compilação feita com base em 307 estudos usando marcadores de DNA nuclear para avaliar a diversidade entre e dentro de populações (NYBOM, 2004), o que indica alto índice de locos polimórficos, o que pode contribuir para a melhor estrutura genética da população analisada. Assim, a perda de heteroziguidade pode reduzir o valor adaptativo individual, diminuindo a

viabilidade da população remanescente, o que pode culminar com a erosão genética, pela perda de indivíduos.

Tabela 5. Estimativa de parâmetros genéticos populacionais de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.), em 2 populações, sendo uma localizada no Baixo São Francisco Sergipano (Local 1) e outra no Município de Pinhão/SE (Local 2). UFS, São Cristóvão-SE, 2010.

	H_T	H_S	D_{ST}	G_{ST}
Média	0,37	0,29	0,08	0,21
Desvio padrão	0,02	0,02		

H_T : heterozigidade total; H_S : heterozigidade média dentro de populações; D_{ST} : diversidade gênica entre populações; G_{ST} : Coeficiente diversidade gênica entre populações.

A distribuição da variabilidade genética entre as populações (D_{ST}) de mulungu foi de 0,07 e o coeficiente de diversidade genética entre populações foi (G_{ST}) 0,21 (Tabela 5). Com este valor de G_{ST} pode-se inferir, que a variabilidade amostrada entre as populações, contribui com 21% para a heterozigidade total, sendo 79% a variabilidade distribuída dentro das populações.

Estudos realizados em diversas espécies, baseados em marcadores RAPD e locos isoenzimáticos têm estimado valores que variam de 0,05 a 0,34 de divergência genética (G_{ST}) entre populações (ZIMBACK *et al.*, 2004). Segundo Yeh (2000) uma estimativa de G_{ST} de 0,151 a 0,250 representa um alto nível de diferenciação, assim o índice de G_{ST} entre as populações de mulungu é considerado um índice muito elevado de divergência genética.

Este padrão de distribuição está de acordo com o observado para outras espécies arbóreas e com o esperado em espécies de fecundação cruzada ou de sistema misto, predominantemente fecundação cruzada. As habilidades dos indivíduos em trocar alelos, associadas ao fluxo alélico entre populações, reduzem as diferenças entre populações por deriva genética e seleção, reduzindo a diversidade genética entre populações (KAGEYAMA *et al.*, 2003)

4.2. REAÇÕES ISOENZIMÁTICAS

Dos quinze sistemas enzimáticos testados para o mulungu, apenas seis foram empregados na estimativa de parâmetros genéticos, por serem passíveis de interpretação. Apenas um sistema não apresentou expressão monomérica (PO), e a maioria deles segregou dois alelos nos sete locos observados (Tabela 6).

Tabela 6. Locos enzimáticos analisados, número de alelos e frequência alélica média observada nos 40 indivíduos de *Erythrina velutina* Willd., coletados no Baixo São Francisco Sergipano e no Município de Pinhão/SE. UFS, São Cristóvão-SE, 2010.

Loco	Alelo	Frequência alélica
IDH	1	0,6714
	2	0,3286
SOD	1	0,5000
	2	0,5000
MDH	1	0,4828
	2	0,5172
EST	1	0,4167
	2	0,5833
PO-1	1	0,4107
	2	0,5893
PO-2	1	1,0000
	2	0,0000
G6PDH	1	0,5500
	2	0,4500
Total de alelos		13

O alelo que apresentou menor frequência alélica foi o alelo 2 do loco IDH (0,3286) e o que apresentou maior frequência foi o alelo 1, também do loco IDH (0,6714). O alelo 1 do loco PO-2 apresentou-se fixado, o que significa que apenas um único alelo está representado na população, como consequência provável para a ocorrência de deriva genética.

Com base nos valores das frequências alélicas dos sete locos enzimáticos foram estimados os índices de diversidade e estrutura genética (Tabela 7). Obteve-se heterozigosidade média observada de 0,5091, portanto, maior que a esperada (0,4262), o que indica uma maior ocorrência de heterozigotos do que o esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Valores semelhantes foram encontrado por Gois *et al.* (2009) para *Spondias lutea* L., em uma população natural do baixo São Francisco sergipano, em que a heterozigosidade média observada (0,5312) foi maior que a esperada (0,5145).

Tabela 7. Estimativa de parâmetros genéticos populacionais utilizando marcadores isoenzimáticos, para 2 populações de *Erythrina velutina* Willd., estando uma localizada no Baixo São Francisco Sergipano (Local 1) e outra localizada no município de Pinhão/SE (Local 2). UFS, São Cristóvão, 2010.

Populações	Local 1		Local 2		Todas as Populações	
	Média	S	Média	s	Média	s
<i>H_o</i>	0,4059	0,3492	0,5620	0,3633	0,5091	0,3171
<i>H_e</i>	0,3096	0,2261	0,3640	0,1998	0,4262	0,1894
<i>P%</i>	71,43		85,71		85,71	
<i>f</i>	-	-	-	-	-0,2731	
<i>F_{is}</i>	-	-	-	-	-0,5098	
<i>F_{it}</i>	-	-	-	-	-0,1798	
<i>F_{st}</i>	-	-	-	-	0,2186	

Essa informação é confirmada pelo valor encontrado para o índice de fixação de Wright (-0,2731), uma vez que, valores negativos desse índice indicam ausência de endogamia, logo excesso de heterozigotos na população (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O número médio de alelos por loco foi de 1,85. Quando comparado ao estudo realizado por Souza *et al.*,(2004), este valor é inferior ao encontrados para o conjunto de

populações fragmentadas (2,38) de *Chorisia speciosa* St. Hil.(Bombacaceae) e próximo ao encontrado por Gonçalves *et al.*, (2010) para *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae), onde esse valor foi 2,0.

A porcentagem de locos polimórficos foi de 71,43% para a Pop 1 e de 85,71% para a Pop 2, sendo estes valores próximos ao encontrado por Pinto *et al.*, (2004) para *Copaifera langsdorffii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar, onde o valor encontrado foi de 72,7% para ambas as populações. Já em relação aos valores encontrado por Gois *et al.*, (2009) para uma população de *Spondias lutea* L. (90%), estes valores foram inferiores. No entanto, de acordo com Hamrick & Godt (1990), para espécies vegetais, um valor igual ou superior a 50% indica alto polimorfismo, o que torna estas populações favoráveis a conservação *in situ*.

Em relação a estrutura genética, o resultados evidenciam que os índices de fixação para a média das populações (*Fis*) e para o conjunto das populações (*Fit*) foram negativos (-0,5098 e -0,1798), logo, estatisticamente diferente de zero, o que sugere ausência de endogamia. A divergência genética entre populações (*Fst*) foi de 0,2186, mostrando que 21,9% da variabilidade genética encontra-se entre as populações e que 78,1% encontra-se dentro das populações. Esses valores são próximos aos encontrados por Pinto *et al.*, (2004), onde a variabilidade genética entre populações de *Copaifera langsdorffii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar, foi de 17,5%.

4.3. Estrutura genética espacial

A estrutura genética espacial obtida pelo teste de Mantel revelou ausência de associação entre a matriz de distância genética e a matriz de distribuição geográfica. O coeficiente de correlação foi negativo tanto para a população do Local 1 (-0,12588); quanto para a população do Local 2 (-0,00169), demonstrando que a diferença nas frequências alélicas não podem ser explicadas pela distância geográfica entre os indivíduos de ambas as populações, sendo a deriva genética a causa mais provável.

Situação semelhante foi evidenciada por Souza *et al.*, (2004), estudando a estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). Os autores encontraram valor de correlação de -0,443 e também atribuíram à essa ocorrência a deriva genética.

5. CONCLUSÕES

As populações de mulungu estudadas possuem variabilidade genética suficiente a serem utilizadas em programas de melhoramento e conservação da espécie.

A diversidade genética para as populações de mulungu estudadas é maior dentro das populações.

Sugere-se o uso dos indivíduos M1, M7, M11 e M14 do Bioma Mata Atlântica; e dos indivíduos M5, M6, M18, M19 do Bioma Caatinga como os mais divergentes para futuros estudos químicos, bioquímicos e farmacológicos.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A espécie *Erythrina velutina* Willd. tem sido muito estudada nos dias atuais devido às suas ricas propriedades medicinais e ampla plasticidade ecológica, que a coloca em posição de destaque dentre outras espécies arbóreas da região nordeste. Entretanto, devido à exploração desordenada que vem ocorrendo, essa espécie vem sendo perdida, podendo apenas ser encontrada em número bastante reduzido no estado de Sergipe, onde se tem como exemplo a área de 100ha do Baixo São Francisco Sergipano, onde apenas 20 indivíduos da espécie foram identificados, o que sugere o caráter de raridade da espécie e a necessidade de conservação dos indivíduos existentes.

Sendo assim, este trabalho pode contribuir de forma significativa para o processo de manejo e conservação da espécie, uma vez que possibilita a indicação de indivíduos prioritários para estudos em nível multidisciplinar como os farmacológicos, bioquímicos e químicos, assim como aqueles a serem priorizados para a recuperação de áreas degradadas, visando a perpetuação da espécie para a presente e futuras gerações.

São vários os trabalhos desenvolvidos na Universidade Federal de Sergipe com essa espécie. Dentre esses, se pode citar o trabalho desenvolvido pela profa. Dra. Rosilene Moretti Marçal, com o objetivo de avaliar a atividade anticolinesterásica de extratos e frações de *E. velutina*, e os trabalhos realizados pela profa. Dra. Flávia Teixeira Silva, desenvolvendo ações para avaliação da potencial atividade ansiolítica do extrato seco de *E. velutina*.

Nesta pesquisa se estudou a diversidade genética de indivíduos, visando à sugestão dos mais divergentes para estudos posteriores. Cabe ainda salientar que as informações obtidas com os dados obtidos, ainda poderão contribuir para o futuro monitoramento das áreas de coleta de sementes, quanto aos aspectos ecológicos e de resiliência.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletoforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 242p., 1991.
- ALFENAS, A.C. **Eletoforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 574p., 1998.
- AMER, M.E.; SHAMMA, M.; FREYER, A.J. The tetracyclic *Erythrina* alkaloids. **Journal of Natural Products**. v. 54, n 2, p. 329-363, 1991.
- ANJOS, A. **Análise do padrão de distribuição espacial do palmito (*Euterpe edulis*) utilizando a função K de Ripley**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 110p. 1998. (Dissertação de Mestrado)
- ANJOS, A.; COUTO, H.T.Z.; BATISTA, J.L.F.; REIS, A. Análise do efeito de um manejo em regime de rendimento sustentável sobre o padrão de distribuição espacial do palmito (*Euterpe edulis* Martius), utilizando a Função K de Ripley. **Revista Árvore**, v.22, n.2, p.215-225, 1998.
- AVISE, J.C. **Phylogeography**. Harvard University Press, Cambridge. 2000.
- AVISE, J.C.; HAMRICK, J.L. **Conservation genetics, case histories from nature**. Chapman & Hall, New York. 1996.
- BAWA, K.S.; O'MALLEY, D.M. Estudios genéticos y de sistemas de cruzamiento em algunas espécies arbóreas de bosques tropicales. **Revista de Biología Tropical**, v. 35, n. 1, p. 177-188, 1987.
- BERG, E.E.; HAMRICK, J.L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal of Forest Research**, v.27, p.415-424, 1997.
- BORÉM, A. Melhoramento de plantas. 22 edição, Viçosa: Editora UFV, 453 p.,1998.
- BORÉM, A.; SANTOS, F.R. **Biotechnologia simplificada**. Visconde do Rio Branco, MG: Editora Suprema. 250p., 2001.
- BORÉM, A. & CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG, 374p., 2006.
- BORGES, E.C.; ROMANHA, A.J.; DIOTAIUTI, L. Uso do *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) no estudo populacional do *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 16 (Sup. 2): 97-100, 2000.
- BROWN, A.H.D.; WEIR, B.S. Measuring genetic variability in plant populations. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding: part. A*. **Amsterdam: Elsevier Science**, p. 219-239, 1983.
- BUSSAB, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. Introdução á análise de agrupamentos. In: Simpósio Nacional de Probabilidade e estatística,9. São Paulo. Anais. São Paulo, Associação Brasileira de Estatística, ABE, v.1,p.1-20, 42-57, 1990.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, p. 9-78, 2006.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 3, 2008.

CASTANHEIRA, A.L.M. **Marcadores RAPD na avaliação do potencial de métodos de condução de população segregante de feijão**. 76p, 2001. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

CAVALLARI, M.M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação**. 92p., 2004. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 189-199, 2000.

CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites**. Piracicaba, 124p., 2004. . (Tese) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

CRUZ, C. D. **Genes**: Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 2007.

DANTAS, M. C.; OLIVEIRA, F. S.; BANDEIRA, S. M.; BATISTA, J. S.; SILVA JÚNIOR, C. D.; ALVES, P. B.; ANTONIOLLI, A. R.; MARCHIORO, M. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, Irlanda, v.94, n. 1, p. 129-133, 2004.

DANTAS, A. C. M.; NODARI, R. O. **Marcadores Genéticos**. Parte 2, FDGV/CCA.UFSC. 2005. Disponível em <www.cca.ufsc.br/dfito/labs> Acesso em 21 de fevereiro de 2006.

DECKER, M. W.; ANDERSON, D.J.; BRIONI, D. L.; DONELLY-ROBERTS, D. L.; CHAE, K. H.; O'NEILL, A. B., PIATTONI-KAPLAN, M., SWANSON, S., SULLIVAN, J. P. Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **European J Pharmacol**, v. 280, p.79-89, 1995.

EPAMIG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. **O Gênero *Erythrina* L. no PAMG** - Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Daphne 3: p.20-25, 1993.

EPPERSON, B.K. **Geographical genetics**. New Jersey: Princeton University Press, 356p., 2003. (Monographs in Population Biology, 38).

EPPERSON, B.K.; ALLARD, R.W. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of *Lodgepole pine*. **Genetics**, v.121, p.369-377, 1989.

EPPERSON, B.K. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S., ed. **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, p.229-253, 1990.

ESTOPA, R. A.; SOUZA, M. S.; MOURA, M. C. O.; BOTREL, M. C. G; MENDONÇA, E. G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em população natural de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish). **Scientia Florestalis**. n.70, p.97-106, 2006.

FERREIRA, M. E., GRATTAPLAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMPRAPA-CENARGEN, 220p., 1998.

FILHO, J. E. R. M.; AZEVEDO, R. M.; SILVA-MANN, R.; CARVALHO, S. A.; FERREIRA, R. A.; CASTRO, R. D. VOS, R. C. H. de; HALL, R. D.; MARÇAL, R. M. Influencia dos estresses hídrico e térmico em campo sobre a resposta ileal e o perfil de metabólitos para os extratos aquosos das folhas de *Erythrina velutina* Willd. (Fabaceae). In: 5º ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFS, 2009.

GALETTI JR, P. M., RODRIGUES, F. P., SOLÉ-CAVA, A., MIYAKI, C. Y., CARVALHO, D., EIZIRIK, E., VEASEY, E. A., SANTOS, F. R., FARIAS, I. P., VIANNA, J. A., OLIVEIRA, L. R., WEBER, L. I., ALMEIDA-TOLEDO, L. F., FRANCISCO, M. R., REDONDO, R. A. F., SICILIANO, S., DEL LAMA, S. N., FREITAS, T. R.O., HRBEK, T., MOLINA, W. F. **Genética da conservação brasileira**. p.244-274. In: Fundamentos de Genética da Conservação. Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., Ribeirão Preto, SP, Editora SBG, 290p., 2008.

GARAY, I.E.G.; DIAS, B.F.S. **Conservação da Biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento**. Petrópolis: Editora Vozes, 2001.

GLAUBITZ, J. C.; MORAN, G. F. Genetic tools. In: YOUNG, A.; BOYLE, T.; BOSHIER, D. (Ed.). **Forest conservation genetics**. Melbourne: CSIRO Publishing, p.39-59, 2000.

GAN, Y.; ROBERTSON, F.W.; SOEPADMO, E. Isozyme variation in some rain forest trees. **Biotropica**, v. 13, p. 20-28, 1981.

GOIS, I.B.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R.A. Variabilidade genética de *Spondias lutea* L. em uma população do baixo São Francisco sergipano, por meio de isoenzimas. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 81, p. 55-60, 2009.

GONÇALVES, A.C.; VIEIRA, F.A.; REIS, C.A.F.; CARVALHO, D. Conservação de *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae) baseada na estrutura genética de populações naturais. Revista Árvore, Viçosa-MG, v.34, n.1, p.95-101, 2010.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. **Biotropica**, v. 18, n.3, p. 201-207, 1986.

HERRIT, M.M. **Ecology and genetic variation of four hardwoods of Brazil's Atlantic Forest Region**. Raleigh, 240p., 1991. Tese(Doutoramento). North Caroline State University.

HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. 1996. Molecular Systematic. Sinauer Associates. Sunderland.

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

KRUSKAL, J.B.. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. **Psychometrika**, v. 29, p. 1-27, 1964.

LACERDA, C.M.B. de; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética espacial de duas populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* M. Allemão na região semi-árida, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.27, n.2, p.145-150, 2003.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P. LEMOS-FILHO, J.P. Genetic diversity and structure of natural populations of *Planthymenia reticulata* (Mimosaceae) a tropical tree from Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, v.10, p.1143-1152, 2001.

LEGENDRE, P. Spatial autocorrelation: trouble or new paradigm? *Ecology*, Washington, v. 74, n. 6, p. 1659-1673, 1993.

LIMA, N. M. ; SALES, G. T. M. ; MONTEIRO, V. S. ; CHAVES, E. M. C. ; PEREIRA, E. C. ; TEIXEIRA, M. A. ; MENDONÇA, Â. R.; ARRUDA, M. DE O. V. ; LIMA, R. C. DE S. ; ESCUDEIRO, S. de S. ; CALLADO, R. B. ; VASCONCELOS, S. M. M. Estudo da atividade ansiolítica dos produtos do fracionamento da espécie *Erythrina velutina*. In: III Reunião Regional FeSBE, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 3.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 512p., 2002.

MALTEZ, H.M. **Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. - Apocynaceae (peroba rosa) em uma floresta estacional semidecídua no estado de São Paulo**. 132p., 1997. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MARTINELLI, B.M. Marcadores moleculares e o melhoramento genético de espécies florestais. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/bioano01/div39.htm>. Acessado em: 27 de novembro de 2007.

MORAES, M.L.T. **Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* F.F & M.F. Alemão Anarcadiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Engler**. Piracicaba, 139p., 1993. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo.

NEI, M. **Analysis of gene diversity in subdivided populations**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.70. p.3321-3223, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, n.3, p.583-590, 1978.

NETO, J.D.G.; SEBBEN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade genética de uma população "ex situ" de *Caesalpinia echinata* Lam. **Scientia Forestalis**, n.69, p.125-133, 2005.

NEWTON, A.C., ALLNUTT, T.R., GILLIES, A.C.M., LOWE, A.J. & ENNOS, R.A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, p.140-145, 1999.

NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J. B. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Madison, v. 120, n. 2, p. 300-306, 1995.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 13, p 1143-1155, 2004.

OLIVEIRA, C.A.M.; SILVA, E. F.; MOLINA, S.G.; FERREIRA R.; LIRA, D.A.S.; JUNIOR, J.A.B.B. Diversidade e estrutura genética em populações de *Caesalpinia echinata* (Lam.) na Estação Ecológica do Tapacurá-PE. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.70, p.77-83, 2006.

PAIVA, J.R.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOVSKY, R.; CONTEL, P.B. Genetics of rubber tree (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. De Juss.) Mull. Arg.) **Silvae genética**, v.43, n.5/6,p. 307-312, 1994.

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

PINTO, S. I. do C.; CARVALHO, D. de. Estrutura genética de populações de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Sprengel) por isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**. vol.27, no.3, p.597-605, 2004.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na Agropecuária**. Lavras: UFLA, 472p., 2000.

RAPOSO, A.; MARTINS, K.; CIAMPI, A.Y.; WADT, L.H.O.; VEASEY, E.A. Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, 2007.

REIS, M.S. Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais de plantas. **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, p.37-47, 1996.

REIS, A.M.A. **Disitribuição da Variabilidade Genética em Aroeira (Myracrodruon urundewa, Anacardiaceae) por marcadores RAPD e polimorfismo de seqüência de cpDNA**. 60p., 1999. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São de Paulo, Piracicaba.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York. Version 2.1, 2001.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.1, p.15-22, 2002.

SANTANA, G. DA C.; SILVA MANN, R., FERREIRA, R. A., GOIS, I. B.; OLIVEIRA, A. DOS S., BOARI, A. DE J; CARVALHO, S. V. A. Diversidade genética de *enterolobium contortisiliquum* (vell.) morong. no baixo Rio São Francisco, por meio de marcadores RAPD. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.32, n.3, p.427-433, 2008.

SANTOS, F.R.; REDONDO, R.A.F. A biotecnologia aplicada à conservação de espécies silvestres. In: **Biotecnologia de A a Z**. BORÉM, A.; SANTOS, F.R. & ALMEIDA, M.R. Viçosa, 229p., 2003.

SANTOS, M.R.V.; ALVES, P.B.; ANTONIOLLI, A.R.; MARCHIORI, M. Efeito relaxante do extrato aquoso das folhas de *Erythrina velutina* em ducto deferente de rato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17 n.3, 2007.

SKROCH, P. W.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationship using RAPD marker data. In: INTERNATIONAL UNION OF FORESTRY RESEARCH ORGANIZATIONS. Proceedings of IUFRO **International Conference: Breeding Tropical Trees**. Cali, p. 26-30. (Section 202- 08). 1992.

SEBBENN, A. M. **Estrutura genética de subpopulações de Genipa americana L. (Rubiaceae) em mata ciliar a partir de isoenzimas**. 107p., 1997. Dissertação Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SERGIPE. Secretaria de Estado do Planejamento e da Ciência e Tecnologia. Santana do São Francisco. In: **Perfis Municipais**. Aracaju, 75p., 2000.

SOUZA, L.M.F.I.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBEN, A.M. Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). **Scientia Forestalis**. n. 65, p.70-79, 2004.

TELLES, M.P.C.; SILVA, R.S.M.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G.; DINIZ FILHO, J.A.F. Divergência entre subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica*) em resposta a padrões edáficos e distribuição espacial. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 36, n. 11, p. 1387-1394, 2001.

TELLES, M.P.C.; VALVA, F.D.; BANDEIRA, L.F.; COELHO, A.G. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. - Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasil. Bot.**, v.26, n.1, p.123-129, 2003.

TOREZAN, J.M.D.; SOUZA, R.F.; RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; CAMARGO, E.H.; VANZELA, A.L.L. Genetic variability of pre and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.48, n.2, p.171-180, 2005.

VASCONCELOS, S.M.M.; OLIVEIRA, G.R.; CARVALHO, M.M.; RODRIGUES, A.C.P.; SILVEIRA, E.R.; FONTELES, M.M.F.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.R. Antinociceptive Activities of the Hydroalcoholic Extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in Mice. **Biol. Pharm. Bull.** v.26, n.7, p. 946-949, 2003.

VENCOVSKY, R. Variance of an estimative of outcrossing rate. **Revista Brasileira de Genética**, v.17, n.3, p.349-351, 1994.

WESH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. K. G.; KUBELI, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. v. 18, p. 6531-6535. 1990.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Ann. Eugen**, v.15, p.313-354, 1951.

ZIMBACK, L.; MORI, E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; VEIGA, R.F.A.; MELLO JÚNIOR, J.R.S. Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) por marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.65, p.114-119, 2004.

YEH, R.C; YANG, R. C; BOYLE, T. POPGENE. Version 1.21: **Software Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. Edmonton: University of Alberta, 1997.

YEH, F.C. Population genetics. *In*: **Forest conservation genetics: principles and practice**. A.Young, D. Boshier & T.Boyle (eds.). p. 21-37. Collingwood: CSIRO Publishing 2000.

ANEXOS

ANEXO A

Anexo 1A. Similaridade genética em % e erro padrão associado à similaridade (em negrito) entre indivíduos de *Erythrina velutina* Willd. pertencentes ao Baixo São Francisco Sergipano (Local 1) baseado no Coeficiente de Jaccard. UFS, São Cristóvão, 2010.

Anexo 2A. Similaridade genética em % e erro padrão associado à similaridade (em negrito) entre indivíduos de *Erythrina velutina* Willd., pertencentes ao município de Pinhão (Local 2) baseado no Coeficiente de Jaccard. UFS, São Cristóvão, 2010.

ANEXO 1A. Similaridade genética em % e erro padrão associado à similaridade (em negrito) entre indivíduos de *Erythrina velutina* Willd. pertencentes ao Baixo São Francisco Sergipano (Local 1) baseado no Coeficiente de Jaccard. UFS, São Cristóvão, 2010.

	P1M1	P1M2	P1M3	P1M4	P1M5	P1M6	P1M7	P1M8	P1M9	P1M10	P1M11	P1M12	P1M13	P1M14	P1M15	P1M16	P1M17	P1M18	P1M19	P1M20
P1M1		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
P1M2	63,16		0,05																	
P1M3	47,62	58,62		0,05																
P1M4	63,08	59,09	56,72		0,05															
P1M5	32,79	40,35	42,86	38,80		0,05														
P1M6	58,21	64,06	61,54	71,01	50,00		0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,05							
P1M7	23,81	32,76	35,09	30,43	54,76	40,62		0,05	0,04	0,05	0,05									
P1M8	45,93	48,61	44,59	53,85	41,79	64,38	39,39		0,05											
P1M9	51,39	54,28	45,94	59,21	45,45	72,86	36,76	70,83		0,05	0,05	0,04	0,05							
P1M10	43,08	53,33	46,03	50,00	48,15	59,09	48,08	57,35	61,12		0,05									
P1M11	52,17	57,57	48,57	60,27	38,39	69,56	34,85	63,01	71,43	55,22		0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
P1M12	49,35	56,16	48,05	60,76	39,72	73,92	30,26	65,38	73,33	50,00	68,00		0,05							
P1M13	46,27	46,97	49,23	57,14	51,78	59,42	34,43	55,55	52,70	49,23	53,52	60,81		0,05						
P1M14	25,81	30,51	32,76	32,35	38,30	32,35	29,17	29,58	27,40	32,76	25,35	28,57	34,43		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
P1M15	52,86	49,29	47,22	56,58	32,39	60,81	28,17	51,25	56,41	39,47	51,28	62,02	50,00	38,82		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
P1M16	50,00	46,03	50,82	56,72	35,59	56,72	32,76	46,57	47,94	48,39	48,57	50,00	46,97	35,09	43,24		0,05	0,05	0,05	0,05
P1M17	45,57	44,30	42,50	53,01	36,00	64,93	26,92	57,32	58,54	40,74	55,55	67,90	54,54	28,57	56,10	42,50		0,05	0,05	0,05
P1M18	50,79	54,10	46,87	59,70	36,67	57,35	27,42	45,33	50,68	46,87	45,20	50,65	54,69	27,42	52,11	56,67	46,83		0,05	0,05
P1M19	45,71	42,25	44,28	52,00	34,85	58,33	28,36	48,72	53,95	40,28	50,67	55,70	49,29	28,36	59,72	48,53	57,69	56,06		0,05
P1M20	43,08	50,82	50,87	52,17	37,93	54,41	37,50	42,86	45,94	46,03	46,48	54,05	53,97	32,76	47,22	50,82	48,05	59,32	53,03	

ANEXO 2A. Similaridade genética em % e erro padrão associado à similaridade (em negrito) entre indivíduos de *Erythrina velutina* Willd., pertencentes ao município de Pinhão (Local 2) baseado no Coeficiente de Jaccard. UFS, São Cristóvão, 2010.

	P2M1	P2M2	P2M3	P2M4	P2M5	P2M6	P2M7	P2M8	P2M9	P2M10	P2M11	P2M12	P2M13	P2M14	P2M15	P2M16	P2M17	P2M18	P2M19	P2M20
P2M1		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05											
P2M2	69,44		0,05																	
P2M3	60,56	67,16		0,05																
P2M4	62,16	66,20	66,67		0,05															
P2M5	54,54	58,10	53,52	51,31		0,05														
P2M6	59,46	58,90	56,52	54,05	52,70		0,05	0,06	0,05	0,05										
P2M7	62,82	62,34	58,11	64,00	54,43	55,13		0,05												
P2M8	75,64	60,71	49,41	52,87	62,96	55,95	64,70		0,04	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05						
P2M9	69,74	68,82	52,59	60,26	56,96	53,75	67,06	73,17		0,05										
P2M10	60,00	65,79	63,89	65,33	53,75	58,44	63,75	62,07	64,20		0,05									
P2M11	68,42	57,50	53,25	58,97	55,70	58,44	59,76	69,88	66,25	65,00		0,05								
P2M12	56,41	48,15	47,37	51,28	42,68	41,46	47,06	55,17	58,75	59,50	57,50		0,05							
P2M13	65,85	61,44	55,55	59,04	61,73	56,63	63,53	75,29	67,86	62,79	64,70	59,52		0,05						
P2M14	57,65	53,49	45,88	58,54	46,59	50,59	55,68	61,54	54,44	60,46	64,28	53,49	65,91		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
P2M15	60,49	62,02	53,85	61,54	58,23	61,04	64,20	66,28	62,65	67,50	65,43	50,59	71,08	60,92		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
P2M16	60,49	66,23	62,16	65,79	60,26	55,00	62,19	66,28	60,71	67,50	61,44	50,59	65,12	59,09	65,85		0,05	0,05	0,05	0,05
P2M17	55,84	51,28	48,65	54,67	49,35	50,00	55,70	58,33	62,34	55,00	58,97	49,37	60,97	52,94	61,54	63,64		0,05	0,05	0,05
P2M18	58,02	63,64	55,26	55,00	53,75	60,53	65,82	62,07	64,20	62,96	62,96	44,83	64,70	58,62	67,50	65,43	65,33		0,05	0,05
P2M19	60,52	50,00	49,33	49,37	42,68	50,65	54,32	53,41	56,80	59,49	55,55	51,90	52,27	45,05	58,02	52,38	63,25	57,50		0,05
P2M20	56,25	59,74	64,28	59,21	48,15	56,58	62,02	53,33	56,63	65,38	53,57	48,19	63,09	51,68	59,76	65,82	57,14	63,29	55,70	

