



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

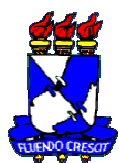
**VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Zizyphus joazeiro* MART. E *Cassia
grandis* L.f., POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES**

ITAMARA BOMFIM GOIS

MESTRADO

2010





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO
MESTRADO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



**VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE POPULAÇÕES
NATURAIS DE *Zizyphus joazeiro* MART. E *Cassia grandis* L.f., POR MEIO DE
MARCADORES MOLECULARES**

AUTOR(A): ITAMARA BOMFIM GOIS

ORIENTADOR(A): ROBÉRIO ANASTÁCIO FERREIRA

CO-ORIENTADOR(A): RENATA SILVA-MANN

SÃO CRISTOVÃO, SERGIPE

AGOSTO, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

G616v Gois, Itamara Bomfim
Variabilidade genética entre e dentro de populações naturais de *Zizyphus joazeiro* Mart. e *Cassia grandis* L.f., por meio de marcadores moleculares / Itamara Bomfim Gois. – São Cristóvão, 2010.
116 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Robério Anastácio Ferreira
Co-orientado: Profª. Renata Silva-Mann

1. Ecologia. 2. Variabilidade genética. 3. Estrutura genética. 4. *Zizyphus joazeiro* Mart.. 5. *Cassia grandis* L.f.. 6. Marcadores moleculares. I. Título.

CDU 634.662

TERMO DE APROVAÇÃO

VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Zizyphus joazeiro* MART. E *Cassia grandis* L.f., POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES

por

ITAMARA BOMFIM GOIS

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Sergipe, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Apresentada à banca examinadora composta por

Robério Anastácio Ferreira

Núcleo de pós-graduação em Ecologia e Conservação/UFS

Renata Silva-Mann

Universidade Federal de Sergipe

Silmara de Moraes Pantaleão

Universidade Federal de Sergipe

São Cristovão/SE, 25 de agosto de 2010

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido mais esta vitória e por ter me presenteado com pessoas maravilhosas nesta fase da minha vida.

Aos meus pais, Cristina e João, pelo amor, ensinamentos, por toda confiança que depositaram em mim e por proporcionarem a realização deste sonho, agradeço o esforço de cada dia. Devo tudo a vocês...

Aos meus irmãos, Camila e Itamar, por todo incentivo e carinho.

Ao professor-orientador Robério Anastácio Ferreira pelo incentivo, orientação e pela confiança em mim depositada...

À professora Renata Silva-Mann pelos ensinamentos transmitidos, pela orientação, apoio, incentivo e pelas conversas amigas.

À professora Silmara Pantaleão que me incentivou para a execução deste trabalho e contribui positivamente para a elaboração do mesmo.

Aos professores do mestrado em Ecologia e Conservação pelos ensinamentos transmitidos.

Ao pessoal da turma 2008/1 e 2009/2 do mestrado em Ecologia e Conservação por todos os momentos vividos e pelo carinho, em especial aos sete anões: Dani (Atchim), Francis (Dunga), Aline (Soneca), Beth (Mestre), Jú (Feliz) e Juliana (Zangada). Saibam que me diverti muito com vocês...

A todos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento vegetal da UFS e do laboratório de Dendrologia, que me ajudaram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho, pelos momentos sérios e de descontração: Danilla, Susi, Thalyta, Glauber, Rodrigo, Sandro, Higor, Iuri, Andreza, Lázaro, Rafaela, Larissa, Gallo, Felipe e João.

À professora Maria de Fátima Arrigoni Blank pelo carinho e pelo incentivo sempre.

"A gente não faz amigos, reconhece-os" – Vinícius de Moraes

Às minhas eternas amigas Alê, Mimi e Andréa pelos momentos de muitas alegrias. Com vocês os obstáculos tornaram-se pequenos e, cada momento vivido ficará para sempre na memória. É bom saber que a distância não é o limite e que eu posso contar sempre com vocês: Amo vocês!

Aos amigos com quem pude dar gargalhadas, conversar, aprender, enfim, passar horas de alegria e também compartilhar momentos de tristeza: Paula, Soraia, Camila Ponzzes, Carol, Lane, Silná, Georgea, Michelli, Geane e Júlio.

"Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas" - Saint-Exupéry

Agradeço imensamente a Danilla e a Susi pelas conversas amigas, conselhos, por me fazerem rir, por me ajudarem sempre que preciso (mesmo sem saber que eu estava precisando)...só por estarem ao meu lado!!!

À Fundação de Amparo à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe – FAPITEC/SE pela concessão da Bolsa de Mestrado, por meio do Programa de Mestrado em Ecologia e Conservação.

Ao Banco do Nordeste (BNB) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica...

O MEU ETERNO MUITO OBRIGADA!

“É PRECISO EXIGIR DE CADA UM, O QUE CADA UM PODE DAR”

Saint-Exupéry

A Deus, luz que ilumina o meu caminho!

Dedico

Aos meus pais, João e Cristina, que
significam muito para mim.

Ofereço

SUMÁRIO

Nomenclatura, Símbolos e Abreviações.....	ix
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiv
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xviii
Capítulo 1.....	1
Introdução Geral.....	2
Objetivos.....	4
Revisão de Literatura.....	5
1. <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. e <i>Cassia grandis</i> L.f.	5
2. Variabilidade genética em populações naturais.....	6
3. Estrutura genética em populações naturais.....	7
4. Fluxo gênico em populações naturais.....	9
5. Efeitos da fragmentação florestal na diversidade genética de populações naturais.....	10
6. Recuperação de áreas degradadas.....	12
7. Uso de marcadores moleculares para estudos de diversidade genética de populações naturais.....	13
7.1. Uso de marcadores RAPD no estudo de genética de populações.....	14
7.2. Uso de marcadores isoenzimáticos no estudo de genética de populações.....	16
Referências Bibliográficas.....	18
Capítulo 2. Variabilidade genética em populações naturais de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. e <i>Cassia grandis</i> L.f., por meio de marcadores moleculares RAPD.....	24
Resumo.....	25
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1. Caracterização das áreas de estudo.....	29
2.2. Coleta do material vegetal.....	32
2.3. Análise DNA-RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso).....	33

2.3.1. Extração de DNA.....	33
2.3.2. Quantificação do DNA.....	34
2.3.3. Condições de amplificação do DNA genômico.....	34
2.3.4. Análise dos dados RAPD.....	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.1. Distribuição geográfica e análise dos dados dendrológicos.....	39
3.2. Análise da diversidade e estrutura genética em populações naturais de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart.....	44
3.3. Análise da diversidade e estrutura genética em populações naturais de <i>Cassia grandis</i> L.f.....	56
4. CONCLUSÕES.....	67
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
Capítulo 3. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de <i>Zizyphus joazeiro</i> MART. e <i>Cassia grandis</i> L. f.....	73
RESUMO.....	74
1. INTRODUÇÃO.....	76
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	78
2.1. Análise Isoenzimática.....	78
2.1.1. Extração de isoenzimas.....	78
2.1.2. Eletroforese.....	79
2.1.3. Análise Estatística.....	80
2.1.3.1. Frequências alélicas.....	80
2.1.3.2. Índices de Diversidade Genética.....	80
2.3.3.2.1. Proporção de locos polimórficos ($\hat{P}$).....	81
2.3.3.2.2. Número médio de alelos por loco ($\hat{A}$).....	81
2.3.3.2.3. Heterozigosidade média observada ($\hat{H}_0$).....	81
2.3.3.2.4. Heterozigosidade média esperada ($\hat{H}_e$).....	82
2.3.3.2.5. Índice de Fixação de Wright ($\hat{F}_{IS}$).....	82
2.3.3.2.6. Estatística F de Wright.....	83
2.3.3.3. Fluxo gênico ($\hat{N}_m$) e tamanho efetivo das populações ($\hat{N}_e$).....	83
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
3.1. Análise da diversidade e estrutura genética em populações naturais de	

<i>Zizyphus joazeiro</i> Mart.....	85
3.2. Análise da diversidade e estrutura genética em populações naturais de <i>Cassia grandis</i> L.f.....	95
4. CONCLUSÕES.....	103
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
Anexos	110

NOMENCLATURA, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism/ Polimorfismo de comprimento do fragmento amplificado

AP-PCR - Arbitrarily Primed - Polymerase Chain Reaction/ Primers arbitrários – Reação de polimerase em cadeia

$\hat{A}$ - Número médio de alelos por loco

BSA - Bovine serum albumin/ Soro albumina bovina

CAP - Circunferência a altura do peito

cm - Centímetro

CODISE - Companhia de Desenvolvimento Industrial e de Recursos Minerais de Sergipe.

CTAB - Cetyl Trimethylammonium Bromide/ Brometo de cetil trimetil amônio

DEA - Departamento de Engenharia Agrônômica

DIECA - Dietilditiocarbamato

DNA – Deoxyribonucleic acid/ Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desorribonucleotídeo trifosfatado

E.C. - Enzyme Commission/ Comissão de enzimas

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid/ Ácido etilenodiamino tetra-acético

$\hat{F}_{(IS)}$ - Índice de fixação de Wright

F_{IS} - Índice de fixação médio dentro das populações

F_{IT} - Índice de fixação para o conjunto das populações

F_{ST} - Divergência genética entre populações

g - Grama

GPS - Global Position System/ Sistema de posição global

G_{ST} - Relação entre a diversidade genética entre populações e a diversidade total

H_e - Diversidade genética de Nei

$\hat{H}_e$ - Heterozigosidade média esperada de acordo com o equilíbrio de Hardy Weinberg

$\hat{H}_0$ - Heterozigosidade média observada

H_S - Diversidade genética dentro das populações

H_T - Diversidade genética total (heterozigosidade)

IDT - Integrated DNA Technologies/ Tecnologia integrada de DNA

Km - Quilômetro

m - Metro

M - Molar

mg - Miligrama

mL - Mililitros

mm - Milímetros

mM - Milimolar

µg - Micrograma

µL - Microlitro

NaCl – Cloreto de sódio

nbp - Número de bandas polimórficas;

nbt - Número de bandas total

ng - Nanograma

$\hat{N}_e$ – Tamanho efetivo

$\hat{N}_m$ – Fluxo gênico

P = Porcentagem de polimorfismo

$\hat{P}_{ij}$ = Estimativa da frequência do alelo *i* na população *j*

$\hat{P}$ - Proporção de locos polimórficos

P% - Porcentagem de locos polimórficos

PCR - Polymerase Chain Reaction/ Reação de polymerase em cadeia

PMV – População mínima viável

PVP - Polivinil pirrolidone

RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA/ Polimorfismo de DNA amplificado
ao acaso

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism/ Restrição de comprimento dos
fragmentos polimórficos

rpm - Rotação por minuto

SEPLANTEC - Secretaria de Estado do Planejamento e da Ciência e Tecnologia

Sg_{ij} - Similaridade genética

Sgm - Valor mínimo de similaridade

SUPES - Superintendência de Estudos e Pesquisas

TBE – Tris Borato EDTA (tampão)

TE – Tris-EDTA

UFS – Universidade Federal de Sergipe

UPGMA - Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average/ Agrupamento ponderado não pareado baseado na media aritmética

V - Volt

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Localização das populações de <i>Zyziphus joazeiro</i> Mart. e <i>Cassia grandis</i> L.f. em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano (Área 1: Santana do São Francisco; Área 2: Canhoba; Área 3: Nossa Senhora de Lourdes; Área 4: Canindé do São Francisco).....	29
Figura 2.	Indivíduo de <i>Zyziphus joazeiro</i> Mart. localizado no município de Santana do São Francisco.....	31
Figura 3.	Indivíduo de <i>Cassia grandis</i> Lf. localizado no município de Canhoba.....	32
Figura 4.	Distribuição geográfica das populações naturais de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	39
Figura 5.	Distribuição geográfica das populações naturais de <i>Cassia grandis</i> L. f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	40
Figura 6.	Dendrograma da similaridade genética entre 20 indivíduos de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. localizados no município de Santana do São Francisco, definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no índice de Jaccard, por meio de marcadores RAPD.....	46
Figura 7.	Dendrograma da similaridade genética entre 19 indivíduos de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. localizados no município de Canhoba, definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no índice de Jaccard, por meio de marcadores RAPD.....	47
Figura 8.	Dendrograma da similaridade genética entre 15 indivíduos de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. localizados no município de Canindé, definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no índice de Jaccard, por meio de marcadores RAPD.....	48
Figura 9.	Correlação entre a matriz de similaridade genética e a matriz de distância geográfica das populações de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart.	

	localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	50
Figura 10.	Dendrograma da similaridade genética entre indivíduos de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. localizados em três municípios do Estado de Sergipe (Santana do São Francisco – pop1, Canhoba – pop2 e Canindé do São Francisco- pop3), definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no índice de Jaccard, por meio de marcadores RAPD.....	51
Figura 11.	Dendrograma da similaridade genética entre 18 indivíduos de <i>Cassia grandis</i> L.f. localizados no município de Santana do São Francisco, definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no índice de Jaccard, por meio de marcadores RAPD.....	58
Figura 12.	Dendrograma da similaridade genética entre 15 indivíduos de <i>Cassia grandis</i> L.f. localizados no município de Canhoba, definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no índice de Jaccard, por meio de marcadores RAPD.....	59
Figura 13.	Dendrograma da similaridade genética entre 8 indivíduos de <i>Cassia grandis</i> L.f. localizados no município de Nossa Senhora de Lourdes, definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no índice de Jaccard, por meio de marcadores RAPD.....	60
Figura 14.	Correlação entre a matriz de similaridade genética e a matriz de distância geográfica das populações de <i>Cassia grandis</i> L. f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	62
Figura 15.	Dendrograma da similaridade genética entre indivíduos de <i>Cassia grandis</i> L. f. localizados em três municípios do Estado de Sergipe (Santana do São Francisco – pop1, Canhoba – pop2 e Nossa Senhora de Lourdes- pop3), definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no índice de Jaccard, por meio de marcadores RAPD.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Seqüências dos oligonucleotídeos que foram utilizadas nas reações de RAPD em indivíduos de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. e <i>Cassia grandis</i> L.f. procedentes de diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	35
Tabela 2.	Distância geográfica (Km) entre as populações de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	40
Tabela 3.	Distância geográfica (Km) entre as populações de <i>Cassia grandis</i> L. f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	41
Tabela 4.	Parâmetros dendrológicos avaliados nas populações de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	42
Tabela 5.	Parâmetros dendrológicos avaliados nas populações de <i>Cassia grandis</i> L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	42
Tabela 6.	Relação do número de produtos amplificados para cada oligonucleotídeo, com suas respectivas porcentagens de polimorfismo, em análise de RAPD, em populações naturais de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	44
Tabela 7.	Índice de diversidade de Shannon (1972), diversidade genética de Nei (1978) e % de locos polimórficos em populações naturais de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	52
Tabela 8.	Diversidade genética de Nei em populações naturais de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	53
Tabela 9.	Medidas originais de distância genética e identidade genética de Nei entre populações naturais de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	54
Tabela 10.	Relação do número de produtos amplificados para cada	

	oligonucleotídeo, com suas respectivas porcentagens de polimorfismo, em análise de RAPD, em populações naturais de <i>Cassia grandis</i> L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	56
Tabela 11.	Índice de diversidade de Shannon (1972), diversidade genética de Nei (1978) e porcentagem de locos polimórficos em populações naturais de <i>Cassia grandis</i> L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	63
Tabela 12.	Diversidade genética de Nei em populações naturais de <i>Cassia grandis</i> L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	64
Tabela 13.	Medidas originais de distância genética e identidade genética de Nei entre populações naturais de <i>Cassia grandis</i> L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	66
Tabela 14.	Siglas e códigos dos sistemas enzimáticos que foram utilizados para estimar a diversidade genética em populações naturais de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. e <i>Cassia grandis</i> L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	79
Tabela 15.	Locos isoenzimáticos, número de alelos e frequência alélica das populações analisadas de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	86
Tabela 16.	Índices de diversidade genética de três populações naturais de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart., localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano, baseados em 23 locos e 14 sistemas enzimáticos.....	89
Tabela 17.	Estimativas das estatísticas F de Wright (F_{IS} , F_{ST} e F_{IT}) e fluxo gênico para as populações naturais de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	91

Tabela 18.	Tamanho efetivo ($\bar{N}_e$) e número de indivíduos (N) de três populações naturais de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	93
Tabela 19.	Locos isoenzimáticos, número de alelos e frequência alélica das populações analisadas de <i>Cassia grandis</i> L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	95
Tabela 20.	Índices de diversidade genética de três populações naturais de <i>Cassia grandis</i> L.f., localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano, baseados em 23 locos e 14 sistemas enzimáticos.....	98
Tabela 21.	Estimativas das estatísticas F de Wright (F_{IS} , F_{IT} e F_{ST}) e fluxo gênico para as populações naturais de <i>Cassia grandis</i> L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	99
Tabela 22.	Tamanho efetivo ($\bar{N}_e$) e número de indivíduos (N) de três populações naturais de <i>Cassia grandis</i> L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano.....	101

RESUMO

O conhecimento da diversidade genética entre e dentro de populações naturais é de suma importância para a elaboração de estratégias de conservação *in situ* e *ex situ*, devido a fragmentação florestal que altera processos ecológicos essenciais à manutenção desta diversidade. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a variabilidade genética dentro e entre populações de *Zizyphus joazeiro* Mart. e *Cassia grandis* L.f., por meio de marcadores moleculares, visando definir estratégias de coleta de sementes para a produção de mudas destinadas à recuperação de áreas degradadas. O estudo foi realizado em diferentes municípios localizados na região do Baixo São Francisco sergipano. As populações de *Z. joazeiro* foram amostradas em Santana do São Francisco, Canhoba e Canindé do São Francisco, enquanto as populações de *C. grandis* foram amostradas em Santana do São Francisco, Canhoba e Nossa Senhora de Lourdes. Para a avaliação da estrutura genética das populações foram utilizados os marcadores isoenzimáticos e o marcador de DNA-RAPD. A partir dos resultados observados pode-se inferir que devido ao processo de fragmentação florestal, causada principalmente pela ocupação humana na região do Baixo São Francisco, as populações estão estruturadas. No entanto, as espécies apresentam elevada diversidade genética intrapopulacional, ausência de endogamia e alelos raros e exclusivos. Estes resultados devem estar ligados, além do processo de fragmentação florestal, às características do agente polinizador das espécies estudadas (insetos), pois, como percorre pequenas distâncias, o fluxo gênico não é amplo, o que pode ocasionar a estruturação genética das populações. Assim, estratégias para a conservação da variabilidade existente, como coleta de material genético em todas as populações estudadas, devem ser adotadas.

Palavras Chave: Estrutura genética; RAPD; Isoenzimas.

ABSTRACT

The genetic diversity within and among natural populations is critical to developing strategies for conservation *in situ* and *ex situ*, due to forest fragmentation alters ecological processes that are essential to maintaining this diversity. This study was conducted to evaluate the genetic variability within and between populations of *Zizyphus joazeiro* Mart. and *Cassia grandis* L.f. by molecular markers, to define strategies for collect of the seed to produce seedlings for the rehabilitation of degraded areas. The study was realized in different municipalities in the Baixo São Francisco sergipano. Populations of *Z. joazeiro* were sampled in Santana do São Francisco, Canhoba e Canindé do São Francisco, while populations of *C. grandis* were sampled in Santana do São Francisco, Canhoba e Nossa Senhora de Lourdes. To evaluate the genetic structure of populations were used isozymes and RAPD-DNA marker. From the observed results can be inferred that due to forest fragmentation, mainly caused by human occupation in the Baixo São Francisco, the populations are structured. However, the species showed high genetic diversity within populations, inbreeding and lack of rare alleles and unique. These results should be linked, in addition to forest fragmentation, pollination characteristics of the studied species (insects), for as short distances, gene flow is not large, which can lead to the genetic structure of populations. Thus, strategies for conservation of variability, such as the collection of genetic material in all populations studied, should be adopted.

Key words: Genetic structure; RAPD; Isozymes.

Capítulo 1

Introdução

INTRODUÇÃO GERAL

Os ecossistemas naturais apresentam elevada diversidade biológica, o que influencia diretamente na sua sustentabilidade. As matas ciliares contribuem para a conservação desta biodiversidade uma vez que, funcionam como corredores ecológicos, como fonte de alimentação para a fauna, contribui com a melhoria das condições ambientais favorecendo o desenvolvimento de diversas espécies, entre outras causas. No entanto, devido às propriedades físico-químicas de seus solos e da elevada umidade observada, estas têm sido degradadas principalmente para o uso agrícola da terra, promovendo uma significativa supressão e fragmentação da vegetação.

A fragmentação florestal é um processo pelo qual há a divisão das populações naturais em pequenas populações isoladas. No Estado de Sergipe observa-se que as principais causas da fragmentação da vegetação ciliar são: o uso agrícola da terra, a ocupação humana e a exploração das espécies vegetais que são utilizadas como lenha e carvão ou aquelas que apresentam potencial madeireiro.

O isolamento entre as populações das espécies, observado após o processo de fragmentação, influencia na estrutura genética destas, pois interfere no fluxo gênico, podendo causar processos genéticos como endogamia e deriva genética. Assim, torna-se importante a recuperação das áreas fragmentadas para que os processos ecológicos sejam retomados.

O processo de recuperação de áreas degradadas deve levar em consideração algumas premissas básicas para garantir o sucesso da implantação. Deve-se dar preferência às espécies nativas da região e realizar um programa de produção e coleta de sementes para a produção de mudas baseado na caracterização genética das populações das espécies selecionadas. Esta fornece as informações necessárias para o estabelecimento de planos de conservação *in situ*, *ex situ* e para a recuperação de áreas.

A escolha dos indivíduos de cada espécie que será utilizada em programas de recuperação deve contemplar várias populações e a seleção destes deve ser realizada de forma que abranja a maior diversidade genética possível. Estes procedimentos devem ser realizados para que não ocorra a perda de alelos, nem o cruzamento entre indivíduos aparentados na área onde serão empregadas as sementes ou mudas das espécies selecionadas, tornando o processo mais sustentável do ponto de vista ecológico.

A caracterização da diversidade genética em populações naturais pode ser realizada por meio de marcadores moleculares e/ou bioquímicos. Os marcadores isoenzimáticos (bioquímicos) e os marcadores RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso - molecular) têm sido utilizados em estudo de diversidade e estrutura genética de populações naturais em diversas espécies arbóreas, devido à acessibilidade, fácil execução e baixo custo. Por meio dos parâmetros ecológicos e genéticos obtidos, utilizando estes marcadores, pode-se ainda definir o tamanho efetivo das populações e a população mínima viável, valores que dão subsídios às estratégias de conservação das espécies, como também aos planos de recuperação de áreas degradadas.

Para a realização deste estudo foram selecionadas as espécies *Zizyphus joazeiro* Mart. e *Cassia grandis* L. f., espécies arbóreas economicamente e ecologicamente importantes da região do Baixo São Francisco sergipano que apresentam alta plasticidade ecológica, permitindo-lhes ocupar diversos tipos de ambientes e formações vegetais.

A fragmentação da vegetação observada na região do Baixo São Francisco sergipano tem sido ocasionada principalmente pela ocupação humana. Devido a isto, observa-se a existência de pequenas populações isoladas, ao longo desta região, das espécies selecionadas para o estudo. Este isolamento pode ocasionar o aumento da diversidade genética entre as populações, devido à ausência de fluxo gênico, uma vez que os agentes polinizadores destas espécies percorrem pequenas distâncias (insetos), e conseqüentemente a estruturação genética das populações. Além disto, processos como a deriva genética e a endogamia podem estar ocorrendo.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar a variabilidade genética dentro e entre populações de *Zizyphus joazeiro* Mart. e *Cassia grandis* L.f., por meio de marcadores moleculares e bioquímicos, localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco, no Estado de Sergipe.

Específicos

- a) Caracterizar geneticamente três populações naturais de *Zizyphus joazeiro* Mart. e *Cassia grandis* L.f., por meio de marcadores isoenzimáticos e RAPD.
- b) Estimar parâmetros de estrutura e diversidade genética;
- c) Definir estratégias para produção e coleta de sementes, visando à produção de mudas destinadas à recuperação de áreas degradadas.

REVISÃO DE LITERATURA

1. *Zizyphus joazeiro* Mart. e *Cassia grandis* L. f.

Zizyphus joazeiro Mart. (joazeiro), pertencente à família Rhamnaceae, é uma espécie monóica (SALOMÃO e ALLEM, 2001), que apresenta como agentes polinizadores essencialmente abelhas e diversos insetos pequenos (CARVALHO, 2007). Na região da Caatinga apresenta suma importância para estes insetos, uma vez que, na época mais seca do ano quando a maior parte da vegetação encontra-se sem flores, suas flores são usadas como fonte de néctar e pólen (CARVALHO et al., 2006). É uma planta clímax exigente em luz, perenifólia, heliófita e seletiva higrófila e é encontrada no Nordeste do País (Piauí até o Norte de Minas Gerais), especialmente nas Caatingas e campos abertos do polígono da seca (LORENZI, 1992). Na região do Baixo São Francisco sergipano, ocorre desde o município de Canindé do São Francisco (Alto Sertão) até a Foz do rio, no município de Brejo Grande (Litoral). A espécie é utilizada nas construções rurais, na produção de lenha e carvão, na arborização urbana e por ser uma das poucas espécies de Caatinga que se conservam sempre verdes, as folhas de *Z. joazeiro* podem ser utilizadas na alimentação de caprinos e ovinos como um recurso alternativo durante a época seca. Seus frutos são comestíveis e ricos em vitamina C (BRAGA, 1976; BARROS et al., 1991; LORENZI, 1992; CARVALHO, 2007). Na medicina popular, é muito empregada em tratamento de gastrites, gripes, contusões e ferimentos, fabricação de cosméticos, xampus anticapa e creme dental (MATOS, 2000). Santos et al. (2009) realizaram um estudo etnobotânico sobre a indicação de plantas medicinais para tratamentos de patologias bucais na cidade de João Pessoa (PB), e constataram que o joazeiro é utilizado na região contra o sangramento gengival. Apesar da grande utilidade, a exploração do *Z. joazeiro* limita-se ao extrativismo, sendo a realização de estudos que contribuam com a sua conservação de suma importância (ALVES et al., 2008).

Cassia grandis L.f. (canafístula), pertencente à família Fabaceae, é uma espécie arbórea decídua, característica de mata secundária e da floresta primária aberta de terra firme. Pertence ao grupo ecológico clímax exigente em luz e é hermafrodita, apresentando como agente polinizador principalmente as abelhas (OLIVEIRA FILHO et al., 1995; CARVALHO, 2006). É utilizada para fins paisagísticos e sua madeira na construção civil

(LORENZI, 1992). Na medicina popular esta espécie é utilizada no tratamento de doenças da pele, sendo suas folhas utilizadas na produção de chá ou banho (MACEDO e FERREIRA, 2004). Às folhas e aos frutos são atribuídas as propriedades anti-anêmica, anti-micótica, anti-séptica, adstringente, depurativa, diurética, estimulante, expectorante, febrífuga, galactogogue, laxante, purgante e tônica (PARRA e SARDIÑAS, 2000). Na região do Baixo São Francisco, no Estado de Sergipe, a ocorrência desta espécie vai desde o município de Nossa Senhora de Lourdes (Alto Sertão) até a Foz do rio, no município de Brejo Grande (Litoral). As populações ribeirinhas desta região utilizam seus frutos na medicina popular e também cortam a sua madeira para usar como lenha e carvão.

2. Variabilidade genética em populações naturais

O Brasil é um dos poucos países de ‘mega-biodiversidade’, ou seja, possui um grande número de ecossistemas, de espécies que interagem dentro destes ecossistemas, e de alelos que diferenciam os indivíduos em cada população de cada espécie (CLEMENT, 2001). Porém esta mega-biodiversidade está sendo perdida devido à exploração dos recursos naturais.

A exploração inadequada dos recursos naturais vem ocasionando a extinção de um grande número de espécies nos diferentes biomas do planeta, especialmente naqueles situados nos trópicos, e entre as causas dessas extinções, as mais comuns são a perda e a fragmentação de habitats. Verifica-se que em populações de baixa densidade de indivíduos a ocorrência de fenômenos genéticos como a deriva genética (reduz a variabilidade genética rapidamente em pequenas populações) e a endogamia (auto-fecundações e cruzamentos entre indivíduos aparentados) ocasionam a perda da heterozigosidade. Em virtude de tal realidade, existe a necessidade da realização de estudos genéticos em nível populacional das espécies que compõem tais ecossistemas (BOTREL e CARVALHO, 2004; BARREIRA, 2005), pois, a variabilidade genética é um componente fundamental para a estabilidade destes (SIVA e KRISHNAMURTHY, 2005).

São raros os casos de espécies estudadas do ponto de vista genético, sendo estes indispensáveis para que não ocorra a perda da diversidade genética natural, permitindo que as populações mantenham-se vivas e reprodutivas no ciclo evolutivo da seleção natural (KAWAGUICI e KAGEYAMA, 2001). Portanto, a variação genética presente em uma

espécie é a base para programas de conservação genética (GRIBEL, 2001). Assim, estudos genéticos em nível populacional das espécies, sobretudo em áreas perturbadas, devem ser realizados para reunir subsídios que contribuam para a conservação *in situ*, o manejo sustentável e a formação de áreas de coletas de sementes visando à recuperação de áreas degradadas, principalmente para as espécies sob forte pressão antrópica (PINTO et al., 2004; CIAMPI et al, 2007).

A caracterização da variabilidade genética dentro de populações pode ser efetuada a partir de medidas de diversidade genética intrapopulacional, que poderão ser estimadas a partir de dados de marcadores genéticos (MOURA, 2005). As principais medidas de diversidade genética utilizadas para caracterizar os níveis de variação genética em populações são: porcentagem de locos polimórficos; número médio de alelos por loco; heterozigosidade média esperada e observada; e o índice de fixação de Wright.

3. Estrutura genética em populações naturais

A conservação da biodiversidade das florestas tropicais se torna mais importante quando se busca compreender as interações biológicas, caracterizando a reprodução, a sucessão ecológica e a estrutura das populações. Deste modo, é possível fornecer subsídios para o delineamento de estratégias de conservação, melhoramento e manejo sustentável (definição de tamanho de reservas, manejo adequado de espécies, recuperação de áreas degradadas e coleta de sementes para plantio com espécies nativas) (KAGEYAMA et al., 2003; BARREIRA, 2005).

A estrutura populacional de uma espécie é definida como o conjunto de características genéticas e demográficas resultantes da ação e das interações de vários mecanismos evolutivos e ecológicos. Do ponto vista ecológico, a estrutura genética é caracterizada pela densidade populacional, natureza das relações entre os indivíduos e o ambiente e as interações entre indivíduos e populações locais. Já do ponto de vista genético-evolutivo, a estrutura genética é caracterizada pela variabilidade morfológica e quantitativa existentes entre indivíduos, sistema reprodutivo, padrões de fluxo gênico e estratégias adaptativas aos ambientes locais (MARTINS, 1987). Assim, os conceitos da ecologia de populações e da genética de populações são fundamentais para a análise da

estrutura de populações de espécies florestais e para a definição de parâmetros adequados para o monitoramento das mesmas (KAGEYAMA et al., 1998).

A formação da estrutura é resultante de fatores como sistema de acasalamento, níveis de endogamia, seleção natural ou artificial, fluxo gênico e deriva genética entre e dentro das populações (FERREIRA, 2003). Estudos a respeito da estrutura genética de populações e distribuição da variabilidade genética de uma espécie possuem grande importância para a sua conservação e exploração racional, além de contribuírem para a compreensão dos mecanismos evolutivos de maneira geral (CAVALLARI, 2008). Um dos objetivos dos estudos de estrutura genética populacional é tentar explicar, de maneira integrada, os papéis relativos dos mecanismos microevolutivos como seleção, fluxo gênico e deriva genética, na diferenciação de populações em ambientes heterogêneos, relacionando-os à distribuição dos indivíduos tanto no tempo como no espaço. Esta abordagem é de particular interesse para a análise e interpretação de aspectos biológicos fundamentais relacionados à conservação *in situ* de recursos genéticos (MARTINS, 1987).

Acredita-se que as espécies arbóreas de diferentes grupos sucessionais apresentam padrões característicos de estrutura genética. Espécies arbóreas pioneiras, devido às suas características de ciclo de vida curto (~20 anos), alta densidade populacional, ocorrência agregada e dispersão de sementes a curta distância, provavelmente apresentam fluxo gênico de curta distância, causando alta diversidade genética entre populações ($\theta = 15-25\%$). Espécies secundárias, por suas características de ciclo de vida longo e menor densidade populacional, possivelmente apresentam fluxo gênico intermediário, com moderada divergência genética entre as populações ($\theta = 5-10\%$). Finalmente, espécies climáticas, por suas características de vida longa, baixa densidade populacional e altos níveis de cruzamento, provavelmente apresentam fluxo gênico a longa distância com baixa diversidade genética entre as populações ($\theta = 5\%$) (KAGEYAMA et al., 2003).

A caracterização da estrutura genética entre populações por marcadores codominantes pode ser abordada de três maneiras diferentes: a) estatísticas F de Wright (WRIGHT, 1965); b) análise da diversidade gênica em populações subdivididas (NEI, 1977); e c) coeficientes de coancestralidade de Cockerham (1969).

As três abordagens apresentam bases genéticas similares, porém, são complementares em relação ao significado biológico das estimativas obtidas. Desta forma, as estatísticas F permitem a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre populações (F_{ST}), assim como dos níveis médios de endogamia ao nível populacional

(FIS) e total (FIT); os coeficientes de coancestralidade (θ) possibilitam a avaliação da divergência em diferentes níveis de hierarquia, além de possibilitar a obtenção de estimativas de endogamia, a partir de uma base não viesada; e a análise da divergência gênica em populações subdivididas permite a comparação dos níveis de heterozigosidade entre e dentro das populações, bem como a obtenção de uma estimativa de divergência, a partir de uma base diferente daquela que fundamenta as estimativas de F_{ST} e θ (MOREIRA, 2006).

4. Fluxo gênico em populações naturais

O tamanho pequeno de uma população e a endogamia, os quais reduzem a variação genética dentro da população via deriva genética, podem contribuir para o desenvolvimento de uma heterogeneidade genética entre populações. No entanto, a presença de fluxo gênico promove uma homogeneização espacial da variação genética, de modo que, se for o único fator operante, todas as populações irão convergir para a mesma frequência alélica (FUTUYMA, 1992; MOURA, 2005).

O fluxo gênico se refere a todos os mecanismos que geram movimentos de genes de uma população para outra (EGUIARTE et al., 2007). Em populações naturais de plantas o fluxo gênico ocorre durante as gerações gametofítica e esporofítica, portanto, através da dispersão do pólen e de semente (MARTINS, 1987).

A estrutura reprodutiva é um dos fatores que limita o fluxo de genes tanto dentro como entre populações, estando praticamente impedido no caso de populações que se reproduzem assexuadamente e ocorrendo em diferentes modos e graus no caso de populações com reprodução sexuada (MARTINS, 1987). O padrão e a quantidade de pólen e de semente dispersos afetam o arranjo espacial dos genótipos. Um fluxo gênico limitado e seleção intrapopulacional em micro habitats podem promover a formação de agrupamentos familiares, entre os quais as frequências alélicas podem diferir (MORAES et al., 2004).

Existem diversos modelos de fluxo gênico que correspondem a diferenças na estrutura da população, dentre os quais se incluem: o modelo “continente-ilha”, no qual efetivamente existe um movimento unidirecional de uma população grande, para uma população menor e isolada; o modelo de “ilha”, no qual a migração ocorre ao acaso entre

um grupo de pequenas populações; o modelo de “alpondras”, no qual cada população recebe imigrantes somente de populações vizinhas; e o modelo do “isolamento pela distância”, no qual o fluxo gênico ocorre localmente entre os vizinhos, em uma população de distribuição contínua (FUTUYMA, 1992).

A mensuração do fluxo gênico pode ser realizada de forma direta ou indireta. O método mais comum para se medir o fluxo gênico de forma direta em plantas é o baseado na observação da dispersão dos grãos de pólen ou das sementes, o que permite a estimativa do fluxo gênico potencial ou da dispersão gênica. Outros métodos diretos utilizam marcadores genéticos, e, nesse caso, pode-se estimar o fluxo gênico real. Os métodos indiretos utilizam a distribuição da variância genética para se inferir a intensidade de fluxo gênico. Os dados mais informativos dessas análises são aqueles sobre a frequência alélica para um ou mais locos discretos (BORÉM, 2002). O valor de fluxo gênico mensurado determina se a deriva genética, por si só, pode produzir variabilidade genética substancial entre locais. Se o fluxo gênico for maior que 1, este será alto o suficiente para prevenir uma diferenciação devido à deriva (MORAES e DERBYSHIRE, 2002).

5. Efeitos da fragmentação florestal na diversidade genética de populações naturais

A destruição, fragmentação, degradação de habitats (incluindo poluição), super-exploração das espécies para uso humano, introdução de espécies exóticas e aumento de ocorrência de doenças são as principais ameaças à diversidade biológica, causadas pelo uso crescente dos recursos naturais por uma população humana em crescimento exponencial (PRIMACK e RODRIGUES, 2001).

As florestas tropicais úmidas têm mais de 50% do número total de espécies mundiais em somente 7% da área do planeta e, apesar de sua importância biológica, a diversidade genética das espécies vem sendo amplamente ameaçada (PRIMACK e RODRIGUES, 2001; WILSON, 2001). Assim, torna-se necessária a conservação da biodiversidade em função do elevado nível de perturbações antrópicas nos ecossistemas naturais, e uma das principais consequências dessas perturbações é a fragmentação de ecossistemas naturais (VIANA e PINHEIRO, 1998)

Em todo o mundo, grandes extensões de florestas naturais foram devastadas em decorrência do avanço das fronteiras agrícolas e do intensificado processo de urbanização.

Portanto, com a fragmentação e a redução de áreas, os habitats tornam-se expostos a condições externas adversas, anteriormente inexistentes, o que resulta, em última análise, numa deterioração da diversidade biológica comprometendo a sobrevivência das espécies (TILMAN et al., 1994). No Brasil, os sucessivos ciclos econômicos: a produção da cana-de-açúcar, a busca por ouro, o cultivo do café e a pecuária foram os principais responsáveis pela supressão das florestas nativas (SANTOS et al., 2008). Como consequência, a formação de mosaicos de vegetação remanescente é cada vez mais evidenciada, reduzindo-se assim o tamanho de grandes populações e promovendo-se alterações nos processos ecológicos e genéticos das espécies naturais que ali ocorrem (ESTOPA et al., 2006).

Este tipo de exploração, aliado ao desconhecimento das exigências culturais, da biologia reprodutiva, da regeneração natural e do padrão de distribuição genética das diferentes espécies florestais nativas, tem ocasionado deterioração da base genética, comprometendo o patrimônio genético dos ecossistemas e o potencial evolutivo das espécies reduzindo assim, a capacidade das populações se adaptarem às mudanças ambientais (MELO JÚNIOR et al., 2004; PINTO et al., 2004).

A redução no número de indivíduos, o declínio no tamanho populacional médio e a separação de remanescentes florestais por áreas não florestadas, afetam processos genéticos fundamentais ocorrentes nas populações, como a deriva genética, o fluxo gênico e a reprodução (SEOANE et al., 2005). Com o fluxo gênico das espécies comprometido, os fragmentos apresentarão dificuldade de constituírem metapopulações, reduzindo-se, na imensa maioria dos casos, o tamanho efetivo populacional (N_e), o que interfere na sua normal continuidade e evolução. Nas populações pequenas pode ocorrer, em curto prazo, deriva genética, o que significa ter as frequências de seus genes afastadas daquelas da população original e, em longo prazo, ainda pode haver um aumento da endogamia, decorrente da maior probabilidade de autofecundação e acasalamento entre indivíduos aparentados (KAGEYAMA et al., 1998; ROGALSKI et al., 2003). Somado a isto, há ainda uma perda de genes adaptados aos ambientes específicos de ocorrência das espécies arbóreas e, devido à ausência de conectividade há a redução da chegada de propágulos, o que compromete a formação do banco de sementes para iniciar e, principalmente, para dar continuidade ao processo sucessional (ROGALSKI et al., 2003; VIEGAS, 2009).

Jump e Peñuelas (2006) comprovaram o impacto genético negativo da fragmentação florestal estudando a espécie *Fagus sylvatica* L. Observaram o estrangulamento genético e a perturbação do sistema reprodutivo da espécie, sendo

observados elevados níveis de consangüinidade, elevada diversidade genética entre populações e a redução da diversidade genética dentro das populações.

6. Recuperação de áreas degradadas

A fragmentação de habitats tornou-se um sério problema no campo da conservação da biodiversidade, pois existe um grande número de espécies ameaçadas, antes mesmo de serem conhecidas. É, portanto, imprescindível a proteção e a recuperação dessas áreas, na tentativa de evitar tal situação (LAGE, 2008).

A recuperação de áreas degradadas consiste na restituição de um ecossistema ou de uma população silvestre degradada a uma condição não degradada, que pode ser diferente de sua condição original (BRASIL, 2000). As estratégias para a recuperação destas áreas podem ser em longo, médio ou curto prazo. A estratégia de recuperação em longo prazo consiste no abandono da área (pousio); a principal estratégia em médio prazo é a introdução de sistemas agroflorestais; e em curto prazo é a adoção de tecnologias visando à pronta recuperação da área (uso de corretivo no solo, fontes orgânicas, adubação mineral, dentre outras.) (WEDT et al., 2003).

Existem vários modelos de recuperação de áreas degradadas e estes, devem levar em consideração as características ecológicas das espécies (fazer um levantamento da vegetação regional e de suas espécies características); a relação flora-fauna, como por exemplo, as formas de dispersão de sementes, da polinização e das características do banco de sementes; as técnicas de manejo do solo; o manejo da regeneração; e os tratamentos culturais (KOBAYAMA et al., 2001). Identificadas as espécies que devem ser utilizadas como fornecedoras de sementes em programas de recuperação, a seleção de matrizes dentro da população é de suma importância.

Na seleção de matrizes para os sistemas de produção de sementes florestais visando à recuperação de áreas degradadas deve-se considerar: o número de matrizes coletadas, a distância entre estas, o número de ocasiões em que as árvores produzem sementes em seu ciclo vital, os intervalos entre os eventos de produção, a quantidade de sementes produzidas por árvore, a duração do período de produção, o grupo ecológico a que a espécie pertence e a classificação da árvore na floresta (DAVIDE et al., 2000).

É importante salientar que, os estudos de variabilidade genética entre as matrizes fornecedoras de sementes são imprescindíveis. Uma vez que, o conhecimento da variabilidade genética em populações naturais é importante para se estabelecerem estratégias de conservação das espécies e ecossistemas, além de subsidiar programas de coleta de material para banco de germoplasma, coleta de sementes e produção de mudas para os programas de reflorestamento (BOTREL et al., 2006). Como objetiva-se reconstituir a área degradada o mais próximo possível de sua condição original, o material genético utilizado na recuperação deve também representar geneticamente o ambiente em que a área está inclusa (ROGALSKI et al., 2003).

7. Uso de marcadores moleculares para estudos de diversidade genética em populações naturais

No papel de reconstrução de florestas é importante que se mantenha o nível de variabilidade genética encontrado nas populações naturais, então, tornam-se necessários, estudos dos padrões de distribuição da variabilidade genética que ocorrem nos fragmentos florestais. O conhecimento desta distribuição entre e dentro das populações naturais é imprescindível para que seus tamanhos não caiam abaixo do mínimo viável e permite um melhor entendimento de como a seleção está atuando em função da adaptabilidade, pois quanto maior a variabilidade genética existente na população, maior é a chance de perpetuação da espécie. Sendo assim, uma maneira muito utilizada para detectar essa variabilidade é por meio de estudos da estrutura genética de populações naturais (BOTREL e CARVALHO, 2004; ESTOPA et al., 2006).

A maioria das espécies arbóreas tropicais apresenta um ciclo vegetativo longo e não existe tecnologia silvicultural que permita o cultivo adequado de árvores para constituir os testes genéticos clássicos. Por estas razões, torna-se necessário desenvolver estudos na área de genética molecular para conhecer, de forma precisa e rápida, a estrutura genética das populações (JAEGER, 2004).

Neste ramo da genética, os marcadores moleculares têm sido empregados freqüentemente em espécies florestais (FERREIRA, 2003). É considerado marcador molecular qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA que corresponde a regiões expressas

ou não do genoma. Um marcador molecular é considerado como marcador genético, ao ser comprovado que seu comportamento está de acordo com as leis básicas da herança Mendeliana (FERREIRA e GRATTAPLAGIA, 1995).

As técnicas para a detecção de marcadores moleculares mais utilizadas, atualmente, são as isoenzimas, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*/ Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*/ Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*/ Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos Amplificados), Minisatélites e Microsatélites. Estes marcadores podem ser aplicados com diversos fins, como, por exemplo, para estudar a estrutura genética de populações; para análise de filogenias; detecção de ligação gênica com caracteres mono e poligênicos; identificação de variedades; avaliação de germoplasma; introgressão gênica; seleção indireta de características agrônômicas, dentre outros. As pesquisas realizadas na genética de populações e quantitativa e no melhoramento de plantas com o emprego das técnicas de marcadores moleculares comprovam a eficiência destes métodos (FERREIRA, 2003).

7.1. Uso de marcadores RAPD no estudo de genética de populações

Uma forma muito eficaz de detectar a variabilidade genética é por meio do uso de marcadores moleculares, sendo o RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) um dos mais utilizados (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O desenvolvimento do princípio de reações de polimerização em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*/ Reação de Polimerase em Cadeia) permitiu o aparecimento de novas metodologias de marcador molecular, como o RAPD, que identifica o polimorfismo baseado na amplificação de fragmentos de DNA com tamanhos diferentes. Os marcadores moleculares RAPD baseiam-se no fato de que os “primers” são curtos o suficiente para que as seqüências complementares arbitrárias de oligonucleotídeos encontrem seqüências complementares no genoma, de tal forma que pares de “primers” estejam localizados próximos e com os respectivos finais 3’ direcionados uns para os outros (SAWAZAKI et al., 1998). A técnica foi desenvolvida independentemente por Williams et al. (1990), que patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado (RAPD) e descreveram a técnica no contexto da análise Mendeliana,

demonstrando a identificação de marcadores genéticos para mapeamento; e por Welsh e McClelland (1990), que propuseram a denominação de AP-PCR (*Arbitrarily Primed - Polymerase Chain Reaction*/ Primers arbitrários – Reação de Polimerase em Cadeia) para a técnica, sendo esta mais adequada, pois os *primers* possuem seqüências arbitrárias, mas a amplificação não ocorre ao acaso e sim em lugares específicos no genoma (FERREIRA, 2003).

Entre as vantagens freqüentemente citadas para a técnica de RAPD, pode-se destacar: simplicidade, rapidez, baixo custo, demanda de quantidades mínimas de DNA para realização das análises, possibilidade de estudo de espécies sobre as quais não se tem nenhum tipo de informação genética e espécies com pouco ou nenhum polimorfismo em locos isoenzimáticos. Por utilizar *primers* de seqüência arbitrária, a técnica de RAPD permite a realização de análises genéticas diretamente ao nível de DNA sem a necessidade de nenhum conhecimento prévio sobre a genética da espécie a ser estudada (LACERDA et al., 2002).

Entretanto, os marcadores RAPD também apresentam limitações destacando-se o baixo conteúdo de informação genética por loco. Apenas um alelo é detectado, o segmento que é amplificado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como alelo nulo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores RAPD possuem caráter dominante, limitando seu uso na estimação de parâmetros genéticos, além de apresentar problemas de reprodutibilidade (KARP et al., 1996). A dominância neste caso não se refere à interação genética entre alelos de um mesmo loco e sim à interpretação relativa entre fenótipo e genótipo (CIAMPI et al., 2007).

Desde o surgimento da técnica em 1990, muitos estudos são realizados com diferentes finalidades em diversos grupos taxonômicos de plantas, animais e microrganismos, visando não apenas a caracterização, como também a conservação das espécies (LACERDA et al., 2002).

Lima et al. (2003) utilizaram a técnica de isoenzimas e RAPD para caracterizar cultivares de pessegueiro e nectariana (*Prunus persica* (L.) Batsch) e observaram que por meio da técnica de isoenzimas não foi possível realizar a caracterização de todas as cultivares devido ao baixo polimorfismo, já os marcadores RAPD, associados ou não à eletroforese de isoenzimas, foram eficientes.

Na genética e conservação de plantas para a determinação da diversidade e da estrutura genética em populações naturais diversos trabalhos têm utilizado a técnica.

Trindade e Chaves (2005) a utilizaram com o objetivo de analisar a estrutura genética de treze populações de *Eugenia dysenterica* DC localizadas no estado de Goiás e observaram que a estrutura genética foi significativa entre as populações, apesar de a maior variabilidade genética ter sido observada dentro destas. Estopa et al. (2006), para caracterizar a variabilidade genética intra e interpopulacional em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish, observaram que a maior parte da variabilidade encontra-se em nível intrapopulacional, indicando a possibilidade das populações serem utilizadas em programas de conservação genética, manejo e melhoramento florestal, comprovando a eficiência deste marcador. Freire et al. (2007) estimaram o padrão de distribuição da variação genética entre e dentro de cinco populações de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake e observaram que estas possuem potencial para a conservação genética.

Visando contribuir para a definição de estratégias de coleta de sementes de indivíduos remanescentes de *Enterolobium contortisiliquum*, Santana et al. (2008) avaliaram, por meio de marcadores RAPD, a diversidade genética existente na população e observaram que, mesmo com um número reduzido de indivíduos (8), a população apresenta indivíduos geneticamente divergentes.

7.2. Uso de marcadores isoenzimáticos no estudo de genética de populações

A efetiva conservação genética de uma espécie requer o prévio conhecimento de seu sistema de reprodução, estrutura e diversidade genética. Estes conhecimentos permitem o delineamento de estratégias para a recombinação, amostragem e uso do material genético remanescente. Tais informações podem ser obtidas por meio do uso de marcadores genéticos como as isoenzimas, que vêm sendo muito utilizadas para o estudo de diversidade genética de espécies nos ecossistemas, como também para se conhecer a variação genética entre e dentro de populações naturais (KAWAGUICI e KAGEYAMA, 2001; BOTREL et al., 2004); e por serem tecnicamente acessíveis e apresentarem baixo custo em relação aos outros marcadores, têm gerado informações práticas na identificação de espécies, híbridos, populações naturais e cultivadas de diversos organismos vivos (LIMA et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2004).

Isoenzimas são formas diferentes de uma mesma enzima que apresentam afinidade por um mesmo substrato, ou seja, desempenham a mesma atividade catalítica, mas podem ter diferentes propriedades cinéticas e ser separadas por processos bioquímicos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). A análise das mobilidades eletroforéticas das enzimas produzidas permite a caracterização genotípica de cada indivíduo, bem como as distribuições gênicas em populações e espécies (PÓVOA, 2002).

As análises da variação isoenzimática têm se expandido em pesquisas de genética florestal. As principais aplicações destas técnicas têm sido na investigação dos padrões de variabilidade genética (BOTREL e CARVALHO, 2004; CARVALHO e OLIVEIRA, 2004; MORAES et al., 2004; PINTO et al., 2004; GUSSON et al., 2005; GOIS et al., 2009) e dos sistemas de cruzamentos (RIBAS, 2003; GUSSON et al., 2006). Estas aplicações aumentam o conhecimento da estrutura genética em povoamentos naturais, aumentando a eficiência do melhoramento e dos esforços de conservação de genes de espécies ameaçadas de extinção (OLIVEIRA et al., 2002).

Gois et al. (2009) determinaram a diversidade genética existente em uma população de *Spondias lutea* L. localizada na Região do Baixo São Francisco sergipano, por meio de marcadores isoenzimáticos e observaram que, devido ao polimorfismo detectado, a população estudada ainda apresenta elevado potencial para a conservação *in situ*.

Como o conhecimento sobre o sistema reprodutivo e a taxa de cruzamento de uma população é um instrumento de grande valor para o delineamento de programas de conservação genética e manejo de uma espécie, Oliveira et al. (2002) utilizaram a técnica de eletroforese de isoenzimas em uma população de *Copaifera langsdorffii* Desf. e com a análise dos perfis isoenzimáticos foi possível verificar que a espécie apresenta reprodução mista, predominantemente alógama.

Devido a gama de informações obtidas por meio das análises isoenzimáticas, estas continuam sendo uma classe muito útil de marcadores em análises genéticas que não requeiram amostragem ampla do genoma, mesmo com técnicas moleculares mais modernas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. U.; BRAGA JÚNIOR, J. M.; BRUNO, R. L. A.; OLIVEIRA, A. P.; CARDOSO, E. A.; ALVES, A. Y. ALVES, A. U.; SILVA, K. B. Métodos para quebra de dormência de unidades de dispersão de *Zizyphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 3, p.407-415, 2008.
- BARREIRA, S. **Diversidade genética em população natural de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish como base para o manejo florestal**. 2005. 73f. Tese (Doutorado em Recursos Florestais), Escola superior “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.
- BARROS, N. N.; FREIRE, L. C. L.; LOPES, E. A.; JOHNSON, W. L. Valor nutritivo do feno de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) para caprinos e ovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, 26(8), p.1.299-1.304, 1991.
- BOREM, A. Dispersão gênica. In: BOREM, A. **Escape gênico e transgênico**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002, p. 91-101.
- BOTREL, M. C.; CARVALHO, D. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.4, p.621-627, 2004.
- BOTREL, M. C. G.; SOUZA, A. M.; CARVALHO D.; PINTO, S. I. C.; MOURA, M. C. O.; ESTOPA, R. A. Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* camb. em duas populações de mata ciliar. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.5, p.821-827, 2006.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Natal, ESAM. 1976.
- BRASIL. **Lei nº 9.985** de 18 de julho de 1990. Regulamenta o art. 225, § 1º, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências.
- CARVALHO, D.; OLIVEIRA, A. F. Genetic structure of *Copaifera langsdorffii* Desf. natural populations. **Revista Cerne**, Lavras, v. 10, n. 2, p. 137-153, 2004.
- CARVALHO, P. E. R. Cássia-Rósea – *Cassia grandis*. **Circular técnica - Embrapa**, Colombo-PR, nº117, 2006.
- CARVALHO, P. E. R. Juazeiro – *Zizyphus joazeiro*. **Circular técnica - Embrapa**, Colombo-PR, nº139, 2007.
- CAVALLARI, M. M. **Variabilidade genética e química entre e dentro de populações de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) no Estado de São Paulo**. 2008. 128f. Tese (doutorado em Ciência Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2008.

CIAMPI, A. Y.; SUJII, P. S.; ALEGRIA, M. R. M. Análise genética em populações de *Trithrinax brasiliensis* Mart. utilizando marcadores moleculares RAPD. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 558-560, 2007.

CLEMENT, C. R. **Melhoramento de espécies nativas - Recursos genéticos e melhoramento - plantas**. Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso - Fundação MT, Rondonópolis, MT. p. 423-441, 2001.

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequency. **Evolution**, Lawrence, v.23, n.1, p.72-74, 1969.

DAVIDE, A. C.; FERREIRA, R. A.; FARIA, J. M. R.; BOTELHO, S. A. Restauração de matas ciliares. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 207, p. 65-74, 2000.

EGUIARTE, L., SOUZA, V.; e AGUIRRE, X. **La ecología molecular de plantas y animales**. INE/ Conabio, México. 592 p. 2007.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPLAGIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. EMBRAPA - CENARGEN, Brasília, 1995. 220p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª edição, Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220.

FERREIRA, M. A. J. F. **Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas**. Boa Vista: Embrapa Roraima (Embrapa Roraima. Documentos, 1), 2003. 63p.

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

FUTUYMA, D. J. Biologia evolutiva. 2ªed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992. 646p.

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 Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 81, p. 55-60, 2009.

GRIBEL, R. Biologia reprodutiva de plantas amazônicas: importância para o uso, manejo e conservação dos recursos naturais. **Humanidades**, Brasília, n.48, p.110-114, 2001.

GUSSON, E.; SEBBEN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. **Scientia Forestalis**. n.67, p.123-135, 2005.

GUSSON, E.; SEBBEN, A. M. e KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em populações de *eschweilera ovata* (cambess.) miers. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.30, n.4, p.491-502, 2006.

JAEGER, P. **Caracterização genética e demográfica de populações de *Xylopia emarginata* Mart. (Annonaceae)**. 2004. 113f. Dissertação (mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

JUMP, A. S.; e PEÑUELAS J. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, 103, p. 8096-8100, 2006.

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

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

KARP, A., SEBERG, O., BUIATTI, M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annual of Botany**, v. 78, n. 2, p. 143-149, 1996.

KAWAGUICI, C. B.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade genética de três grupos de indivíduos (adultos, jovens e plântulas) de *Calophyllum brasiliense* em uma população de mata de galeria. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.59, p.131-143, 2001.

KOBIYAMA, M.; MINELLA, J. P. G.; FABRIS, R. Áreas degradadas e sua recuperação. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, n. 210, v.22, p.10–17, 2001.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS, F. J. P. e LOVATO, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas, **Lundiana**, v.3, n.2, p.87-92, 2002.

LAGE, E. A. S.; TELLES, M. P. C.; SOARES, T. N.; RESENDE, L. V. JÁCOMO, A. T. A. SILVEIRA, L. Variabilidade genética em bandos de queixada (*Tayassu pecari*) do Parque Nacional das Emas utilizando marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). **Neotropical Biology and Conservation**, n.3(3), p.126-134, 2008.

LIMA, M. R.; AUGUSTIN, E.; CHOER, E.; RASEIRA, M. C. B. Caracterização de cultivares de pessegueiro e de nectarineira por marcadores moleculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 349-355, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 384 p

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.14, p. 40-44, 2004.

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

MATOS F. J. A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2. ed. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2000. 346p.

MELO JÚNIOR, A.F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J.S.R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequiizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.), **Scientia forestalis**, n.66, p.56-65, 2004.

MORAES, P. L. R.; DERBYSHIRE, M. T. V. C. Estrutura genética de populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae) através de marcadores isoenzimáticos. *Biota Neotropical*, v.2, n.2, 2002. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v2n2/pt/abstract?article+BN02402022002>.

MORAES, P. L. R.; DERBYSHIRE, M. T. V. C. Diferenciação genética e diversidade em populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). *Biota Neotropical*, v.3, n.1, 2003. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v3n1/pt/abstract?article+BN01803012003>

MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R. e VENCOSKY, R. Estrutura genética intrapopulacional em *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae), **Revista Brasileira de botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 475-487, 2004.

MOREIRA, R. F. C. Estrutura genética de populações de *Crinipellis pernicioso* e *Moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, 2006.

MOURA, M. C. O. Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish por isoenzimas e RAPD. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

NEI, M. F. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annal of Human Genetics**, n. 41, p. 225-233, 1977.

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

- OLIVEIRA FILHO, A.; VILELA, E.A.; CARVALHO, D.A.; GAVILANES, M.L. **Estudos florísticos e fitossociológicos em remanescentes de matas ciliares do Alto e Médio Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG, 1995. 27p.
- PARRA, A. L.; SARDIÑAS, M. I. G. Toxicidad aguda oral de 3 formas farmacéuticas a partir de *Cassia grandis* L. **Revista Cubana Plantas Medicinales**, v. 5(2), p. 68-70, 2000.
- PINTO, S. I. C.; CARVALHO, D. Estrutura genética de populações de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Sprengel) por isoenzimas. *Revista Brasileira de Botânica*, v.27, n.3, p.597-605, 2004.
- PINTO, S. I. C.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 65, p.40-48, 2004.
- PÓVOA, J. S. R. **Distribuição da variação genética de *Cedrella fissilis* Vell., em fragmentos florestais, no sul de Minas Gerais, por meio de isoenzimas**. 2002. 95p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.
- PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina, E. Rodrigues, 328p, 2001.
- RIBAS, LUCIANO ARRUDA. **Diversidade genética e sistema de cruzamento em populações naturais de duas espécies pioneiras arbóreas**. 2003. 116p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola superior “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- ROGALSKI, J.M.; BERKENBROCK, I.S.; REIS, A.; REIS, M.S; Sucessão e manutenção da diversidade biológica e da variabilidade genética: ferramentas básicas para a restauração ambiental. In: SOBRADO, 2003, **Anais**, 2003.
- SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. Polyembryony in angiospermous trees of the Brazilian Cerrado and Caatinga vegetation. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 369-378. 2001.
- SANTANA, G. C.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A.; GOIS, I. B.; OLIVEIRA, A. S.; BOARI, A. J. 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, A. L. S.; PEREIRA, E. C. G.; ANDRADE, L. H. C. Fragmentação florestal decorrente do uso do solo e do processo de degradação ambiental, no município de Junqueiro (AL). **Caminhos de Geografia**, Uberlândia, v. 9, n. 25, p. 115 – 120, 2008.
- SANTOS, E. B.; DANTAS, G. S.; SANTOS, H. B.; DINIZ, M. F. F. M.; SAMPAIO, F. C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 1b, p. 321-324, 2009.

SAWAZAKI, H. E., BOVI, M. L. A., SODEK, L. e COLOMBO, C. A. Diversidade genética em palmeiras através de isoenzimas e RAPD. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 4, p. 681-691, 1998.

SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; RIBEIRO, A.; MATIAS, R.; REIS, M. S.; BAWA, K. e SEBBENN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 25-43, 2005.

SIVA, R.; KRISHNAMURTHY, K. V. Isozyme diversity in *Cassia auriculata* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 4 (8), p. 772-775, 2005.

TEIXEIRA, A. S.; CHAVES, L. DA S.; YUYAMA, K. Esterases no exame da estrutura populacional de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae). **Acta Amazonica**, v. 34, n.1, p.75-88, 2004.

TILMAN, D.; MAY, R. M.; LEHMAN, C. L.; NOWAK, M. A. Habitat destruction and the extinction debt. **Nature**, n.371, p.65- 66, 1994.

TRINDADE, M. G.; CHAVES, L. J. Genetic structure of natural *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) populations in northeastern Goiás, Brazil, accessed by morphological traits and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.3, p.407-413, 2005.

VIANA, V. M.; PINHEIRO, L. A. F. V. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. Série Técnica IPEF, v. 12, n. 32, p. 25-42, 1998.

VIEGAS, M.P. **Diversidade genética em populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., sob diferentes tipos de perturbação antrópica**. 2009. 68f. Dissertação (mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

WADT, P.G.S.; PEREIRA, J. E. S.; GONÇALVES, O. C.; SOUZA, C. B. C.; e ALVES, L. S. **Práticas de conservação do solo e recuperação de áreas degradadas**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2003. 29p. (Embrapa Acre. Documentos 90).

Welsh, J.; e McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.** v.18, p. 7213-7218, 1990.

WILLAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

WILSON, E. O. (Ed.) **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001. 660p.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, n.19(3), p.395- 420, 1965.

Capítulo 2

VARIABILIDADE GENÉTICA EM
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Zizyphus*
joazeiro MART. E *Cassia grandis* L. f., POR
MEIO DE MARCADORES
MOLECULARES RAPD

CAPÍTULO 2. VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Zizyphus joazeiro* MART. E *Cassia grandis* L. f., POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD

RESUMO

Os estudos de diversidade genética em populações naturais de espécies florestais são imprescindíveis para a elaboração de estratégias para a conservação *in situ* e *ex situ*. Estes dão subsídios aos planos de coleta de sementes e produção de mudas para fins de recuperação de áreas degradadas ou ainda, para a elaboração de planos de manejo de espécies economicamente importantes. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar geneticamente, por meio de marcadores RAPD, populações naturais de *Zizyphus joazeiro* Mart. e *Cassia grandis* L.f. As populações de *Z. joazeiro* foram amostradas nos municípios de Santana do São Francisco, Canhoba e Canindé do São Francisco, enquanto as de *C. grandis* em Santana do São Francisco, Canhoba e Nossa Senhora de Lourdes. Foram efetuadas as seguintes avaliações dendrológicas de cada indivíduo: altura total (m), altura da 1ª ramificação (m), circunferência à altura do peito – CAP (cm), número de fustes e área da copa. Para a análise RAPD foram empregados 20 oligonucleotídeos e a partir do polimorfismo observado foram calculadas a porcentagem de polimorfismo e a estimativa de similaridade genética (Sg_{ij}), por meio do coeficiente de Jaccard. O teste de Mantel foi realizado para avaliar a correlação entre a similaridade genética e a distância geográfica entre os indivíduos analisados. Para a caracterização da variabilidade genética foram utilizados os seguintes parâmetros: diversidade genética de Nei (H_e), porcentagem de locos polimórficos (P%), índice de Shannon, diversidade genética total (H_T), diversidade genética dentro das populações (H_S) e diversidade genética entre populações (G_{ST}). O fluxo gênico também foi estimado. Nas populações de *Z. joazeiro* os parâmetros CAP, área de copa e altura da 1ª ramificação apresentaram diferença estatística significativa, sendo que as maiores médias foram observadas nas populações de Canhoba e Canindé do São Francisco. Nas populações de *C. grandis* apenas a altura da 1ª ramificação apresentou diferença estatística significativa, sendo observada maior média na população de Santana do São Francisco. O polimorfismo observado nas populações de *Z. joazeiro* variou de 58,1 a 66,5% e a similaridade genética de 44 a 54%, enquanto nas populações de *C. grandis*, o polimorfismo variou de 44,1 a 58,9% e a similaridade genética de 51,5 a 69,87%. A similaridade genética observada não está

correlacionada à distância geográfica entre os indivíduos. Os valores observados para o índice de diversidade genética de Nei, índice de Shannon e para os parâmetros H_S , H_T e G_{ST} foram considerados altos e semelhantes aos encontrados em outras espécies arbóreas para ambas as espécies. A porcentagem de locos polimórficos foi considerada baixa, com exceção da população de Canhoba da espécie *Z. joazeiro*, provavelmente devido ao isolamento das populações. Para o *Z. joazeiro* maior identidade genética foi encontrada entre as populações de Canindé do São Francisco e Santana do São Francisco (0,7599) e a maior distância genética entre as populações de Canhoba e Canindé do São Francisco (0,3540); enquanto para *C. grandis*, maior identidade genética foi observada entre as populações de Canhoba e Nossa Senhora de Lourdes (0,7814) e a maior distância genética entre as populações de Santana do São Francisco e Canhoba (0,4449). O fluxo gênico foi maior que 1 para ambas as espécies. Com base nos resultados pode-se afirmar que as populações estudadas de ambas as espécies apresentam alta variabilidade genética entre as populações e que devido ao processo de fragmentação florestal pode estar ocorrendo estruturação destas. Assim, estratégias de conservação devem ser adotadas para que a variabilidade genética presente nas populações não seja perdida.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, boa parte da biodiversidade encontra-se concentrada em fragmentos isolados de ambientes naturais (VIANA & PINHEIRO, 1998), devido ao processo de fragmentação florestal.

A fragmentação florestal é uma ameaça presente em todos os ecossistemas florestais do planeta, que vem ocorrendo principalmente em decorrência do crescimento populacional humano e da expansão da fronteira agrícola. Como consequência, a formação de mosaicos de vegetação remanescente é cada vez mais evidenciada, reduzindo assim o tamanho de grandes populações naturais e acarretando alterações nos processos ecológicos e genéticos das espécies que ali ocorrem tais como a deriva genética, o fluxo gênico e a reprodução (ESTOPA et al., 2006).

Devido à redução do tamanho populacional, gargalos genéticos (*bottlenecks*) são criados, pois os indivíduos que restam contêm apenas uma pequena amostra do conjunto gênico original (SEOANE et al., 2005). Além disso, as alterações podem refletir nos padrões de distribuição espacial e no comportamento de espécies relacionadas, como os polinizadores, por exemplo, afetando de forma negativa a sua estrutura genética. Dentre os resultados dessas alterações, pode-se mencionar a perda de alelos, reduzindo os níveis de variabilidade genética da espécie (MOURA, 2005).

Diante de tal realidade, são imprescindíveis estudos genéticos em nível populacional das espécies que compõem tais ecossistemas, para que sejam estabelecidas estratégias de conservação genética, sobretudo em áreas perturbadas, procurando reunir subsídios que contribuam para a conservação *in situ*, o manejo sustentável e a formação de áreas de coletas de sementes visando à recuperação de áreas degradadas (PINTO e CARVALHO, 2004). Saber como essa variabilidade está partilhada dentro e entre as populações é de suma importância para que seus tamanhos não caiam abaixo do mínimo viável, comprometendo a perpetuação da espécie. Sendo assim, uma maneira muito utilizada para se conseguir detectar essa variabilidade é por meio de estudos da diversidade genética de populações naturais (BOTREL & CARVALHO, 2004).

Na caracterização da diversidade genética, basicamente se utilizam quatro tipos de marcadores: morfológicos, bioquímicos, moleculares e citológicos. Os marcadores moleculares apresentam a particularidade de poderem ser utilizados para a análise em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (KAMADA et al., 2009). Além disso, os

marcadores moleculares de DNA são recursos muito eficientes para a determinação da variabilidade genética, por analisarem diretamente o material genético (YANAKA et al., 2005).

Algumas propriedades de tais marcadores que os tornam mais adequados do que os marcadores fenotípicos são: a) tanto as regiões codantes como não codantes de caracteres são analisadas; b) o número de marcadores analisados pode ser da ordem das centenas, enquanto para as variáveis fenotípicas, normalmente, é da ordem das dezenas; c) possibilidade de obter dados em qualquer fase do desenvolvimento da espécie vegetal; e, principalmente, d) independência das influências ambientais (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

O marcador molecular RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) tem sido utilizado para detectar a variabilidade genética em populações naturais de forma eficiente. Entre as vantagens citadas para a técnica, pode-se destacar: simplicidade, rapidez, baixo custo, demanda de quantidades mínimas de DNA e, por utilizar *primers* de sequência arbitrária, é possível a realização de análises genéticas diretamente ao nível de DNA, sem a necessidade de conhecimento prévio sobre a genética da espécie a ser estudada (LACERDA et al., 2002).

Desde o surgimento da técnica em 1990, muitos estudos têm utilizado o RAPD na realização de análises genéticas com diferentes finalidades em diversos grupos taxonômicos de plantas, animais e microorganismos, visando não apenas a caracterização, como também a conservação das espécies (LACERDA et al., 2002). Para a determinação da diversidade e da estrutura genética em populações naturais de espécies florestais diversos autores têm utilizado a técnica. Trindade e Chaves (2005) e Freire et al. (2007) comprovaram a eficiência desta estudando a estrutura genética de *Eugenia dysenterica* e *Schizolobium parahyba*, respectivamente.

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar geneticamente, por meio de marcadores RAPD, populações naturais de *Z. joazeiro* Mart. e *C. grandis* L.f., localizadas em diferentes municípios da região do Baixo São Francisco sergipano, com a finalidade de elaborar estratégias de coleta de sementes e produção de mudas para a recuperação de áreas degradadas. As espécies selecionadas apresentam alta plasticidade ecológica, permitindo-lhes ocupar diversos tipos de ambientes e formações vegetais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização das áreas de estudo

O estudo foi realizado em quatro municípios localizados na região do Baixo São Francisco sergipano (Figura 1). Como não há um consenso na ecologia para o conceito de população, neste trabalho uma população é considerada o conjunto de indivíduos da mesma espécie amostrados no mesmo município.

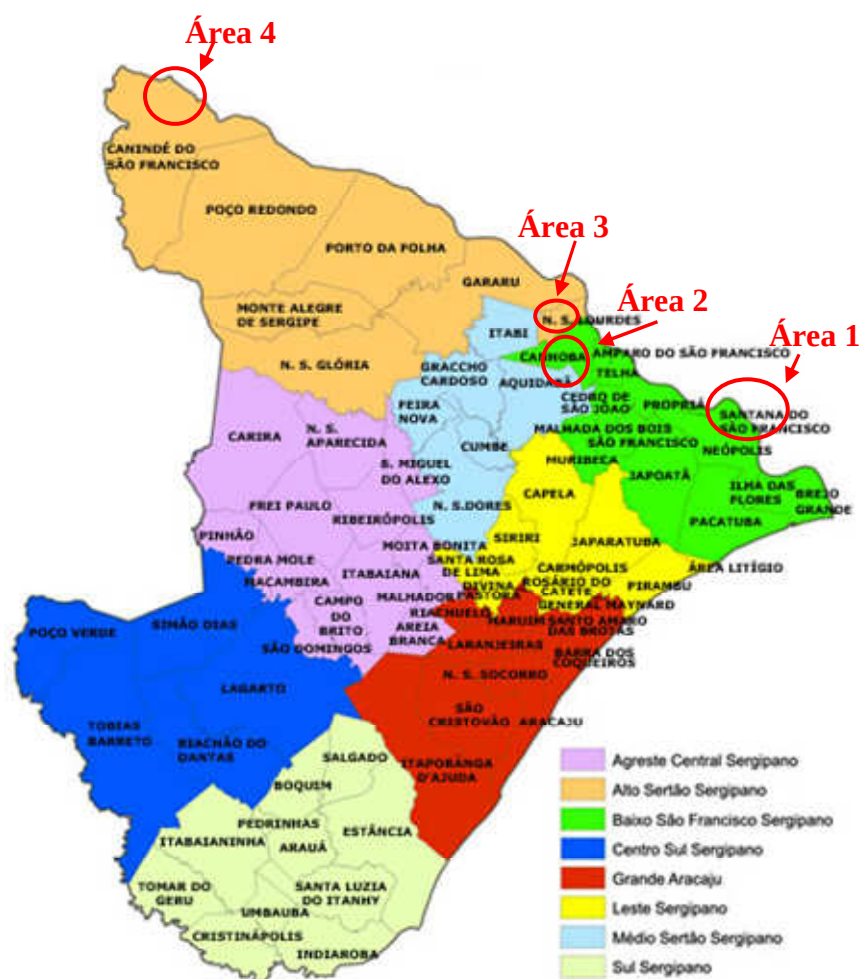


Figura 1. Localização das populações de *Zyziphus joazeiro* Mart. e *Cassia grandis* L.f. em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano (Área 1: Santana do São Francisco; Área 2: Canhoba; Área 3: Nossa Senhora de Lourdes; Área 4: Canindé do São Francisco). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010. Fonte: CODISE, 2007.

- **Área 1:** está localizada no município de Santana do São Francisco, que apresenta clima do tipo megatérmico seco a sub-úmido com temperatura média anual de 26°C, precipitação pluviométrica média anual de 1.200 mm e período chuvoso de março a agosto. O relevo é 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).

- **Área 2:** está localizada no município de Canhoba, que está inserido na área do polígono das secas, com clima do tipo megatérmico semi-árido, temperatura média anual de 26°C, precipitação pluviométrica média anual de 800 mm e período chuvoso de março a agosto. O relevo é dissecado, tendo como formas predominantes Colinas e Tabuleiros, com aprofundamento de drenagem muito fraca a fraca. Os solos são Litólicos Eutróficos, cobertos por uma vegetação de Campos Limpos e Sujos, Capoeira e Caatinga (SERGIPE. SEPLANTEC/SUPES, 1997/2000).

- **Área 3:** está localizada no município de Nossa Senhora de Lourdes, que possui clima do tipo megatérmico semi-árido, com temperatura média anual de 26°C, precipitação pluviométrica média no ano de 800 mm e período chuvoso de março a agosto. O relevo apresenta feições dissecadas dos tipos colina e tabular. Os solos são Litólicos Eutróficos, com vegetação de campos limpos, campos sujos, capoeira e caatinga (SERGIPE. SEPLANTEC/SUPES, 1997/2000).

- **Área 4:** está localizada no município de Canindé do São Francisco, que está inserido na área do Polígono das Secas, tem um clima do tipo megatérmico árido, temperatura média no ano de 25,8°C, precipitação pluviométrica média anual de 485,5mm e período chuvoso de março a julho. A forma de relevo é de superfície Pediplanada e Dissecada, com Colinas e aprofundamento de drenagem muito fraco. Os solos são Bruno não Cálcico, Planosol, Rego Sol Distrófico e Litólicos Eutróficos, cobertos por uma vegetação de Capoeira e Caatinga (SERGIPE. SEPLANTEC/SUPES, 1997/2000).

A redução de diversidade como consequência da fragmentação, ocorre por dois processos distintos: a perda imediata das espécies e o isolamento dos fragmentos gerados.

No Estado de Sergipe observa-se o isolamento de populações naturais de várias espécies, entre elas, as espécies: *Cassia grandis* L.f. (Figura 2) e *Zizyphus joazeiro* Mart. (Figura 3). Assim, o número reduzido de indivíduos estudados se deve principalmente ao processo de fragmentação que ocorreu nas vegetações ciliares do Estado de Sergipe.

As populações de *Z. joazeiro* foram amostradas nos municípios de Santana do São Francisco (20 indivíduos); Canhoba (19 indivíduos); e Canindé do São Francisco (15 indivíduos).



Figura 2. Indivíduo de *Zizyphus joazeiro* Mart. localizado no município de Santana do São Francisco. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

As populações de *C. grandis* foram amostradas nos municípios de Santana do São Francisco (18 indivíduos); Canhoba (13 indivíduos); e Nossa Senhora de Lourdes (oito indivíduos).



Figura 3. Indivíduo de *Cassia grandis* L.f. localizado no município de Canhoba. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

2.2. Coleta do Material Vegetal

Para a realização dos estudos de diversidade e estrutura genética foram coletadas folhas tenras de indivíduos de *Z. joazeiro* Mart. e *C. grandis* L.f. , com o auxílio de podão. Todo o material foliar coletado foi envolvido em gaze e acondicionado em saco plástico devidamente lacrado, identificado, mantido em caixa de isopor com gelo e transportado ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal, do Departamento de Engenharia Agrônômica, da Universidade Federal de Sergipe (DEA/UFS), sendo armazenado em *freezer* a -20°C , até o momento da extração.

A amostragem dos indivíduos de cada população foi do tipo aleatória simples, tentando-se respeitar uma distância mínima de 50m entre eles, uma vez que o espaço mínimo recomendado entre árvores-matriz é de 50 a 100 m (KAGEYAMA e GANDARA,

1999). Com o auxílio de um GPS (*Global Position System*) modelo Garmin 12 foram marcadas as coordenadas geográficas dos indivíduos de cada população para a visualização da distribuição geográfica, e por meio do programa Track Macker (FERREIRA JÚNIOR, 2008) foi elaborado o mapa de localização desses. Foram efetuadas as seguintes avaliações dendrológicas de cada indivíduo: altura total (m), altura da primeira ramificação (m), circunferência à altura do peito – CAP (cm), número de fustes e área da copa. A altura total e a altura da primeira ramificação foram estimadas utilizando-se o método de superposição de ângulos; e a área da copa e a CAP foram obtidas com o auxílio de um diastímetro de 50m.

Os valores obtidos para as características dendrológicas avaliadas foram submetidos à análise de variância, segundo o teste F, e as médias foram comparadas por meio do teste de Scott e Knott (1974), a 5% de probabilidade. O programa utilizado para as análises estatísticas foi o SISVAR (FERREIRA, 2000).

2.3. Análise DNA-RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)

2.3.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Nienhuis et al. (1995), com modificações. Em um almofariz, 1g de folhas tenras foi macerado com 5mL de tampão de extração CTAB 2% (Cetil Trimetil Brometo de Amônio) e 20 μ L de β -mercaptoetanol para retardar a oxidação de metabólitos secundários. O tampão de extração é constituído de 2% de CTAB, 100mM de Tris (pH 8,0), 20mM de EDTA (pH 8,0), 1,4M de NaCl e 1% de Polivinil pirrolidone (PVP). O material macerado foi colocado em tubos de ensaio e levado ao banho-maria a 65°C por 60 minutos.

Após esse período, 1.000 μ L de cada amostra foram colocados em tubos tipo eppendorf contendo 1.000 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados lentamente 50 vezes, para a obtenção de uma emulsão e, posteriormente centrifugados a 7.000rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi pipetado, vertido em 1.000 μ L de álcool: acetato de amônio e condicionado no *freezer* (-20°C) por no mínimo 1 hora para a precipitação dos ácidos nucleicos. Após a precipitação do DNA, as amostras

foram centrifugadas a 14.000rpm por 10 minutos e ao precipitado foram adicionados 100µL de etanol, deixando-se 10 minutos em temperatura ambiente, e uma nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 4.000rpm, sendo assim possível retirar o sobrenadante e secar o precipitado (DNA). Após, foram adicionados 100µL de TE (1mM de Tris e 0,1mM de EDTA) para a solubilização do DNA.

2.3.2. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA extraído foi realizada em gel de agarose 1% em TBE 0,5X (0,045M Tris-borato e 0,001M de EDTA). 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 e visualizados sob luz ultravioleta após a coloração com brometo de etídio. Posteriormente, o DNA foi diluído para a realização das reações de RAPD.

2.3.3. Condições de Amplificação do DNA genômico

As reações de RAPD foram baseadas no método descrito por Willians et al. (1990), usando oligonucleotídeos de dez bases com sequência arbitrária, sendo as reações otimizadas para a obtenção de produtos de amplificação de melhor qualidade. Foram empregados 20 oligonucleotídeos para a geração de polimorfismo da marca IDT (Integrated DNA Technologies) (Tabela 1). As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Uniscience Biometra Tpersonal, em um volume de 13µL contendo 2,92µL de água ultra-pura; 1,30µL de tampão PCR 10X; 1µL de cloreto de magnésio 50mM; 1,04µL de dNTP 2,5mM; 1,04µL de BSA (Soro Albumina Bovina); 0,2µL da enzima Taq DNA polimerase; 2,5µL do oligonucleotídeo iniciador e 3µL do DNA genômico.

As reações foram submetidas a 45 ciclos de amplificação após a desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos. Cada ciclo foi constituído de três temperaturas: 15 segundos para desnaturação a 94°C, 30 segundos para anelamento do oligonucleotídeo a 42°C, e 30

segundos para a extensão da fita de DNA a 72°C. Ao final dos 45 ciclos foi realizada uma extensão final de 2 minutos a 72°C.

Tabela 1. Seqüências dos oligonucleotídeos que foram utilizadas nas reações de RAPD em indivíduos de *Zyziphus joazeiro* Mart. e *Cassia grandis* L.f. procedentes de diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

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

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em cuba horizontal, utilizando-se gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X, a 100V por 90 minutos. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) por 10 a 15 minutos e os produtos da amplificação visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

2.3.4. Análise dos dados RAPD

Nas avaliações visuais dos géis, a presença (1) e a ausência de bandas (0) foram usadas para a construção de uma matriz binária. As bandas com coloração fraca e baixa

definição foram descartadas. Com a matriz binária foi calculada a porcentagem de polimorfismo obtida com cada oligonucleotídeo utilizado, por meio da expressão:

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

(Equação 1)

Onde:

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

nbp = Número de bandas polimórficas;

nbt = Número de bandas total.

A estimativa de similaridade genética (Sg_{ij}), entre cada par de indivíduos de *Z. joazeiro* Mart. e *C. grandis* L.f., foi calculada por meio do coeficiente de Jaccard empregando-se o programa NTSYS pc2.1. (ROHLF, 2000). As similaridades obtidas foram calculadas empregando-se a seguinte expressão:

$$Sg_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

(Equação 2)

Onde:

a = Número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos os indivíduos, simultaneamente;

b = Número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo i ;

c = Número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo j ;

Foi realizado o teste de Mantel (MANLY, 1997) com 1000 permutações para avaliar a correlação entre a similaridade genética e a distância geográfica nas diferentes populações analisadas, utilizando o programa NTSYS pc2.1. (ROHLF, 2000). O valor Z de Mantel é dado por:

$$Z = \sum_{i,j=1}^n X_{ij}Y_{ij}$$

(Equação 3)

Onde, X_{ij} e Y_{ij} são elementos das matrizes X e Y a serem comparadas (no caso, as matrizes de distância geográfica e similaridade genética).

Os erros associados a cada distância genética ($1-Sg_{ij}$) foram estimados segundo Skroch et al. (1992), por meio da seguinte expressão:

$$V = \frac{n.d(1-d)}{(n-1)}$$

(Equação 4)

Onde:

V = Variância da distância genética entre cada par de indivíduos;

n = Número total de bandas utilizadas na estimativa da distância genética;

d = Distância genética entre cada par de indivíduos.

$$\text{O erro padrão estimado} = \left(\frac{V}{n} \right)^{\frac{1}{2}}.$$

(Equação 5)

A representação simplificada das similaridades foi obtida pela construção de dendrogramas pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average) (SNEATH e SOKAL, 1973), utilizando-se o programa NTSYS pc2.1 (ROHLF, 2000). Com o objetivo de verificar a consistência de cada agrupamento foi realizada a análise *bootstrap* por meio do aplicativo BOOD (COELHO, 2000).

Os indivíduos geneticamente diferentes foram identificados a partir da estimativa do valor mínimo de similaridade (Sgm), acima do qual os indivíduos são considerados semelhantes. O Sgm será estimado por meio do teste t de Student (0,1% de probabilidade), utilizando-se a seguinte expressão (CASTANHEIRA, 2001):

$$Sgm = 1 - (t.\bar{S}sg)$$

(Equação 6)

Onde:

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

$\bar{S}sg$ = erro médio das comparações consideradas no dendrograma.

Para a caracterização da variabilidade genética foi utilizado o programa POPGENE (Population Genetic Analysis) versão 1.32 (YEH et al., 1999), utilizando-se parâmetros para dados diplóides dominantes. Tendo em vista a natureza dominante dos dados, esse programa pressupõe, para os cálculos das estimativas das frequências alélicas, que os locos estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foi estimada a diversidade genética de Nei (1973) (H_e), a porcentagem de locos polimórficos (P%) e o índice de Shannon, para cada população e para o conjunto de populações. Também foi realizada a análise de diversidade genética entre populações pelo método de Nei (1978), estimando a heterozigosidade total (H_T), a diversidade gênica média dentro de populações (H_s), a divergência genética média entre populações (G_{ST}) e o fluxo gênico (N_m).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Distribuição geográfica e análise dos dados dendrológicos.

A distribuição geográfica das populações estudadas de *Z. joazeiro* Mart., está representada na Figura 4. A população 1 está localizada no município de Santana do São Francisco, a população 2 no município de Canhoba e a população 3 no município de Canindé do São Francisco.

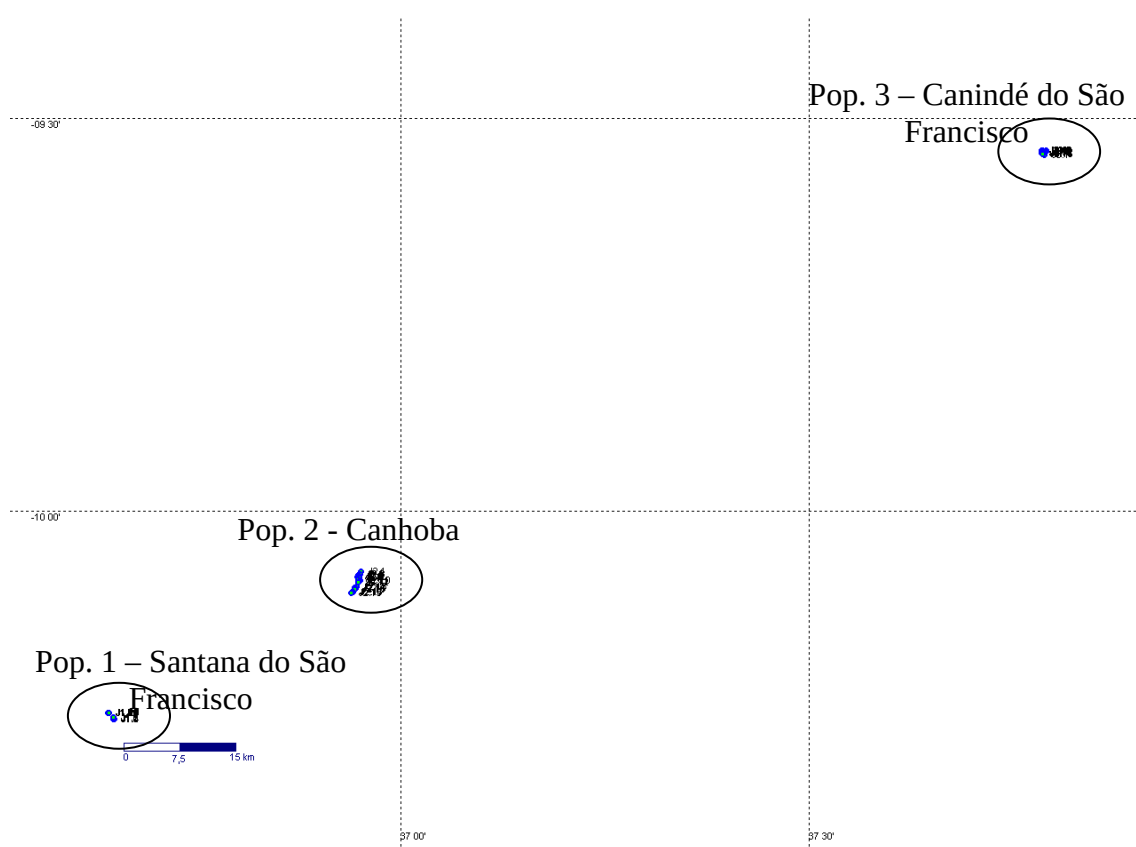


Figura 4. Distribuição geográfica das populações naturais de *Zizyphus joazeiro* Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

As populações estudadas da espécie *C. grandis* L.f. estão representadas na Figura 5. A população 1 está situada no município de Santana do São Francisco, a população 2 no município de Canhoba e a população 3 no município de Nossa Senhora de Lourdes.

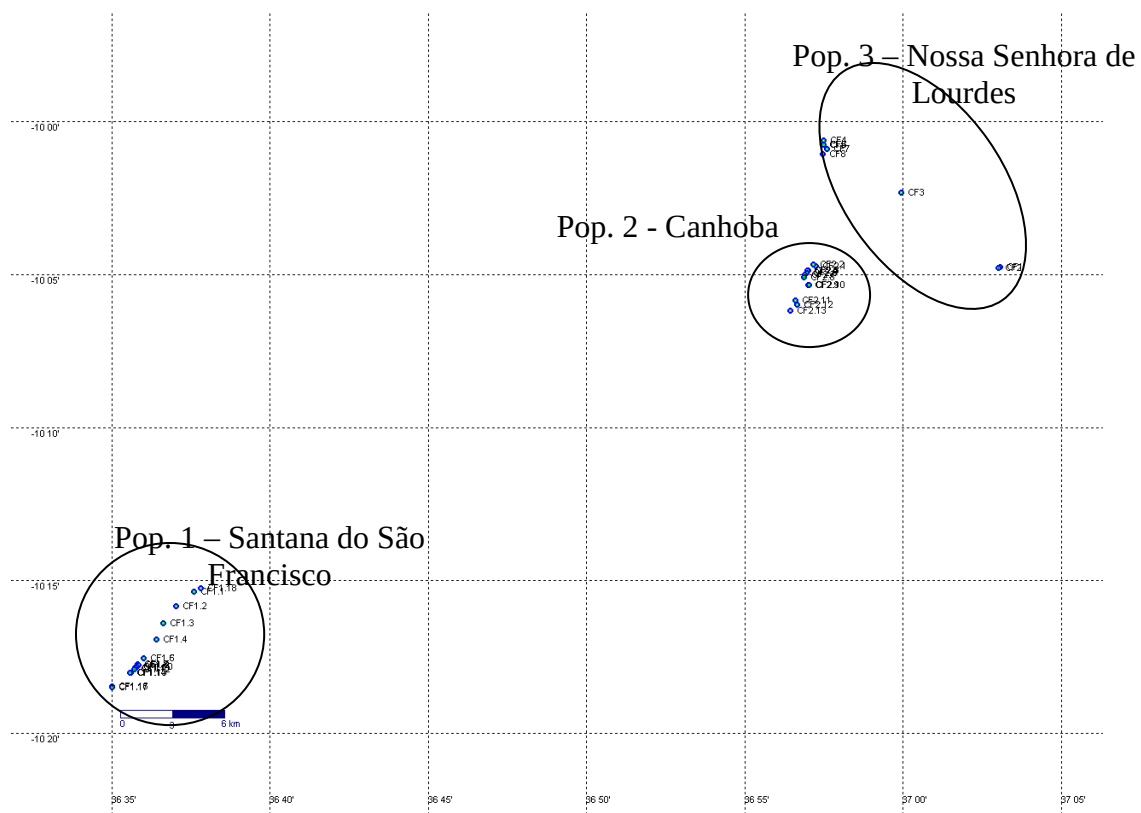


Figura 5. Distribuição geográfica das populações naturais de *Cassia grandis* L. f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sertão. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

As distâncias em quilômetro (Km) entre as populações estudadas de *Z. joazeiro* e *C. grandis* estão apresentadas nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Distância geográfica (Km) entre as populações de *Zizyphus joazeiro* Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sertão. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

	Santana do São Francisco	Canhoba
Santana do São Francisco	-	
Canhoba	36,472	-
Canindé do São Francisco	148,029	109,190

Analisando-se a distância geográfica entre as populações de *Z. joazeiro* observa-se que a menor distância é observada entre as populações de Santana do São Francisco e de Canhoba, e a maior entre as de Santana do São Francisco e Canindé do São Francisco. Para *C. grandis*, a maior distância geográfica é observada entre as populações de Santana do São Francisco e Canhoba, e a menor entre as de Canhoba e Nossa Senhora de Lourdes.

Tabela 3. Distância geográfica (Km) entre as populações de *Cassia grandis* L. f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

	Santana do São Francisco	Canhoba
Santana do São Francisco	-	
Canhoba	37,938	-
N. S. de Lourdes	44,432	6,668

As diferenças fitogeográficas e as distâncias entre os municípios, onde foram amostradas as populações de *Z. joazeiro* e *C. grandis*, podem influenciar nos parâmetros dendrológicos avaliados, uma vez que, em ambientes heterogêneos as plantas tendem a apresentar uma maior plasticidade fenotípica em resposta às adversidades ambientais (PEREIRA et al., 2004).

Os parâmetros dendrológicos avaliados para a espécie *Z. joazeiro* estão apresentados na Tabela 4. Os dados referentes à altura e ao número de bifurcações não apresentaram diferença estatística significativa. Observa-se, no entanto, que as maiores médias foram observadas nas populações de Santana do São Francisco e Canhoba. Os parâmetros CAP, área de copa e altura da 1ª ramificação foram diferentes estatisticamente entre as populações. As maiores médias para os parâmetros CAP e área de copa foram observados na população de Canhoba e a maior média para o parâmetro altura da 1ª ramificação nas populações de Canhoba e Canindé do São Francisco. Constata-se então, que a variação entre populações existe também numa escala geográfica maior. Geralmente, quanto mais distanciadas estão as populações, mais diferentes elas são em frequências alélicas e nas características fenotípicas de base genética, embora não haja frequentemente, uma correlação estrita (FUTUYMA, 1992).

Tabela 4. Parâmetros dendrológicos avaliados nas populações de *Zizyphus joazeiro* Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

	Altura (m)	CAP (cm)*	Nº B	Área de copa (m ²)*	Altura da 1ª ramificação (cm)*
Santana do São Francisco	7,00	38,90 a1	5,00	70,54 a1	3,25 a1
Canhoba	6,98	69,94 a2	6,00	118,45 a2	27,63 a2
Canindé do São Francisco	6,09	48,82 a1	4,53	82,81 a1	20,60 a2

* Resultados estatisticamente significativos, utilizando o teste Scott Knott. CAP – circunferência à altura do peito; NºB - número de bifurcações.

Os parâmetros dendrológicos avaliados para as populações de *C. grandis* estão apresentados na Tabela 5. Com exceção da altura da 1ª ramificação, nenhum parâmetro apresentou diferença estatística significativa. Maiores médias para os parâmetros altura, CAP, número de bifurcações e altura da 1ª ramificação foram observadas na população de Santana do São Francisco, enquanto para o parâmetro área de copa a maior média foi observada na população de Canhoba.

Tabela 5. Parâmetros dendrológicos avaliados nas populações de *Cassia grandis* L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

	Altura (m)	CAP (cm)	Nº B	Área de copa (m ²)	Altura da 1ª ramificação (cm)*
Santana do São Francisco	11,95	167,06	1,84	248,19	279,25 a2
Canhoba	11,12	156,38	1,75	276,99	149,92 a1
Nossa Senhora de Lourdes	9,78	141,37	1,11	253,47	131,25 a1

* Resultados estatisticamente significativos, utilizando o teste Scott Knott. CAP – circunferência à altura do peito; NºB - número de bifurcações.

As diferenças dendrológicas observadas entre as populações das espécies estudadas, provavelmente, são advindas das práticas extrativistas (usos) realizadas pelas populações locais sobre as espécies e da adaptação das mesmas ao meio. *Z. joazeiro* em regiões secas é utilizada como fonte de alimento e sombra para os animais (LORENZI, 2000), situação que foi constatada nos municípios de Canhoba e Canindé do São Francisco. Assim, os

produtores evitam o corte dos indivíduos desta espécie. Em *C. grandis*, as diferenças podem estar relacionadas às condições climáticas, principalmente à disponibilidade de água, que podem favorecer um maior desenvolvimento desta espécie.

3.2. Análise da diversidade genética em populações naturais de *Zizyphus joazeiro* Mart.

Com a utilização de 20 oligonucleotídeos, para o estudo da divergência genética em populações naturais de *Z. joazeiro*, foram gerados pelo menos dois fragmentos de DNA polimórficos entre os indivíduos (Tabela 6). No total, foram gerados 177 produtos de amplificação para a população de Santana do São Francisco; 203 para a população de Canhoba; e 160 para a população de Canindé do São Francisco. Com uma média de 8,85; 10,15 e 8 fragmentos por oligonucleotídeo, respectivamente. O número de fragmentos polimórficos variou de 93 a 135. Assim, a população de Santana do São Francisco apresentou 63,3% de polimorfismo, a de Canhoba 66,5% e a de Canindé do São Francisco 58,1%.

Tabela 6. Relação do número de produtos amplificados para cada oligonucleotídeo (NTB), com suas respectivas porcentagens de polimorfismo (%P), em análise de RAPD, em populações naturais de *Zizyphus joazeiro* Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

Oligonu- cleotídeos	Santana do São Francisco			Canhoba			Canindé do São Francisco		
	NTB	NBP	%P	NTB	NBP	%P	NTB	NBP	%P
IDT 1	10	5	50,0	12	7	58,3	7	3	42,8
IDT 2	7	4	57,1	10	5	50,0	7	4	57,1
IDT 3	6	3	50,0	8	5	62,5	9	7	77,8
IDT 4	9	7	77,8	7	7	100,0	11	9	81,8
IDT 5	7	5	71,4	6	4	66,7	5	2	40,0
IDT 6	7	5	71,4	11	8	72,7	7	3	42,8
IDT 7	10	7	70,0	11	8	72,7	9	6	66,7
IDT 8	7	5	71,4	6	4	66,7	6	4	66,7
IDT 9	9	5	55,5	13	7	53,8	7	4	57,1
IDT 10	12	7	58,3	11	6	54,5	7	4	57,1
IDT 11	12	9	75,0	14	9	64,3	13	7	53,8
IDT 12	8	6	75,0	12	9	75,0	8	4	50,0
IDT 13	12	8	66,6	9	5	55,5	9	7	77,8
IDT 14	8	4	50,0	10	5	50,0	9	4	44,4
IDT 15	9	5	55,5	10	7	70,0	7	4	57,1
IDT 16	9	8	88,9	10	7	70,0	5	3	60,0
IDT 17	12	4	33,3	13	9	69,2	10	5	50,0
IDT 18	5	3	60,0	7	4	57,1	5	2	40,0
IDT 19	10	8	80,0	12	12	100,0	11	6	54,5
IDT 20	8	4	50,0	11	7	63,6	8	5	62,5
TOTAL	177	112	63,3	203	135	66,5	160	93	58,1

Os polimorfismos observados nas populações são considerados baixos, indicando que estas apresentam baixa heterozigosidade e que processos ecológicos como o fluxo gênico não estão ocorrendo entre as populações. Valores próximos ao observado neste estudo foram encontrados por Bertoni et al. (2007) estudando oito populações de *Zeyheria montana* Mart. (média de 60%). Por outro lado, Freire et al. (2007) observaram um polimorfismo de 96,9%, estudando populações naturais de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake distantes entre si 64 a 350 Km.

Os oligonucleotídeos que apresentaram maior número de fragmentos polimórficos para a população de Santana do São Francisco foi o IDT 11 (9 fragmentos), para a população de Canhoba o IDT 19 (12 fragmentos), e para a população de Canindé do São Francisco o IDT 4 (9 fragmentos). Os oligonucleotídeos que apresentaram menor número de fragmentos polimórficos foram: IDT 3 e IDT 18 (3 fragmentos), na população de Santana do São Francisco; IDT 5, IDT8 e IDT 18 (4 fragmentos) na população de Canhoba; e IDT5 e IDT 18 (2 fragmentos) na população de Canindé do São Francisco.

O número de fragmentos polimórficos utilizados na avaliação da variabilidade genética em plantas é bastante variável. Estopa et al. (2006) utilizaram 56 fragmentos de DNA para a caracterização da diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* DC. MacLeish. Freire et al. (2007) utilizaram cinco primers e identificaram 31 fragmentos polimórficos para o estudo de estrutura genética de populações de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake. Bessega et al. (2000) utilizaram quatro oligonucleotídeos e obtiveram 46 fragmentos polimórficos, que foram suficientes para determinar a diversidade genética entre indivíduos de *Prosopis glandulosa* (Torr.) Standl. e *P. velutina* Wood. Observa-se então, que como as espécies não são domesticadas encontra-se elevado polimorfismo em um número reduzido de oligonucleotídeos.

A partir dos 112 fragmentos polimórficos obtidos na população de Santana do São Francisco, foi estimada uma matriz de similaridade genética, pelo método de Jaccard, relacionando todos os pares de indivíduos (Anexo 1). A similaridade genética média entre os indivíduos foi de 54,0%, o erro padrão médio foi de 4% e a amplitude das similaridades variou de 38 a 72%. Os indivíduos que se apresentaram mais semelhantes foram o J5 e J6 ($72\% \pm 0,04$) e os mais divergentes J3 e J16 ($38\% \pm 0,04$).

Para as 1.000 permutações conduzidas pelos *bootstraps* (Figura 6), observou-se que apenas os grupos formados pelos indivíduos J5 e J6 (76,83%); J17 e J18 (51,96%); e J10 e

J11 (53,11%) apresentaram proporções relativamente altas de replicações similares, os demais grupos apresentaram-se com proporções de replicações similares baixas.

O valor mínimo de similaridade foi igual a 0,90 (linha de corte), indicando que não há indivíduos semelhantes geneticamente na população de Santana do São Francisco.

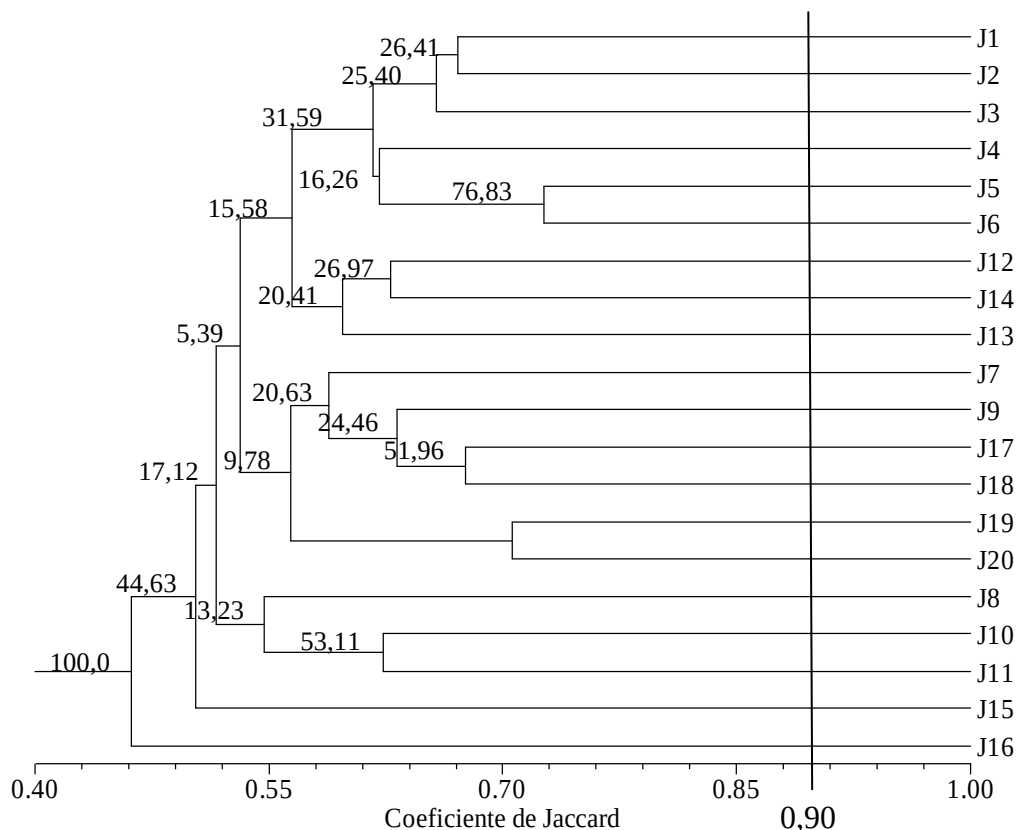
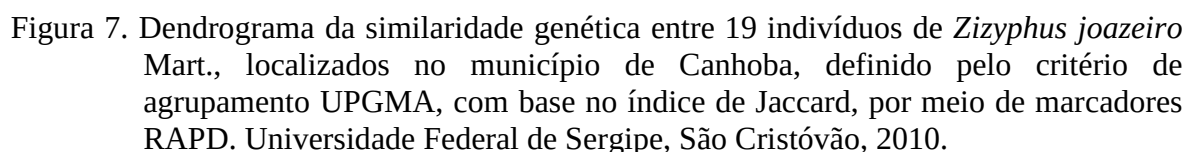


Figura 6. Dendrograma da similaridade genética entre 20 indivíduos de *Zizyphus joazeiro* Mart., localizados no município de Santana do São Francisco, definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no índice de Jaccard, por meio de marcadores RAPD. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

A similaridade genética média entre os indivíduos de *Z. joazeiro* da população de Canhoba foi estimada utilizando 135 fragmentos polimórficos. A similaridade média foi igual a 55,0%, o erro padrão médio foi de 4 % e a amplitude das similaridades variou de 32 a 68%. Os indivíduos que se apresentaram mais semelhantes foram o J4 e J5 ($68\% \pm 0,04$) e os mais divergentes J3 e J19 ($32\% \pm 0,04$) (Anexo 2).

Observa-se que apenas os grupos formados pelos indivíduos J2 e J3 ($75,15\%$); e J4, J5, J6, J7, J9, J10, J11, J12, J13, J14, J15, J16, J17 e J18 ($68,78\%$) apresentaram proporções relativamente altas de replicações similares para as 1.000 permutações

O valor mínimo de similaridade foi igual a 0,90 (linha de corte), indicando que não houve indivíduos semelhantes na população de Canhoba (maior similaridade genética entre os indivíduos 68%)



Observa-se que apenas os grupos formados pelos indivíduos J2 e J4 (64,01%); J2, J4 e J5 (85,46%); e J6 e J7 (57,69%), apresentaram proporções relativamente altas de

replicações similares para as 1.000 permutações conduzidas pelos *bootstraps* (Figura 8). Os demais grupos apresentaram-se com proporções de replicações similares relativamente baixas.

O valor mínimo de similaridade foi igual a 0,88 (linha de corte), indicando que não há indivíduos semelhantes na população de Canindé do São Francisco (CASTANHEIRA, 2001).

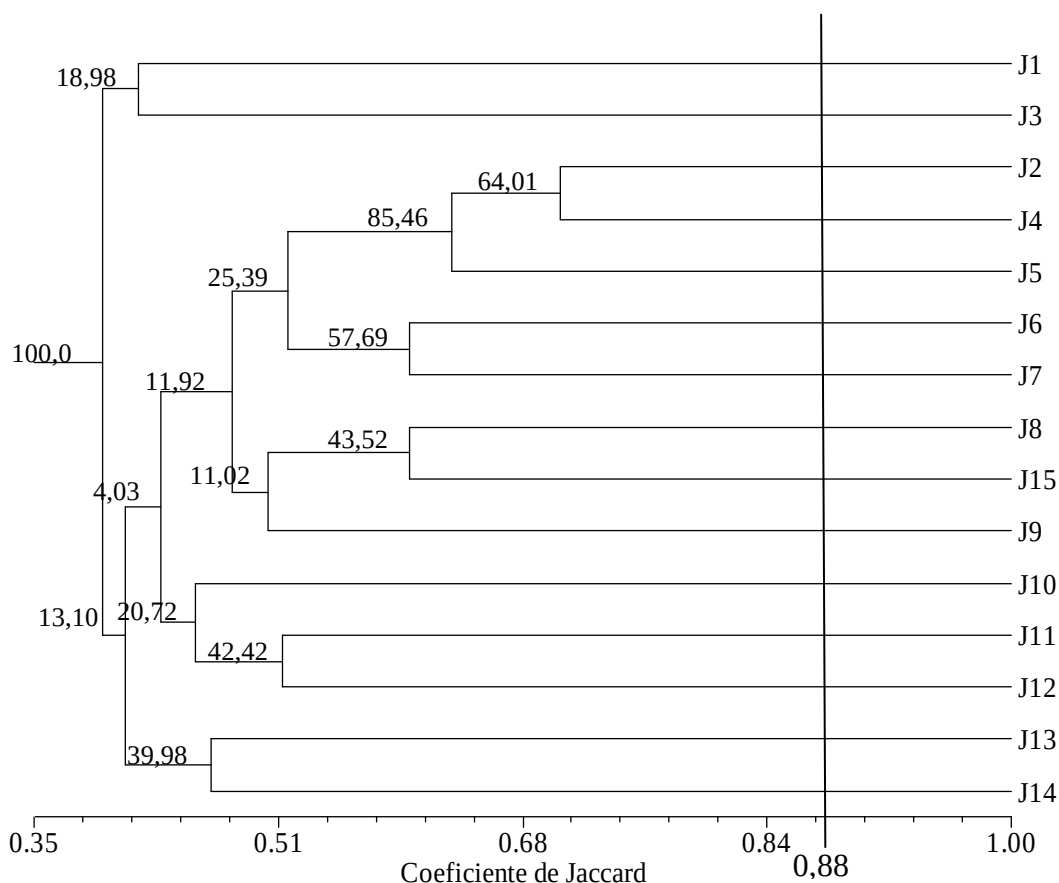


Figura 8. Dendrograma de similaridade genética entre 15 indivíduos de *Zizyphus joazeiro* Mart., localizados no município de Canindé, definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no índice de Jaccard, por meio de marcadores RAPD. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

A alta variabilidade observada entre as populações estudadas de *Z. joazeiro* confirma a eficácia dos marcadores moleculares RAPD para detectar a variabilidade genética em populações naturais, o que pode ser comprovado pelo número de bandas polimórficas. As similaridades genéticas médias observadas nas populações de *Z. joazeiro* variaram de 44 a 54 %, indicando que há considerável divergência genética entre os indivíduos e estes podem ser utilizados na coleta de sementes e produção de mudas para a

recuperação de áreas degradadas. Portanto, as populações devem ser incluídas em programas de conservação genética da espécie, devido à existência de considerável variabilidade genética intrapopulacional e a presença de alelos exclusivos.

Segundo Nienhuis et al. (1995), a partir de 100 bandas, praticamente ocorre uma estabilização do coeficiente de variação das distâncias genéticas entre os genótipos. Entretanto, não foi observada a estabilização de alguns agrupamentos na análise de *bootstrap* realizada para as populações. Esta análise é importante para a discriminação dos erros das estimativas dos parâmetros. É relevante conhecer a magnitude dos erros, pois se ela for elevada, a precisão das estimativas é baixa, o que pode ser prejudicial para as estratégias de conservação da diversidade genética das populações naturais. Uma vez que, a preservação destas é baseada nas medidas de diversidade intra e interpopulacionais, quantificadas pelas estimativas dos parâmetros populacionais. Se eles forem estimados com baixa precisão, decisões errôneas podem ser tomadas quanto à manutenção ou não de populações na natureza, o que pode levar à perda da variabilidade genética, ou ter outras conseqüências (CARLINI-GARCIA et al., 2001).

A avaliação da linha de corte realizada por meio do teste t de Student a 1% de probabilidade, denominado valor mínimo de similaridade, acima do qual os indivíduos são considerados geneticamente semelhantes (CASTANHEIRA, 2001), permite inferir que os indivíduos analisados são divergentes, confirmando os dados de similaridade genética.

Em geral, a variação genética entre populações pode ser resultado da distância geográfica e das zonas ecológicas (MILANKOV et al., 2007). O teste de Mantel revelou uma correlação negativa (-1,2530) e não significativa (0,1051) para a população de Santana do São Francisco (Figura 9a). Na população de Canhoba a correlação foi negativa (-0,40335) e significativa (0,0001) (Figura 6b) e para a população de Canindé do São Francisco a correlação foi positiva (0,3299) e não significativa (0,6293). Observa-se então, que para a população de Canindé do São Francisco, mesmo com o valor de correlação positivo, a similaridade genética não pode ser explicada pela distância geográfica, uma vez que o teste estatístico não suportou a tendência observada, fato também observado por Cavallari Neto (2004) estudando populações de *Tabebuia cassinoides* LAM (D.C.). Assim, pode-se inferir que a distância geográfica não está relacionada com a similaridade genética entre os indivíduos analisados.

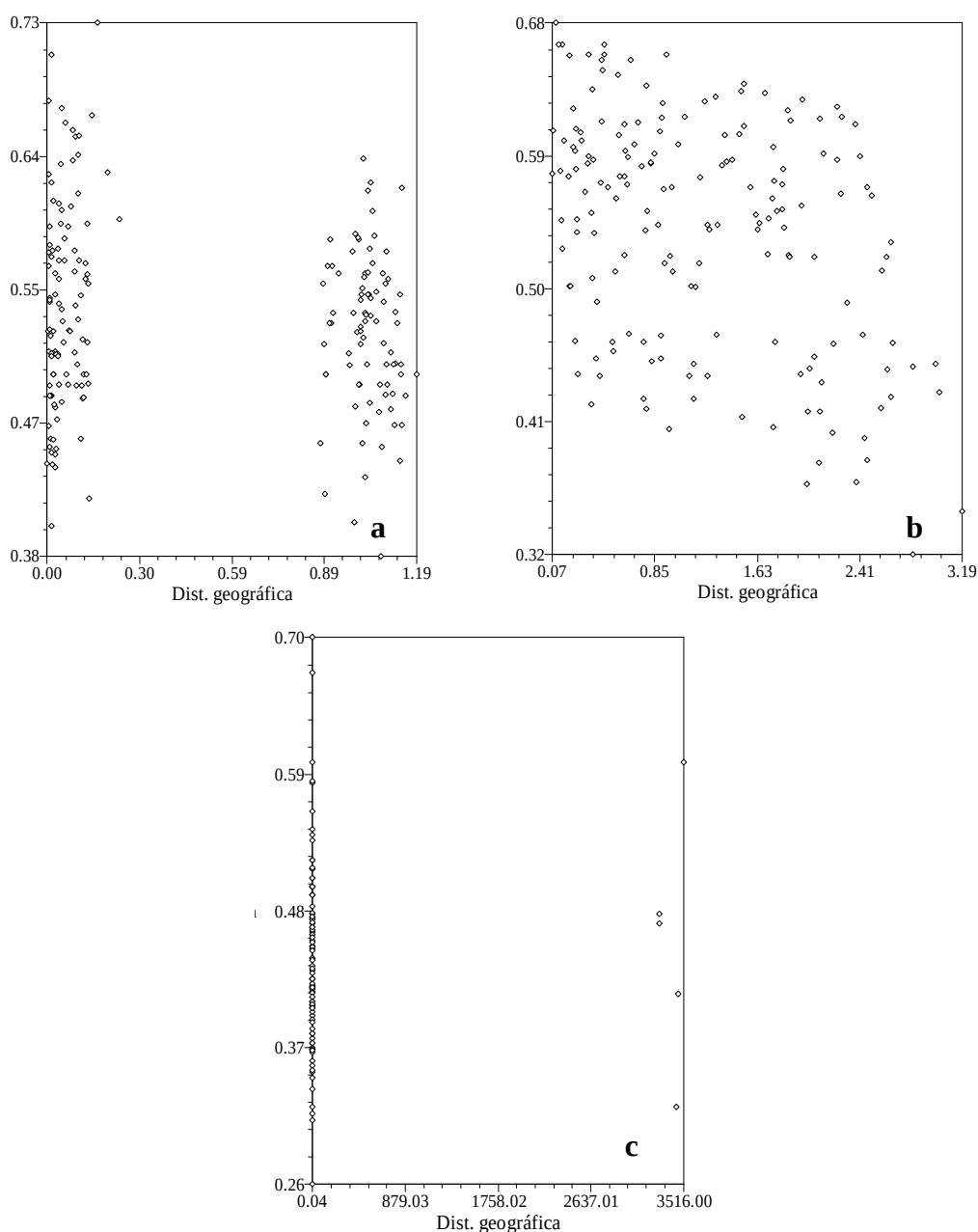


Figura 9. Correlação entre a matriz de similaridade genética e a matriz de distância geográfica das populações de *Zizyphus joazeiro* Mart localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010. a – Santana do São Francisco; b – Canhoba; e c – Canindé do São Francisco.

O agrupamento dos indivíduos das três populações de *Z. joazeiro*, com base na matriz das similaridades pelo método UPGMA, é apresentado na Figura 10. A junção dos dados de similaridade permitiu discriminar os indivíduos de *Z. joazeiro* em suas respectivas populações. Este resultado evidencia a diversidade genética presente nestas.

Assim, para fins de conservação deve-se coletar material das três áreas amostradas, visando à manutenção da variabilidade genética existente.

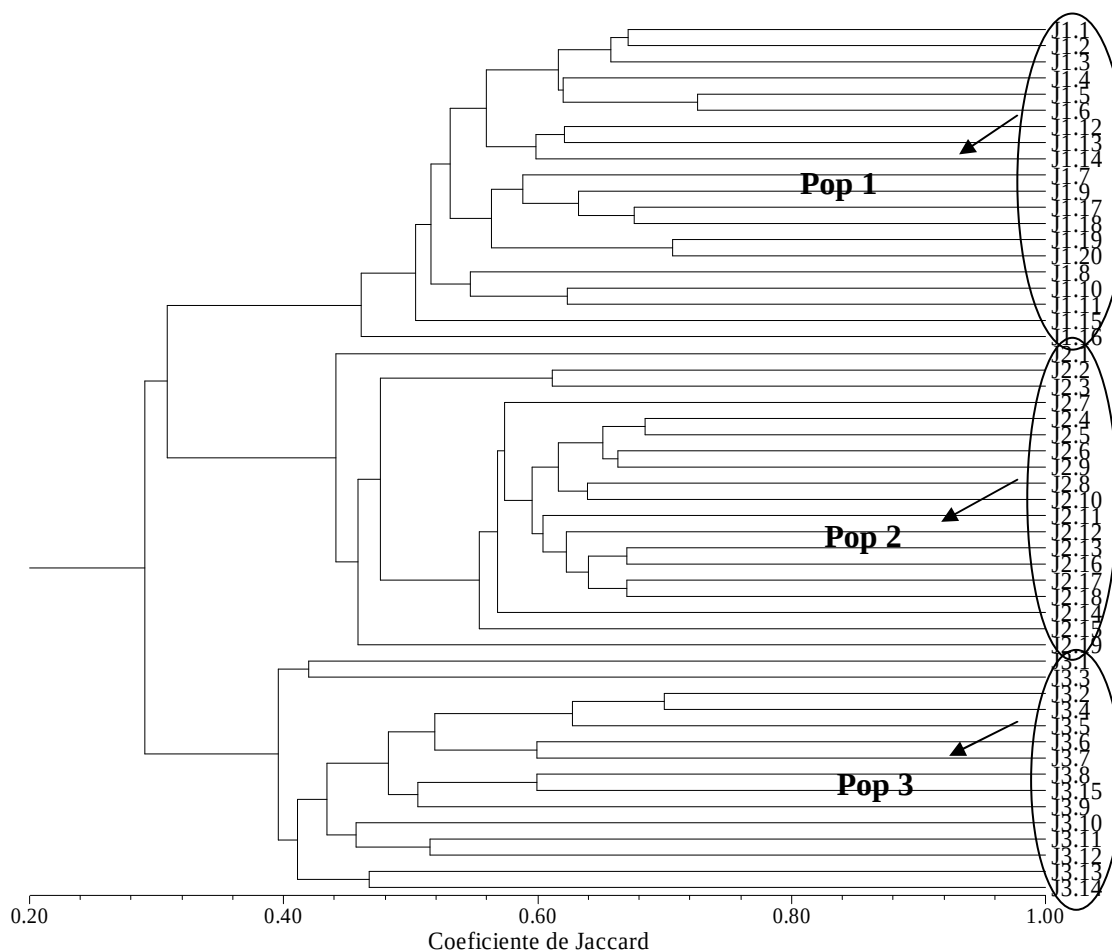


Figura 10. Dendrograma da similaridade genética entre indivíduos de *Zizyphus joazeiro* Mart. localizados em três municípios do Estado de Sergipe (Santana do São Francisco – pop1, Canhoba – pop2 e Canindé do São Francisco- pop3), definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no índice de Jaccard, por meio de marcadores RAPD. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

A maioria das espécies é fragmentada em certa medida, dependendo do ambiente (fragmentação do habitat), da biologia das espécies (dispersão, comportamento territorial, caráter de deslocamento), e dos eventos históricos (deriva genética, efeito fundador e gargalo genético). Em populações fragmentadas espacial ou temporalmente ocorre a estruturação das populações (MILANKOV, 2007) e, devido à diferenciação das três populações por meio da análise de similaridade genética, pode-se afirmar que as populações estão estruturadas.

Os índices de diversidade genética entre as populações estão apresentados na Tabela 7. A heterozigosidade, também chamada de índice de diversidade genética de Nei,

foi usada para avaliar o conteúdo polimórfico de cada loco e obteve-se um valor de 0,2539 para a população amostrada em Santana do São Francisco, 0,3093 para a população de Canhoba e 0,2451 para a população de Canindé do São Francisco. Os valores obtidos foram semelhantes aos encontrados por Tambarussi et al. (2008), estudando nove populações naturais de *Piptadenia gonoacantha* Mart. (média de 0,292) e por Freire et al. (2007), estudando populações de *Schizolobium parahyba* Vell. (0,36).

Tabela 7. Índice de diversidade de Shannon (1972), diversidade genética de Nei (1978) e % de locos polimórficos em populações naturais de *Zizyphus joazeiro* Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

Populações	Diversidade genética de Nei	Índice de Shannon	% Locos polimórficos
Santana do São Francisco	0.2539	0.3815	76,71
Canhoba	0.3093	0.4652	92,47
Canindé do São Francisco	0.2451	0.3602	63,70
Conjunto de populações	0.3601	0.5344	100,0

Uma medida de diversidade que vem sendo utilizada em análises populacionais por meio do marcador de DNA-RAPD é o índice de diversidade de Shannon, que tem a vantagem de ser insensível ao viés causado pela não detecção dos genótipos heterozigotos, já que ele se baseia na frequência fenotípica da banda na população (ESTOPA, 2003). O Índice de Shannon varia de 0 a 1 e considera-se que quanto mais próximo o valor for de zero, mais baixas são as diversidades (BOTREL et al., 2006). Nas populações estudadas de *Z. joazeiro* o índice de Shannon foi igual a 0,3815 na população de Santana do São Francisco, 0,4652 na população de Canhoba e 0,3602 na população de Canindé do São Francisco. Os valores obtidos foram próximos ao encontrado por Estopa et al. (2006) estudando populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (0,49 e 0,50).

A porcentagem de locos polimórficos variou de 63,70 (Canindé do São Francisco) a 92,47% (Canhoba). O baixo nível de locos polimórficos observado nas populações de Santana do São Francisco e Canindé do São Francisco indica que estas estão isoladas, situação também observada por ZIMBACK et al. (2004) estudando populações de *Trichilia pallida* Swartz. A perda de heterozigosidade geralmente está associada a eventos aleatórios

de colonização, devido a diversos fatores. Desse modo, a deriva genética, tende a diminuir o nível de polimorfismo das espécies (PEREIRA et al., 2004).

Cabe ressaltar que a maioria dos índices de diversidade genética depende da estimativa da heterozigosidade na população e considerando o caráter dominante dos marcadores RAPD, a estimativa destes índices seguindo este método é uma aproximação (FREIRE et al., 2007).

Os parâmetros estimados da diversidade genética de Nei estão apresentados na Tabela 8. A heterozigosidade total observada (0,3573) indica que a espécie apresenta reserva de variabilidade genética nas populações estudadas.

A divergência genética foi relativamente alta, demonstrando que 24% da variabilidade genética se encontra entre as populações (0,2458) e 76% dentro das populações ($H_S = 0,2695$), em concordância com a grande quantidade de alelos exclusivos observada, sugerindo fortes restrições no fluxo gênico (FERREIRA-RAMOS, 2008). A maior diversidade genética dentro de populações tem sido encontrada em outras espécies arbóreas. Zimback et al (2004) e Wendt (2005) observaram que maior parte da diversidade genética é encontrada dentro das populações de *Trichilia pallida* Swartz e *Ilex paraguariense* A. St.-Hil, respectivamente.

Tabela 8. Diversidade genética de Nei em populações naturais de *Zizyphus joazeiro* Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

	H_T	H_S	G_{ST}	Nm
Média	0,3573	0,2695	0,2458	1,5344
Desvio padrão	0,0174	0,0151		

H_T = diversidade genética total (heterozigosidade); H_S = diversidade genética dentro das populações; G_{ST} = relação entre a diversidade genética entre populações e a diversidade genética total; Nm = fluxo gênico.

Segundo Lovelles e Hamrick (1984), muitas espécies arbóreas possuem efetivos meios de dispersão de genes e, com isto, mantêm altos níveis de variação genética dentro de populações, com pouca diferenciação entre populações. No entanto, maior diferenciação genética é esperada em populações geograficamente e reprodutivamente isoladas entre si, fato este observado nas populações estudadas de *Z. joazeiro*.

O baixo valor do fluxo gênico observado (1,5344) para estas populações pode ser um indicativo de isolamento genético, o que pode estar associado à distância geográfica

entre elas. O valor de N_m determina se a deriva genética, por si só, pode produzir variabilidade genética substancial entre locais. Se N_m for maior que 1,0, o fluxo gênico será alto o suficiente para prevenir uma diferenciação devido à deriva (MORAES e DERBYSHIRE, 2002). No entanto, o valor observado corresponde ao fluxo gênico aparente que ocorreu no passado (fluxo gênico histórico), quando as populações faziam parte de uma única grande população ou constituíam metapopulações. Portanto, isto deve ser interpretado com cautela, pois indica que as populações de diferentes regiões, apesar de geograficamente isoladas, apresentam alelos e frequências similares, como resultado de trocas gênicas antigas (RAPOSO et al., 2007).

A ausência de fluxo gênico associada à grande distância separando as populações e, conseqüentemente, isolando-as reprodutivamente, pode explicar a alta diferenciação genética observada entre estas populações, fato este observado também por Viegas (2009) estudando populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. localizadas em Aramina-SP e Selvíria-MS

As medidas de distância genética e identidade genética de Nei (1978) estão apresentadas na Tabela 9. A maior identidade genética foi observada entre as populações de Canindé do São Francisco e Santana do São Francisco (0,8710) e a maior distância genética foi observada entre as populações de Santana do São Francisco e Canhoba (0,2632). Observou-se que, embora as populações de Canindé e Santana estejam mais distantes geograficamente apresentaram a menor distância genética, inferior às populações mais próximas (Santana do São Francisco e Canhoba).

Tabela 9. Medidas originais de distância genética e identidade genética de Nei entre populações naturais de *Zizyphus joazeiro* Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

	Santana-SE	Canhoba-SE	Canindé-SE
Santana-SE	-	0,7686	0,8710
Canhoba-SE	0,2632	-	0,8186
Canindé-SE	0,1381	0,2001	-

Valores acima da diagonal correspondem à identidade genética e abaixo da diagonal a distância genética.

A correlação entre a distância geográfica e a divergência genética entre as populações para o teste de Mantel foi nula e não significativa (0,500). Esse resultado indica que as populações não estão isoladas por distância, logo a divergência genética entre elas

não pode ser explicada pela distância geográfica (LOSS et al., 2006), sendo a deriva genética a causa mais provável (SOUZA et al., 2004).

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações evidenciou a presença de certa estrutura genética, porém esta não foi correlacionada com a distribuição espacial das populações. Loveless e Hamrick (1984) afirmam que a diferenciação entre as populações tende a ser reduzida quando as espécies apresentam fertilização cruzada e fluxo de pólen, porém devido à ausência de fluxo gênico entre as populações, foi observada a diferenciação entre as mesmas.

Outro fator que influencia na estruturação das populações naturais é o agente polinizador da espécie. As espécies que são polinizadas por insetos apresentam baixa variabilidade, reduzido tamanho efetivo e devido ao movimento limitado dos mesmos a estruturação das populações é observada (LOVELESS e HAMRICK, 1984). Observou-se que a estruturação das populações de *Z. joazeiro* pode ser resultado não apenas da distância geográfica entre elas, como também pelas características ecológicas da espécie.

3.3. Análise da diversidade genética em populações naturais de *Cassia grandis* L.f.

O número de fragmentos polimórficos observados com a utilização de 20 oligonucleotídeos, para o estudo da divergência genética em populações naturais de *C. grandis*, variou de 0 (IDT 8 e IDT 16 na população de Santana do São Francisco) a 12 (IDT 13 na população de Santana do São Francisco) (Tabela 10). No total, foram gerados 146 produtos de amplificação para a população de Santana do São Francisco; 185 para a população de Canhoba; e 163 para a população de Nossa Senhora de Lourdes, com uma média de 7,3; 9,25; e 8,15 fragmentos por oligonucleotídeo, respectivamente. A população que apresentou maior polimorfismo foi a de Santana do São Francisco (58,9%), seguida da população de Canhoba (45,4%) e Nossa Senhora de Lourdes (44,1%).

Tabela 10. Relação do número de produtos amplificados para cada oligonucleotídeo, com suas respectivas porcentagens de polimorfismo em análise de RAPD em populações naturais de *Cassia grandis* L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

Oligonu- cleotídeos	Santana do São Francisco-SE			Canhoba-SE			Nossa Senhora de Lourdes-SE		
	NTB	NBP	%P	NTB	NBP	%P	NTB	NBP	%P
IDT 1	5	1	20,0	9	4	44,4	8	4	50,0
IDT 2	5	5	100,0	8	6	75,0	6	3	50,0
IDT 3	11	7	63,6	11	7	63,6	10	4	40,0
IDT 4	7	5	71,4	6	2	33,3	7	4	57,1
IDT 5	3	1	33,3	7	4	57,1	6	3	50,0
IDT 6	6	3	50,0	8	4	50,0	8	4	50,0
IDT 7	12	8	66,7	10	5	50,0	7	3	42,8
IDT 8	4	0	0,0	9	5	55,5	7	3	42,8
IDT 9	6	4	66,7	8	3	37,5	8	1	12,5
IDT 10	11	8	72,7	9	2	22,2	8	4	50,0
IDT 11	11	3	27,3	13	5	38,4	9	3	33,3
IDT 12	9	8	88,9	9	4	44,4	10	3	30,0
IDT 13	12	12	100,0	17	5	29,4	12	6	50,0
IDT 14	6	4	66,7	6	2	33,3	10	4	40,0
IDT 15	9	7	77,8	10	4	40,0	11	5	45,4
IDT 16	5	0	0,0	8	3	37,5	5	2	40,0
IDT 17	7	2	28,6	11	8	72,7	8	3	37,5
IDT 18	3	1	33,3	4	2	50,0	6	3	50,0
IDT 19	7	2	28,5	11	4	36,3	11	7	63,6
IDT 20	7	5	71,4	11	5	45,4	6	3	50,0
TOTAL	146	86	58,9	185	84	45,4	163	72	44,1

A baixa heterozigosidade detectada nas populações estudadas pode ser comprovada observando os baixos valores de polimorfismos. Souza et al. (2009) estudando populações de *Mandevilla velutina* Mart. observaram um total de 81,08% de locos polimórficos. Oliveira et al. (2008) observaram um polimorfismo de 44,29% e 72,86% em populações de *Dimorphandra mollis* Benth.

Os oligonucleotídeos que apresentaram maior número de fragmentos polimórficos para a população de Santana do São Francisco foi o IDT 13 (12 fragmentos), para a população de Canhoba o IDT 17 (8 fragmentos), e para a população de Nossa Senhora de Lourdes o IDT 19 (7 fragmentos). Os oligonucleotídeos que apresentaram menor número de fragmentos polimórficos foram: IDT 8 e IDT 16 (nenhum fragmento), na população de Santana do São Francisco; IDT 4, IDT10, IDT14 e IDT 18 (2 fragmentos) na população de Canhoba; e IDT9 (1 fragmento) na população de Nossa Senhora de Lourdes.

No estudo da variabilidade genética de espécies florestais, observa-se uma elevada amplitude do número de fragmentos polimórficos utilizados nas análises. Tambarussi et al. (2008) com o objetivo de avaliar a variabilidade genética em nove populações de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) utilizaram 35 fragmentos polimórficos de DNA. Bertoni et al. (2007) utilizaram 65 fragmentos polimórficos para avaliar a diversidade genética em oito populações naturais de *Zeyheria montana* Mart.

A partir dos 86 fragmentos polimórficos obtidos na população de Santana do São Francisco, foi estimada uma matriz de similaridade genética, pelo método de Jaccard, relacionando todos os pares de indivíduos (Anexo 4). A similaridade genética média entre os indivíduos foi de 69,87%, o erro padrão médio foi de 3,8 % e a amplitude das similaridades variou de 47 a 88%. Os indivíduos que se apresentaram mais semelhantes foram o CF11 e CF12; CF12 e CF13 ($88\% \pm 0,03$) e os mais divergentes CF1 E CF8 ($47\% \pm 0,04$).

Observou-se que os grupos formados pelos indivíduos CF1 e CF2 (87,19%); CF3 e CF4 (91,29%); CF11, CF12, CF13, CF14, CF15, CF16 e CF18 (63,35%); CF16 e CF18 (62,62%); CF1, CF2, CF3, CF4, CF5, CF6, CF7, CF10, CF11, CF12, CF13, CF14, CF15, CF16, CF17 e CF18 (61,13%); e CF8 e CF9 (69,29%) apresentaram proporções relativamente altas de replicações similares, para as 1.000 permutações conduzidas pelos *bootstraps* (Figura 11). Os demais grupos apresentaram-se com proporções de replicações similares relativamente baixas.

O valor mínimo de similaridade foi igual a 0,91 (linha de corte), indicando que não há indivíduos semelhantes na população de Santana do São Francisco.

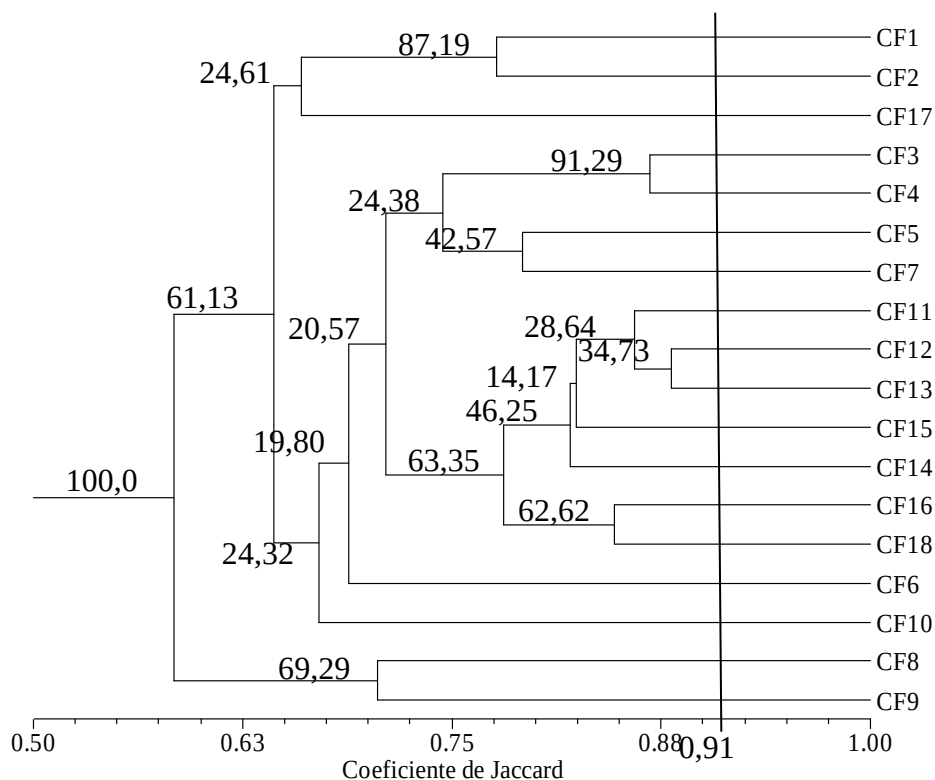


Figura 11. Dendrograma de similaridade genética entre 18 indivíduos de *Cassia grandis* L.f. localizados no município de Santana do São Francisco, definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no índice de Jaccard, por meio de marcadores RAPD. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

A partir dos 84 fragmentos polimórficos obtidos na população de Canhoba, foi estimada uma matriz de similaridade genética, pelo método de Jaccard, relacionando todos os pares de indivíduos (Anexo 5). A similaridade genética média entre os indivíduos foi de 52,03%, o erro padrão médio foi de 5,0% e a amplitude das similaridades variou de 35 a 74%. Os indivíduos que se apresentaram mais semelhantes foram os CF2 e CF4 ($74\% \pm 0,05$) e os mais divergentes CF3 e CF10; e CF10 e CF12 ($35\% \pm 0,05$).

Observou-se que apenas os grupos formados pelos indivíduos CF2 e CF4 ($51,70\%$); CF1, CF2, CF3, CF4, CF5, CF6, CF7, CF8, CF9 e CF13 ($66,17\%$); CF11 e CF12 ($71,69\%$); CF1, CF2, CF3, CF4, CF5, CF6, CF7, CF8, CF9, CF11, CF12 e CF13

(51,30%); apresentaram proporções relativamente altas de replicações similares, para as 1.000 permutações conduzidas pelos *bootstraps* (Figura 12). Os demais grupos apresentaram-se com proporções de replicações similares relativamente baixas.

O valor mínimo de similaridade foi igual a 0,88 (linha de corte), indicando que não há indivíduos semelhantes geneticamente na população de Canhoba.

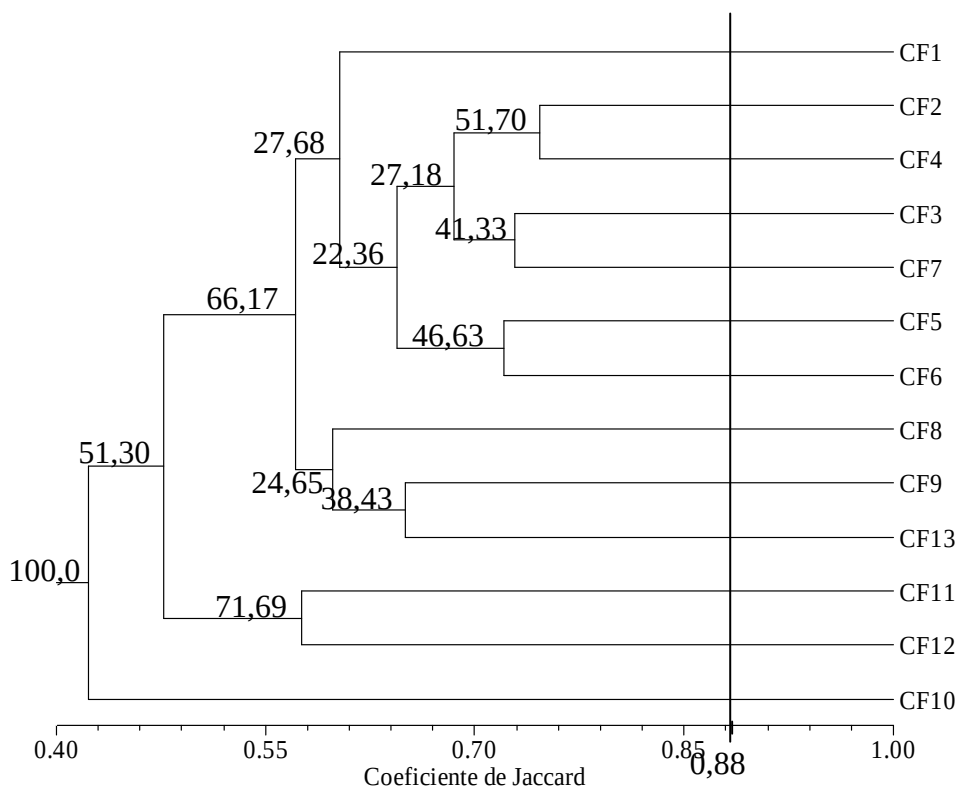


Figura 12. Dendrograma de similaridade genética entre 13 indivíduos de *Cassia grandis* L.f. localizados no município de Canhoba, definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no índice de Jaccard, por meio de marcadores RAPD. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

A partir dos 72 fragmentos polimórficos obtidos na população de Nossa Senhora de Lourdes, foi estimada uma matriz de similaridade genética, pelo método de Jaccard, relacionando todos os pares de indivíduos (Anexo 6). A similaridade genética média entre os indivíduos foi de 51,5%, o erro padrão médio foi de 5,8 % e a amplitude das similaridades variou de 22 a 74%. Os indivíduos que se apresentaram mais semelhantes foram os CF5 e CF7 ($74\% \pm 0,05$) e os mais divergentes CF3 e CF4 ($22\% \pm 0,05$).

Observou-se que com exceção dos grupos formados pelos indivíduos: CF1, CF5, CF7 e CF8 (28,19%); e CF1, CF4, CF5, CF7 e CF8; os demais apresentaram proporções relativamente altas de replicações similares, para as 1.000 permutações conduzidas pelos *bootstraps* (Figura 13).

O valor mínimo de similaridade foi igual a 0,86 (linha de corte), indicando que os indivíduos da população de Nossa Senhora de Lourdes não são semelhantes geneticamente.

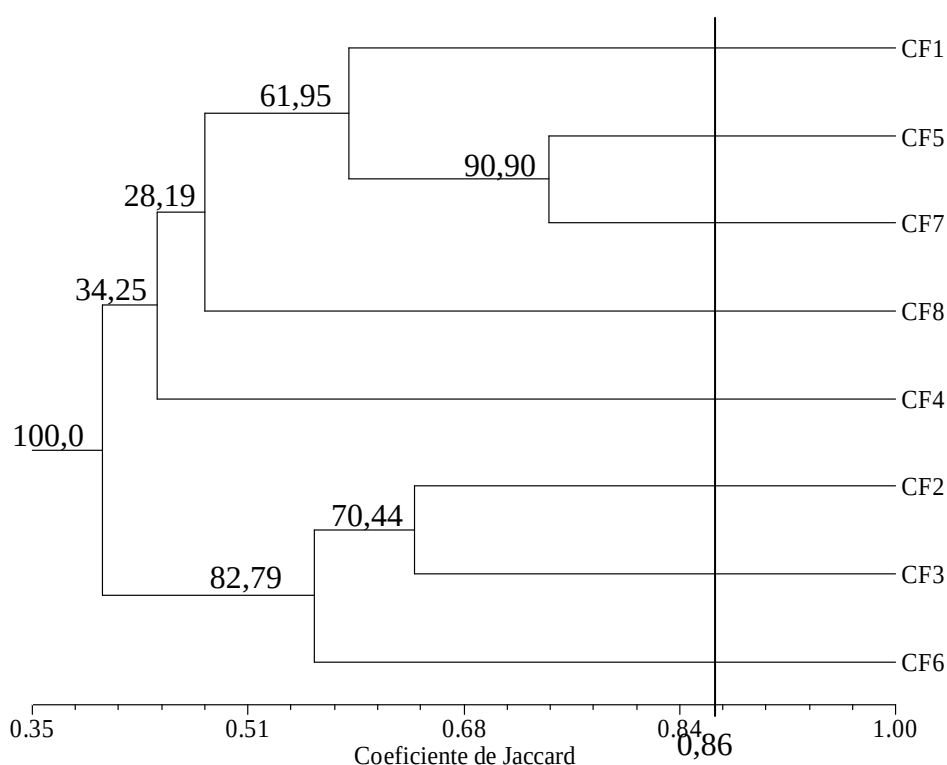


Figura 13. Dendrograma de similaridade genética entre 8 indivíduos de *Cassia grandis* L.f. localizados no município de Nossa Senhora de Lourdes, definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no índice de Jaccard, por meio de marcadores RAPD. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

Os indivíduos analisados são considerados potenciais matrizes para a coleta de sementes visando à conservação *ex situ* e a produção de sementes e mudas para a recuperação de áreas degradadas, pois há reserva de variabilidade genética entre os mesmos. Santana et al. (2008) observaram 37,68% de similaridade média em indivíduos remanescentes de *Enterolobium contortisiliquum* Vell., valor inferior ao encontrado neste

estudo (51,5 – 69,87), mostrando que mesmo com número reduzido de indivíduos a diversidade genética pode estar sendo mantida na população.

Segundo Nienhuis et al. (1995), a partir de 100 bandas, ocorre a estabilização do coeficiente de variação das distâncias genéticas entre os genótipos. Entretanto, na análise de *bootstrap* realizada para as populações não foi observada a estabilização de alguns agrupamentos. Este método fornece um ponto de equilíbrio que permite uma estimativa precisa dos grupos (LAVORANTI, 2003). A não estabilização dos agrupamentos pode indicar que o número de fragmentos amplificados não são suficientes para a realização das estimativas dos parâmetros genéticos.

Os indivíduos analisados em cada população não são considerados semelhantes geneticamente, o que foi comprovado pela linha de corte realizada por meio do teste t de Student a 1% de probabilidade, denominado valor mínimo de similaridade, acima do qual os indivíduos são semelhantes (CASTANHEIRA, 2001).

A distância geográfica e as zonas ecológicas podem estar correlacionadas com a variação genética presente nas populações (MILANKOV et al., 2007). A correlação entre as similaridades genéticas e as distâncias geográficas das populações de *C. grandis* está representada na Figura 14. O teste de Mantel revelou uma correlação negativa (-0,9223; -0,4256) e não significativa (0,1782; 0,3352) para as populações de Santana do São Francisco (Figura 11 a) e Nossa Senhora de Lourdes (Figura 11 c), respectivamente. Na população de Canhoba a correlação foi negativa (-2,3695) e significativa (0,0089) (Figura 11 b). Observa-se então, que a similaridade genética não está correlacionada com a distância geográfica.

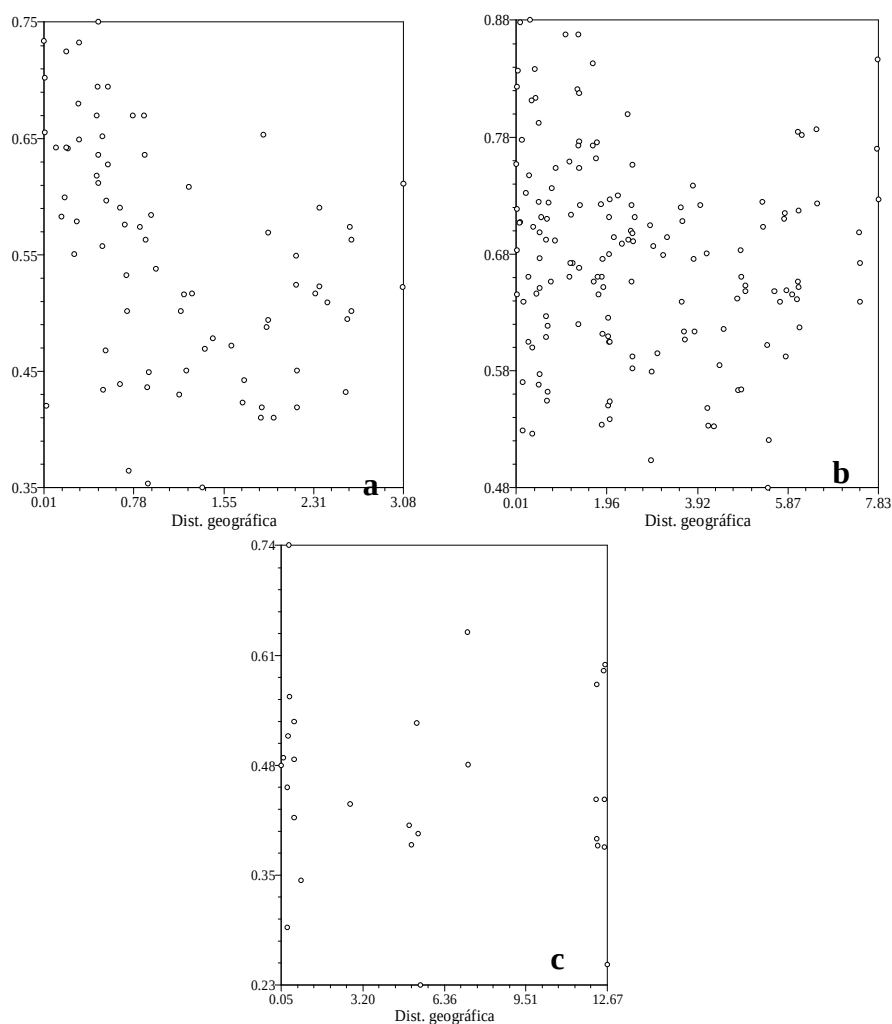


Figura 14. Correlação entre a matriz de similaridade genética e a matriz de distância geográfica das populações de *Cassia grandis* L. f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010. a – Santana do São Francisco; b – Canhoba; e c – Nossa Senhora de Lourdes.

O agrupamento dos indivíduos das três populações de *C. grandis*, com base na matriz das similaridades pelo método UPGMA, é apresentado na Figura 15. Observou-se que os agrupamentos formados não representam as populações isoladamente sendo que, a única população que ficou isolada no dendrograma foi a população 1 (apresenta maior distância geográfica). Os indivíduos analisados das populações que apresentam uma menor distância geográfica (Canhoba e Nossa Senhora de Lourdes) foram agrupados pela análise de similaridade genética.

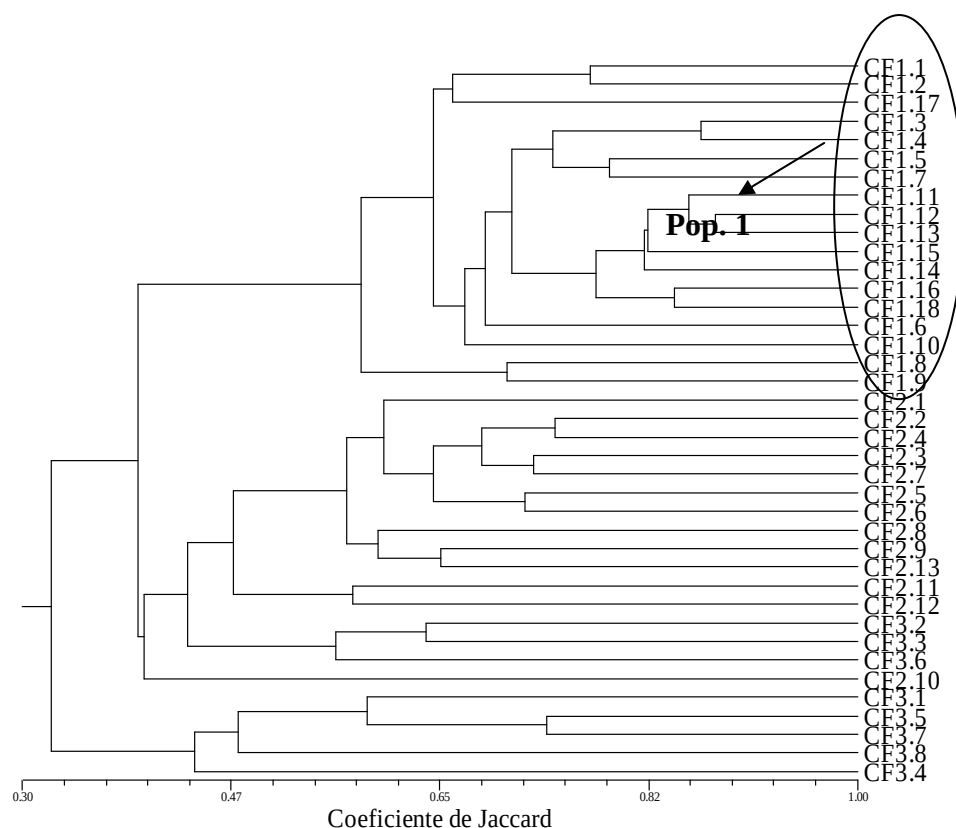


Figura 15. Dendrograma de similaridade genética entre indivíduos de *Cassia grandis* L. f., localizados em três municípios do Estado de Sergipe (Santana do São Francisco – pop1, Canhoba – pop2 e Nossa Senhora de Lourdes- pop3), definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no índice de Jaccard, por meio de marcadores RAPD. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

A diversidade genética molecular total para cada população pode ser observada tanto por meio do percentual de locos polimórficos quanto pelo Índice de Diversidade de Shannon e Diversidade Genética de Nei (Tabela 11).

Tabela 11. Índice de diversidade de Shannon (1972), diversidade genética de Nei (1978) e porcentagem de locos polimórficos em populações naturais de *Cassia grandis* L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

Populações	Diversidade genética de Nei	Índice de Shannon	% Locos polimórficos
Santana do São Francisco	0.2539	0.3754	68,80
Canhoba	0.2594	0.3795	67,20
Nossa Senhora de Lourdes	0.2246	0.3279	56,80
Conjunto de populações	0.3653	0.5364	97,60

A diversidade genética de Nei foi igual a 0.2539 para a população amostrada em Santana do São Francisco, 0.2594 para a população de Canhoba e 0.2246 para a população

de Nossa Senhora de Lourdes. Valores próximos aos encontrados por Estopa et al. (2006) estudando três populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (0,32; 0,29; e 0,36).

O Índice de Shannon varia de 0 a 1, e considera-se que quanto mais próximo o valor for de zero, mais baixas são as diversidades (BOTREL et al., 2006). Nas populações estudadas de *C. grandis* este índice variou de 0,3279 a 0,3795. Oliveira et al. (2008) estudando populações de *Dimorphandra mollis* Benth., espécie da família das Fabaceae, observaram que o índice de Shannon nas populações estudadas variou de 0,2598 a 0,4166.

A porcentagem de locos polimórficos variou de 56,80 (Nossa Senhora de Lourdes) a 68,80 (Santana do São Francisco). O baixo polimorfismo observado, provavelmente se deve ao efeito da deriva genética, uma vez que, esta tende a reduzir o polimorfismo das espécies (PEREIRA et al., 2004). Os valores obtidos foram inferiores aos observados por Moura (2005) e Zimback et al. (2004) estudando populações de *Eremanthus erythropappus* (DC.) (90,48 e 92,86%) e *Trichilia pallidae* Swartz (90,3 a 97,3), respectivamente; e semelhantes aos observados por Oliveira et al. (2008) estudando populações de *Dimorphandra mollis* Benth. (44,29 a 74,86).

A presença de reserva de variabilidade genética pode ser constatada observando-se o valor da heterozigosidade total observada (Tabela 12), que foi relativamente alto (0,3602). A alta divergência genética entre as populações observada (0,3172) era esperada, considerando-se a distância geográfica e a ausência de fluxo gênico indicando que 31,72% da diversidade genética encontra-se entre as populações e 68,28% dentro das populações ($H_S = 0,2460$). O acelerado processo de fragmentação de “habitats” pode vir a aumentar a divergência genética entre as populações ao longo das gerações, ameaçando ainda mais a sobrevivência das espécies (MARTINS-CORDER et al., 2009).

Tabela 12. Diversidade genética de Nei em populações naturais de *Cassia grandis* L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

	H_T	H_S	G_{ST}	Nm
Média	0,3602	0,2460	0,3172	1,0763
Desvio padrão	0,0226	0,0173		

H_T = diversidade genética total (heterozigosidade); H_S = diversidade genética dentro das populações; G_{ST} = relação entre a diversidade genética entre populações e a diversidade genética total; Nm = fluxo gênico.

A alta divergência entre as populações naturais também sugere que ambas tenham passado pelo efeito de deriva genética, seja na fundação ou pelo efeito de estrangulamento também denominado efeito do gargalo de garrafa (*bottleneck*), o que pode explicar a estrutura genética observada, como observado por Oliveira et al. (2006) estudando populações naturais de *Caesalpinia echinata* Lam. O alto valor de distância genética pode, erroneamente, ser interpretado como evidência para um grande tempo de separação entre populações. Em estudos evolutivos a amostragem de populações cujas frequências gênicas tenham sido alteradas por gargalos populacionais deve ser evitada, uma vez que, a ocorrência destes promove uma grande divergência entre a população que o sofreu e as demais. Esta maior divergência é observada nas frequências gênicas e refletida nas distâncias genéticas (MORAES e DERBYSHIRE, 2003).

Os estudos realizados com espécies arbóreas nativas comprovam que maior parte da variabilidade genética está distribuída dentro das populações. Freire et al. (2007) observaram que 89,51% da diversidade genética encontra-se dentro das populações de *Schizolobium parahyba* (Vell.). Zucchi et al. (2005) estudando dez populações de *Eugenia dysenterica* DC do sudeste do Estado de Goiás, com 54 locos de RAPD, encontrou uma variação dentro das populações de 73%.

O fluxo gênico estimado foi maior que 1, indicando que este pode contrapor os efeitos da deriva genética. No entanto, vale ressaltar que o fluxo gênico estimado nesse trabalho refere-se ao fluxo aparente, o qual reflete o que ocorreu em gerações passadas (WADT, 2001). Assim, o valor encontrado indica que está ocorrendo isolamento genético por deriva e estratégias de conservação devem ser estabelecidas.

As medidas de distância genética e identidade genética de Nei (1978) estão apresentadas na Tabela 13. A maior identidade genética foi observada entre as populações de Canhoba e Nossa Senhora de Lourdes (0,8666) e a maior distância genética entre as populações de Santana do São Francisco e Nossa Senhora de Lourdes (0,3306). Com base nesses resultados, observa-se que quanto mais próximas geograficamente as populações estiverem, menor a distância genética entre elas. A correlação entre estas variáveis foi positiva (0,9), porém a correlação para o teste de Mantel foi nulo e não significativo (0,500). Assim, mesmo observando a relação existente entre as variáveis, esta não pode ser comprovada estatisticamente.

Tabela 13. Medidas originais de distância genética e identidade genética de Nei entre populações de *Cassia grandis* L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

	Santana-SE	Canhoba-SE	N. S. Lourdes-SE
Santana-SE	-	0.7328	0.7185
Canhoba-SE	0.3109	-	0.8666
N. S. Lourdes-SE	0.3306	0.1432	-

A variação dentro das populações de espécies hermafroditas, como a *C. grandis*, tende a ser média, quando esta apresenta cruzamento aleatório (LOVELESS e HAMRICK,1984). A distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações evidenciou a presença de estrutura genética, principalmente na população de Santana (mais distante geograficamente). Segundo Loveless e Hamrick (1984) os insetos, devido ao movimento limitado, promovem a estruturação das populações de espécies que são polinizadas por eles.

4. CONCLUSÕES

- Maior diversidade genética é observada dentro das populações das espécies estudadas;
- A diversidade genética entre populações é elevada, o que pode ser ocasionada pela distância geográfica destas e pelos fatores ecológicos das espécies;
- Indícios de estruturação podem ser observados nas populações de *Z. joazeiro*, o que não ocorre em todas as populações de *C. grandis*, provavelmente devido a proximidade geográfica destas;
- A coleta de sementes deve ser realizada selecionando-se os indivíduos que apresentam maior diversidade genética, com o intuito de evitar a perda de alelos;
- A distância genética observada não está relacionada à distância geográfica;

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTONI, B. W.; ASTOLFI FILHO, S.; MARTINS, E. R.; DAMIÃO FILHO, C.F.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; TELLES, M. P. C.; DINIZ FILHO, J. F. Genetic variability in natural populations of *Zeyheria montana* Mart. from the Brazilian cerrado. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 409-415, 2007.
- BESSEGA, Cecilia; SAIDMAN, Beatriz O.; VILARDI, Juan C.. Isozyme and RAPD studies in *Prosopis glandulosa* and *P. Velutina* (Leguminosae, Mimosoideae). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 23, n. 3, 2000.
- BOTREL, M. C.; CARVALHO, D. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.4, p.621-627, 2004.
- BOTREL, M. C. G.; SOUZA, A. M.; CARVALHO D.; PINTO, S. I. C.; MOURA, M. C. O.; ESTOPA, R. A. Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* camb. em duas populações de mata ciliar. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.5, p.821-827, 2006.
- CARLINI-GARCIA, L. A.; VENCOVSKY, R.; COELHO, A. D. G. Método bootstrap aplicados em níveis de reamostragem na estimação de parâmetros genéticos populacionais. **Scientia Agricola**, v.58, n.4, p.785-793, 2001.
- CASTANHEIRA, A. L. M. **Marcadores RAPD na avaliação do potencial de métodos de condução de população segregante de feijão**. 2001. 76p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- CAVALLARI NETO, M. Efeito do Manejo na diversidade genética de populações naturais de *Tabebuia cassinoides* Lam. (DC), por marcadores isoenzimáticos. 2004. 67f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.
- CHALMERS, K. J.; WAUGH, R.; SPRENT, J. I.; SIMONS, A. J.; POWELL, W. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculate* using RAPD markers. **Heredity**, v.69, p.465-472, 1992.
- COELHO, A.S.G. **BOOD**: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Goiânia: UFG, 2000.
- ESTOPA, R. A.; SOUZA, A. M.; MOURA, M. C. O.; BOTREL, M. C. G.; MENDONÇA, E. G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 70, p. 97-106, 2006.
- ESTOPA, R. A. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC) Mac Leish. 2003. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995. 220p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª edição, Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220.

FERREIRA JÚNIOR, O. GPS Track Maker, Belo Horizonte, 2008. 176f.

FERREIRA, D.F. Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2000. 66p.

FERREIRA-RAMOS, R. **Estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de *Eugenia uniflora* L. na região de Ribeirão Preto (SP), utilizando marcadores microssatélites**. 2008. 165f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

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

FUTUYMA, D. J. Biologia evolutiva. 2ª ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992. 646p.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Restauração, conservação genética e produção de sementes. In: SIMPÓSIO MATA CILIAR: CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 1999, Belo Horizonte. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1999. p.59-68.

KAMADA, T.; PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; CRUZ, C. D.; VIEIRA, R. F. OTONI, W. C. Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 403-409, 2009.

LACERDA, D. R.; MACEDO, M. D. P.; LEMOS, F. J. P. e LOVATO, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas, **Lundiana**, v.3, n.2, p.87-92, 2002.

LAVORANTI, O. J. **Estabilidade e adaptabilidade fenotípica através da reamostragem “Bootstrap” no modelo AMMI**. 2003. 166f. Tese (Doutorado em Estatística e Experimentação Agronômica) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 384 p

LOSS, A. C. C.; LEITE, Y. L. R.; LOURO, I. D. Diversidade genética de populações de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) no estado do Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**, n.4(2), p. 55-61, 2006. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br>.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, n.15, p.65-95. 1984.

MANLY, B.F.J. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology. **Chapman & Hall**, London. 1997.

MARTINS-CORDER, M. P.; FIALHO, L. E. B.; ZAMBIAZI, D. C.; KONZEN, E. R. Análise da diversidade genética de populações de palmito (*Euterpe edulis* MARTIUS) através de marcadores isoenzimáticos. **Revista Ceres**, v.56 (2), p. 204-213, 2009.

MILANKOV, V.; STAMENKOVIĆ, J.; VUJIĆ, A. Genetic differentiation and linkage disequilibrium in a spatially fragmented population of *Cheilosia vernalis* (Diptera: Syrphidae) from the Balkan peninsula. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum**, v. 53 (2), p. 193–201, 2007.

MORAES, P. L. R.; DERBYSHIRE, M. T. V. C. Estrutura genética de populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae) através de marcadores isoenzimáticos. *Biota Neotropical*, v.2, n.2, 2002. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v2n2/pt/abstract?article+BN02402022002>.

MORAES, P. L. R.; DERBYSHIRE, M. T. V. C. Diferenciação genética e diversidade em populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). *Biota Neotropical*, v.3, n.1, 2003. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v3n1/pt/abstract?article+BN01803012003>

MOURA, M. C. O. Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish por isoenzimas e RAPD. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

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

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.87, p.583-590, 1978.

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.

OLIVEIRA, D. A.; PAULA, M. F. B.; PIMENTA, M. A. S.; BRAGA, R. F.; FERREIRA, M. F. M.; RODRIGUES, L. A. Variabilidade genética de populações de fava d'anta (*Dimorphandra mollis*) da região norte do estado de Minas Gerais. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.32, n.2, p.355-363, 2008.

PEREIRA, M. F.; VALVA, F. D.; COELHO, A. S. G.; AGUIAR, A. V.; ZUCCHI, M. I. Estrutura genética de populações de espécies arbóreas nativas do cerrado encontradas em terrenos serpentínicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, n. 34 (2), p. 75-82, 2004.

PINTO, S. I. C.; CARVALHO, D. Estrutura genética de populações de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Sprengel) por isoenzimas. *Revista Brasileira de Botânica*, v.27, n.3, p.597-605, 2004.

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, p.1291-1298, 2007.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1.** New York: Exeter Software, 2000. 38 p.

SANTANA, G. C.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A.; GOIS, I. B.; OLIVEIRA, A. S.; BOARI, A. J. 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.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n. 2, p. 507-512, 1974.

SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; RIBEIRO, A.; MATIAS, R.; REIS, M. S.; BAWA, K. e SEBBENN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 25-43, 2005.

SERGIPE. SECRETARIA DE ESTADO DO PLANEJAMENTO E DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA- SEPLANTEC.SUPERINTENDÊNCIA DE ESTUDOS E PESQUISAS-SUPES. Perfis Municipais: Aracaju, 1997. 75v.

SERGIPE. SECRETARIA DE ESTADO DO PLANEJAMENTO E DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA- SEPLANTEC.SUPERINTENDÊNCIA DE ESTUDOS E PESQUISAS-SUPES. Informes Municipais: Aracaju, 2000. 75v.

SKROCH, P. W.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationship using RAPD marker data. In: IUFRO INTERNATIONAL CONFERENCE: "Breeding tropical trees" Section 202-08, 1992, Cali, Colombia. **Proceedings...** Cali: p. 26-30. 1992.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification.** W. H. Freeman, San Francisco, 1973.

SOUZA, A. V; BIONDO, R.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; TELLES, M. P. C.; PEREIRA, A. M. S. Diversidade genética em populações naturais de infalível. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2 (Suplemento - CD Rom), agosto 2009

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

TAMBARUSSI, E. V.; MORI, E. S.; ZIMBACK, L.; MORI, N. T.; PINTO, C. S.; FERNANDES, K. H. P.; Tambarussi et al. Estrutura genética de populações de *Piptadenia*

gonoacantha (Mart.) Macbr. por meio de marcadores moleculares RAPD. **Revista científica eletrônica de engenharia florestal**, Ano VII, n. 12, 2008.

TRINDADE, M.G.; CHAVES, L.J. Genetic structure of natural *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) populations in northeastern Goiás, Brazil, accessed by morphological traits and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, p.407-413, 2005.

VIANA, V. M.; PINHEIRO, L. A. F. V. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. Série Técnica IPEF, v. 12, n. 32, p. 25-42, 1998.

VIEGAS, M.P. **Diversidade genética em populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., sob diferentes tipos de perturbação antrópica**. 2009. 68f. Dissertação (mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

WADT, L. H. O. **Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC.) visando seu uso e conservação**. 2001. 109f. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

WENDT, S. N. Genética de populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil. 2005. 165f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

WILLAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

YANAKA, F. Y.; FALL’AGNOL, M.; ACHIFINO-WITTMANN, M. T.; DIAS, P. M. B.; GOMES, K. E. Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees (Poaceae) com Base em Isoenzimas e Marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, n.6, p. 1897-1904, 2005.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. **POPGENE version 1.32**: Microsoft Window-based freeware for population genetics analysis. University of Alberta, Edmonton, Canada, 1999.

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*, n. 65, p. 114-119, 2004.

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

Capítulo 3

VARIABILIDADE ISOENZIMÁTICA
EM POPULAÇÕES NATURAIS DE
Zizyphus joazeiro MART. E *Cassia*
grandis L. f.

CAPÍTULO 3. VARIABILIDADE ISOENZIMÁTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Zizyphus joazeiro* MART. E *Cassia grandis* L. f.

RESUMO

Os marcadores isoenzimáticos têm sido empregados freqüentemente no estudo da estrutura genética de populações naturais de espécies florestais, que se refere à distribuição da variabilidade genética entre e dentro destas. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar geneticamente, por meio de marcadores isoenzimáticos, populações naturais de *Zizyphus joazeiro* Mart. e *Cassia grandis* L.f. com a finalidade de elaborar estratégias de coleta de sementes e produção de mudas para a recuperação de áreas degradadas. As populações de *Z. joazeiro* foram amostradas nos municípios de Santana do São Francisco, Canhoba e Canindé do São Francisco e as de *C. grandis* nos municípios de Santana do São Francisco, Canhoba e Nossa Senhora de Lourdes. A diversidade genética foi caracterizada a partir das estimativas das freqüências alélicas ($\hat{P}_{ij}$) e dos Índices de diversidade (Heterozigosidade média observada ($\hat{H}_0$); Heterozigosidade média esperada ($\hat{H}_e$), número médio de alelos por loco ($\hat{A}$) e porcentagem de locos polimórficos). Também foi calculado o índice de fixação F de Wright, para cada população. Para a análise da estrutura genética das populações foram realizadas as estatísticas F de Wright. Foram estimados também o fluxo gênico, o tamanho efetivo das populações e a população mínima viável a curto e longo prazo. Nas populações de *Z. joazeiro* foram analisados 32 locos. As freqüências alélicas variaram desde a completa fixação até freqüências muito baixas (0,02). A porcentagem de locos polimórficos ($\hat{P}$) variou de 60,87 a 78,26%; o número médio de alelos por loco ($\hat{A}$) foi alto, variando de 2,50 a 2,57; a heterozigosidade média observada ($\hat{H}_0$) variou de 0,5633 a 0,5955; a esperada de 0,4675 a 0,488 e o índice de Fixação de Wright de -0,2620 a -0,3486. O índice de fixação dentro das populações ($\hat{F}_{IS}$) foi igual a -0,3059, a divergência genética entre populações ($\hat{F}_{ST}$) foi igual a 0,3802 e o índice de fixação para o conjunto das populações ($\hat{F}_{IT}$) igual a 0,1906. O tamanho efetivo das populações foi maior do que o número de indivíduos amostrados e a população mínima viável para o conjunto de populações é de 107 indivíduos a curto prazo e de 1.071 a longo prazo. Nas populações de *C. grandis* foram analisados 15 locos. As freqüências alélicas variaram desde a completa fixação até

freqüências muito baixas (0,0278). A porcentagem de locos polimórficos ($\hat{P}$) variou de 60 a 73,33%; o número médio de alelos por loco (na) de 2,2 a 2,9; a heterozigosidade média observada ($\hat{H}_0$) variou de 0,7806 a 0,8279; a esperada de 0,5116 a 0,5442 e o índice de Fixação de Wright de -0,5533 a 0,6748. O índice de fixação dentro das populações ($\hat{F}_{IS}$) foi igual a -0,6158, a divergência genética entre populações ($\hat{F}_{ST}$) foi igual a -0,0666 e o índice de fixação para o conjunto das populações ($\hat{F}_{IT}$) igual a 0,3399. O tamanho efetivo das populações foi maior do que o número de indivíduos amostrados e a população mínima viável para o conjunto de populações é de 75 indivíduos a curto prazo e de 750 a longo prazo. Analisando-se as freqüências alélicas observa-se que há diferença entre as populações, sendo observados alelos raros e exclusivos nas populações das duas espécies, o que é indicativo de isolamento. A alta diversidade genética observada entre as populações é um indicativo de estruturação. Assim, em programas de conservação deve ser realizada a coleta de sementes em todas as populações estudadas, visando manter a variabilidade genética existente.

1. INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, grandes extensões de florestas naturais foram devastadas em decorrência do avanço das fronteiras agrícolas e do intensificado processo de urbanização. A fragmentação dos habitats pode levar a perdas da biodiversidade e mudanças na distribuição e abundância das espécies devido à descontinuidade da vegetação original, acarretando restrição do tamanho das populações, acréscimo dos efeitos de borda e impedimentos para a migração (PINTO e CARVALHO, 2004). Os principais efeitos da redução e fragmentação de populações naturais das espécies florestais nativas são: a ocorrência de endogamia, o distanciamento entre indivíduos reprodutivos, a redução do fluxo gênico e o aumento da divergência genética entre populações remanescentes (BOTREL et al., 2006).

A falta de informações sobre os aspectos genéticos das espécies é um dos principais problemas na avaliação de recursos genéticos e decorre, principalmente, da carência de estudos sobre diversidade genética. Esse problema dificulta o estabelecimento de estratégias que assegurem não só a conservação de populações naturais de plantas ecologicamente importantes, mas também a de outros recursos genéticos potencialmente úteis às populações humanas (BLANCO et al., 2007).

Assim, o desenvolvimento de estudos de genética populacional das espécies que compõem os ecossistemas é importante para elaboração de estratégias de conservação (conservação *in situ*, e a formação de áreas de coleta de sementes) e uso racional de recursos genéticos (PINTO et al, 2004; KAMADA et al., 2009). De acordo com a distribuição da diversidade genética são estabelecidas populações ou regiões prioritárias para conservação de determinadas espécies, visando definir unidades de manejo para conservação, principalmente quando há destruição de seu habitat natural (LOSS et al., 2006).

Neste ramo da genética, os marcadores moleculares têm sido empregados freqüentemente no estudo da estrutura genética das populações, que se refere à distribuição da variabilidade genética entre e dentro destas. A formação da estrutura é resultante de fatores como sistema de acasalamento, níveis de endogamia, seleção natural ou artificial, fluxo gênico e deriva genética entre e dentro das populações (FERREIRA, 2003).

Os marcadores moleculares podem ser dominantes ou co-dominantes. Os marcadores co-dominantes permitem a identificação do genótipo (homozigoto ou

heterozigoto) sem a necessidade de testes de progênies, e, além disso, os processos de estimação baseados nesse tipo de marcadores são mais eficientes. O número de locos analisados está relacionado à precisão das estimativas. Em geral, analisando-se um maior número de locos pode-se atingir estimativas mais precisas. Além disso, é possível obter e comparar taxas de cruzamento verificadas a partir de locos individuais e de locos múltiplos para mais informações sobre a endogamia (LOPES et al., 2002).

Dentre os marcadores co-dominantes, podemos citar as isoenzimas, formas diferentes de uma mesma enzima que apresentam afinidade por um mesmo substrato, ou seja, desempenham a mesma atividade catalítica, mas podem ter diferentes propriedades cinéticas e serem separadas por processos bioquímicos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). A análise das mobilidades eletroforéticas das enzimas produzidas permite a caracterização genotípica de cada indivíduo, bem como as distribuições gênicas em populações e espécies (PÓVOA et al., 2002).

As análises da variação isoenzimática têm se expandido em pesquisas de genética florestal. As principais aplicações destas técnicas têm sido na investigação dos padrões de variabilidade genética (BOTREL et al., 2004; CARVALHO e OLIVEIRA, 2004; MORAES et al., 2004; PINTO et al., 2004; GUSSON et al., 2005; GOIS et al., 2009) e dos sistemas de cruzamentos (RIBAS, 2003; GIUDICI NETO et al., 2005; GUSSON et al., 2006). Estas aplicações aumentam o conhecimento da estrutura genética em povoamentos naturais, aumentando a eficiência do melhoramento e dos esforços de conservação de genes de árvores ameaçadas de extinção (OLIVEIRA et al., 2002).

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar geneticamente, por meio de marcadores isoenzimáticos, populações naturais de *Zizyphus joazeiro* Mart. e *C. grandis* L.f., localizadas em diferentes municípios, com a finalidade de elaborar estratégias de coleta de sementes e produção de mudas para a recuperação de áreas degradadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em quatro municípios localizados na região do Baixo São Francisco sergipano (Santana do São Francisco, Canhoba, Nossa Senhora de Lourdes e Canindé do São Francisco). Como não há um consenso na ecologia para o conceito de população, neste trabalho uma população é considerada o conjunto de indivíduos da mesma espécie amostrados no mesmo município. As populações de *Z. joazeiro* foram amostradas nos municípios de Santana do São Francisco (20 indivíduos amostrados), Canhoba (19 indivíduos amostrados) e Canindé do São Francisco (15 indivíduos amostrados) e as populações de *C. grandis* nos municípios de Santana do São Francisco (18 indivíduos amostrados), Canhoba (13 indivíduos amostrados) e Nossa Senhora de Lourdes (8 indivíduos amostrados).

A amostragem dos indivíduos de cada população foi do tipo aleatória simples, respeitando-se uma distância de 50m entre eles, uma vez que o espaço mínimo recomendado entre árvores-matriz é de 50 a 100 m (KAGEYAMA e GANDARA, 1999). Para a realização dos estudos de diversidade genética foram coletadas folhas tenras de indivíduos de *Z. joazeiro* Mart. e *C. grandis* L.f. (a coleta das folhas foi efetuada com auxílio de podão devido à altura dos indivíduos). Todo material foliar coletado foi envolvido em gaze e acondicionado em saco plástico devidamente lacrado, identificado, mantido em caixa de isopor com gelo e transportado ao laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal, do Departamento de Engenharia Agrônômica, da Universidade Federal de Sergipe (DEA/UFS), sendo armazenado em *freezer* a -20°C, até o momento da extração.

2.1. Análise Isoenzimática

2.1.1. Extração de Isoenzimas

Para a extração das isoenzimas foram maceradas 200 mg de folhas tenras com 0,5mg de PVP (polivinil pirrolidone) e 1,5 mL da solução tampão de extração nº1 segundo Alfenas et al. (1991), modificado pela ausência de DIECA (Dietilditiocarbamato). A extração foi feita manualmente mediante o uso de almofariz e pistilo de porcelana

previamente resfriados. Esta foi realizada à baixa temperatura, para evitar a desnaturação de proteínas e, conseqüentemente, a perda da atividade enzimática. Os extratos obtidos foram colocados em tubos tipo eppendorf de 2mL, previamente identificados, e levados à centrifugação a 13.200rpm por 30 minutos a 4°C. Após, estes foram armazenados a -20°C até o momento das análises eletroforéticas.

2.1.2. Eletroforese

A análise das isoenzimas foi conduzida em gel de poliacrilamida descontínuo, sendo o gel de concentração de 4,5% e o gel de separação de 7,5%, em eletroforese vertical. Foram aplicados 40µL do extrato protéico de cada amostra para a corrida eletroforética. Esta, foi realizada a 150V com duração de 3,5 horas, à temperatura de 4°C, sendo utilizado para o sistema tampão gel eletrodo Tris-glicina pH 8,9. Os procedimentos de preparo do gel e eletroforese seguiram a metodologia descrita por Alfenas et al. (1991).

Ao término da corrida, os géis foram submetidos à coloração em enzimas específicas, seguindo a metodologia descrita por Alfenas et al. (1991), sendo que neste processo foram testados 14 sistemas enzimáticos (Tabela 14).

Tabela 14. Siglas e códigos dos sistemas enzimáticos que foram utilizados para estimar a diversidade genética em populações naturais de *Zyziphus joazeiro* Mart. e *Cassia grandis* L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

Enzima	Sigla	Referência (E.C.)
Álcool Desidrogenase	ADH	1.1.1.1
Esterase	EST	3.1.1.1
Fosfatase Alcalina	ALP	3.1.3.1
β-Galactose Desidrogenase	GLDH	1.1.1.48
Glucose Desidrogenase	GLUDH	1.1.1.47
Glutamato Oxaloacetato Transaminase	GOT	2.6.1.1
Peroxidase	PO	1.1.1.17
Sorbitol Desidrogenase	SOD	1.1.5.11
Xiquimato Desidrogenase	SKDH	1.1.1.25
Enzima Málica	ME	1.1.1.40
Malato Desidrogenase	MDH	1.1.1.37
Glicose 6-fosfato desidrogenase	G6PDH	1.1.1.49
Isocitrato desidrogenase	IDH	1.1.1.42
Xiquimato Desidrogenase	SKDH	1.1.1.25
E.C.: "Enzyme Comission"		

Após o surgimento das zonas codificadoras, os géis foram retirados da solução de revelação, lavados em água corrente e fixados em solução de glicerol a 10%. A secagem dos géis foi efetuada pelo método do bastidor (ALFENAS et al., 1991). Após a secagem, a presença dos locos e dos alelos e a interpretação de cada sistema enzimático foi realizada seguindo-se os padrões descritos por Alfenas et al. (1991).

2.1.3. Análise Estatística

2.1.3.1. Freqüências alélicas

As freqüências alélicas descrevem a variação para um loco e foram estimadas por meio do programa Popgene (Population Genetic Analysis) (YEH et al., 1999) utilizando-se a seguinte expressão:

$$\hat{P}_{ij} = n_{ij} / n_j$$

(Equação 7)

Onde:

$\hat{P}_{ij}$ = estimativa da freqüência do alelo i na população j;

n_{ij} = número de ocorrências do alelo i na amostra de população j;

n_j = número total de alelos encontrados na amostra da população j.

2.1.3.2. Índices de Diversidade Genética

A partir das freqüências alélicas foram obtidos os seguintes índices de diversidade genética: porcentagem de locos polimórficos ($\hat{P}$); número médio de alelos por loco ($\hat{A}$); heterozigosidade média observada ($\hat{H}_0$) e heterozigosidade média esperada ($\hat{H}_e$) de acordo com o equilíbrio de Hardy Weinberg. Com base nas estimativas das freqüências observadas ($\hat{H}_0$) e esperadas ($\hat{H}_e$) de heterozigotos, foi calculado o índice de fixação de Wright (F_{IS}), para cada população. As estimativas das estatísticas de F de Wright também

foram calculadas. Estes índices foram obtidos utilizando-se o programa Popgene (YEH et al., 1999).

2.3.3.2.1. Proporção de locos polimórficos ($\hat{P}$)

Para os valores de $\hat{P}$ adotou-se o critério de 95% de probabilidade, em que um loco é considerado polimórfico se a frequência do alelo mais comum não excede 95% (O critério 95% é recomendado quando o tamanho amostral é menor que 50 indivíduos). Esta medida foi obtida pela média aritmética do número de locos polimórficos pelo número total de locos (PÓVOA, 2002; MARTINS-CORDER et al., 2009).

2.3.3.2.2. Número médio de alelos por loco ($\hat{A}$)

O número médio de alelos por loco exprime a riqueza alélica presente na população. Assim, fornece uma idéia da distribuição dos alelos nas diferentes populações estudadas e será calculada para cada loco por:

$$\hat{A}_e = 1 / \sum \hat{p}_i^2$$

(Equação 8)

Em que p_i é a frequência do alelo i.

2.3.3.2.3. Heterozigosidade média observada ($\hat{H}_0$)

A heterozigosidade média observada será obtida pela média do número de genótipos heterozigotos em relação ao total de genótipos em cada loco e para as médias dos locos de acordo com a equação abaixo:

$$\hat{H}_0 = 1 - \sum_i \hat{p}_{ii}$$

(Equação 9)

$$\hat{H}_0 = \frac{1}{m} \sum^m \hat{H}$$

(Equação 10)

2.3.3.2.4. Heterozigosidade média esperada ($\hat{H}_e$)

A heterozigosidade média esperada será estimada pelas médias das $\hat{H}_e$ nos locos de acordo com as seguintes expressões:

$$\hat{H}_e = 1 - \sum_{i=1}^k \hat{p}_i^2$$

(Equação 11)

$$\hat{H}_e = 1 - \frac{\sum_i \sum_j^m p_{ij}^2}{m}$$

(Equação 12)

Onde m é o número de indivíduos e p_i é a frequência do iésimo alelo.

2.3.3.2.5. Índice de Fixação de Wright ($\hat{F}_{IS}$)

Este índice (Wright, 1931) mede a fração de redução na heterozigosidade com relação ao esperado em uma população de cruzamentos aleatórios, conforme as expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Este índice varia de -1 a 1, e quanto mais próximos de zero os índices, maior é a panmixia, ou seja, a população está em EHW. O índice de fixação de Wright será calculado de acordo com a equação abaixo:

$$\hat{F}_{(IS)} = \hat{H}_O - \hat{H}_e / H_e$$

(Equação 13)

2.3.3.2.6. Estatística F de Wright

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações foi caracterizada pelas estatísticas F de Wright (1931), utilizando-se o índice de fixação médio dentro das populações (F_{IS}), índice de fixação para o conjunto das populações (F_{IT}) e a divergência genética entre populações (F_{ST}). O F_{IT} expressa a correlação entre os gametas que se unem para produzir os indivíduos em relação aos gametas da população total; o F_{IS} expressa a média das correlações, sendo cada uma delas proveniente dos gametas que se unem em cada subpopulação em relação aos gametas desta subpopulação; e o F_{ST} expressa a correlação entre os gametas ao acaso dentro da subpopulação em relação aos gametas da população total.

2.3.3.3. Fluxo gênico ($\bar{N}_m$) e tamanho efetivo das populações ($\bar{N}_e$)

As estimativas do fluxo gênico entre as populações foram obtidas pela relação entre a quantidade de migrantes ($\bar{N}_m$) e a divergência entre populações ($\hat{F}_{ST}$) de acordo com Crow e Aoki (1984):

$$\bar{N}_m = \frac{1}{4\alpha} \left(\frac{1}{\hat{F}_{ST}} - 1 \right)$$

(Equação 14)

Onde:

α - $(n/(n-1))^2$; n – número de populações; $\bar{N}_m$ - número de migrantes.

O conhecimento do tamanho efetivo populacional ($\bar{N}_e$) é imprescindível quando o objetivo é a preservação de germoplasma, coleta de sementes e/ou conservação *in situ*, já que mede a representatividade genética dos indivíduos amostrados na população em relação a uma população panmítica ideal (BOTREL e CARVALHO, 2004). Para se estimar o tamanho efetivo populacional, foram utilizados os métodos propostos por Vencovsky (1992), para duas diferentes situações. A primeira estimativa do $\bar{N}_e$ para indivíduos adultos de uma simples população foi baseada na expressão:

$$\hat{N}_s = \frac{n}{1 + f}$$

(Equação 15)

Onde, n é o número de indivíduos e f é o coeficiente de endogamia médio da população.

A segunda estimativa do $\hat{N}_s$ para várias populações foi baseada na expressão:

$$\hat{N}_s = \frac{0,5}{\theta_p \left[\frac{1 + C_p}{n} - \frac{1}{n_i} \right] + \frac{1 + F}{2n}}$$

(Equação 16)

Onde, θ_p é a divergência genética entre populações; n é o número total de indivíduos avaliados nas populações; C_p é o quadrado do coeficiente de variação do número de indivíduos sobre as populações; e F é o índice de fixação para o conjunto de populações.

Adicionalmente, calculou-se a população mínima viável (PMV), que corresponde ao número de indivíduos necessários para a manutenção da integridade genética da população, pela relação:

$$PMV = \frac{\hat{N}_s(\text{referência})}{\frac{\hat{N}_s}{n}}$$

(Equação 17)

Onde, $\hat{N}_s$ é o tamanho efetivo populacional e n é o número de indivíduos.

O tamanho efetivo de referência utilizado foi de 150 e 1.500, proposto por Nunney & Campbell (1993), para a conservação a curto e longo prazo, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise da diversidade e estrutura genética em populações naturais de *Zizyphus joazeiro* Mart

Os catorze sistemas enzimáticos foram utilizados para a caracterização da variabilidade genética das populações de *Z. joazeiro*. Nos sistemas PO e SDH foi possível a interpretação de três locos; nos sistemas EST, GOT, MDH, ME e G6PDH a interpretação de dois locos e os sistemas ADH, GLDH, GLUDH, SKDH, SOD, ALP e IDH apresentaram apenas um loco passível de interpretação, totalizando 23 locos.

Como já observado em outros trabalhos, o número de locos polimórficos utilizados como marcadores isoenzimáticos em espécies arbóreas é bastante variável. Gusson et al. (2005) utilizaram 8 locos polimórficos para a caracterização da diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata* (Cambess.) Mart. Moraes e Derbyshire (2003) estudaram a diferenciação e a diversidade em populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez. utilizando 39 locos polimórficos. Para estudar a variabilidade genética de *Spondias lutea* L. em uma população localizada no município de Santana do São Francisco, Gois et al. (2009) utilizaram 10 locos isoenzimáticos. Berg e Hamrick (1997) sugerem um mínimo de 10 locos polimórficos para os estudos de diversidade e estrutura genética por isoenzimas. Assim, o número de locos polimórficos obtidos para as populações é suficiente para a avaliação e a caracterização da variabilidade, estrutura genética e do fluxo gênico.

Um dos 23 locos avaliados em *Z. joazeiro* foi monomórfico, enquanto os demais apresentaram de dois a cinco alelos. Nos locos avaliados foram observados 49 alelos na população de Santana do São Francisco, 53 na população de Canhoba e 40 na população de Canindé do São Francisco. As freqüências alélicas variaram desde a completa fixação, como para os alelos: 1 no loco *PO-1* em Santana do São Francisco; alelo 1 no loco *ME-1* em Canhoba; alelo 1 no loco *ME-2* em Santana do São Francisco e Canindé do São Francisco; alelo 1 no loco *ALP* em Canhoba; e alelo 1 no loco *G6PDH-2* em Canhoba e Canindé do São Francisco; até freqüências muito baixas (0,02), como para os alelos: 1 no loco *EST-1* e o alelo 2 no loco *SOD*, ambos na população de Canhoba. Os dados das freqüências alélicas das populações de *Z. joazeiro* são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Locos isoenzimáticos, número de alelos e frequência alélica das populações naturais analisadas de *Zizyphus joazeiro* Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

Loco	Populações			
	Alelo	Santana	Canhoba	Canindé
ADH	1	***	0,5000	0,5000
	2	***	***	***
	3	***	0,5000	0,5000
EST-1	1	***	0,0263	0,1875
	2	***	0,7105	***
	3	***	0,2632	0,8125
EST-2	1	0,5000	0,3333	***
	2	0,5000	0,6667	***
GOT-1	1	0,8000	0,2273	0,2143
	2	0,2000	0,6364	0,5000
	3	***	0,1364	0,2857
GOT-2	1	0,8667	0,6944	0,5000
	2	0,1333	0,2500	0,2917
	3	***	0,0556	0,2083
MDH-1	1	0,1667	0,5833	***
	2	0,5833	0,4167	***
	3	0,2500	***	***
MDH-2	1	0,0750	0,0833	0,0333
	2	0,1000	0,1667	0,2667
	3	0,3500	0,1944	0,1667
	4	0,4750	0,5556	0,5333
PO-1	1	1,0000	0,3889	***
	2	***	0,6111	***
PO-2	1	0,7750	0,2895	0,3667
	2	0,1000	0,2105	0,0333
	3	0,1250	***	0,1000
	4	***	0,3684	***
	5	***	0,1316	0,5000
PO-3	1	***	0,1250	***
	2	***	0,8750	***
ME-1	1	0,4706	1,0000	0,2500
	2	0,1176	***	0,7500
	3	0,4118	***	***
ME-2	1	1,0000	0,5000	1,0000
	2	***	0,1842	***
	3	***	0,3158	***
GLDH	1	0,7500	0,1500	0,1667
	2	***	0,1053	0,8333
	3	***	0,3947	***
GLUDH	1	0,4750	0,4333	0,4333
	2	0,1750	0,2667	***
	3	0,3500	0,3000	0,5667

SKDH	1	0,5000	0,3235	0,3750
	2	***	0,1176	0,1250
	3	0,0500	0,5588	0,5000
	4	0,1500	***	***
	5	0,3000	***	***
SOD	1	0,5000	0,4737	0,1667
	2	***	0,0263	0,2333
	3	0,0750	***	0,2000
	4	***	***	0,1333
	5	0,4250	0,5000	0,2667
ALP	1	0,2500	1,000	***
	2	0,2500	***	***
	3	0,5000	***	***
G6PDH-1	1	0,3077	0,5000	0,3333
	2	0,1154	0,5000	0,6667
	3	0,5769	***	***
G6PDH-2	1	***	1,0000	1,0000
IDH	1	0,6667	0,2500	0,4000
	2	0,3333	0,2500	0,6000
	3	***	0,5000	***
SDH-1	1	0,5500	***	***
	2	0,4500	***	***
SDH-2	1	0,3125	***	***
	2	0,2188	***	***
	3	0,4688	***	***
SDH-3	1	0,0500	0,3333	0,2222
	2	0,1250	0,5000	0,7778
	3	0,8250	0,1667	***
Total de alelos	70	49	53	40

Foram detectados 12 alelos exclusivos (o alelo 3 no loco *MDH-1*; o alelo 3 no loco *ME-1*; os alelos 4 e 5 no loco *SKDH*; os alelos 2 e 3 no loco *ALP*; o alelo 3 no loco *G6PDH1*; os alelos 1 e 2 no loco *SDH-1*; e os alelos 1, 2 e 3 no loco *SDH-2*) e 2 alelos raros (alelo 3 no loco *SKDH*; e alelo 1 no loco *SDH-3*) na população de Santana do São Francisco. Na população de Canhoba foram detectados 9 alelos exclusivos (o alelo 2 do loco *EST-1*; o alelo 2 do loco *PO-1*; o alelo 4 do loco *PO-2*; os alelos 1 e 2 do loco *PO-3*; os alelos 2 e 3 do loco *ME-2*; o alelo 3 do loco *GLDH*; e o alelo 3 do loco *IDH*) e 2 alelos raros (o alelo 1 no loco *EST-1*; e o alelo 2 no loco *SOD*). Apenas um alelo exclusivo foi detectado na população de Canindé do São Francisco (alelo 4 no loco *SOD*) e 2 alelos raros (alelo 1 no loco *MDH-2*; e alelo 2 no loco *PO-2*).

A presença desses alelos exclusivos e raros pode ser fruto da amostragem ou do isolamento das populações, o que desfavorece o fluxo gênico contínuo entre elas (GUSSON et al., 2005). Assim, quando alelos exclusivos e raros são observados em populações naturais, estratégias para a conservação genética *in situ* e *ex situ* são fundamentais para conservar e garantir a manutenção da variabilidade genética das populações (NAZARENO, 2009).

A presença de alelos fixados em populações naturais é um indicativo de adaptação. Os alelos podem ter sido favorecidos pelas condições ambientais das áreas onde as populações estão situadas, atingindo níveis próximos ou a completa fixação (MARTINS – CORDER, 2009). Assim, a fragmentação das populações de *Z. joazeiro* observada na região do Baixo São Francisco pode ocasionar a deriva genética, eliminando estes alelos relacionados com as características adaptativas, aumentando os riscos de extinção da espécie.

O modelo clássico da genética de populações é o Teorema de Hardy-Weinberg (EHW), que presume que uma população de tamanho infinito, com cruzamentos aleatórios entre os indivíduos e que não sofre ação de forças perturbadoras (mutação e migração), estabelece frequências genotípicas que não irão se alterar nas futuras gerações (FUTUYMA, 1992). De acordo com Futuyma (1992), violações nas premissas básicas deste teorema causam alterações nas frequências dos alelos, dos genótipos ou de ambos.

Oscilações nas frequências alélicas, variando da perda à fixação de alelos, podem ser indicativas de deriva genética ou seleção. As oscilações desenvolvem-se por meio de processos aleatórios, quando não existem mecanismos de seleção natural (PÓVOA, 2002). Essas alterações podem ser provenientes da introdução de alelos advindos de outras populações, por meio da migração, que pode ser evidenciada pela presença de alelos raros a uma das populações analisadas. Assim, a análise das frequências alélicas é de grande importância, pois reflete os efeitos estocásticos mais adequadamente que a maioria dos parâmetros utilizados no estudo de genética de populações, uma vez que, alguns parâmetros como a heterozigosidade observada, não refletem diretamente frequências alélicas eventualmente muito baixas (BOTREL e CARVALHO, 2004).

Os índices de diversidade genética estimados para as populações de *Z. joazeiro* estão apresentados na Tabela 16. A porcentagem de locos polimórficos ($\hat{P}$) foi de 73,91% para a população de Santana do São Francisco, 78,26% para a população de Canhoba e 60,87% para a população de Canindé do São Francisco. A porcentagem de locos

polimórficos foi baixa devido à presença de locos monomórficos nas populações. À semelhança de *Z. joazeiro* observou-se também a ocorrência de baixo polimorfismo em outras espécies arbóreas, como *Hymenaeae stigonocarpa* Mart. Ex Hayne (DEFAVARI et al., 2009) e *Caesalpinia echinata* Lam. (GIUDICE NETO et al., 2005), 69,2 e 66,7%, respectivamente. Uma hipótese que pode ser levantada para explicar o baixo polimorfismo observado na espécie estudada é o efeito fundador, em que as populações teriam sido originadas a partir de poucos indivíduos, perdendo a diversidade por deriva genética (KAGEYAMA et al., 2003).

Tabela 16. Índices de diversidade genética de três populações naturais de *Zizyphus joazeiro* Mart., localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano, baseados em 23 locos e 14 sistemas enzimáticos. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

Índices de Diversidade Genética	Santana- SE	Populações Canhoba- SE	Canindé- SE
% de locos polimórficos (0,95)	73,91	78,26	60,87
Número médio de alelos por loco (na)	2,57 (0,8)	2,52 (0,8)	2,50 (1,1)
Heterozigosidade média observada ($\hat{H}_0$)	0,5633 (0,3)	0,5874 (0,3)	0,5955 (0,3)
Heterozigosidade média esperada ($\hat{H}_e$)	0,4749 (0,2)	0,4881 (0,2)	0,4675 (0,2)
Índice de Fixação de Wright ($\hat{F}_{IS}$)	-0,2620	-0,2924	-0,3486

O número médio de alelos por loco (na) foi alto, variando de 2,50 a 2,57 entre as populações. Valores próximos a este têm sido encontrados em outras espécies arbóreas. O número médio de alelos por loco observados nas populações de *Xylopia brasilienses* Sprengel variou de 1,9 a 2,2 (PINTO e CARVALHO, 2004) e nas populações de *Machaerium villosum* Vog variou de 2,2 a 2,6 (BOTREL e CARVALHO, 2004). Espécies de grande tamanho e densidade populacional teoricamente deveriam apresentar maior número de alelos, pela maior probabilidade de aparecer novos alelos via mutação. Por outro lado, em espécies de baixa densidade populacional, seria esperado menor número de alelos pelo mesmo motivo (KAGEYAMA et al., 2003). Assim, observa-se que as populações apresentam o número de alelos esperados para as espécies de grande tamanho e densidade populacional. No entanto, este parâmetro não é considerado um bom índice de

diversidade genética uma vez que, é influenciado pelo tamanho da amostragem genética (número de locos), ele dá uma idéia da riqueza alélica das populações analisadas (BOTREL et al., 2006).

A heterozigosidade média observada ($\hat{H}_o$) para a população de Santana do São Francisco foi de 0,5633, para a população de Canhoba foi de 0,5874; e 0,5955 para a população de Canindé do São Francisco; e a heterozigosidade esperada segundo as expectativas de Hardy-Weinberg - EHW ($\hat{H}_e$) foi de 0,4749, 0,4881 e 0,4675, respectivamente. As populações apresentaram nível de heterozigosidade observada alta ($> 0,15$), como proposto por Oliveira (2006). Valores elevados de heterozigosidade são comuns em espécies com alta densidade populacional, pois a maior densidade de indivíduos pode permitir maior número de recombinações, resultando em altos níveis de diversidade genética (MOURA, 2005). Porém, segundo Luikart et al. (1998), elevada heterozigosidade pode ser encontrada também em populações que passaram por um processo recente de gargalo genético devido à redução e fragmentação florestal, situação encontrada por Nazareno (2009) estudando a espécie *Ficus eximia* em uma área fragmentada e isolada há pelo menos 120 anos.

Comparando-se os dados de heterosigozidade média observada e esperada, observa-se então, que a heterozigosidade observada foi maior do que a esperada em todas as populações, indicando que há mais heterozigotos na população do que o esperado pelo EHW (GOIS, 2009). Esta situação pode ser confirmada observando-se os valores do Índice de Fixação de Wright (Santana do São Francisco: -0,2620; Canhoba: -0,2924; e Canindé do São Francisco: -0,3486). O índice de fixação de Wright (1965) mede a relação entre a heterozigosidade observada e a esperada em uma população de cruzamentos aleatórios, conforme as expectativas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A estimativa deste índice para as populações de *Z. joazeiro* foi negativa indicando a ausência de cruzamento entre indivíduos aparentados e o excesso de heterozigotos nas populações em relação ao esperado pelas proporções do EHW.

O índice de fixação é um dos parâmetros mais importantes em genética de populações, por medir o balanço entre homozigotos e heterozigotos nas populações (KAGEYAMA et al., 2003). Souza et al. (2007) estudaram duas populações da espécie *Callophylum brasiliense* Camb. em ambientes ciliares e observaram valores negativos para o índice de fixação. Estudando a espécie *Copaifera langsdorfii* Desf. em duas áreas de

mata ciliar, Pinto et al. (2004) observaram valor negativo para a área fragmentada e valor positivo para a área menos fragmentada, indicando que o processo de endogamia não está ocorrendo mesmo depois da fragmentação.

Altos níveis de diversidade genética são esperados em espécies de ampla distribuição geográfica como *Z. joazeiro* e alta diversidade populacional. Portanto, os altos níveis de diversidade genética observados podem ser explicados pela ampla distribuição geográfica da espécie, fato observado também por Oliveira et al. (2006) estudando populações naturais de *Caesalpineia echinata* Lam.

Por outro lado, Nei (1978) afirma que quando ocorre redução no tamanho populacional, mesmo que o número de alelos seja reduzido, o grau de heterozigosidade e a diversidade genética podem permanecer tão alto quanto na população original. Isto se deve, na maioria dos casos, ao fato de que os alelos perdidos por deriva são raros, os quais contribuem pouco para o nível de heterozigosidade. (ALMEIDA, 2006).

Foram estimados os valores médios do índice de fixação dentro das populações ($\hat{F}_{IS}$), divergência genética entre populações ($\hat{F}_{ST}$) e índice de fixação para o conjunto das populações ($\hat{F}_{IT}$) conforme Nei (1987) (Tabela 17).

Tabela 17. Estimativas das estatísticas F de Wright ($\hat{F}_{IS}$, $\hat{F}_{ST}$ e $\hat{F}_{IT}$) e fluxo gênico para as populações naturais de *Zyziphus joazeiro* Mart. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

Parâmetros	Estimativas
Índice de fixação médio dentro das populações ($\hat{F}_{IS}$)	-0,3059
Índice de fixação para o conjunto das populações ($\hat{F}_{IT}$)	0,1906
Divergência genética entre populações ($\hat{F}_{ST}$)	0,3802
Fluxo gênico ($\hat{N}_m$)	0,4076

A maior parte da diversidade genética encontra-se dentro das populações (0,6198), embora exista grande variação entre as populações ($\hat{F}_{ST}$ =0,3802), indicando divergências associadas a presença de alelos raros ou exclusivos (AULER, 2004). Gargalos genéticos experimentados por populações em decorrência das alterações de habitat podem causar a perda independente de alelos (predominantemente os raros) em cada fragmento, aumentando, portanto, a divergência genética interpopulacional (JUMP e PEÑUELAS, 2006). Segundo Loveless e Hamrick (1984), as espécies tipicamente alógamas apresentam

alta variação genética dentro e pequena entre populações. No entanto, a divergência é reduzida de acordo com o aumento do fluxo gênico (pólen e/ou semente). Pode-se inferir, avaliando os índices apresentados, que as populações podem estar isoladas, ou seja, não há fluxo gênico entre as populações, o que explica a alta diversidade genética entre as mesmas.

Observando o alto valor da diversidade genética entre as populações, pode-se inferir que elas estão estruturadas. O que pode ser constatado com a observação do índice F_{IT} (0,1906) pois, valores altos significam que o conjunto de populações desvia-se da pressuposição de cruzamentos aleatórios, estando a população estruturadas devido à deriva genética. Assim, os desvios do EHW observados nas estimativas F de Wright podem indicar estruturação populacional produzida pela amostragem ou pela presença de alelos nulos (KAGEYAMA et al., 2003; NAZARENO, 2009). Raposo (2007) observou um valor de 9,1% para a diversidade genética entre as populações de *Carapa guianensis* Aubl. e atribuiu o valor encontrado à presença de alelos exclusivos na população e à distância geográfica entre as mesmas.

A deriva genética pode estar ocorrendo nas populações estudadas, mesmo tendo sido observada alta diversidade genética nestas, principalmente, devido à fragmentação e ao isolamento destas populações em decorrência das ações antrópicas observadas na região do Baixo São Francisco. Estas podem ser os agentes causais do desequilíbrio na estrutura genética destas populações. A principal implicação da estruturação é o aumento da probabilidade de cruzamentos entre indivíduos aparentados, o que pode gerar endogamia na população (MORAES et al., 2005).

O fluxo gênico estimado (N_m) entre as populações foi de 0,4076 migrantes por geração porém, devido à ausência de conectividade entre as populações e à distância geográfica entre as mesmas pode-se afirmar que não está ocorrendo fluxo gênico. Assim, como a estimativa do fluxo gênico é uma medida aparente e não a real, pois é uma medida indireta, obtida a partir de divergência genética, o valor do fluxo gênico calculado reflete o fluxo gênico que ocorreu durante um longo período; ele não indica se está havendo fluxo gênico em determinado evento reprodutivo, mas estima os níveis de fluxo gênico que devem ter ocorrido no passado para produzir os padrões observados de estrutura genética (JAEGER, 2004). Wright (1931) afirma que valores de N_m inferiores a 1 mostram um isolamento genético, podendo estar associados à distância geográfica entre as populações.

Do ponto de vista da Genética de Populações, a erosão genética e as medidas de combate para minimizar seus efeitos, podem ser enfocadas sob a ótica do tamanho efetivo populacional - $\hat{N}_e$ (VENCOVSKY, 1987). A partir da estimativa de $\hat{N}_e$ (tabela 18) pode-se pressupor que os 20 indivíduos amostrados na população de Santana do São Francisco, os 19 em Canhoba e os 15 em Canindé do São Francisco, representariam geneticamente 27, 27 e 23 indivíduos, respectivamente, de uma população panmítica ideal.

Tabela 18. Tamanho efetivo ($\hat{N}_e$) e número de indivíduos (N) de três populações naturais de *Zizyphus joazeiro* Mart., localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

População	N	Índice de Fixação	$\hat{N}_e$	PMV 150*	PMV 1500*
Santana	20	-0,2620	27	111	1.111
Canhoba	19	-0,2924	27	105	1.056
Canindé	15	-0,3486	23	98	980
Conjunto de populações	54	-0,3059	76	107	1.071

* Tamanho efetivo de referência ($\hat{N}_{e(\text{referência})}$) = 150 (conservação a curto prazo), 1.500 (conservação a longo prazo) (Nunney & Campbell, 1993).

A não existência de cruzamentos entre indivíduos aparentados nas populações estudadas pode ser comprovada pelos valores observados de $\hat{N}_e$, já que os tamanhos efetivos calculados para cada uma das populações foi superior ao número de indivíduos amostrados (BOTREL e CARVALHO, 2004). Isto acontece porque os heterozigotos, por carregarem sempre dois alelos, representam um maior número de indivíduos na população, o que é justificado pelos altos valores observados de heterozigosidade (PÓVOA, 2002). De acordo com o resultado obtido para o conjunto das populações, a coleta de sementes, para conservação *ex situ*, deverá contemplar, pelo menos, 76 árvores matrizes, garantindo, assim, a manutenção da variabilidade genética.

Vencovsky (1987) sugere que para aumentar o tamanho efetivo para a coleta de sementes deve-se coletar um número aproximadamente igual de sementes de cada matriz. Assim, na atividade de coleta de sementes, o ideal é que se procure reunir sempre descendentes de um maior número possível de plantas genitoras. A recuperação de áreas degradadas com sementes coletadas a partir deste princípio dará origem a populações com elevado potencial evolutivo, devido às possíveis novas recombinações genotípicas (OLIVEIRA et al. 2002).

O conhecimento do tamanho efetivo populacional é fundamental para a conservação de uma espécie, sendo o fator central para a determinação de uma “população mínima viável” – PMV (MORAES et al., 1999). A população mínima viável foi calculada com base no tamanho efetivo de referência 150 (conservação em curto prazo) e 1.500 (conservação em longo prazo), para todas as populações. Esses cálculos são realizados com base no tamanho efetivo da população (N_e), e se referem ao número de indivíduos com determinada probabilidade para não ocorrência de problemas genéticos associados com deriva e endogamia. Assim, observa-se que a população mínima viável para o conjunto de populações é de 107 e 1.071 indivíduos, para a conservação a curto e longo prazo, respectivamente. Os valores de PMV representam o número mínimo de árvores que deverão ser mantidas nas populações naturais, visando assegurar a manutenção dos níveis de variabilidade genética existentes nestas (MOURA, 2005).

3.2. Análise da diversidade e estrutura genética em populações naturais de *Cassia grandis* L.f.

Dos catorze sistemas enzimáticos testados, dez foram selecionados em função da sua resolução para a caracterização da diversidade genética dentro e entre as populações de *Cassia grandis*. Os sistemas selecionados foram: EST, GOT, MDH, PO, ME, SKDH, ALP, G6PDH, IDH e SDH, nos quais foram analisados 15 locos. Nos sistemas EST, MDH, PO, ME e IDH foi possível a interpretação de dois locos e os sistemas GOT, SKDH, ALP, G6PDH e SDH apresentaram apenas um loco passível de interpretação.

O número de locos polimórficos utilizados como marcadores isoenzimáticos em espécies arbóreas é bastante variável, como pode ser visto em alguns trabalhos já realizados. Oliveira et al. (2006) estudaram a diversidade e estrutura genética em populações de *Caesalpinia echinata* Lam. com a utilização de 11 locos polimórficos; Botrel e Carvalho (2004) estudaram a variabilidade isoenzimática em populações naturais de *Machaerium villosum* Vog., utilizando 10 locos polimórficos; Moraes e Derbyshire (2002) para estimar a diferenciação genética e diversidade em populações de *Cryptocarya aschersoniana* Mez. utilizaram 38 locos polimórficos. No entanto, 10 locos polimórficos são considerados suficientes para os estudos de diversidade e estrutura genética por isoenzimas, segundo Berg e Hamrick (1997). Assim, considera-se que o número de locos polimórficos analisados é suficiente para a caracterização da variabilidade genética, estrutura e fluxo gênico de *C. grandis*.

Dos 15 locos avaliados (Tabela 19), dois foram monomórficos (*EST-2* e *MDH-1*), enquanto os demais apresentaram de dois a cinco alelos. Foram observados 29 alelos na população de Santana do São Francisco, 32 alelos na população de Canhoba e 28 na população de Nossa Senhora de Lourdes.

Tabela 19. Locos isoenzimáticos, número de alelos e frequência alélica das populações analisadas de *Cassia grandis* L.f. localizadas em diferentes municípios do Bixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

Loco	Populações			
	Alelo	Santana	Canhoba	N. S. de Lourdes
EST-1	1	0,5000	0,3750	0,4167
	2	***	0,6250	0,5833
	3	0,0278	***	***
	4	0,1389	***	***

	5	0,3333	***	***
EST-2	1	***	***	1,0000
GOT-1	1	0,4231	0,4000	0,2143
	2	0,5769	0,6000	0,0714
	3	***	***	***
	4	***	***	0,2143
	5	***	***	0,5000
MDH-1	1	***	1,0000	***
MDH-2	1	0,0278	0,5000	0,3000
	2	0,4167	***	0,7000
	3	0,0556	0,5000	***
	4	0,0833	***	***
	5	0,4167	***	***
PO-1	1	1.0000	0,5000	0,4167
	2	***	0,1429	0,5833
	3	***	***	***
	4	***	***	***
	5	***	0,3571	***
PO-2	1	***	***	0,5000
	2	***	***	0,5000
ME-1	1	0,1111	0,1923	0,5000
	2	0,2500	0,8077	0,5000
	3	0,6389	***	***
ME-2	1	***	0,2917	0,7000
	2	***	0,2917	0,3000
	3	***	0,4167	***
SKDH	1	0,4444	0,2692	0,1429
	2	0,2222	0,1923	***
	3	0,3333	0,0385	0,3571
	4	***	0,5000	0,2857
	5	***	***	0,2143
ALP	1	0,5000	***	***
	2	0,0455	***	***
	3	0,4545	***	***
G6PDH-1	1	0,2000	0,3333	0,0833
	2	0,2000	0,4167	0,1667
	3	0,6000	0,2500	0,7500
IDH-1	1	***	0,5000	***
	2	***	***	***
	3	***	0,3125	***
	4	***	0,0625	***
	5	***	0,1250	***
IDH-2	1	0,5000	0,4615	0,5000
	2	***	0,0769	***
	3	0,5000	0,4615	0,5000
SDH-1	1	0,0833	0,4231	0,5000
	2	0,5000	0,1538	***
	3	0,4167	0,4231	0,5000
Total de alelos	52	29	32	28

Houve uma grande variação nas freqüências alélicas nos indivíduos analisados, desde a fixação de alelos até freqüências muito baixas, estas podem ser alteradas por migração, como também por mutação (WRIGHT, 1931). A presença de alelos raros foi observada nas populações de Santana do São Francisco e Canhoba. Na população de Santana do São Francisco o alelo 3 do loco *EST-1* (0,0278); o alelo 1 do loco *MDH-2* (0,0278) e o alelo 2 do loco *ALP* (0,0455); e na população de Canhoba o alelo 3 do loco *SKDH* (0,0385). Houve a fixação do alelo 1 do loco *EST-2* na população de Nossa Senhora de Lourdes; do alelo 1 do loco *MDH-1* na população de Canhoba; e do alelo 1 do loco *PO-1* na população de Santana do São Francisco.

Foram detectados 9 alelos exclusivos na população de Santana do São Francisco, os alelos 3, 4 e 5 no loco *EST-1*; os alelos 4 e 5 no loco *MDH-2*; o alelo 3 no loco *ME-1*; e os alelos 1, 2 e 3 no loco *ALP*. Na população de Canhoba foram detectados 8 alelos exclusivos, o alelo 1 no loco *MDH-1*; o alelo 5 no loco *PO-1*; o alelo 3 no loco *ME-1*; os alelos 1, 3, 4 e 5 no loco *IDH-1*; e o alelo 2 no loco *IDH-2*; e na população de Nossa Senhora de Lourdes 5 alelos exclusivos foram detectados; os alelos 4 e 5 no loco *GOT-1*; os alelos 1 e 2 no loco *PO-2*; e o alelo 5 no loco *SKDH*. A presença de alelos exclusivos ou privados pode ser um indicativo de restrição ao fluxo de genes, indicando que há certa diferenciação entre populações ou como efeito da deriva genética, os indivíduos analisados não foram suficientes para representar a freqüência alélica de toda a população (OLIVEIRA et. al., 2002; BOTREL et al., 2006). A hipótese 1 é a mais provável, uma vez que foram utilizados todos os indivíduos adultos presentes nas áreas de estudo.

Oscilações nas freqüências alélicas, perdas e fixação de alelos, podem ser indicativas de deriva genética ou de seleção. As oscilações se desenvolvem por meio de processos aleatórios, quando não existem mecanismos de seleção natural. No caso da seleção, o efeito poderia ser tanto de natureza direta, uma vez que as aloenzimas participam de rotas metabólicas que afetam características sujeitas à seleção, como de natureza indireta, se os locos enzimáticos estiverem ligados a genes controladores daquelas características (OLIVEIRA et al., 2002).

Avaliando-se os parâmetros estimados para as populações de *C. grandis*, a partir das freqüências alélicas de locos isoenzimáticos (Tabela 20), observou-se que a porcentagem de locos polimórficos ($\hat{P}$) foi de 60 % para a população de Santana do São Francisco e de 73,33% para as populações de Canhoba e Nossa Senhora de Lourdes. Os valores observados foram inferiores aos encontrados por Melo Júnior et al. (2004)

estudando populações naturais de *Caryocar brasiliense* Camb. (100%) e superiores ao encontrado por Póvoa (2002) em populações de *Cedrela fissilis* Vell. (média de 48,72%). Hamrick e Murawski (1991) observaram valores médios de locos polimórficos igual a 77% para as espécies comuns e 42% para as raras. A reduzida porcentagem de locos polimórficos encontrada nas populações de *C. grandis* pode ser explicada pela presença de locos monomórficos nas populações.

Tabela 20. Índices de diversidade genética de três populações naturais de *Cassia grandis* L.f., localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano, baseados em 15 locos e 10 sistemas enzimáticos. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

Índices de Diversidade Genética	Populações		
	Santana do São Francisco-SE	Canhoba-SE	N. S. de Lourdes-SE
% de locos polimórficos (0,95)	60,00	73,33	73,33
Número médio de alelos por loco (na)	2,9000 (1,1)	2,2667 (0,8)	2,3333 (0,8)
Número efetivos de alelo por loco (ne)	2,2009 (0,5)	2,2489 (0,6)	2,0439 (0,6)
Heterozigosidade média observada ($\hat{H}_0$)	0,7889 (0,3)	0,8279 (0,3)	0,7806 (0,3)
Heterozigosidade média esperada ($\hat{H}_e$)	0,5295 (0,1)	0,5442 (0,2)	0,5116 (0,1)
Índice de Fixação de Wright ($\hat{F}_{(IS)}$)	-0,5533	-0,6210	-0,6748

O número médio de alelos por loco esperado para espécies que apresentam elevado tamanho e densidade populacional é alto, e baixo para espécies com baixa densidade populacional. Assim, observa-se que mesmo com tamanho populacional reduzido, o número de alelos por loco para as populações de *C. grandis* foi alto (variou de 2,2 a 2,9). Pode-se supor então, que a espécie que hoje é rara na área, era abundante no passado (KAGEYAMA et al., 2003). Valores próximos a este têm sido encontrados em outras espécies arbóreas. Botrel e Carvalho (2004) estudando três populações da espécie *Machaerium villosum* Vog, observaram valores médios de alelo por loco variando de 2,2 a 2,6. Estudando populações naturais e manejadas de *Tabebuia cassinoides* Lam. (DC.) Cavallari Neto (2004) observou um total de 3,4 alelos por loco.

A heterozigosidade média observada ($\hat{H}_0$) para as populações variou de 0,7806 a 0,8279; e a heterozigosidade esperada segundo as expectativas de Hardy-Weinberg - EHW

($\hat{H}_e$) variou de 0,5116 a 0,5442. As populações apresentaram nível de heterozigosidade observada alta ($> 0,15$) conforme proposto por Oliveira (2006). Observa-se que a heterozigosidade observada foi maior do que a esperada em todas as populações, sugerindo excesso de heterozigotos em relação ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg (MOURA et al., 2009). Estes resultados podem ser confirmados observando-se os valores encontrados para o índice de fixação de Wright (Santana do São Francisco: -0,5533; Canhoba: -0,6210; e Nossa Senhora de Lourdes: -0,6748). Nas três populações analisadas os valores do índice de fixação foram negativos, demonstrando excesso de heterozigotos nas populações em relação ao esperado pelas proporções do EHW. Estes valores elevados de heterozigosidade encontrados nas populações indicam que podem existir mecanismos seletivos atuando em favor de heterozigotos (SILVA, 2006), o que favorece o aumento da plasticidade ecológica da espécie (KAWAGUICI e KAGEYAMA, 2001). Valores negativos do índice de fixação têm sido observado em outras espécies arbóreas: *Caryocar brasiliense* Camb. (Melo Júnior, 2004); *Protium spruceanum* Benth. (VIEIRA e CARVALHO, 2009).

Os valores médios obtidos para as estatísticas F de Wright são apresentados na Tabela 21. A maior parte da diversidade genética encontra-se distribuída dentro das populações (0,6601), embora exista grande variação entre as populações ($\hat{F}_{ST}=0,3399$). Este padrão de distribuição está de acordo com o observado para outras espécies arbóreas e com o esperado em espécies alógamas ou de sistema misto, predominantemente alógamas, com eficiente mecanismo de dispersão de pólen e sementes (KAGEYAMA et al., 2003).

Tabela 21. Estimativas das estatísticas F de Wright ($\hat{F}_{IS}$, $\hat{F}_{IT}$ e $\hat{F}_{ST}$) e fluxo gênico para as populações naturais de *Cassia grandis* L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

Parâmetros	Estimativas
Índice de fixação médio dentro das populações ($\hat{F}_{IS}$)	-0,6158
Índice de fixação para o conjunto das populações ($\hat{F}_{IT}$)	-0,0666
Divergência genética entre populações ($\hat{F}_{ST}$)	0,3399
Fluxo gênico ($\hat{N}_m$)	0,4855

A alta divergência entre as populações sugere que ambas tenham passado pelo efeito de deriva genética, seja na fundação ou pelo efeito de estrangulamento também

denominado efeito do gargalo (OLIVEIRA et al., 2006). Para Zucchi et al. (2003), o alto nível de diferenciação genética entre populações (0,3399) é decorrente de efeitos da deriva genética e da predominância de fluxo gênico a pequenas distâncias, ocasionando o isolamento reprodutivo das mesmas. Assim, a fragmentação observada na vegetação, devido às intervenções antrópicas na região do Baixo São Francisco sergipano, pode ter aumentado a diversidade genética entre populações. Considerando-se a natureza neutra do marcador isoenzimático, a divergência entre as populações pode ser o resultado de uma distribuição espacial dos genótipos estruturada; efeito, por exemplo, de uma dispersão de sementes curta ou restrita aos locais (CAVALLARI NETO, 2004; SILVA, 2006).

As populações de espécies ameaçadas de extinção se encontram frequentemente estruturadas. Isso ocorre devido à degradação ambiental, que pode favorecer a formação de refúgios (fragmentos), onde pequenas populações dessas espécies persistem, sem poder trocar genes com outros acessos localizados em áreas não alteradas (SOUZA et al., 2009).

Não é possível inferir se as populações analisadas de *C. grandis* estão estruturadas, uma vez que a estimativa do índice de fixação para o conjunto das populações ($\bar{F}_{IT}$), foi negativa (-0,0666), indicando que há alta heterozigose; segundo Botrel e Carvalho (2004) valores negativos do índice de fixação para o conjunto de populações sugere que, em media, as populações não apresentam cruzamento entre indivíduos aparentados. Provavelmente, pode estar ocorrendo fluxo gênico entre as populações mais próximas (Canhoba e Nossa Senhora de Lourdes - 6,668Km) ou o processo de fragmentação entre estas populações é recente. Observa-se então, que a análise da estrutura genética de populações é de suma importância para fins de conservação, uma vez que, se as populações encontram-se estruturadas, as estratégias de conservação devem preservar a diversidade das espécies na área, pois já podem existir adaptações locais.

O fluxo gênico, número médio de migrantes por geração, entre as populações foi igual a 0,4855. Entretanto, atualmente estas se encontram isoladas por culturas agrícolas, aglomerados urbanos, estradas etc., e a baixa divergência reflete, provavelmente, o fluxo gênico ocorrido no passado, quando as florestas eram contínuas ou ocupavam grande parte da extensão que as separaram e não o fluxo atual. O isolamento, possivelmente, no futuro refletirá em aumento na diferenciação entre populações por deriva genética (MORAES et al., 2005). Segundo Wright (1951), quando a estimativa de fluxo gênico é menor que um, os efeitos da migração não são suficientes para contrapor os efeitos da deriva e, portanto, favorece a divergência entre populações.

O tamanho efetivo é indicativo de representatividade genética dos indivíduos contidos numa amostra, em relação à geração imediatamente anterior (população amostrada) (VENCOVSKY, 1987). O conhecimento do tamanho efetivo populacional ($\bar{N}_e$) é imprescindível quando o objetivo é a preservação de germoplasma, coleta de sementes e/ou conservação *in situ*, já que mede a representatividade genética dos indivíduos amostrados na população em relação a uma população panmítica ideal (PÓVOA, 2002). A partir da estimativa de $\bar{N}_e$ (Tabela 22) pode-se pressupor que os 18 indivíduos amostrados na população de Santana, os 13 em Canhoba e os 8 em Nossa Senhora de Lourdes, representariam geneticamente 40, 34 e 24 indivíduos, respectivamente, de uma população panmítica ideal.

Tabela 22. Tamanho efetivo ($\bar{N}_e$) e número de indivíduos (N) de três populações naturais de *Cassia grandis* L.f. localizadas em diferentes municípios do Baixo São Francisco sergipano. Universidade federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

População	N	Índice de Fixação	$\bar{N}_e$	PMV 150*	PMV 1500*
Santana	18	-0,5533	40	67	681
Canhoba	13	-0,6210	34	58	575
N. Senhora de Lourdes	8	-0,6748	24	50	500
Conjunto de populações	39	-0,6158	78	75	750

* Tamanho efetivo de referência ($\bar{N}_{e(\text{referência})}$) = 150 (conservação a curto prazo), 1.500 (conservação a longo prazo) (Nunney & Campbell, 1993).

Assim, observa-se que o tamanho efetivo foi superior ao número de indivíduos. Estes resultados estão de acordo com os índices de fixação calculados, ou seja, não há cruzamento entre indivíduos aparentados, resultado observado também por Oliveira et al. (2002) estudando populações naturais de *Copaifera langsdorffii* Desf. De acordo com o resultado obtido para o conjunto das populações, a coleta de sementes, para conservação *ex situ*, deverá contemplar, pelo menos, 78 árvores matrizes, garantindo, assim, a manutenção da variabilidade genética. Porém, conforme afirma Eguiarte et al. (2007), é importante salientar que os níveis de variabilidade genética observados em populações naturais nem sempre correspondem ao predito na teoria, já que algumas espécies com alta variabilidade têm pequenas populações e estão demograficamente em perigo. Situação observada nas populações de *C. grandis*, pois estas foram reduzidas drasticamente, o que pode ser comprovado pelo número de indivíduos estudados em cada população.

Vencovsky (1987) afirma que, para a maximização das atividades de coleta de sementes, é importante ter informações a respeito da representatividade genética das matrizes da população e que a amostragem deve ser aleatória não nas sementes, e sim nas matrizes, tomando-se o cuidado de amostrar igual número de sementes do maior número possível de plantas genitoras.

A população mínima viável foi calculada com base no tamanho efetivo de referência 150 (conservação em curto prazo) e 1.500 (conservação em longo prazo), para todas as populações. Observa-se que a população mínima viável para o conjunto de populações é de 75 e 750 indivíduos, para a conservação a curto e longo prazo, respectivamente. Estes valores correspondem ao número mínimo de árvores que deverão ser mantidas, visando assegurar a manutenção dos níveis de variabilidade genética em populações naturais (MOURA, 2005). Devido ao reduzido número de indivíduos presentes nas áreas estudadas (inferior ao indicado para a conservação a curto e longo prazo), causada pela fragmentação da vegetação, a introdução de imigrantes é uma opção plausível, uma vez que as populações estão sujeitas a perdas rápidas de variabilidade genética.

4. CONCLUSÕES

- A fragmentação da vegetação do Baixo São Francisco sergipano favorece a estruturação das populações de *Z. joazeiro* e *C. grandis*;
- Para enriquecimento da vegetação, recuperação de áreas degradadas ou para fins de conservação *ex situ*, deve-se coletar sementes de 76 árvores matrizes nas populações de *Z. joazeiro* e 78 nas populações de *C. grandis*;
- Como consequência do processo de fragmentação florestal é observada a redução da população abaixo do mínimo viável nas populações de *C. grandis*;
- Devido ao reduzido número de indivíduos observados nas populações de *C. grandis*, a introdução de indivíduos geneticamente diferentes, provenientes de outras populações, pode ser uma prática a ser adotada para amenizar os efeitos negativos da deriva genética, detectada nas populações analisadas;

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, C. G. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 1991. 242 p.
- ALMEIDA, C. M. A. **Diversidade genética em populações de *Aechmea fulgens* Brongn (Bromeliaceae) em fragmentos da Mata Atlântica em Pernambuco**. 2006. 57f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento de plantas), Universidade Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2006.
- AULER, N.M.F. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Bacharis trimera* (Less) DC. (carqueja) no Sul do Brasil**. 2004. 108f. Tese (Doutorado em Agronomia)- Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria.
- BERG, E.E.; HAMRICK, J. L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadá Journal of Forest Research**, OTAWA, v.27, nº 3, p. 415-424, 1997.
- BLANCO, A.; PEREIRA, M.; COELHO, A.; CHAVES, L.. Diversidade genética em populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) por meio da análise de seqüências de cpDNA. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37(3), p. 169-175, 2007.
- BOTREL, M. C.; CARVALHO, D. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.4, p.621-627, 2004.
- BOTREL, M. C. G.; SOUZA, A. M.; CARVALHO D.; PINTO, S. I. C.; MOURA, M. C. O.; ESTOPA, R. A. Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* camb. em duas populações de mata ciliar. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.5, p.821-827, 2006.
- CARVALHO, D.; OLIVEIRA, A. F. Genetic structure of *Copaifera langsdorffii* Desf. natural populations. **Revista Cerne**, Lavras, v. 10, n. 2, p. 137-153, 2004.
- CAVALLARI NETO, M. **Efeito do Manejo na diversidade genética de populações naturais de *Tabebuia cassinoides* Lam. (DC), por marcadores isoenzimáticos**. 2004. 67f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.
- CROW, J. F.; AOKI, K. Group selection for polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 81, p. 6073-6077, 1984.
- DEFAVARI, G. R.; TARAIZI, R. MORENO, M. A.; FERRAZ, E. M.; GANDARA, F. B.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética espacial intrapopulacional de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne na Estação Ecológica de Itirapina, SP. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 81, p. 089-098, 2009.

EGUIARTE L, SOUZA, V. e AGUIRRE, X. **La ecología molecular de plantas y animales**. INE/ Conabio, México. 592 p., 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª edição, Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220.

FERREIRA, M. A. J. F. **Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas**. Boa Vista: Embrapa Roraima (Embrapa Roraima. Documentos, 1), 2003. 63p.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2ªed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992. 646p.

GIUDICE NETO, J.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade genética de uma população “ex situ” de *Caesalpinia echinata* Lam. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.3, n.69, p.125-133, 2005.

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 Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 81, p. 55-60, 2009.

GUSSON, E.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade e estrutura genética especial em duas populações de *Eschweilera ovata*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.1, n.67, p.123-135, 2005.

GUSSON, E.; SEBBENN, A. M. e KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em populações de *eschweilera ovata* (cambess.) miers. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.30, n.4, p.491-502, 2006.

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

JAEGER, P. **Caracterização genética e demográfica de populações de *Xylopia emarginata* Mart. (Annonaceae)**. 2004. 113f. Dissertação (mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

JUMP, A. S.; PENUELAS, J. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v.103, p.8096-8100, 2006.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Restauração, conservação genética e produção de sementes. In: SIMPÓSIO MATA CILIAR: CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 1999, Belo Horizonte. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1999. p.59-68.

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

- KAMADA, T.; PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; CRUZ, C. D.; VIEIRA, R. F. OTONI, W. C. Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 403-409, 2009.
- KAWAGUICI, C. B.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade genética de três grupos de indivíduos (adultos, jovens e plântulas) de *Calophyllum brasiliense* em uma população de mata de galeria. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.59, p.131-143, 2001.
- LOPES, Ricardo; BRUCKNER, Cláudio Horst; LOPES, Maria Teresa Gomes. Estimação da taxa de cruzamento da aceroleira com base em dados isoenzimáticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 3, 2002.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, n.15, p.65-95. 1984.
- LOSS, A. C. C.; LEITE, Y. L. R.; LOURO, I. D. Diversidade genética de populações de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) no estado do Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**, n.4(2), p. 55-61, 2006. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br>.
- LUIKART, G.; ALLENDORF, F.W.; CORNUET, J. M.; SHERWIN, W.B.; Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal. Hereditary**, v. 89, p. 238-247. 1998.
- MARTINS-CORDER, M. P.; FIALHO, L. E. B.; ZAMBIAZI, D. C.; KONZEN, E. R. Análise da diversidade genética de populações de palmito (*Euterpe edulis* MARTIUS) através de marcadores isoenzimáticos. **Revista Ceres**, v.56 (2), p. 204-213, 2009.
- MELO JÚNIOR, A.F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J.S.R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), **Scientia forestalis**, n.66, p.56-65, 2004.
- MORAES, P. L. R.; DERBYSHIRE, M. T. V. C. Estrutura genética de populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae) através de marcadores isoenzimáticos. **Biota Neotropical**, v.2, n.2, 2002. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v2n2/pt/abstract?article+BN02402022002>.
- MORAES, P. L. R.; DERBYSHIRE, M. T. V. C. Diferenciação genética e diversidade em populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). **Biota Neotropical**, v.3, n.1, 2003. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v3n1/pt/abstract?article+BN01803012003>
- MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R.; VENCOSKY, R. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, 1999.
- MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R. e VENCOSKY, R. Estrutura genética intrapopulacional em *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae), **Revista Brasileira de botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 475-487, 2004.

MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; **Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sob diferentes condições antrópicas.** Revista Árvore, Viçosa-MG, v.29, n.2, p.281-289, 2005.

MOURA, M. C. O. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish por isoenzimas e RAPD.** Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MOURA, T. M.; SEBBENN, A. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; OLIVEIRA, G. C. X.; KAGEYAMA, P. Y. **Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites.** Scientia Forestalis, Piracicaba, v. 37, n. 82, p. 143-150, jun. 2009.

NAZARENO, A. G. **Estrutura e diversidade genética de populações naturais de *Ficus* spp. (Moraceae) em fragmentos florestais no Estado de São Paulo,** 2009. 105f. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics.** New York: Columbia University, 1987. 512p.

NUNNEY, L.; CAMPBELL, K. A.; Assessing minimum viable population size: demography meets populations genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 234-239, 1993.

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

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

PINTO, S. I. C.; CARVALHO, D. Estrutura genética de populações de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Sprengel) por isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.3, p.597-605, 2004.

PINTO, S. I. C.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.1, n.65, p.40-48, 2004.

PÓVOA, J. S. R. **Distribuição da variação genética de *Cedrella fissilis* Vell., em fragmentos florestais, no sul de Minas Gerais, por meio de isoenzimas.** 2002. 95p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

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, p.1291-1298, 2007.

RIBAS, LUCIANO ARRUDA. **Diversidade genética e sistema de cruzamento em populações naturais de duas espécies pioneiras arbóreas**. 2003. 116p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola superior “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SILVA, M. S. **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de *Geonoma schottiana* Mart. no Parque Florestal Quedas do Rio Bonito**. 2006. 51f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

SOUZA, A.M.; CARAVALHO, S.; VIEIRA, F.A.; NASCIMENTO, L.H.; LIMA, D.C. Estrutura genética e espacial de populações naturais de *calophyllum brasiliense* Camb. em mata de galeria. **Revista Cerne**, Lavras, v.13, n.3, p.239-247, 2007.

SOUZA, A. V; BIONDO, R.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; TELLES, M. P. C.; PEREIRA, A. M. S. Diversidade genética em populações naturais de infalível. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2 (Suplemento - CD Rom), 2009.

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

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

VENCOVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. **Genetics and Molecular Biology**, v. 15, p. 53-60, 1992

VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Genetic differentiation of the neotropical tree species *Protium spruceanum* (Benth.) Engler (Burseraceae) between fragments and vegetation corridors in Brazilian Atlantic forest. **Acta Botânica Brasileira**, v.23(4), p. 1180-1185, 2009.

VIEGAS, M.P. **Diversidade genética em populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., sob diferentes tipos de perturbação antrópica**. 2009. 68f. Dissertação (mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, n. 16, p. 97-159, 1931.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, New York, v. 15, p. 395-420, 1951.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. **POPGENE version 1.32**: Microsoft Window-based freeware for population genetics analysis. University of Alberta, Edmonton, Canada, 1999.

ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCovsky, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. Genetics and Molecular Biology, v.26, m.4, p.449-457, 2003.

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de similaridade genética (abaixo da diagonal) e erro padrão estimado (acima da diagonal) entre os 20 indivíduos de *Zizyphus joazeiro* Mart., localizados no município de Santana do São Francisco, analisados por meio de marcadores RAPD. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20
J1		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J2	0,67		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J3	0,66	0,65		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J4	0,65	0,56	0,63		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J5	0,66	0,59	0,58	0,64		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J6	0,60	0,61	0,63	0,60	0,72		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J7	0,53	0,56	0,51	0,48	0,59	0,56		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J8	0,54	0,53	0,46	0,50	0,56	0,51	0,54		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J9	0,55	0,52	0,49	0,50	0,62	0,54	0,59	0,52		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J10	0,56	0,49	0,50	0,50	0,53	0,53	0,54	0,51	0,60		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J11	0,50	0,49	0,48	0,44	0,48	0,53	0,46	0,58	0,50	0,62		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J12	0,58	0,54	0,56	0,62	0,57	0,57	0,49	0,57	0,53	0,52	0,48		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J13	0,54	0,52	0,52	0,53	0,55	0,57	0,49	0,55	0,49	0,52	0,46	0,61		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J14	0,62	0,58	0,57	0,55	0,55	0,58	0,53	0,50	0,57	0,54	0,45	0,62	0,58		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J15	0,55	0,48	0,45	0,50	0,47	0,50	0,48	0,52	0,52	0,47	0,46	0,51	0,51	0,58		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J16	0,45	0,40	0,38	0,46	0,43	0,42	0,48	0,50	0,52	0,44	0,40	0,45	0,49	0,51	0,44		0,04	0,04	0,04	0,04
J17	0,53	0,58	0,47	0,48	0,52	0,56	0,57	0,56	0,60	0,58	0,50	0,51	0,57	0,55	0,55	0,57		0,04	0,04	0,04
J18	0,55	0,54	0,49	0,50	0,56	0,52	0,59	0,52	0,65	0,56	0,48	0,49	0,51	0,51	0,48	0,48	0,67		0,04	0,04
J19	0,64	0,59	0,56	0,54	0,53	0,50	0,56	0,50	0,63	0,57	0,50	0,51	0,51	0,56	0,52	0,45	0,59	0,58		0,04
J20	0,59	0,50	0,55	0,47	0,52	0,45	0,49	0,42	0,56	0,54	0,47	0,48	0,45	0,61	0,45	0,44	0,52	0,55	0,70	

Anexo 2. Matriz de similaridade genética (abaixo da diagonal) e erro padrão estimado (acima da diagonal) entre os 20 indivíduos de *Zizyphus joazeiro* Mart., localizados no município de Canhoba, analisados por meio de marcadores RAPD. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19
J1		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J2	0,51		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J3	0,42	0,61		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J4	0,46	0,60	0,50		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J5	0,52	0,59	0,44	0,68		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J6	0,46	0,54	0,49	0,62	0,67		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J7	0,43	0,44	0,45	0,59	0,55	0,54		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J8	0,47	0,51	0,46	0,62	0,66	0,60	0,58		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J9	0,45	0,55	0,54	0,66	0,65	0,66	0,59	0,58		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J10	0,44	0,52	0,45	0,59	0,61	0,59	0,57	0,63	0,66		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J11	0,47	0,51	0,40	0,54	0,64	0,60	0,56	0,57	0,60	0,58		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J12	0,41	0,50	0,42	0,60	0,66	0,59	0,58	0,58	0,55	0,56	0,61		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J13	0,44	0,46	0,40	0,55	0,64	0,59	0,58	0,63	0,57	0,57	0,59	0,61		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J14	0,37	0,42	0,37	0,52	0,55	0,54	0,54	0,61	0,54	0,58	0,50	0,61	0,61		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J15	0,38	0,42	0,38	0,56	0,52	0,56	0,52	0,57	0,54	0,54	0,52	0,52	0,59	0,55		0,04	0,04	0,04	0,04
J16	0,42	0,46	0,40	0,52	0,63	0,54	0,55	0,63	0,59	0,60	0,63	0,62	0,67	0,58	0,53		0,04	0,04	0,04
J17	0,43	0,53	0,43	0,66	0,59	0,62	0,56	0,59	0,62	0,58	0,57	0,61	0,63	0,57	0,60	0,65		0,04	0,04
J18	0,45	0,52	0,45	0,57	0,61	0,62	0,59	0,62	0,62	0,57	0,60	0,63	0,62	0,59	0,58	0,66	0,67		0,04
J19	0,35	0,45	0,32	0,46	0,51	0,47	0,40	0,49	0,45	0,45	0,44	0,55	0,44	0,45	0,42	0,47	0,47	0,50	

Anexo 3. Matriz de similaridade genética (abaixo da diagonal) e erro padrão estimado (acima da diagonal) entre os 15 indivíduos de *Zizyphus joazeiro* Mart., localizados no município de Canindé, analisados por meio de marcadores RAPD. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15
J1		0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05
J2	0,47		0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
J3	0,42	0,43		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05
J4	0,42	0,70	0,39		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
J5	0,35	0,58	0,47	0,67		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
J6	0,46	0,49	0,46	0,52	0,51		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
J7	0,41	0,53	0,37	0,54	0,50	0,60		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
J8	0,47	0,50	0,50	0,50	0,47	0,56	0,54		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
J9	0,44	0,49	0,38	0,50	0,45	0,50	0,47	0,58		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
J10	0,36	0,40	0,36	0,40	0,35	0,37	0,40	0,48	0,43		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
J11	0,37	0,46	0,32	0,46	0,45	0,51	0,40	0,47	0,47	0,46		0,05	0,05	0,05	0,05
J12	0,42	0,49	0,31	0,47	0,40	0,40	0,41	0,47	0,44	0,45	0,51		0,05	0,05	0,05
J13	0,35	0,45	0,26	0,45	0,38	0,42	0,43	0,32	0,34	0,42	0,40	0,41		0,05	0,05
J14	0,34	0,44	0,32	0,38	0,37	0,37	0,42	0,41	0,45	0,39	0,43	0,40	0,46		0,05
J15	0,38	0,46	0,40	0,42	0,39	0,42	0,52	0,60	0,42	0,37	0,41	0,40	0,41	0,47	

Anexo 4. Matriz de similaridade genética (abaixo da diagonal) e erro padrão estimado (acima da diagonal) entre os 18 indivíduos de *Cassia grandis* L.f., localizados no município de Santana, analisados por meio de marcadores RAPD. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

	CF1	CF2	CF3	CF4	CF5	CF6	CF7	CF8	CF9	CF10	CF11	CF12	CF13	CF14	CF15	CF16	CF17	CF18
CF1		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
CF2	0,77		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
CF3	0,71	0,67		0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
CF4	0,70	0,68	0,87		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
CF5	0,65	0,61	0,80	0,75		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
CF6	0,64	0,60	0,69	0,66	0,75		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
CF7	0,60	0,68	0,70	0,72	0,79	0,72		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
CF8	0,47	0,54	0,50	0,53	0,57	0,56	0,64		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
CF9	0,52	0,53	0,57	0,61	0,67	0,65	0,70	0,70		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
CF10	0,64	0,53	0,59	0,60	0,69	0,62	0,63	0,52	0,56		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
CF11	0,64	0,58	0,67	0,69	0,73	0,65	0,74	0,60	0,65	0,77		0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04
CF12	0,71	0,61	0,69	0,73	0,75	0,69	0,70	0,52	0,59	0,73	0,88		0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04
CF13	0,71	0,64	0,72	0,75	0,75	0,66	0,71	0,55	0,60	0,69	0,84	0,88		0,03	0,03	0,03	0,04	0,04
CF14	0,61	0,56	0,63	0,69	0,71	0,67	0,72	0,56	0,61	0,71	0,81	0,81	0,83		0,03	0,04	0,04	0,04
CF15	0,69	0,64	0,68	0,74	0,72	0,69	0,71	0,54	0,62	0,65	0,76	0,84	0,87	0,82		0,03	0,04	0,04
CF16	0,63	0,65	0,66	0,67	0,69	0,65	0,72	0,60	0,67	0,67	0,77	0,77	0,81	0,77	0,82		0,04	0,03
CF17	0,67	0,65	0,56	0,61	0,58	0,59	0,60	0,55	0,53	0,65	0,66	0,65	0,72	0,62	0,68	0,71		0,04
CF18	0,64	0,64	0,68	0,72	0,72	0,70	0,71	0,59	0,64	0,64	0,78	0,78	0,78	0,72	0,77	0,84	0,72	

Anexo 5. Matriz de similaridade genética (abaixo da diagonal) e erro padrão estimado (acima da diagonal) entre os 13 indivíduos de *Cassia grandis* L.f., localizados no município de Canhoba, analisados por meio de marcadores RAPD. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

	CF1	CF2	CF3	CF4	CF5	CF6	CF7	CF8	CF9	CF10	CF11	CF12	CF13
CF1		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
CF2	0,64		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
CF3	0,59	0,66		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
CF4	0,62	0,74	0,73		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
CF5	0,69	0,69	0,69	0,65		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
CF6	0,50	0,58	0,64	0,59	0,72		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
CF7	0,57	0,66	0,73	0,67	0,64	0,64		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
CF8	0,53	0,58	0,63	0,61	0,61	0,55	0,58		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
CF9	0,51	0,60	0,63	0,66	0,56	0,57	0,55	0,65		0,05	0,05	0,05	0,05
CF10	0,45	0,51	0,35	0,43	0,44	0,36	0,43	0,46	0,42		0,05	0,05	0,05
CF11	0,52	0,58	0,49	0,48	0,56	0,44	0,47	0,47	0,50	0,43		0,05	0,05
CF12	0,43	0,49	0,41	0,52	0,45	0,41	0,42	0,42	0,40	0,35	0,57		0,05
CF13	0,52	0,61	0,56	0,57	0,50	0,50	0,51	0,54	0,65	0,41	0,53	0,43	

Anexo 6. Matriz de similaridade genética (abaixo da diagonal) e erro padrão estimado (acima da diagonal) entre os 8 indivíduos de *Cassia grandis* L.f., localizados no município de Nossa Senhora de Lourdes, analisados por meio de marcadores RAPD. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

	CF1	CF2	CF3	CF4	CF5	CF6	CF7	CF8
CF1		0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
CF2	0,49		0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06
CF3	0,48	0,63		0,05	0,06	0,06	0,06	0,06
CF4	0,44	0,25	0,22		0,06	0,05	0,06	0,05
CF5	0,60	0,38	0,40	0,45		0,06	0,05	0,06
CF6	0,44	0,59	0,53	0,29	0,48		0,06	0,06
CF7	0,57	0,44	0,41	0,53	0,74	0,52		0,06
CF8	0,39	0,39	0,39	0,34	0,49	0,42	0,56	