

Variabilidade genética em populações de *Erythrina velutina* Willd. por meio de isoenzimas

Genetic variability of the Erythrina velutina Willd. populations by isoenzyme

Rafaela Montalvão de Azevedo^[a], Heloisa Oliveira dos Santos^[b], Robério Anastácio Ferreira^[c], Rosilene Moretti Marçal^[d], Renata Silva-Mann^[e]

^[a] Bióloga, mestranda do Instituto Nacional do Câncer (INCa), Rio de Janeiro, RJ - Brasil,
e-mail: rafaela_montalvao@yahoo.com.br

^[b] Engenheira florestal, doutora, professora substituta da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG - Brasil,
e-mail: heloisa.ufs@gmail.com

^[c] Engenheiro florestal, doutor, professor associado da Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE - Brasil,
e-mail: raf@ufs.br

^[d] Farmacêutica, doutora, professora adjunta da Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE - Brasil,
e-mail: rosilenemoretti@gmail.com

^[e] Engenheira agrônoma, doutora, professora adjunta da Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE - Brasil,
e-mail: renatamann@hotmail.com

Resumo

As formações florestais naturais representam uma fonte imensurável de recursos genéticos, porém grande parte desses recursos está sendo impactada pela ação antrópica. Dentre as espécies mais destruídas, pode ser destacada a *Erythrina velutina* Willd., conhecida popularmente como “mulungu”. Apesar dessa espécie possuir valor madeireiro, ecológico, ornamental, industrial e medicinal, não existem relatos sobre sua diversidade genética. Neste estudo, avaliou-se a diversidade genética de indivíduos de *E. velutina*, por meio de marcadores bioquímicos, visando à conservação dos recursos genéticos da espécie. Foram coletadas folhas jovens de 13 indivíduos, localizados no Baixo São Francisco, na região semiárida e na região litorânea do Estado de Sergipe. As amostras foram submetidas a oito sistemas enzimáticos, dentre os quais, dois não apresentaram atividade e os demais foram polimórficos. Os seis sistemas enzimáticos selecionados (ADH, EST, IDH, MDH, PO e SOD) produziram 15 locos, sendo um monomórfico (*Sod-5*), e um total de 39 alelos. A análise das frequências alélicas indicou a presença de um total de 12 alelos de baixa frequência e de 15 alelos exclusivos, o que sugeriu a existência de variabilidade entre as três localidades. A espécie encontra-se em equilíbrio nas localidades estudadas em virtude do excesso de homozigotos indicado pelo índice de fixação. Os níveis de diversidade genética medidos por número médio de alelos por loco, porcentagem de locos polimórficos e heterozigosidade esperada foram altos, evidenciando as populações estudadas como potenciais para a conservação *in situ* e a coleta de sementes para a recuperação de áreas degradadas.

Palavras-chave: Diversidade genética. Frequência alélica. Mulungu.

Abstract

*The natural forests represent an immeasurable source of genetic resources, but many of these resources are being impacted by human action. Among the species most destroyed *Erythrina velutina* Willd., popularly known as "coral tree", can be highlighted. Although this species has timber value, ecological, ornamental, medicinal and industrial value, there are not reports about its genetic diversity. In this study we assessed the genetic diversity of the *E. velutina* individuals, using biochemical markers for conservation of genetic resources of this specie. Young leaves were collected from thirteen individuals, located in the Lower São Francisco River in the semi-arid region and the coastal region of the Sergipe State. The samples were submitted to eight enzyme systems where two showed no activity and the others were polymorphic. The six selected enzyme systems (ADH, EST, IDH, MDH, PO and SOD) produced fifteen loci, in which one was monomorphic (Sod-5), and a total of thirty-nine alleles. Analysis of allele frequencies indicated the presence of a total of twelve low-frequency alleles and fifteen alleles that suggested the existence of variability among the three localities. The species are in equilibrium at studied locations according to the excess of the homozygotes indicated by the fixation index. The levels of genetic diversity measured by mean number of alleles per locus, percentage of polymorphic loci and expected heterozygosity were high, indicating the localities studied populations as potential for in situ conservation and seed collection for the restoration of degraded areas.*

Keywords: Genetic diversity. Allele frequency. Mulungu.

Introdução

As florestas tropicais possuem uma grande biodiversidade, com potencial de utilização. Entretanto, seu equilíbrio tem sido afetado, devido à exploração predatória ocasionada pela explosão demográfica e pela expansão das fronteiras agrícolas, causando desequilíbrio desses ecossistemas (ALBUQUERQUE, ANDRADE, 2002; PINTO, CARVALHO, 2004).

Dentre as formações florestais mais impactadas pelas atividades humanas, encontram-se as matas ciliares e áreas do semiárido nordestino. As matas ciliares são as principais responsáveis pela estabilidade marginal dos cursos de água, manutenção do regime hídrico e formação de corredores genéticos entre as poucas florestas primárias existentes nas margens dos rios. As áreas pertencentes ao semiárido têm sido consideradas corredores ecológicos extremamente importantes, pois favorecem o fluxo gênico, a intensa circulação de animais e a dispersão vegetal (SEBBENN et al., 2003).

A *Erythrina velutina* Willd. é uma espécie da família Fabaceae, conhecida popularmente como "mulungu", árvore de porte elevado que pode ser encontrada em regiões fragmentadas de matas ciliares e do semiárido brasileiro (LORENZI, 1992). Suas cascas são utilizadas, principalmente, pela população do nordeste brasileiro, graças às suas propriedades calmante, sudorífica, emoliente e anestésica local

(LORENZI; MATOS, 2002). Dantas et al. (2004) evidenciaram que o extrato aquoso das folhas de mulungu, em doses maiores, agiu como sedativo e bloqueador neuromuscular periférico. No entanto, não existem relatos sobre a diversidade genética nesta espécie.

Tais informações são estratégicas para a restauração de áreas degradadas, que representa uma atividade básica para a conservação *in situ*, refazendo comunidades e estabelecendo corredores entre fragmentos florestais (REIS et al., 2003). De acordo com Luca (2002), projetos de restauração devem envolver questões genéticas para poder desempenhar um papel importante na conservação da diversidade da espécie estudada, estabelecendo populações geneticamente representativas. A conservação de espécies tem por base a manutenção dos níveis naturais de variabilidade genética nas populações (YEEH et al., 1996). Assim, o conhecimento dos níveis e distribuição da variação genética entre as populações são de fundamental importância para o estabelecimento de práticas conservacionistas efetivas e eficientes (FRANKEL, 1983).

Diante do exposto, objetivou-se, com o presente estudo, avaliar a variação genética de 13 indivíduos de *E. velutina* Willd., distribuídos em três populações do Estado de Sergipe, por meio de marcadores bioquímicos (isoenzimas), visando à conservação dos recursos genéticos.

Materiais e métodos

Em levantamento realizado em três diferentes regiões do Estado de Sergipe, foram selecionados 13 indivíduos de *E. velutina*.

Foram identificados seis indivíduos (1-S6), numa área de 100 ha de mata ciliar no Baixo São Francisco Sergipano, entre os municípios de Neópolis (S10°18'39" e W36°34'56") e Santana do São Francisco (S10°15'55" e W36°38'15"); cinco indivíduos (P7-P11), no município de Pinhão (S10°34'50,08" e W37°43'24,02"), região do semi-árido sergipano e outros dois indivíduos (UFS12 e UFS13), no Campus da Universidade Federal de Sergipe (S10°55'32" e W37°06'08"), em São Cristóvão (SE), incluídos na região litorânea do estado.

Para a caracterização bioquímica, foram coletadas folhas jovens de cada indivíduo, as quais foram acondicionadas em gaze e em sacos plásticos devidamente identificados e lacrados, transportados em caixa de isopor com gelo e armazenados em freezer (-4 °C) até a realização das devidas extrações. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Sementes (LAS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Para a extração das enzimas foram maceradas, aproximadamente, 100 mg de tecido foliar mediante o uso de almofariz e pistilo, na presença de nitrogênio líquido e 5 mg do antioxidante PVP (Polivinilpirrolidona). Adicionou-se 700 µL de tampão de extração, constituído de dois tampões: uma parte de tampão de 0,2M de borato de lítio (0,2M de hidróxido de lítio pH 8,3, titulado com 0,4M de ácido bórico) e nove partes de tampão 0,2M de Tris-citrato pH 6,5 (0,2M de Tris-base pH 6,5, titulado com 0,4M de ácido cítrico) e 0,15% de β-mercaptoetanol.

Para proceder à corrida eletroforética, foram aplicados na canaleta do gel 50 µL do sobrenadante e a corrida realizada a 4 °C, a 150 V, por 4h. Após a eletroforese, os géis foram corados para detecção da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), álcool desidrogenase (ADH), α-amilase (α-AM), Esterase (EST), Fosfatase ácida (ACP), Isocitrato desidrogenase (IDH), Peroxidase (PO) e Malato desidrogenase (MDH), de acordo com a metodologia descrita por Alfenas et al. (2006).

Por meio da interpretação dos zimogramas, procedeu-se à caracterização da variação genética para cada população pela estimativa das frequências alélicas e dos índices de diversidade, tais como: número médio de alelos por loco (A); porcentagem de locos polimórficos (P), a 0,95 de probabilidade; heterozigosidade média observada (H_o) e heterozigosidade média esperada (H_e), de acordo com equilíbrio de Hardy-Weinberg, segundo Nei (1987). A partir desses dados, foi calculado o índice de fixação ou coeficiente de endogamia F de Wright ($\hat{F}_{IS}$). Tais estimativas foram realizadas utilizando-se o programa POPGENE versão 1.32 (YEH et al., 1999).

Resultados e discussão

A partir da utilização da distância geográfica como parâmetro de comparação entre os indivíduos, foi possível uma diferenciação dos 13 indivíduos avaliados em três localidades distintas. Os dois indivíduos pertencentes ao Campus da Universidade Federal de Sergipe, em São Cristóvão, foram considerados como uma terceira localidade. Essas localidades foram estudadas de acordo com estudos de genética de populações.

Na caracterização da variação genética, foram observadas variações nos padrões eletroforéticos dentre os sistemas enzimáticos testados. Os sistemas álcool desidrogenase (ADH), esterase (EST), peroxidase (PO), superóxido dismutase (SOD), isocitrato desidrogenase (IDH) e malato desidrogenase (MDH), foram polimórficos para os indivíduos em estudo. Porém, não foi detectada atividade para as enzimas fosfatase ácida (ACP) e alfa-amilase (α-AM).

A identificação das zonas codificadoras dos locos e dos alelos foi feita a partir da região mais catódica para a mais anódica. Foi considerado como polimórfico o loco em que a frequência do alelo mais comum não ultrapassasse 95%.

Analisaram-se 15 zonas de atividade (locos) e as frequências de 39 alelos em seis sistemas enzimáticos para as três localidades de *E. velutina*. Dos 15 locos avaliados, apenas Sod-5 não mostrou variação de alelos, sendo considerado um loco monomórfico. Os demais 14 locos variaram de dois (*Est-1*, *Est-3*, *Po*, *Sod-1* e *Sod-4*) a quatro alelos (*Est-2* e *Sod-3*) (Tabela 1).

Tabela 1 - Frequências alélicas e tamanho da amostra (n) em indivíduos de *Erythrina velutina* Willd. de três diferentes localidades no Estado de Sergipe

(continua)

Locos	Alelos	Locais		
		Santana do São Francisco (6)	Pinhão (5)	São Cristóvão (2)
		Frequência alélica		
ADH-1	1	0,3333	0,0000	0,0000
	2	0,6667	0,6000	1,0000
	3	0,0000	0,4000	0,0000
	n	6	5	2
ADH-2	1	0,4167	0,4000	0,0000
	2	0,5833	0,6000	1,0000
	n	4	5	1
ADH-3	1	0,0000	0,0000	1,0000
	2	0,5833	0,3000	0,0000
	3	0,4167	0,7000	0,0000
	n	3	4	1
EST-1	1	0,3333	-	-
	2	0,6667	-	-
	n	6	0	0
EST-2	1	0,0000	0,4000	0,0000
	2	0,5833	0,3000	0,0000
	3	0,0000	0,0000	1,0000
	4	0,4167	0,3000	0,0000
	n	2	5	1
EST-3	1	0,5000	0,6000	0,7500
	2	0,5000	0,4000	0,2500
	n	6	5	2
IDH	1	0,3333	0,7000	0,5000
	2	0,6667	0,3000	0,2500
	3	0,0000	0,0000	0,2500
	n	6	5	2
MDH-1	1	0,4167	0,2000	0,2500
	2	0,5000	0,8000	0,2500
	3	0,0833	0,0000	0,5000
	n	6	5	2
MDH-2	1	0,0000	0,3000	0,0000
	2	0,2500	0,0000	0,0000
	3	0,7500	0,7000	1,0000
	n	5	5	2
PO	1	0,5833	0,0000	-
	2	0,4167	1,0000	-
	n	4	1	0
SOD-1	1	0,4167	0,4000	-
	2	0,5833	0,6000	-
	n	2	3	0

Tabela 1 - Frequências alélicas e tamanho da amostra (n) em indivíduos de *Erythrina velutina* Willd. de três diferentes localidades no Estado de Sergipe

(conclusão)

Locos	Alelos	Locais		
		Santana do São Francisco (6)	Pinhão (5)	São Cristóvão (2)
		Frequência alélica		
SOD-2	1	0,0000	0,2000	0,2500
	2	0,8333	0,7000	0,7500
	3	0,1667	0,1000	0,0000
	n	6	5	2
SOD-3	1	0,5000	0,0000	0,0000
	2	0,0000	0,0000	0,2500
	3	0,0000	0,0000	0,2500
	4	0,5000	1,0000	0,5000
	n	2	2	2
SOD-4	1	0,5833	0,0000	-
	2	0,4167	1,0000	-
	n	3	1	0
SOD-5	1	1,0000	1,0000	1,0000
	n	6	5	2
Total de alelos	39	23	23	19
Alelos de baixa frequência: $0,25 \geq p < 0,05$	-	2 (6,7%)	2 (7,7%)	8 (42,1%)
Alelos raros: $0,05 \geq p < 0,01$	-	0	0	0
Alelos muito raros: $p < 0,01$	-	0	0	0

Fonte: Dados da pesquisa.

Nos indivíduos das três localidades avaliadas, não foi encontrado nenhum alelo raro ou muito raro. Houve uma grande variação nas frequências alélicas nos indivíduos analisados, desde a fixação de alelos até frequências muito baixas. Apresentaram-se fixados, os alelos 2 do loco *Adh-1* e o alelo 3 do loco *Mdh-2* na localidade de São Cristóvão. Nas localidades de Santana do São Francisco e de Pinhão não foi observada fixação de alelos.

Na localidade Santana de São Francisco, foi encontrada baixa frequência para o alelo 2 do loco *Mdh-2* (0,2500) e para o alelo 3 do loco *Mdh-1* (0,0833), num total de 6,7%. Na localidade Pinhão, os alelos que apresentaram baixas frequências foram: alelos 1 dos locos *Mdh-1* e *Sod-2* (0,2 e 0,2), totalizando 7,7%.

Com relação à localidade São Cristóvão, 42,1% dos alelos apresentaram baixas frequências, as quais ocorreram: nos alelos 1 dos locos *Mdh-1* e *Sod-2* (0,25 e 0,25); nos alelos 2 dos locos *Est-3*, *Idh*,

Mdh-1 e *Sod-3* (0,25, 0,25, 0,25 e 0,25); e nos alelos 3 dos locos *Idh* e *Sod-3* (0,25 e 0,25).

A análise das frequências alélicas é de grande importância, pois reflete os efeitos aleatórios 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; CARVALHO, 2004).

Foram observados alelos exclusivos às localidades: os alelos 1 dos locos *Adh-1*, *Est-1*, *Po*, *Sod-3* e *Sod-4* e os alelos 2 dos locos *Est-1* e *Mdh-2* para a localidade Santana do São Francisco; os alelos 1 dos locos *Est-2* e *Mdh-2* para a localidade Pinhão; e o alelo 1 do loco *Adh-3*, alelo 2 do loco *Sod-3* e alelo 3 dos locos *Est-2*, *Idh* e *Sod-3* para a localidade São Cristóvão.

A presença de alelos exclusivos às populações já foi detectada em *Myracrodruon urundeuva* (LACERDA, 1997), *Prosopis juliflora* (OLIVEIRA, 1999) e *Machaerium villusum* (GIUDICE-NETO, 1999).

Segundo Kageyama et al. (2003), a presença de alelos exclusivos nas populações e as diferenças nas frequências alélicas entre as populações sugerem que o fluxo gênico é restrito e há presença de deriva genética. Essa deriva pode estar associada ao tamanho amostral e ao processo de fragmentação. As diferenças nas frequências alélicas podem também ser graças à migração, que altera as frequências alélicas na população pela introdução de alelos advindos de outras populações (BOTREL; CARVALHO, 2004).

Póvoa (2002) constatou, ao avaliar a distribuição da variação genética de *Cedrela fissilis* Vell., em fragmentos florestais por meio de isoenzimas, que o sistema enzimático esterase (EST) revelou-se nas populações, apresentando dois locos, ambos polimórficos. Resultado semelhante também foi obtido por Pinto e Carvalho (2004) ao estudarem a estrutura genética de duas populações de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Sprengel), por meio da eletroforese de isoenzimas, em que a análise desse sistema enzimático revelou dois locos: o loco 1 apresentou-se polimórfico com três alelos para as duas populações e o loco 2 apresentou-se monomórfico para plantas jovens e polimórfico para plântulas, respectivamente. No presente estudo de diversidade genética de indivíduos de mulungu, observou-se polimorfismo com três locos (*Est-1*, *Est-2* e *Est-3*). Vale ressaltar que, nas localidades de Pinhão e São Cristóvão, o loco *Est-1* não foi detectado.

Os parâmetros estimados a partir das frequências alélicas de 13 locos isoenzimáticos para avaliar a variabilidade genética estão apresentados na Tabela 2.

A porcentagem de alelos polimórficos, a 0,95 de probabilidade, para as três localidades variou de 53,33% (São Cristóvão), 86,67% (Pinhão) e a maior porcentagem foi encontrada na localidade Santana do São Francisco, com 93,33% dos locos polimórficos. Ao comparar a espécie estudada com outra da mesma família (Fabaceae), observou-se, na mesma localidade que a de São Cristóvão, valor abaixo dos encontrados por Botrel e Carvalho (2004), ao avaliarem a variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.).

No entanto, as localidades de Santana do São Francisco e Pinhão apresentaram valores para a porcentagem de locos polimórficos (*P*) superiores aos encontrados por Corder et al. (1996), avaliando a variabilidade isoenzimática em *Eucalyptus urophylla* (77,8%); por Kawaguici e Kageyama (2001), em *Calophyllum brasiliense* (42,86%); por Lacerda (1997), em adultos de duas populações de *Myracrodruon urundeva* (12,5 e 20%); e em *Genipa americana* no estudo realizado por Sebbenn et al. (1997), onde a *P* foi 50%.

Os resultados obtidos pela análise da porcentagem de locos polimórficos nas localidades Santana do São Francisco e Pinhão, por apresentarem altos valores, mostram que as localidades onde se encontram os indivíduos de *E. velutina* estudados, apresentam um alto polimorfismo, o que torna as amostras favoráveis à conservação genética. Já na localidade de São Cristóvão, observou-se um baixo polimorfismo quando comparado com as demais. Nei (1987) justifica tal resultado por causa do

Tabela 2 - Diversidade genética de *Erythrina velutina* Willd. em três localidades com base em 15 locos e seis sistemas enzimáticos

	Locais		
	Santana do São Francisco	Pinhão	São Cristóvão
Porcentagem de locos polimórficos (<i>P</i>)	93,33	86,67	53,33
Número médio de alelos por loco ($\bar{A}$)	1,93	1,73	1,26
Heterozigosidade média observada ($\hat{H}_o$)	0,3444	0,3200	0,2000
Heterozigosidade média esperada ($\hat{H}_e$)	0,5222	0,4474	0,3667
Índice de Fixação de Wright (F_{IS})	-0,3405	-0,2847	-0,4546
Tamanho da amostra (<i>n</i>)	6	5	2

Fonte: Dados da pesquisa.

tamanho da amostragem genética (número de indivíduos) que pode influenciar muito a porcentagem de locos polimórficos e estatística. Por isso não se deve considerar somente essa medida de variabilidade genética para comparação entre amostras de tamanhos diferentes.

A estimativa do número médio de alelos por locos ($\hat{A}$) foi alta, variando de 1,93 para a localidade de Santana do São Francisco, 1,73 para a localidade de Pinhão e 1,26 para a localidade de São Cristóvão. Para a estimativa de $\hat{A}$, consideraram-se todos os locos, monomórficos e polimórficos e como as três localidades apresentaram mais de 50% dos locos polimórficos, o valor estimado pode ser considerado alto, segundo Sebbenn et al. (2003).

A estimativa de $\hat{H}_o$ foi inferior a $\hat{H}_e$ para todas as localidades, revelando excesso de homozigotos ou, em outras palavras, as heterozigosidades observadas nas localidades foram menores do que a esperada se as populações estivessem em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Observa-se que a heterozigosidade média encontrada nas localidades de *E. velutina* estudadas é elevada quando comparadas a outras espécies vegetais. Valores de diversidade genética próximos aos encontrados foram observados por Oliveira (2000) em *Copaifera langsdorffii* ($H_e = 0,366$) e por Moraes (1997) com *Cryptocaria moschata* ($H_e = 0,351$). Valores mais elevados foram observados por Santos (1994) com *Bauhinia forficata* ($H_e = 0,451$) e por Reis (1996) com *Euterpe edulis* ($H_e = 0,452$).

Em concordância, o índice de fixação ($\hat{F}_{(IS)}$) foi negativo e não diferente de zero, no qual a localidade de Santana do São Francisco apresentou índice de - 0,3405, em Pinhão o índice foi de - 0,2847 e em São Cristóvão o índice foi de - 0,4546. Assim, os índices obtidos mostram excesso de homozigotos e que as frequências gênicas observadas se desviam das frequências esperadas, segundo os pressupostos de EHW. Desvios do EHW, em locos supostamente neutros como isoenzimas, implicam que a localidade está subdividida reprodutivamente em grupos com certo grau de parentesco, cruzamentos não aleatórios (autofecundações e cruzamentos biparentais) ou deriva genética. Possivelmente, a subdivisão esteja associada à existência de estruturas de famílias dentro da população nessa localidade. Portanto, parte dos desvios do EHW pode ser atribuída ao sistema de reprodução (SEBBENN et al., 2003).

Para o sucesso de populações implantadas em uma área degradada, é imprescindível uma fonte de sementes de boa qualidade genética para ações de restauração. O conhecimento sobre a diversidade genética e, principalmente, sobre a quantificação dessa diversidade, auxilia no manejo dos indivíduos alvos para coleta de sementes, para que sejam montadas as estratégias de recuperação da área degradada, a fim de promover ao ambiente em recuperação um espaço sustentável (KAGEYAMA; GANDARA, 1993).

Desse modo, o estudo da diversidade genética dos indivíduos de *E. velutina* tem grande importância, já que estes podem ser suprimidos pela intensa exploração madeireira, a qual a espécie está exposta e essa supressão pode levar ao desaparecimento de alelos que, em longo prazo, pode comprometer o fluxo gênico e, conseqüentemente, o futuro da população.

Conclusões

A análise das frequências alélicas de *Erythrina velutina* indica haver variabilidade entre as populações. Essas populações se encontram em equilíbrio, possivelmente graças ao excesso de homozigotos indicado pelo índice de fixação.

Os níveis de diversidade genética medidos por número médio de alelos por loco, porcentagem de locos polimórficos e heterozigosidade esperada foram altos, evidenciando as populações estudadas como potenciais para a conservação *in situ* e a coleta de sementes de *Erythrina velutina* para a recuperação de áreas degradadas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de iniciação científica ao primeiro autor.

Referências

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 16, n. 3, p. 273-285, 2002. doi:10.1590/S0102-33062002000300004.

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006.
- BOTREL, M. C. G.; 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. doi:10.1590/S0100-84042004000400002.
- CORDER, M. P. M. et al. Estudo da Variabilidade isoenzimática em *Eucalyptus urophylla* das ilhas flores. **Scientia Forestalis**, n. 50, p. 43-49, 1996.
- DANTAS, M. C. et al. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 129-133, 2004. doi:10.1016/j.jep.2004.05.007.
- FRANKEL, O. H. The place of management in conservation. In: SCHONEWALDCOX, C. M.; CHAMBERS, S. M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, W. L. (Ed.). **Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations**. Menlo Park, California: The Benjamin; Cumming, 1983. p. 1-14.
- GIUDICE-NETO, J. del. **Estrutura genética por isoenzimas em populações naturais de jacarandá paulista (*Macherium villosum* Vog.)**. 1999. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.
- KAGEYAMA, P. Y. et al. Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Scientia Forestalis**, n. 64, p. 108-119, 2003.
- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. In: CONGRESSO DE ECOSSISTEMAS DA COSTA BRASILEIRA, 3., 1993, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1993. p. 115-125.
- 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**, n. 59, p. 131-143, 2001.
- LACERDA, C. M. B. **Diversidade genética por isoenzimas em populações naturais de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Freire, F. e M. F. Allemão) Anacardeaceae no semiárido**. 1997. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Editora Plantarum, 1992.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2002.
- LUCA, A. Q. **Fenologia, potencial germinativo e taxa de cruzamento de uma população de paineira (*Chorisia speciosa* St. Hil. Bombacaceae) em área ciliar implantada**. 2002. 87 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- MORAES, P. L. R. **Estrutura genética de população de *Cryptocarya moschata* Nees e Martius Ex Nees (Lauraceae)**. 1997. 190 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, 1997.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987.
- OLIVEIRA, A. F. **Estrutura genética de populações naturais de *Copaifera langsdorffii* Desf. a partir de isoenzimas**. 2000. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- OLIVEIRA, V. R. **Diversidade Genética em populações de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) DC.) na região semiárida do nordeste brasileiro**. 1999. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências/ Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 1999.
- PINTO, S. I. C.; CARVALHO, D. Estrutura genética em populações de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Sprengel) por isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 3, p. 597-605, 2004. doi:10.1590/S0100-84042004000300019.
- PÓVOA, J. S. R. **Distribuição da variabilidade genética de *Cedrela fissilis* Vell., em fragmentos florestais, no sul de Minas Gerais, por meio de isoenzimas**. 2002. 95 f. Dissertação Mestrado (em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.
- REIS, A.; ESPÍNDOLA, M. B.; VIEIRA, N. K. Restauração de áreas degradadas: a nucleação como base para os processos sucessionais. **Natureza & Conservação**, v. 1, n. 1, p. 28-36, 2003.

REIS, M. S. **Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpe edulis*)**. 1996. 209 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

SANTOS, E. M. G. **Ecologia da polinização, fluxo de pólen e taxa de cruzamento em *Bauhinia forficata* Link. (Caesalpiniaceae)**. 1994. 114 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

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

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCovsky, R. Conservação genética *in situ* e número de matrizes para a coleta de sementes em população de *Genipa americana* L. **Scientia Forestalis**, n. 63, p. 13-22, 2003.

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. Evaluations of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Theaceae) in Korea based on allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 37, n. 2, p. 141-146, 1996.

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

Recebido: 01/02/2011

Received: 02/01/2011

Aprovado: 14/03/2013

Approved: 03/14/2013