

Universidade Estadual de Montes Claros  
Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Biológicas

**ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Enterolobium contortisiliquum* (VELL.)  
MORONG POR MARCADORES ISSR EM FRAGMENTOS DE MATA SECA NO  
NORTE DE MINAS GERAIS**

**Wesley Pereira Soares**

Montes Claros, Minas Gerais

2011

Universidade Estadual de Montes Claros  
Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Biológicas

**ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Enterolobium contortisiliquum*  
(VELL.) MORONG POR MARCADORES ISSR EM FRAGMENTOS DE MATA  
SECA NO NORTE DE MINAS GERAIS**

**Wesley Pereira Soares**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Montes Claros como pré-requisito necessário para a conclusão do curso de mestrado em Ciências Biológicas.

Montes Claros, Minas Gerais

2011

Universidade Estadual de Montes Claros  
Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Biológicas

ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Enterolobium contortisiliquum* (VELL.)  
MORONG POR MARCADORES ISSR EM FRAGMENTOS DE MATA SECA NO  
NORTE DE MINAS GERAIS

**Wesley Pereira Soares**

Aprovada em: 16 de agosto de 2011

---

Dario Alves de Oliveira

(Orientador)

---

Afrânio Farias de Melo Junior

---

Rodrigo Oliveira Pessoa

Ao meu pai Sebastião Abiceu, minha mãe Maria Dalva, minha irmã Michellia Pereira, minha esposa Larissa Murta e meus filhos Luis Eduardo e João Gabriel pelo apoio e atenção dispensada durante o período de trabalho.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS pelas graças e benefícios alcançados;

À Universidade Estadual de Montes Claros pelo acolhimento;

Ao PPGCB pela oportunidade de realizar o curso de mestrado;

Aos professores e coordenadores do programa que de alguma forma contribuí para essa qualificação;

Aos coordenadores e Gestores do Parque Estadual da Lapa Grande;

Ao Laboratório de Bioprospecção e Recursos Genéticos e todos ligados a ele;

A grande amiga Ligiane, sempre prestativa e positiva obrigado pela descontração no Labs.DJ.

À grande amiga Patrícia de Abreu a qual sempre esteve disponível para ajudar em todas as necessidades, obrigado pela franqueza e incentivo e o apoio incondicional;

À professora e amiga Elitânia, pelas informações e conhecimentos concedidos e pelos momentos de descontração;

Aos meus grandes colegas e amigos Fabiano, Yure, Cleanderson, Thaise e Raissa pelo incentivo nos momentos de fraqueza;

À colega e amiga Leide pela sua serenidade e incentivo;

Aos e técnicos(as) estagiários do Laboratório os quais mantém a sua organização diária;

A Sabrina e Fernanda no trabalho desempenhado nas coletas e extração;

Aos meus grandes amigos Rodrigo, Fernando Guedes, Patrícia, Luana e Fabiana, Jon-Jon;

Ao Professor Afrânio pelas informações.

Ao Professor Dario Alves de Oliveira, pela oportunidade de ser seu orientado e pela oportunidade dada para realização dessa qualificação. Agradeço também pela grande paciência também dedicada;

À professora Yule Roberta pelo incentivo, informações e pela atenção concedida, começando pela graduação;

À equipe da Biomark pela realização dos trabalhos desenvolvidos quando eu não estava presente;

À minha grande irmã (meu anjo da guarda), ao apoio incondicional, pelo incentivo e esforços a mim concedido para conclusão dessa qualificação. Só nos dois podemos dizer o que compartilhamos. Muito Obrigado;

À minha esposa Larissa pelos momentos de apoio;

Aos meus filhos Luis Eduardo e João Gabriel, pelo amor a mim prestado e pela compreensão, nos momentos que eu pai, não estive presente;

Agradeço a meus pais Sebastião e Dalva por min gerar, pela educação a mim fornecida, pelo todo amor dedicado e por todas as atitudes tomadas para minha formação como pessoa e cidadão. Muito obrigado.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	4
2.1. ÁREA DE ESTUDO.....	4
2.2. <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong .....	5
2.3. COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	7
2.4. EXTRAÇÃO DE DNA.....	7
2.5. SELEÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE <i>PRIMERS</i> .....	8
2.6. ANÁLISE DOS DADOS.....	9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
3.1. SELEÇÃO DE <i>PRIMERS</i> .....	11
3.2. NÚMERO ÓTIMO DE FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS.....	12
3.3. DIVERSIDADE GENÉTICA.....	13
4. CONCLUSÕES.....	22
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

## RESUMO

SOARES, Wesley Pereira, M.Sc., Universidade Estadual de Montes Claros, agosto de 2011. **Análise de diversidade genética de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong por marcadores ISSR em fragmentos de Mata Seca no Norte de Minas Gerais.** Orientador: Dario Alves de Oliveira.

As Florestas Estacionais Deciduais, as chamadas Matas Secas são formações tropicais caracterizadas por diferentes níveis de caducifolia durante a estação seca, com mais de 50% dos indivíduos sem folhagem no período desfavorável. A flora endêmica já começa a apresentar extinções locais no território nacional. Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar a diversidade genética de *Enterolobium contortisiliquum* por meio de marcadores moleculares ISSR, em populações no interior da área de proteção do Parque Estadual da Lapa Grande e fora da unidade de conservação. O DNA total foi extraído de tecido foliar de indivíduos adultos e progênies. Foram calculados a porcentagem de locos polimórficos (P), a heterozigosidade esperada (He), o índice de Shannon (I) e estimado fluxo alélico ( $Nm$ ). A identidade genética e a distância genética também foram calculadas. Uma análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) foi usada para verificar a estrutura genética dentro de cada população e entre as populações. No total foram avaliados 313 indivíduos de *Enterolobium contortisiliquum*, sendo 162 da população LAP (148 progênies e 14 adultos) e 151 da ELP (144 progênies e 7 adultos). Cinco *primers* foram selecionados por apresentar bandas de boa intensidade. Os *primers* utilizados geraram 49 locos, com 25 polimórficos. A análise de variância molecular indicou que maior porcentagem de variação genética ocorreu dentro das populações e não entre elas. Os dados mostram que os adultos e progênies de ELP são os mais distantes geneticamente. As progênies das duas áreas são os indivíduos que compartilham a maior similaridade genética.



## ABSTRACT

SOARES, Wesley Pereira, M.Sc., Universidade Estadual de Montes Claros, August 2011. **Analysis of genetic diversity of *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong by ISSR markers in Dry Forest fragments in northern Minas Gerais.** Adviser: Dario Alves de Oliveira.

The deciduous forests, the so-called tropical dry forest formations are characterized by different levels of shedding during the dry season, with more than 50% of subjects without foliage in the unfavorable period. The endemic flora is beginning to show local extinctions in the country. Thus, this study aimed to evaluate the genetic diversity of *Enterolobium contortisiliquum* by ISSR molecular markers, populations within the protected area of Lapa Grande State Park and outside the protected area. Total DNA was extracted from leaf tissue of adults and progeny. We calculated the percentage of polymorphic loci (P), expected heterozygosity ( $H_e$ ), the Shannon index (I) and estimated allelic flow ( $N_m$ ). The genetic identity and genetic distance were also calculated. A hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) was used to examine the genetic structure within each population and between populations. A total of 313 individuals were evaluated *Enterolobium contortisiliquum*, being of the population LAP 162 (148 adults and 14 progeny) and the ELP 151 (144 adults and 7 progeny). Five primers were selected to present bands of good intensity. The primers used generated 49 loci with 25 polymorphic. The analysis of molecular variance indicated that a greater percentage of genetic variation occurred within populations and not between them. The data show that adults and progenies of ELP are genetically more distant. The progenies of the two areas are the individuals who share the greatest genetic similarity.

## 1. INTRODUÇÃO

As Florestas Estacionais Deciduais, as chamadas Matas Secas são formações tropicais caracterizadas por diferentes níveis de caducifolia durante a estação seca, com mais de 50% dos indivíduos despídos de folhagem no período desfavorável, dependentes das condições químicas, físicas e, principalmente, da profundidade do solo (Ribeiro & Walter 1998; Veloso *et al.* 1991). A temperatura anual média é de 25°C, e precipitação média entre 700 e 2.000 mm, com pelo menos três ou mais meses secos ao ano (Sánchez- Azofeifa *et al.*, 2005). A Mata Seca geralmente ocorre sobre solos de origem calcária, às vezes com afloramentos rochosos típicos, mas também pode ocorrer em solos de outras origens (Ribeiro & Walter 1998).

Com o aumento da temperatura e umidade ao final do último período glacial, as florestas de Mata Seca se retraíram dando origem a formação e distribuição atual que temos hoje (Pennington *et al.*, 2000), sendo consideradas por Prado & Gibbs (1993) formações residuais de climas secos do Pleistoceno. Esse tipo de formação vegetal ocorre em forma de manchas disjuntas em toda a região Neotropical, estende desde o México e Caribe até o sudeste do Brasil e o Chacos na Argentina (Pennington *et al.* 2000). Na América do Sul as Matas Secas são distribuídas de forma fragmentada formando pequenas manchas isoladas nos vales da Cordilheira dos Andes, entre a Colômbia e Bolívia (Mayle, 2006). No Brasil, ocorrem na região Central, distribuídas pelos Estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Bahia (Rizzini, 1979).

Estas florestas naturais apresentam estratificação desenvolvida e espécies arbóreas de maiores dimensões (altura total e forma do fuste) que a vegetação de cerrado nas suas distintas fitofisionomias (Ribeiro & Walter 1998). Para as florestas secas sob afloramento de calcário em Minas Gerais Pedralli (1997) descreveu um estrato arbóreo com dossel descontínuo, e onde a floresta apresenta dossel, este se possui maior adensamento, e são locais que se pode observar clareiras naturais. Os indivíduos que se sobressaem (emergentes) podem atingir alturas de 20 metros. Neste estrato ocorrem *Anadenanthera colubrina* (angico), *Myracrodruon urundeuva* (aroeira), *Phytolacca dioica* (cebolão), *Celtis iguanea* (espírito-de-galo), *Cedrela odorata* (cedro), *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril), dentre outras espécies.

A flora endêmica das florestas estacionais deciduais, localizadas em áreas calcárias, já começa a apresentar extinções locais no território nacional (Pereira *et al.* 1996). Nos últimos

séculos, essas florestas foram seriamente reduzidas a pequenos fragmentos e severamente perturbadas pela pecuária extensiva, fogo, retirada indiscriminada de madeira e exploração pelas fábricas de cimento (Turner, 1996; Ramos, 1989).

Essas perturbações antrópicas constantes representam uma importante ameaça à biodiversidade, principalmente nas regiões onde o processo de fragmentação iniciou-se há várias décadas (Turner, 1996). Estudos se fazem necessários para adotar uma política de conservação desses ecossistemas (Ramos, 1989). A singularidade, o nível de endemismos e o desconhecimento dessa vegetação caracterizam a importância das mesmas para a conservação, aliadas ao fato de serem pouco representadas em unidades de conservação (Silva & Scariot, 2003). No Estado de Minas Gerais 10 unidades de conservação abrangem áreas de Florestas Estacionais Deciduais. Essas unidades somam 194.160 hectares de áreas protegidas. No entanto, esses números não se referem apenas às Florestas Decíduas, mas também a outras fitofisionomias, o que fortalece a necessidade de criação de novas unidades de conservação nas áreas de Matas Secas (Biodiversitas, 2003).

Dada a alta biodiversidade em florestas tropicais, estudos genético-ecológicos em espécies representativas é uma maneira de avaliar o nível de preservação das populações no interior de unidades de conservação e o efeito da ação antrópica em fragmentos não protegidos (Kageyama & Gandara, 1998). As análises de DNA realizadas com técnicas moleculares tem sido de grande utilidade para programas de conservação *in situ*. A utilização de marcadores moleculares tem permitido um grande avanço nos estudos de genética populacional de espécies arbóreas florestais, principalmente para descrever a organização da variação genética (Kageyama, 1987).

Marcadores moleculares baseados em técnica de PCR, como SSR, ISSR, AFLP, RAPD, etc, têm sido aplicados com sucesso em diversas espécies de plantas para a genotipagem e análise da diversidade (Caetano-Anollós & Gresshoff, 1998; Jain *et al.*, 2004). Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) representam uma das classes mais recentes e foi desenvolvida a partir da necessidade de explorar repetições microssatélites sem o conhecimento prévio da seqüência de DNA (Zietkiewicz *et al.* 1994). A técnica consiste na amplificação da região que flanqueia as regiões microssatélites que são orientadas em direções opostas, com a utilização de apenas um *primer* com tamanho variando de 16-25 pb de comprimento (Reddy *et al.* 2002; Wolff, 2005). O marcador ISSR pode ser altamente variável dentro de uma espécie e apresenta algumas vantagens em relação a outras técnicas, pois possui maior reprodutibilidade, permite temperaturas de hibridização mais rigorosas e revelam muito mais fragmentos polimórficos (Lei *et al.* 2006).

Desta forma, este trabalho objetivou avaliar a diversidade genética de *Enterolobium contortisiliquum* por meio de marcadores moleculares ISSR; em populações no interior da área de proteção do Parque Estadual da Lapa Grande e fora da unidade de conservação. Os objetivos específicos foram:

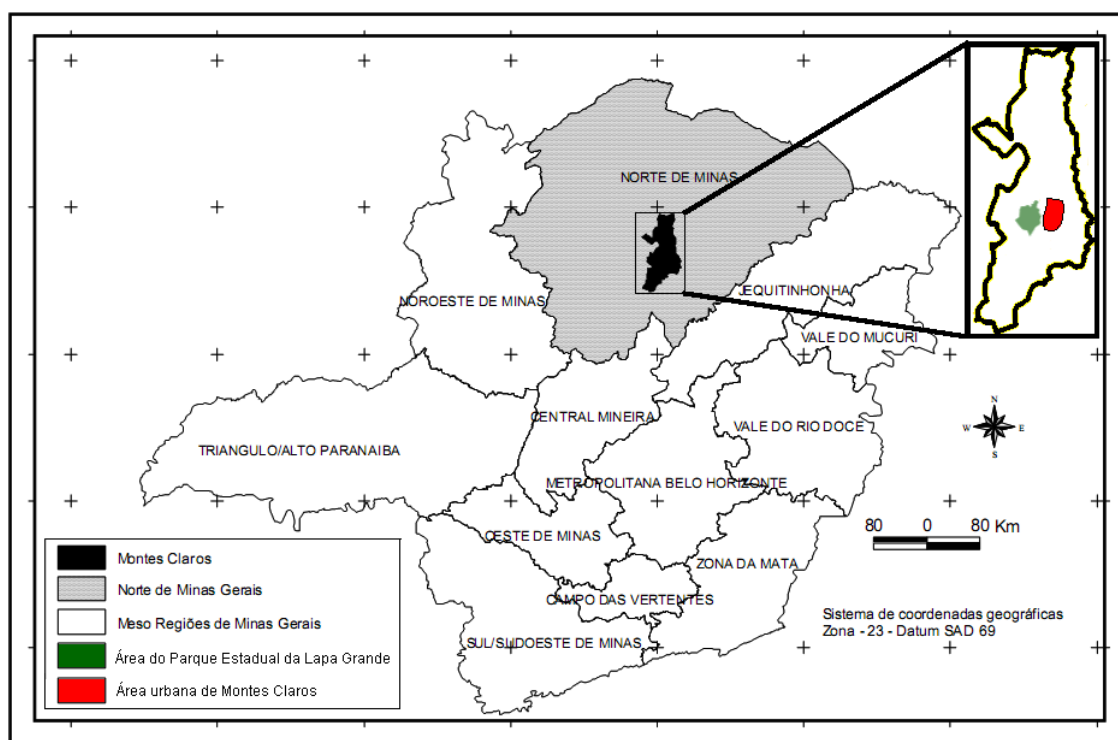
- i. Avaliar a diversidade genética e o fluxo gênico em duas gerações, adultos e progênies, das populações estudadas;
- ii. Analisar a distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações;

Além disso, a seguinte hipótese foi levantada para este estudo: os indivíduos juvenis de *Enterolobium contortisiliquum* localizados dentro da área protegida possuem maior variabilidade genética do que os indivíduos no entorno do Parque Estadual da Lapa Grande, assim como os indivíduos adultos desta espécie.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Área de estudo

O presente estudo foi realizado no Parque Estadual da Lapa Grande, considerado um dos maiores parques urbanos do País (Figura 1 e 2). Criado em 10 de janeiro de 2004 com área aproximada de 7.000 hectares, localizado no perímetro urbano do município de Montes Claros, Região Norte do Estado de Minas Gerais. O Parque Estadual da Lapa Grande está inserido no domínio cerrado, ecossistema predominante no Estado, com ocorrência de fragmentos de Matas Secas (IEF, 2011). Há no local a predominância do relevo cárstico, caracterizado por maciços calcários, dolinas, arcos, pontes, torres e cavernas (Miranda *et al.*, 2011).



**Figura 1:** Mapa de localização do município de Montes Claros e do Parque Estadual da Lapa Grande. Fonte: Veloso e Nery (2011).



**Figura 2:** Imagem de satélite com delimitação do município de Montes Claros e do Parque Estadual da Lapa Grande. Fonte: pedagogiaunimontes (2011)

A criação do Parque Estadual da Lapa Grande teve como objetivos proteger e conservar o complexo de grutas e abrigos do local. O parque é patrimônio natural e arqueológico do Estado, com cerca de 60 grutas de especial valor espeleológico, entre elas a gruta da Lapa Grande, que dá nome à Unidade de Conservação (UC), e nascentes que abastecem cerca de 40% da população do município de Montes Claros. A administração do parque é realizada pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF) em parceria com a Companhia de Saneamento de Água e Esgoto de Minas Gerais (Copasa) (IEF, 2011).

## **2.2. *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong**

A família Fabaceae possui distribuição praticamente cosmopolita; é a terceira maior família de angiospermas e uma das principais do ponto de vista econômico, ocorrendo em uma ampla diversidade de habitats. Inclui cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18000 espécies. No Brasil ocorrem por volta de 175 gêneros e 1500 espécies. Atualmente a família



Fabaceae é dividida em quatro subfamílias sendo elas: Caesalpinioideae, Cercideae, Faboideae e Mimosoideae (Souza e Lorenzi, 2008; Judd *et al.*, 2009).

A subfamília Mimosoideae possui aproximadamente 3275 espécies distribuídas em 82 gêneros (APG, 2011), dentre eles o gênero *Enterolobium* com três espécies de ocorrência no cerrado, *Enterolobium gummiferum*, *Enterolobium schomburgkii* e *Enterolobium contortisiliquum* (Figura 3) (Rede de sementes do cerrado, 2011).

O *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong, conhecido como orelha de negro, orelha de macaco, timburí, timbaúba, tamboril, tambori, pau-de-sabão, timbaíba, timbó, tambaré, pacará, tamburé, é uma árvore de até 20-35 m de altura, encontrada em diversas regiões, desde Pará até o Rio Grande do Sul. É uma planta decídua, heliófita, seletiva higrófito e dispersa em várias formações vegetais. Apresenta inflorescências branco-esverdeadas em capítulos axilares. A frutificação ocorre em junho-julho, mas as favas podem permanecer nas árvores por tempo mais longo. *E. contortisiliquum* se caracteriza por produzir favas pretas, com a forma de uma orelha humana, com 6-10 cm de comprimento (Lorenzi, 2002).



**Figura 3:** Árvore de *Enterolobium contortisiliquum*, inflorescência e fruto maduro.

É uma espécie pouco exigente quanto a características do solo, tem crescimento rápido e por esse motivo é empregada na utilização de florestamento e reflorestamento (Mainieri & Chimelo 1989). Por todas essas características *E. contortisiliquum* pode ser classificado no grupo sucessional das espécies pioneiras (Melo *et al.* 2008).

### **2.3. Coleta do material vegetal**

O material genético de *Enterlobium contortisiliquum* foi coletado em duas populações. A primeira população foi denominada LAP, composta por indivíduos protegidos dentro do perímetro do Parque Estadual da Lapa Grande. A segunda foi nomeada de ELP (entorno da Lapa), local fora da área de proteção do parque, que se encontra sob efeito constante da antropização.

Em cada população foram coletadas amostras de tecido foliar de 15 indivíduos adultos em estágio reprodutivo e registradas as suas coordenadas geográficas com auxílio do Sistema de Posicionamento Global (GPS) modelo Garmin Map 76CSX. O material foi acondicionado em recipientes contendo sílica gel para conservação até o Laboratório de Bioprospecção e Recursos Genéticos da Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES, onde as análises laboratoriais foram conduzidas.

Além do material foliar, foram coletados frutos das duas populações com o auxílio de tesoura de poda alta, ou quando necessário, com realização de escalada em cada indivíduo adulto. Tomou-se o cuidado de não coletar frutos que se encontravam no solo. De cada indivíduo foram coletados aproximadamente 10 frutos e colocadas em sacos de papel com porosidade. As sementes dos frutos foram extraídas, posteriormente escarificadas com o uso de lixa, e colocadas em placas de petry de vidro 100X15, contendo papel mata borrão umidificado com hipoclorito de sódio a 12% para evitar o crescimento de microorganismos que pudessem danificar as sementes, em seguida foram levadas ao germinador. Após as radículas atingirem 10 cm as progênies foram maceradas utilizando todo o material vegetal para extração de DNA .

### **2.4. Extração de DNA**

A extração do DNA genômico total foi realizada com utilização do método CTAB descrito por Doyle & Doyle (1987), com algumas modificações necessárias. Dos indivíduos adultos foram utilizadas 200 mg de tecido foliar e das progênies toda a parte aérea germinada,



incluindo caule e folha. O material vegetal foi macerado com almofariz e pistilo de porcelana, juntamente com areia lavada e autoclavada. Adicionou-se tampão de extração composto por 2% de CTAB (*cationichexadecyl trimethylammonium bromide*), 0,2% de  $\beta$ -mercaptanol, 1M Tris HCL (pH 8,0), 0,2M (pH 8,0) EDTA (*ethylenediaminetetracetate*), NaCl 1,4 M e 1% PVP (polivinilpirrolidona). O material foi transferido para microtubos com capacidade de 2 ml e incubados em banho-maria, a 65°C, por 40 minutos. Em intervalos de 10 minutos todos os tubos foram agitados em vórtex. As amostras foram retiradas do banho-maria e em seguida foram adicionados 600  $\mu$ L de solvente orgânico composto de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1 até a formação de emulsão. Os tubos foram agitados manualmente por 5 minutos colocados em centrifugação a 12.000 g, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado 450  $\mu$ L de isopropanol acondicionado em baixa temperatura e levado para precipitação por 12 horas no freezer. Após esse período, os tubos foram centrifugados novamente a 12.000 g 10 minutos, em centrífuga refrigerada, até a formação de precipitado (*pellet*). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado por duas vezes com 100  $\mu$ l de etanol a 70% e uma vez com etanol a 95%, para a retirada dos sais. As amostras foram secas à temperatura ambiente e depois ressuspensas em 100 $\mu$ l de TE (1% v/v Tris-HCL 1 M pH 8,0 e 0,2% v/v de EDTA 0,5 M pH8,0 em água ultrapura autoclavada). Ao final desta etapa, as amostradas foram armazenadas no freezer a -20°C.

As soluções estoque foram preparadas por diluição em água ultrapura autoclavada para a sua utilização nas reações de amplificação de DNA. Todas as diluições foram padronizadas, pegando-se 3  $\mu$ l do DNA ressuspensado em TE e adicionando-se 97  $\mu$ l de água ultrapura autoclavada.

## **2.5. Seleção e amplificação de *primers***

Dentre as técnicas para análise genética populacional foi escolhido o marcador molecular ISSR (*inter simple sequence repeat*). Em uma análise preliminar, foram testados 10 *primers* e selecionados cinco para este estudo com base na definição, reprodutibilidade, intensidade e polimorfismo das bandas (Tabela 1).

As reações de amplificação foram feitas em volume final de 15/ $\mu$ l, em solução que consistiu de: 4  $\mu$ l do DNA diluído, 1,5  $\mu$ l de tampão PCR 10X, 1,0  $\mu$ l de BSA (2,5mg/ml), 1,0  $\mu$ l de dntp (25 mM), 2,0  $\mu$ L de primer (10 micromolar), 0,5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,2 de taq polimerase (5u/ $\mu$ l) e 4,8  $\mu$ l de água ultrapura.

As amplificações foram conduzidas em termociclador Applied Biosystems Mod: Verti 96, nas seguintes condições: etapa inicial de desnaturação a 94°C, por 4 minutos seguida por 37 ciclos de amplificação por 1 minuto a 94°C, 2 minutos na temperatura de 47 °C, 2 minutos a 72°C e na etapa final 7 minutos a 72°C, em seguida, resfriado a 4°C.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% que continha brometo de etídeo (0,003% v/v a 5 ng/ml), em tampão TBE 0,5X (Tris-Borato EDTA), a uma tensão constante de 100V, por quatro horas.

Os fragmentos de DNA foram visualizados por meio de luz ultravioleta, e as imagens foram digitalizadas em sistema de captura com utilização de o fotodocumentador Vilber Lour Mart. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen).

## 2.6. Análise dos dados

Fragmentos de ISSR inconsistentes ou coalescentes foram excluídos da amostragem. Uma matriz binária de similaridade foi elaborada, onde 1 indica a presença da banda no gel e 0 a ausência.

No intuito de verificar se o número de bandas polimórficas geradas pelos *primers* de ISSR foi suficiente para determinar com precisão as estimativas de similaridades genéticas entre os indivíduos, foi realizada a análise de *bootstrap*. Para cada par de indivíduos, a similaridade genética foi estimada a partir de simulações com reamostragens de diferentes tamanhos, sendo cada banda repetida 10.000 vezes por meio do programa GENES (Cruz, 2001). Foram obtidas as estimativas de correlação de valores da matriz de similaridade original com os de outras matrizes de similaridade, as quais são obtidas levando em consideração diferentes números de bandas. Outro parâmetro também disponibilizado durante as análises é o valor de estresse (E), que indica o ajuste entre matriz original e a matriz amostral.

O programa POPGENE versão 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) foi utilizado para calcular a estatística de variação genética de cada população tendo em vista que para dados dominantes, as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram calculados a porcentagem de locos polimórficos (P), a heterozigosidade esperada (He) e o índice de Shannon (I). O índice de Shannon (*I*) é um identificador de diversidade genética que varia entre 0 a 1; quanto mais próximo de 1, mais diversa será a espécie (Perry & McIntosh, 1991). Esse índice é baseado na frequência fenotípica da banda na população (Moura, 2003). Além disso, também foi

estimado fluxo alélico ( $Nm$ ). Para os índices avaliados foi realizada análise de variância (ANOVA) *F-teste*, a 95% de probabilidade para comparação dos valores obtidos para as duas populações.

A identidade genética e a distância genética também foram calculadas com utilização do mesmo programa. Estas estimativas variam de zero a um, sendo que, na identidade genética quanto mais próxima de um é a estimativa maior o grau de similaridade genética; em contraposição na distância genética, quanto mais próximo de um, mais distantes geneticamente são os pares comparados.

As fórmulas para heterozigosidade, índice de Shannon e fluxo gênico são mostradas abaixo:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

$p_i$  = frequência estimada do *i*ésimo alelo

$$I = - \sum p_i \cdot \log_2 p_i$$

$p_i$  = presença ou ausência de uma banda

$$Nm = 0,5(1 - G_{st}) / G_{st}$$

$G_{st}$  = coeficiente de variação populacional

Uma análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) foi usada para verificar a estrutura genética dentro de cada população e entre as populações, por meio do programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). A significância da estruturação foi testada com 1.000 permutações.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Seleção de *primers*

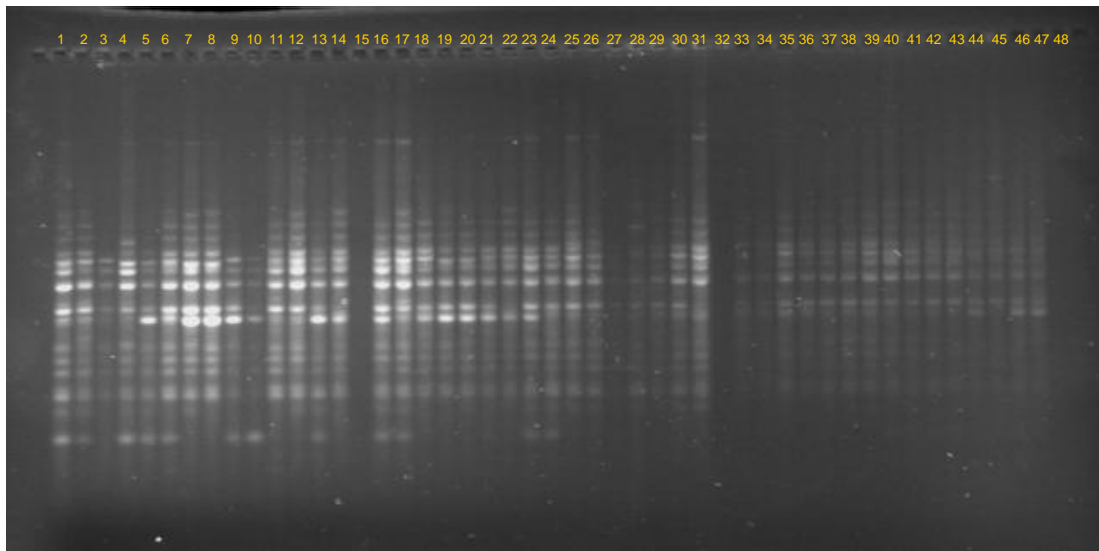
No total foram avaliados 313 indivíduos de *Enterelobium contortisiliquum*, sendo 162 da população LAP (148 progênies e 14 adultos) e 151 da ELP (144 progênies e 7 adultos). Do material foliar coletado para extração de DNA dos 15 indivíduos adultos de cada área, apenas amostras de boa qualidade foram usadas, justificando a diferença entre o número de indivíduos coletados e utilizados para a amplificação dos iniciadores ISSR.

Dos 10 *primers* testados, foram selecionados cinco que apresentaram bandas amplificáveis e de boa intensidade (Tabela 1 e Figura 4). Os *primers* utilizados geraram 49 locos, com 25 considerados polimórficos. O número de bandas por *primer* variou de 8 a 13 bandas, com média de 9,8 bandas por *primer*. As bandas polimórficas analisadas para as progênies de LAP totalizaram 25 e 22 bandas para as progênies da população ELP. O polimorfismo foi menos acentuado nos indivíduos adultos das duas populações, LAP com 11 bandas polimórficas e ELP com 15 bandas.

**Tabela 1:** *Primers* utilizados para amplificação de ISSR, seqüência correspondente e total de bandas amplificadas.

Código	Seqüência (5' – 3')	Número de bandas amplificadas
UBC 827	5'-ACACACACACACACACG-3'	8
UBC 840	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYT-3'	9
UBC 880	5'-GGAGAGGAGAGGAGA-3'	10
MANNY	5'-CAC CACCACCACRC-3'	13
MAO	5'-CTCCTCCTCCTCRC-3'	9
Total		49

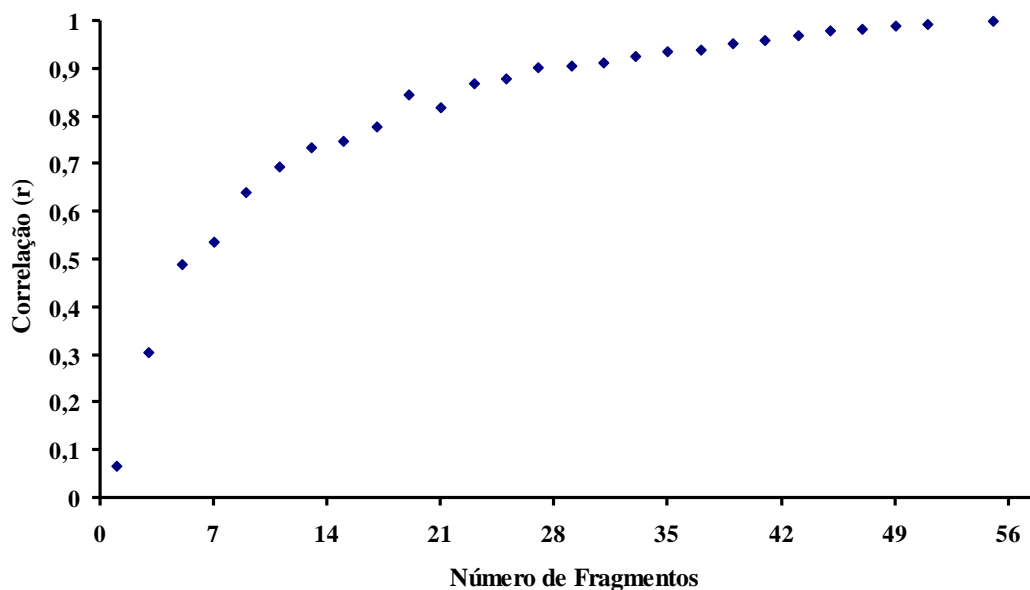
R = A ou G; Y = C ou T



**Figura 4:** Fotografia do gel de agarose 1,5% mostrando a amplificação do *primer* MAO em indivíduos da população LAP (1 a 48) de *Enterolobium contortisiliquum*.

### 3.2. Número ótimo de fragmentos polimórficos

O método de reamostragem (*bootstrap*) foi aplicado para estimar o número de fragmentos necessários para fornecer informações estatisticamente confiáveis. O número ótimo de bandas para as populações amostradas no Parque Estadual da Lapa Grande foi considerado consistência quando a correlação ( $r$ ) atingiu 0,94 e o valor de estresse 0,049, em 37 fragmentos (Figura 5). Conforme Kruskal (1964), o número de bandas é considerado ideal quando o estresse apresenta valor inferior a 0,05. Os valores obtidos sugerem que o número de marcadores utilizados e o número de fragmentos gerados por eles, são suficientes para a análise genética da espécie *Enterolobium contortisiliquum*.



**Figura 5:** Análise de reamostragem contendo as correlações obtidas para a determinação do número ideal de fragmentos gerados por marcador ISSR para população de *Enterolobium contortilium* amostrada no Parque Estadual da Lapa Grande e no seu entorno.

### 3.3. Diversidade genética

Os valores estimados para diversidade genética encontram-se nas Tabelas 2 e 3. A porcentagem de polimorfismo foi próxima para as duas áreas de amostragem, 46,30% para LAP e 42,59% para ELP. Marcadores dominantes como ISSR podem apresentar diferentes níveis de polimorfismo de acordo com a espécie, como encontrado neste estudo e por outros autores, como Souza (2008) trabalhando com as espécies *Dimorphandra wilsonii* e *D. mollis*, onde a porcentagem foi de 10,6% a 43,5% por população. Rodrigues (2010) obteve 13 *primers* amplificando 253 fragmentos polimórficos (85,76%), para 158 indivíduos, referentes às populações de *Cattleya coccinea* e *Cattleya mantiquerae*. Para a espécie *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae), Batista *et al* (2008) testaram 20 iniciadores e selecionaram seis, obtendo 42 locos, sendo 25 polimórficos (59,5%). Brandão (2008) obteve porcentagem de polimorfismo de 75,7% a 94,3% para *Myrcia splendens*. Almeida (2006) trabalhando com a espécie *Aechmea fulgens* em fragmentos de Mata Atlântica encontrou 93 bandas, sendo 84 polimórficas, ou seja, 90,3% de polimorfismo por meio de oito *primers* ISSR. Figueroa *et al.* (2010) analisaram a estrutura genética de *Dendropanax arboreus*, uma espécie pioneira em fragmentos de floresta tropical no México, utilizou DNA de 219 indivíduos (adultos e juvenis) pertencentes a nove populações, por meio de quatro *primers* obteve 75 locos com 60

deles polimórficos, resultando em 80% de polimorfismo para a espécie, variando de 54,7% a 78,7% por área amostral. Diante desses valores percebe-se a dificuldade em afirmar se a porcentagem de polimorfismo encontrada para as populações de *Enterolobium contortilium* é recorrente para a espécie, ou se existe influência do grau de conservação da área, uma vez que até o momento não foram realizados outros trabalhos com mesmo marcador e espécie para se ter um nível de comparação.

**Tabela 2:** Estimativas de diversidade de *Enterolobium contortilium* em duas populações. *P*: porcentagem de locos polimórficos, *I*: índice de Shannon e *H<sub>e</sub>*: diversidade genética de Nei.

Populações	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>H<sub>e</sub></i>
LAP	46,30	0,202 (0,243)	0,127 (0,162)
ELP	42,59	0,113 (0,160)	0,062 (0,095)
<i>F</i> <sub>ANOVA</sub>	–	4,953*	6,292*
Média	44,44	0,157	0,094

( ): desvio padrão; <sup>NS</sup>: não significativo; \* *P* < 0,05 teste *F*

**Tabela 3:** Estimativas de diversidade de *Enterolobium contortilium* em quatro populações. *P*: porcentagem de locos polimórficos, *I*: índice de Shannon e *H<sub>e</sub>*: diversidade genética de Nei, Pro: progênies e Ad: adultos.

Populações	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>H<sub>e</sub></i>
Pro-LAP	46,30	0,204 (0,244)	0,129 (0,163)
Ad-LAP	20,37	0,118 (0,244)	0,081 (0,170)
Pro-ELP	40,74	0,103 (0,154)	0,057 (0,091)
Ad-ELP	27,78	0,153 (0,263)	0,104 (0,183)
<i>F</i> <sub>ANOVA</sub>	–	2,05 <sup>NS</sup>	2,12 <sup>NS</sup>
Média	33,79	0,144	0,092

( ): desvio padrão; <sup>NS</sup>: não significativo; \* *P* < 0,01 teste *F* complementado pelo exame *t* Bonferroni (Rice, 1989).

Ao analisar os indivíduos como subpopulações de adultos e progênies por local de amostragem, foi observado que entre as progênies, aquelas oriundas da população LAP

obtiveram 46,30% de polimorfismo e 40,74% em ELP. Os indivíduos adultos apresentaram baixo polimorfismo quando comparado com as progênies, resultando em 27,78% a população ELP e 20,37% LAP. A diferença de polimorfismo encontrada neste trabalho para progênies e adultos de *Enterolobium contortilium* pode ter sido influenciada pelo reduzido tamanho amostral da geração adulta, principalmente na população ELP. O mesmo resultado deste estudo foi obtido também por Póvoa (2002) analisando a variação genética de *Cedrella fissilis* em três fragmentos de mata por meio de isoenzimas. As progênies se destacaram com 76,92% de locos polimórficos e os adultos com 48,72%. A mesma espécie foi estudada por Gandara (1996) e o valor de polimorfismo para progênies foi maior (84,6%) do que nos indivíduos adultos (76,9%). A análise das progênies, ou seja, de plântulas de sementes coletadas diretamente da árvore matriz, se concentra na migração de alelos potencialmente realizada pela polinização, e não a migração de alelos realizada pela dispersão de sementes, uma etapa seguinte, após a queda do fruto ao solo ou da sua retirada da planta matriz por um dispersor (Seoane *et al.* 2005). Considerando que as populações de LAP possuem maior número de indivíduos reprodutivos por estarem em uma área de proteção, tal condição permite maior número de recombinações e múltiplas paternidades nas progênies. Esse fato favorece o aumento dos níveis de diversidade genética em função das taxas de cruzamento segundo Franceschinelli & Bawa (2000) e Van Treuren *et al.* (1993); justificando maior número de polimorfismo encontrado para as progênies neste estudo.

Para o índice de Shannon ( $I$ ), o maior valor foi verificado para os indivíduos de LAP (0,202), enquanto para ELP foi de 0,113, com média de 0,157. Entre adultos e progênies, o maior valor foi obtido para as progênies de LAP (0,204) e o menor para progênies de ELP (0,103).

A heterozigosidade esperada corrigida de Nei (1978) ( $He$ ) para a população LAP foi de 0,127 e para ELP de 0,062, verificado diferença significativa das duas áreas para esse índice. Ao analisar a heterozigosidade para adultos e progênies por área amostral, os valores variaram de 0,057 (progênie ELP) a 0,129 (progênie LAP), com média de 0,092.

Semelhante aos resultados obtidos para esses dois parâmetros, Rodrigues (2010) encontrou valores similares para cinco populações de *Cattleya coccinea* e *Cattleya mantiquerae*, onde o maior valor de índice de Shannon foi de 0,178 e de heterozigosidade de 0,116. Costa *et al.* (2011) ao analisar banco de germoplasma de *Hancornia speciosa* obteve  $He = 0,17$  e  $I = 0,25$ . Entretanto, os valores estimados para *Enterolobium contortilium* podem ser considerados baixos para todas as populações amostradas. Análises feitas com a utilização de marcadores moleculares para espécies arbóreas tropicais atingiram valores



superiores ao do presente estudo como as populações de *Caryocar brasiliensis* coletadas no norte de Minas Gerais atingiram heteroziguidade de 0,45 a 0,53 (Melo-Júnior *et al.*, 2004), *Tabebuia cassinoides* com  $He = 0,455$  (Neto, 2004), *Myrcia splendens* com  $I = 0,37$  e  $He = 0,53$  (Brandão, 2008), *Eugenia dysenterica* com  $He = 0,236$  (Zucchi, 2002), *Calophyllum brasiliense* com  $He = 0,453$  (Reis *et al* 2009), *Eremanthus erythropappus* com  $He = 0,500$  e índice de Shannon variando de 0,498 a 0,539 (Moura, 2005). *Copaifera langsdorffii* (Carvalho *et al* 2010) atingiu maior heteroziguidade nos subadultos do que nos adultos, com 0,9 e 0,879, respectivamente. Kawaguici e Kageyama (2001) estudando a diversidade genética em *Calophyllum brasiliense*, em diferentes estágios de vida, verificaram que a maior parte da heteroziguidade observada estava presente no grupo de plântulas e não nos adultos. Eles explicam esse fato levando em consideração que o cruzamento de indivíduos homozigotos geraram indivíduos heterozigotos, refletindo nas plântulas. Tal fato pode estar ocorrendo com a população LAP, onde os indivíduos adultos obtiveram menor índice de Shannon e heteroziguidade do que as suas progênies.

Segundo Hamrick e Godt (1990) as heteroziguidades médias esperadas para espécies de cruzamento e polinização entomófila é de 0,167, espécies amplamente dispersas de 0,202, tropicais com 0,148 e arbóreas de 0,177. Todas essas características são enumeradas para *Enterolobium contortilium*, entretanto os valores obtidos são inferiores a todos os descritos pelos autores supracitados, evidenciando novamente a baixa heteroziguidade da espécie e a necessidade de estratégias para a sua conservação.

Comparando as populações LAP e ELP, nota-se que as duas se diferem nos três parâmetros analisados, ou seja, polimorfismo, índice de Shannon e heteroziguidade esperada, e que LAP sobressai em todos eles. Esses dados confirmam a hipótese levantada no presente estudo da importância das unidades de conservação como locais propícios para resguardar e manter a variabilidade genética de espécies vegetais. Existe uma concordância geral de que as reservas e os parques florestais tropicais deveriam ser estabelecidos e manejados de maneira a preservar a máxima variabilidade genética dentro das espécies (Whitmore 1980).

O fluxo gênico dado como número de migrantes na população ( $Nm$ ) estimado para as populações de *Enterolobium contortilium* foi de 1,407. Em espécies tropicais, os valores obtidos para  $Nm$  têm se mostrado, em geral superiores a 1 (Reis, 1996; Ciampi, 1999; Moraes, 1997; Gaiotto, 2001), com algumas exceções como descrito por Moraes e Derbyshire (2002) que observaram valor de fluxo gênico de 0,42 para *Cryptocarya aschersoniana*. Seoane *et al.* (2000) analisando a estrutura genética de progênies e adultos de *Esenbeckia leiocarpa* encontrou  $Nm$  de 0,66 e 0,45 para as respectivas populações. Entretanto, Neto (2004)

estudando a espécie *Tabebuia cassinoides* encontrou valores de  $Nm$  de 1,12 a 3,83. Para a espécie *Copaifera langsdorffii*, Martins *et al.* (2008) analisaram indivíduos adultos e regenerantes obtendo fluxo gênico de 6,93 e 3,06. Valores muito superiores foram relatos por Jaeger (2004) para *Xylopia emarginata*, com  $Nm = 13,87$  e Sebbenn (1997) para a *Genipa americana* com fluxo estimado em 41,4. Espécies pioneiras, como *Enterolobium contortilium*, apresentam características próprias de extinção local e recolonização o que pode contribuir, efetivamente, para aumento de fluxo gênico, reduzindo a diferenciação genética entre populações (Slatkin, 1985, 1987). Segundo Wright (1951), um fluxo gênico superior a 1, ou seja, quando um ou mais indivíduos migram por geração, os efeitos da migração são suficientes para impedir perdas aleatórias de alelos dentro de populações (efeitos de deriva). O valor encontrado para *Enterolobium contortilium* mostrou-se suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética. A dispersão das sementes por animais tem grande potencial para influenciar os padrões de fluxo gênico e a estrutura genética intra e interpopulacional (Sork *et al.*, 1999). A literatura é escassa quanto ao polinizador efetivo e dispersor das sementes da espécie *Enterolobium contortilium*. Segundo Carvalho (2003) suas flores apresentam importância apícola e a dispersão de suas sementes é realizada por roedores, como pacas e cutias. Estudos sobre o sistema reprodutivo e a fauna relacionada a *Enterolobium contortilium* são de fundamental importância para nortear estratégias de conservação da espécie e manutenção do seu fluxo gênico.

A manutenção da diversidade genética é extremamente necessária para que a população seja capaz de responder as variações ambientais (Frankham *et al.* 2002). A diversidade genética é importante em longo prazo para manutenção do potencial adaptativo evolutivo, bem como em curto prazo, para manutenção do valor adaptativo (Frankham, 1996). Desta forma, o nível de variação genética, e de como esta variação está distribuída dentro e entre populações naturais é fundamental, não apenas para o delineamento de estratégias de conservação *in situ e ex situ*, como também para compreensão da história evolutiva das espécies (Frankham *et al.* 2002; O'Brien, 1994, Reis, 1999).

A análise de variância molecular (AMOVA) realizada para dois níveis hierárquicos (Tabela 4), indicou que maior porcentagem de variação genética de *Enterolobium contortilium* ocorreu dentro das populações (83,99%) e apenas 16,01% da diversidade genética total está presente entre as populações LAP e ELP. Dados semelhantes de maior diversidade intrapopulacional foram como encontrado por Mendonça (2006) em *Calophyllum brasiliense*, Zucchi (2002) em *Eugenia dysenterica*, Costa *et al.* (2011) em *Hancornia speciosa*, Ruschel (2007) em *Sorocea bonplandii*, Brandão (2008) em *Myrcia splendens*,

Zimback *et al.* (2004) em *Trichilia pallida* e por Ribas e Kageyama (2004) para *Trema micrantha*.

Espécies arbóreas, em geral, mostram maior variação genética dentro de populações do que entre populações (Yun *et al.*, 1998; Aagaard *et al.*, 1998) devido principalmente pelo sistema de cruzamento misto (Berg & Hamrick, 1997), com predominância de alogamia (Ward *et al.*, 2005). Hamrick e Godt (1990) observaram que, em média, 82% da variabilidade genética total se concentra dentro das populações para espécies arbóreas tropicais. Hamrick (2004) e Nybom (2004) consideraram que, ao lado da grande longevidade, do potencial para elevadas taxas de fluxo de pólen e fecundação cruzada, os altos níveis de diversidade genética dentro das populações podem fazer com que as espécies arbóreas persistam durante períodos de alterações ambientais. Em espécies com pequenas populações, de autofecundação e ou propagação vegetativa, com limitada dispersão de pólen e sementes, tendem a apresentar baixa diversidade dentro das populações e alta diferenciação entre elas (Loveless & Hamrick, 1984).

**Tabela 4:** Análise de variância molecular (AMOVA) em duas populações de *Enterolobium contortilium*. GL = graus de liberdade e SQ = soma do quadrado dos desvios.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes da variância	(%)Variação	P*
Entre populações	1	116,89	0,723	16,01	< 0,0001
Dentro de populações	312	1180,38	3,795	83,99	< 0,0001
Total	313	1297,27	4,57	100	
$F_{ST}$ :	0,160				

\*Valores de P são a probabilidade de ter um componente de variância maior que os valores observados ao acaso. As probabilidades foram calculadas por 1000 permutações ao acaso.

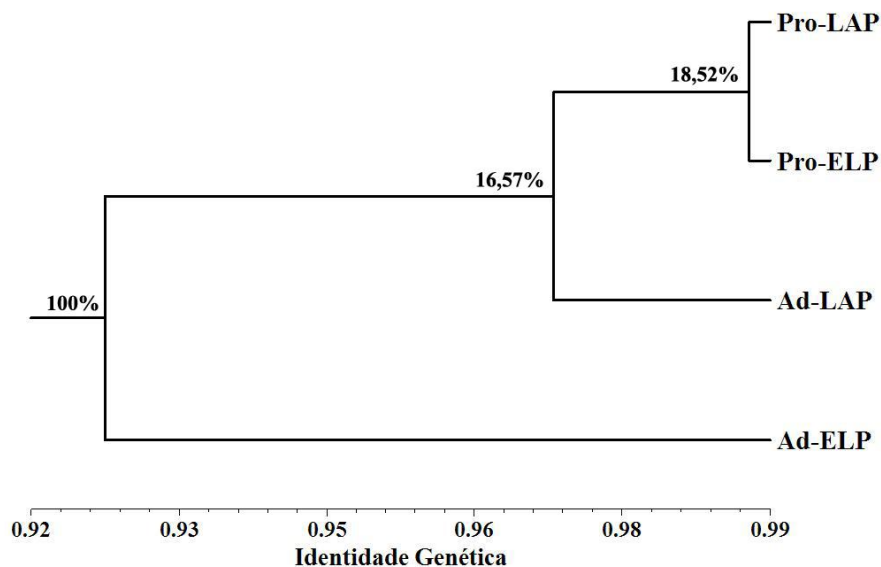
As estimativas de identidade genética e distância genética de Nei (1972) foram calculadas para os pares de populações das progênies e adultos LAP e ELP (Tabela 5). Estas estimativas variam de zero a um, sendo que, na identidade genética quanto mais próxima de um é a estimativa maior o grau de similaridade genética; em contraposição na distância genética, quanto mais próximo de um, mais distantes geneticamente são os pares comparados. A estimativa de identidade genética de Nei (1972) calculada para as populações das progênies e adultos variou de 0,919 a 0,988. A estimativa de distância variou de 0,012 a 0,084. Os dados

mostram que os adultos e progênies de ELP são os mais distantes geneticamente. As progênies das duas áreas são os indivíduos que compartilham a maior similaridade genética.

**Tabela 5:** Estimativas de identidade (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei (1972), entre populações de progênies e adultos de *Enterolobium contortilium*.

Populações	Pro-LAP	Ad-LAP	Pro-ELP	Ad-ELP
Pro-LAP	****	0,979	0,988	0,931
Ad-LAP	0,021	****	0,960	0,931
Pro-ELP	0,012	0,040	****	0,919
Ad-ELP	0,071	0,071	0,084	****

Um dendrograma foi produzido a partir dos valores da identidade genética de Nei (1978) pelo método UPGMA (Figura 6). Na análise de agrupamento foram identificados dois grupos, um constituído pelos adultos de LAP e pelas progênies das duas áreas e no segundo grupo apenas os adultos de ELP.



**Figura 6:** Dendrograma UPGMA das populações de *Enterolobium contortilium*. Amostradas nos sistema corredor-fragmento, calculado de acordo com a identidade genética de Nei (1972)

A menor relação dos adultos da população ELP com as outras populações, provavelmente se deve pelo número reduzido de indivíduos coletados nesta área, não sendo suficientes para a identificação da real diversidade genética da espécie, visto que no geral apresenta um baixo polimorfismo.

De acordo com os dados obtidos neste trabalho pode-se inferir que o fluxo gênico tem ocorrido entre as populações LAP e ELP, pois não foi encontrado padrão genético exclusivo de apenas um grupo, dada a similaridade entre as progênies, não existindo evidências de isolamento reprodutivo até o momento. A criação do Parque Estadual da Lapa Grande ainda é muito recente quando comparado com o ciclo de vida de uma espécie arbórea, sendo assim, a barreira imposta pela criação da unidade de conservação e conseqüentemente a segregação das populações de *Enterolobium contortilium* em indivíduos protegidos e fora desse domínio, ainda não foi refletida na diversidade genética. As populações permanecem geneticamente interligadas como um grande contínuo, visto pela maior porcentagem de diversidade total estar limitada à diversidade intrapopulacional e pelos altos valores de identidade genética das populações estudadas.

Uma preocupação constante no estudo de genética de populações é que imediatamente após a fragmentação de habitats, tem-se um efeito de gargalo na diversidade genética. O isolamento de populações de espécies arbóreas em pequenos fragmentos reduz o número de indivíduos reprodutivos, a densidade populacional, podendo afetar processos genéticos como deriva genética, fluxo de genes, perda de alelos, redução na heterozigosidade, seleção e sistema de reprodução (Young *et al.* 1996; Young & Boyle 2000). Dessa forma, acarretando em menor variabilidade genética podendo reduzir a resistência da população a novas doenças ou mudanças ambientais (Nei *et al.* 1975, Allendorf & Leary 1986). Entretanto, estudos realizados por Apsit e colaboradores (2001) não encontraram evidências de que a alteração de habitat nas matas secas em Guanacaste, Costa Rica, afeta o fluxo gênico em *Enterolobium cyclocarpum*. Ocorre situação contrária existindo fluxo gênico, recebendo pólen de indivíduos distantes. Os autores afirmam que este fato pode ser devido a floração da espécie que ocorre durante a estação seca em que os recursos são escassos e a disponibilidade de flores da espécie poderia promover o fluxo gênico graças a atração de seus polinizadores. Situação similar pode estar ocorrendo *Enterolobium contortilium*, com maior polimorfismo visto nas progênies.

A manutenção da diversidade genética dessa espécie encontra-se ameaçada fora dos domínios das unidades de conservação, onde é alvo de corte pelos avanços das áreas urbanas sobre os remanescentes de Mata Seca ainda existentes no município de Montes Claros e, além

disso, pela retirada de árvores dessa espécie pelos criadores de gado. A diminuição do número de indivíduos da espécie *Enterolobium contortilium* se deve muitas vezes pelos seus compostos biologicamente ativos presentes em suas favas, as saponinas, que são tóxicas ao gado provocando abortos e lesões na pele. Esse composto quando introduzido na corrente sanguínea determinam a hemólise de hemácias e subcutaneamente tais substâncias causam inflamação e necrose, atuando sobre o sistema nervoso central (Garner, 1970). Os criadores de gado vêem a espécie como uma ameaça à criação e procuram eliminá-la dos pastos e áreas onde o rebanho possa pastorear. A presença de espécies em áreas de proteção é uma alternativa para a sua conservação, mas ainda não se sabe até que ponto a sua variabilidade genética poderá ser mantida, com a diminuição das populações próximas a essas áreas.

Uma maneira de minimizar a retirada dos indivíduos de *Enterolobium contortilium* das áreas de externas ao parque é conscientizar a população sobre a importância de preservar a espécie em fragmentos de vegetação nativa, para que o fluxo gênico possa permanecer por meio de corredores ecológicos, para garantir a sua perpetuação.

#### 4. CONCLUSÕES

O estudo da diversidade genética da espécie *Enterolobium contortisiliquum* por meio do marcador molecular ISSR possibilitou chegar às seguintes conclusões:

- A metodologia desenvolvida para extração de DNA e amplificação de iniciadores ISSR foi eficiente para a espécie *Enterolobium contortisiliquum*;
- As progênies das duas áreas de amostragem mostraram maior diversidade genética do que os indivíduos adultos;
- A variabilidade genética da espécie é considerada baixa quando comparada a outras espécies arbóreas tropicais.
- A maior parte da variabilidade genética está contida dentro dos grupos analisados, inferindo que as populações no interior do Parque Estadual da Lapa Grande (LAP) e no seu entorno (ELP) não possuem diferença quanto à diversidade genética;
- Programas de manejo e conservação na região de entorno do Parque Estadual da Lapa Grande são de extrema importância para manter a variabilidade genética de *Enterolobium contortisiliquum*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aagaard, J. E. et al. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiations among populations and races of Douglas-fir. **Heredity**, v.81, n.1, p.69-78, 1998.

Allendorf, F. W. and R. F. Leary. 1986. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. In: (Ed. M. E. Soulé), Conservation Biology: the Science of Scarcity and Diversity. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 57-76.

Almeida, C. M. A. **Diversidade genética em populações de *Aechmea fulgens* Brongn. (Bromeliaceae) em fragmentos de Mata Atlântica em Pernambuco.** 2006. 57p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

APG, 2011. Angiosperm Phylogeny Group, Disponível em: <<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>> Acesso em: 01 de junho de 2011.

Apsit V, Hamrick JL, Nason JD (2001) Breeding neighborhood size of a Costa Rican dry forest species. *Heredity*, 92, 415–420.

Batista, E.C.; Telles, M.P.C.; Ramos, J.R.; Soares, T.N.; Diniz-Filho, J.A.F.; H.D. Ferreira Variabilidade genética intrapopulacional utilizando marcadores ISSR em *Tibouchina papyrus*. In: Anais de resumos IX Simpósio Nacional de Cerrado e II Simppósio Internacional de Savanas do Cerrado. Brasília. 2008.

Berg, E. E.; Hamrick, J. L. Quantification of diversity at allozyme loci. *Canadian Journal Forest Research*, Ottawa, v. 27, n. 3, p. 415-424, Mar. 1997.

Brandão, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema fragmento-corredor semidecíduais no sul de Minas Gerais.** 2008. 80p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 2008.



Caetano-Anollós G & Gresshoff P M, DNA markers: Protocols, applications and overviews (Wiley-VCH, New York) 1998.

Carvalho, A. C. M.; Freitas, M. L. M.; Moraes, S. M. B.; Moraes, M. L. T.; Stranghetti, V.; Marin, A. L. A.; Sebbenn, A. M. Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii*. Revista Brasil. Bot., V.33, n.4, p.599-606. 2010.

Carvalho, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. v. 1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo/PR: Embrapa Florestas, 2003. 1039p.

Ciampi, A. Desenvolvimento e utilização de marcadores microsatélites, AFLP e sequenciamento de cpDNA no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de copaíba (*Copaifera Langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado. Botucatu, 1999. 204p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Costa, T. S.; Silva, A. V. C.; Lédo, A. S.; Santos, A. R. F.; Silva Júnior, J. F. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.46, n.5, p. 499-508, 2011.

Cruz, C. D. Programa Genes: versão windows; aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, Imp. Univer., 2001.

Doyle, J.J. & Doyle, J.S. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus v,12, p,13-15, 1987.  
Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.

Figueroa, E. M. E.; Puebla, F. O., Eguiarte, L. E.; Núñez, J. F. Genetic structure of a bird-dispersed tropical tree (*Dendropanax arboreus*) in a fragmented landscape in Mexico **Revista Mexicana de Biodiversidad** 81: 789 - 800, 2010.

Franceschinelli, E.V., Bawa, K.S. 2000. The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). Heredity 84:116–123.

Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* 10:1500-1508.

Frankham, R., D. A. Briscoe, and J. D. Ballou. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, New York, New York, USA.

Gaiotto, F. A. Inferência sobre herança quantitativa e estrutura genética em populações naturais de *Euterpes edulis* Mart. utilizando marcadores microsatélites . Piracicaba 2001. 122p. tese (doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Gandara, F. B. **Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)**. 1996. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de Campinas, Campinas, SP. 1996.

Garner, R.J. 1970. *Toxicologia Veterinária*, 3a ed. Ed. Acríbia. Zaragoza. España. 470p.

Hamrick, J. L. Response of forest trees to global environmental change *Forest Ecology and Management*. V. 197, p. 323-335, 2004.

Hamrick, J. L.; Godt, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A. H. D. et al. (Eds) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer: 1990. p.43-63.

IEF - Instituto Estadual de Florestas. Disponível em: <<http://www.ief.mg.gov.br/instituicao/281?task=view>>. Acesso em: 01 de junho de 2011.

Jaeger, P. Caracterização genética e demográfica de populações de *Xylopia emarginata* Mart. (Annonaceae). 2004. 113 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Jain S, Jain R K & McCouch S R, Genetic analysis of Indian aromatic and quality rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using panels of fluorescent-labeled microsatellite markers, *Theor Appl Genet*, 135 (2004) 1198-1205.

Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F.; Donoghue, M. J. **Sistemática Vegetal – Um enfoque filogenético**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

Kageyama, P.Y. Conservação *in situ* de recursos genéticos de plantas. IPEF, n.35, p.7-37, 1987.

Kageyama, P.Y.; Gandara, F. B. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica Ipef**. v. 12, n. 32, p. 65-70. 1998.

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.

Kruskal, J.B. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method, *Psychometrika*, v,29, p,115-129, 1964.

Lei, Y.; Gao, H.; Tsering, T.; Shi, S.; Zhong, Y. Determination of genetic variation in *Rhodiola crenulata* from the Hengduan Mountains Region, China using inter-simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology**, 29, 2, 339-344 (2006).

Loveless, M. D.; L. Hamrick. 1984 Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 65–95.

Mainieri, C.; Chimelo, J.P. Fichas de características das madeiras brasileiras, (publicação IPT 1791) Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo. 1989.

Martins, K.; Santos, J. D., Gaiotto, F. A.; Moreno, M. A.; Kageyama, P. Y. Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinioideae) em fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, n.1, p.61-69, jan.-mar. 2008.

Mayle, F. E. The late quaternary biogeographical history of South American seasonally dry tropical forests: insights from paleoecological data. In: *Neotropical savannas and seasonally*

dry forests: plants diversity. Biogeography and Conservation. Pennington, T. R.; Lewis, G. P.; Ratter, J. A. (eds). Tayler & Francis. London. 2006. pp. 395-416.

Melo, R.R.; Cunha, M.C.; Júnior, F.R.; Stangerlin, D.M. Crescimento inicial de mudas de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong, sob diferentes níveis de luminosidade, Revista Brasileira de Ciências Agrárias v,3, n,2, p,138-144, Recife, PE, UFRPE, 2008.

Melo-Júnior, A. F.; Carvalho, D.; Póvoa, J. S. R.; Bearzoti, E. Estrutura genética de populações naturais de pequiheiro (*Caryocar brasiliensis* Camb.) **Scientia Florestalis**. n. 66, p. 56-65, 2004.

Mendonça, E. G. **Análise da diversidade genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. Por marcadores RAPD em populações de mata ciliar**. 2006. 67p. Monografia (Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 2006.

Miranda, W. A.; Melo, A. A. M.; Figueiredo, F.P.; Oliveira, F.G. A importância do uso do SIG e da análise morfométrica para o plano de manejo em unidades de conservação. In: **Anais XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR**, Curitiba, PR, Brasil, 30 de abril a 05 de maio de 2011, INPE p. 1525 – 1531.

Moraes, P. L. R. & Derbyshire, M. T. V. C. Estrutura genética de populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* mez (Lauraceae) através de marcadores isoenzimáticos. **Biota Neotropica** v.2; n.2; 2002.

Moraes, P.L.R. Estrutura genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees & Martius EX Nees (Lauraceae). Piracicaba, 1997. 177p. tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo.

Moura, E. F. Divergência genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*). 2003. 75 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Moura, M. C. O. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish por isoenzimas e RAPD.** 2005. 165p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 2005.

Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the Natural Academy of Science**, Washington, v.70, p.3321-3323, 1973.

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

Nei, M. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 106: 283-292. 1972.

Nei, M., T. Marayuma and R. Chakraborty. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29:1-10.

Neto, M. C. **Efeito do manejo na diversidade genética de populações naturais de *Tabebuia cassinoides* Lam (DC), por marcadores isoenzimáticos.** 2004. 67p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura, ESALQ/USP, Piracicaba, 2004.

O'Brien, G. M. Seasonal reproduction in flying foxes, review in the context of other tropical mammals. *Reproduction, Fertility and Development*. v. 5, p. 499-521, 1993.

Pedagogia Unimontes 2011. Disponível em: <http://6pedagogiaunimontes.blogspot.com/2010/12/surgimento-do-parque-estadual-lapa.html>>. Acesso em julho de 2011.

Pedralli, G. 1997. As florestas Secas sob afloramento de calcário: florística e fisionomia. **Bios** 5: 81-89.

Pennington, T. R.; Prado, D. E.; Coling, A.; Pendry. Neotropical seasonally dry forest and quaternary vegetation changes. **Journal of biogeography**, 27, p 261-273. 2000.

Pereira, B. A. S.; Mecnas, V. V.; Leite, F. Q. & Cardoso, E. S. 1996. **APA da Cafuringa: o retrato do cerrado.** Paralelo 15 editores, Brasília.

Perry, M.C.; McIntosh, M.S. Geographical patterns of variation in the USDA soybean germplasm collection: I. Morphological traits. **Crop Science**, v.31, p.1350-1355, 1991.

Póvoa, J. S. R. Distribuição da variação genética de *Cedrela fissilis* Vell., em fragmentos florestais, no sul de Minas Gerais, por meio de isoenzimas. 2002. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 2002.

Prado, D. E.; Gibbs, P. E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forest South America. **Annals of the Missouri Botanic Garden** 80:902-927. 1993.

Ramos, P. C. M. 1989. **Estudos fitossociológicos em uma floresta mesofítica semidecídua na Fercal, Brasília - DF**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília.

Reddy, M. P.; Sarla, N.; Siddiq, E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, Kluwer Academic Publishers Printed in the Netherlands. 128: 9-17.

Rede de sementes do cerrado, Disponível em: <[http://www.rededesementesdocerrado.com.br/Especies/Leguminosae\\_3904/Enterolobium/index.html](http://www.rededesementesdocerrado.com.br/Especies/Leguminosae_3904/Enterolobium/index.html)> Acesso em: 01 de junho de 2011.

Reis, A. M. M. **Distribuição da diversidade genética em aroeira (*Myracrodruon urudeuva*–Anacardiaceae) por marcadores RAPD e polimorfismo de seqüência de cpDNA**. 1999. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

Reis, C. A. F; Souza, A. M.; Mendonça, E. G. Gonçalves, F. R.; Melo, R. M.; Carvalho, D. Diversidade e estrutura genética espacial de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) em uma floresta paludosa. *R. Árvore*, Viçosa-MG, v.33, n.2, p.265-275, 2009.

Reis, S. R. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmitero (*Euterpe edulis* Martius). Piracicaba, 1996. 2010p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Ribas, L.A.; Kageyama, P.Y. Diversidade e estrutura genética em populações naturais de *Trema micrantha* Trec. Scientia Forestalis, Piracicaba, n.66, p.1-20, 2004.

Ribeiro, J. F. & Walter, B. M. T. 1998. Fitofisionomias do bioma cerrado. pp. 85-166. In: **Cerrado: ambiente e flora**. EMBRAPA-CPAC, Planaltina.

Rice, W. R. Analyzing tables of statistical test. Evolution, Washigton, v.43, p.223-225, 1989.

Rizzini, C. T. 1979. **Tratado de fitogeografia do Brasil**. Hucitec, São Paulo.

Rodrigues, J. F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccínea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. 2010. 81p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura, ESALQ/USP, Piracicaba, 2010.

Ruschel, A. R.; Nodari, R. O.; Moerschbacher, B. M. The Genetic Structure of *Sorocea bonplandii* in Southern Brazilian Forest Fragments: AFLP Diversity. *Silvae Genetica* 56, 2 (2007).

Sánchez- Azofeifa, G. A.; Kalacska, M.; Calvo-Alvarado, J. C.; Nassar, J. M.; rodriguez, J. P. Need for integrated research for a sustainable future in tropical dry forests. **Conservation biology** v.19, n.2, p 285-286. 2005

Sebbenn, A. M. **Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) a partir de isoenzimas**. 1997. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

Seoane, C. E. S.; Kageyama, P. Y.; Ribeiro, A.; Matias, R.; Reis, M. S.; Bawa, K.; Sebbenn, A. M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 25-43, jun. 2005.

Seoane; C. E. S.; Kageyama, P. Y.; Sebbenn, A. M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Forestalis** n. 57, p. 123-139, jun. 2000.

Silva, L. A.; Scariot, A. Composição florística e estrutura da comunidade arbórea em uma floresta estacional decidual em afloramento calcário (Fazenda São José, São Domingos, GO, Bacia do Rio Paranã). *Acta bot. bras.* 17(2): 305-313. 2003.

Slatkin, M. (1985) Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16:393-430.

Slatkin, M. (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787-792.

Sork, V. L., J. Nason, D. R. Campbell & J. F. Fernández. 1999. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends in Ecology and Evolution* 14:224.

Souza, H. A. V. **Análise comparativa da diversidade genética em duas espécies de faveiro: *Dimorphandra wilsonii*, ameaçada de extinção, e *D. mollis*. Implicações para conservação e manejo.** 2008. 42p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, 2008.

Souza, V. C.; Lorenzi, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II.** 2º Edição, Editado por Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, Nova Odessa, São Paulo, 2008. 704pp.

Turner, I.M. 1996. Species loss in fragments of tropical rain forests: a review of the evidence. *Journal of Applied Ecology* 33:200-209.

Van Treuren R, Bulsma R, Ouborg NJ, van Delden (1993) The effects of population size and plant density on outcrossing rates in locally endangered *Salvia pratensis*. *Evolution* 47:1094–1104.



Veloso, A. R.; Nery, C. V. M. Geoprocessamento aplicado à caracterização do Parque da Lapa Grande em Montes Claros/MG. In: Anais XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, Curitiba, PR, Brasil, 30 de abril a 05 de maio de 2011. INPE p. 3711- 3718.

Veloso, H. P.; Rangel Filho, A. L. R. & Lima, J. C. A. 1991. **Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal**. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro.

Ward, M.; Dick, C. W.; Gribel, R.; Lemes, M.; Caron, H.; Lowe, A. J. To self, or not to selfy... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. **Heredity**, London, v.95, n.4, p.246-254, 2005.

Whitmore, T.C. 1980. The conservation of tropical rain forest. In Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective (M.E. Soulé & B.A. Wilcox, eds.). Sinauer Associates, Sunderland, p.303-318.

Wolff, K.; Zietkiewicz, E.; Hofstra, H. 1995. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. *Theor Appl Genet* 91: 439-447.

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

Yeh, F.C.; Yang, R.; Boyle, T. *POPGENE Version 1.31*: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Alberta: University of Alberta and Centre for International Forestry Research, 1999.

Young, A. G.; Boyle, T. J. Forest fragmentation. In: Young, A. G., Boshier, D.; Boyle, T. J. Forest conservation genetics: principles and practice. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000. p. 123-134.

Young, A.; Boyle, T.; Brown, T. The population genetic consequences of habitats fragmentation for plants. **Tree**, v. 11, n. 10, p.413-418, 1996.

Yun, R. et al. Study on DNA diversity of Liaodong populations at Dongling mountain region. **Acta Botanica Sinica**, v.40, p.169-175, 1998.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176–183.

Zimback, L.; Mori, E.S.; Kageyama, P.Y.; Veiga, R.F.A.; Mello Júnior, J.R.S. Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) por marcadores RAPD. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, n.65, p.114-119, 2004.

Zucchi, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC. utilizando marcadores moleculares RAPD e SSR.** 2002. 130p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura, ESALQ/USP, Piracicaba, 2002.