

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL**  
**Curso de Mestrado em Genética**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES**  
**DE *PLATHYMENIA RETICULATA* E *P. FOLIOLOSA***  
**(VINHÁTICO DO CAMPO E VINHÁTICO DA MATA) E**  
**DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DAS DUAS ESPÉCIES**

**Daniela Rodrigues Lacerda**  
**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Maria Bernadete Lovato**

**Belo Horizonte**  
**2000**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Daniela Rodrigues Lacerda**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES  
DE *PLATHYMENIA RETICULATA* E *P. FOLIOLOSA*  
(VINHÁTICO DO CAMPO E VINHÁTICO DA MATA) E  
DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DAS DUAS ESPÉCIES**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Maria Bernadete Lovato

**Belo Horizonte**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**2000**

043 Lacerda, Daniela Rodrigues  
L131d Diversidade e estrutura genética de populações de *Plathymenia reticulata* e *P. foliolosa* (vinhático do campo e vinhático da mata) e diferenciação molecular das duas espécies. / Daniela Rodrigues  
T Lacerda. – Belo Horizonte: UFMG / ICB, 2000.  
70 f.: il., graf., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral.

1. Genética de populações – Teses. 2. Plantas tropicais – Teses.  
3. *Plathymenia* – Teses. 4. Marcadores genéticos – Teses. 5.  
Genética ecológica – Teses. I. Título

Dissertação defendida e aprovada, em 25 de fevereiro de 2000, pela banca examinadora constituída pelos professores:

---

Prof<sup>ª</sup>. Maria Bernadete Lovato – Orientadora

---

Prof<sup>ª</sup>. Cleusa Graça da Fonseca

---

Dr. Edilson Paiva

*Mãe, pai e Breno, com amor*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Maria Bernadete Lovato, por sua amizade, estímulo e principalmente pela confiança em mim depositada desde o começo;

Ao Prof. José Pires de Lemos Filho por suas valiosas sugestões e imprescindível ajuda nos trabalhos de coleta;

À Prof<sup>ª</sup>. Maria Dolores P. Acedo por sua amizade, críticas, esclarecimentos e sugestões e por manter as portas de seu laboratório e de sua sala sempre abertas para todos os que precisam de uma boa conversa, uma boa ouvinte e bons conselhos;

À Prof<sup>ª</sup>. Cleusa Graça da Fonseca por sua dedicação ao nosso curso de Mestrado em Genética, por sua amizade, interesse constante e sugestões;

Ao Prof. Fabrício Rodrigues dos Santos, ao Eduardo Tarazona Santos, ao Adriano Paglia e ao Sérgio Ribeiro pela paciência e pelo tempo em que se dispuseram a me ajudar na utilização de diversos programas de análise estatística;

À Marlene por sua eficiente ajuda no preparo de soluções e na manutenção da ordem no laboratório, e à Rosângela por me guiar nas minhas primeiras incursões pelo “complicado” mundo da extração de DNA de plantas;

À Marina pela dedicação, eficiência e boa vontade com que conduz nossa Secretaria de Pós-Graduação e soluciona os problemas que vão surgindo pelo caminho;

Ao pessoal do Laboratório de Micologia (Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG), especialmente à Prof<sup>ª</sup>. Maria Aparecida de Resende, à Raquel B. Caligiorne e ao Henrique M. Valério, e ao pessoal do Laboratório de Genética Bioquímica (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG), especialmente à Prof<sup>ª</sup>. Glória Regina Franco, à Neusa e demais pessoas que permitiram o uso da *Polaroid* e ajudaram a fotografar meu material;

Ao pessoal do Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA–CNPMS, especialmente ao Edilson Paiva, à Maria José V. de Vasconcelos e ao José Edson F. Figueiredo, pela prontidão com que atenderam ao nosso pedido de ajuda e imediatamente disponibilizaram pessoal, material e laboratório para que pudéssemos realizar alguns testes iniciais; à Flávia

F. Teixeira, ao Miguel, ao Ubiraci e demais pessoas da equipe pela gentileza com que se dispuseram a ajudar;

À Mannesmann Florestal Ltda. que, representada por Guilherme Dias de Freitas e Helder B. Andrade, viabilizou a coleta de material em uma das fazendas da empresa e patrocinou minha participação no 45º Congresso Nacional de Genética;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do trabalho;

À minha mãe por seu amor, carinho, compreensão e apoio que me permitiram atravessar o primeiro ano do curso, ao meu pai por todos os bons conselhos que não gosta de dar e ao Breno por seu estímulo constante e por estar ao meu lado em todos os momentos;

À Deus por guiar meus passos, iluminar meu caminho, orientar minhas escolhas e me permitir alcançar meus objetivos.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
<i>ABSTRACT</i> .....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Estrutura e diversidade genética de plantas.....	4
2.2 Fragmentação de habitats.....	6
2.3 As espécies estudadas.....	8
2.4 A técnica de RAPD.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Amostragem populacional.....	17
3.2 Extração de DNA.....	19
3.3 Reação de PCR.....	21
3.4 Estudo piloto: seleção de <i>primers</i> .....	22
3.5 Análises estatísticas.....	22
4 RESULTADOS.....	25
4.1 Padrões gerais de variação dos marcadores RAPD para <i>P. reticulata</i> e <i>P. foliolosa</i> .....	25
4.2 Diversidade genética dentro e entre populações de <i>P. reticulata</i> e <i>P. foliolosa</i> .....	30
4.3 Diferenciação genética entre <i>P. reticulata</i> e <i>P. foliolosa</i> .....	41
5 DISCUSSÃO.....	46
5.1 Diversidade e estrutura genética de populações de <i>P. reticulata</i> e <i>P. foliolosa</i> .....	46
5.2 Diferenciação de <i>P. reticulata</i> e <i>P. foliolosa</i> .....	52
5.3 Implicações para a conservação das duas espécies.....	54
6 CONCLUSÕES.....	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

## LISTA DE FIGURAS

1 – Indivíduo adulto de <i>P. reticulata</i> .....	12
2 – Indivíduo adulto de <i>P. foliolosa</i> .....	12
3 – Mapa de Minas Gerais com a localização aproximada de cada uma das seis populações de <i>P. reticulata</i> e das quatro populações de <i>P. foliolosa</i> .....	18
4 – Perfis de amplificação com o <i>primer</i> OPA-2.....	27
5 – Perfis de amplificação com o <i>primer</i> OPA-4.....	27
6 – Perfis de amplificação com o <i>primer</i> OPA-18.....	28
7 – Análise Discriminante das seis populações de <i>P. reticulata</i> (a) e das quatro populações de <i>P. foliolosa</i> (b).....	40
8 – Gráficos mostrando, para cada <i>primer</i> , a proporção da variação atribuída à diferenças entre as espécies, entre populações de cada espécie e entre indivíduos dentro de populações.....	42
9 – Análise Discriminante das dez populações estudadas, considerando as duas espécies.....	44
10 – Dendograma construído pelo método de <i>neighbor-joining</i> a partir dos valores de $\phi_{ST}$ entre as seis populações de <i>P. reticulata</i> (SC, FU, GO, FX1, FX2 e SL) e as quatro populações de <i>P. foliolosa</i> (RD, MA, CA e NE).....	45

## LISTA DE TABELAS

1 – Locais de coleta, número de indivíduos analisados, tipo de vegetação predominante no local e localização aproximada das seis populações de <i>P. reticulata</i> e das quatro populações de <i>P. foliolosa</i> utilizadas neste estudo.....	19
2 – <i>Primers</i> selecionados, suas sequências de nucleotídeos e faixa de tamanho das bandas produzidas.....	26
3 – Bandas exclusivas, espécie-específicas e monomórficas para <i>P. reticulata</i> e <i>P. foliolosa</i> produzidas pelos dez <i>primers</i> selecionados para este estudo.....	29
4 – Número de fenótipos distintos obtidos através de cada um dos dez <i>primers</i> considerando-se as duas espécies e apenas <i>P. reticulata</i> (todas as populações em conjunto e cada uma separadamente).....	31
5 – Número de loci considerados, número de loci polimórficos, total e por população (proporção de loci polimórficos), para as seis populações de <i>P. reticulata</i> , considerando-se os dez <i>primers</i> selecionados.....	32
6 – Número de loci considerados, número de loci polimórficos, total e por população (proporção de loci polimórficos), para as quatro populações de <i>P. foliolosa</i> , considerando-se os dez <i>primers</i> selecionados.....	32
7 – Estimativas de índice de Shannon de diversidade fenotípica ( $H_0$ ) e subdivisão da diversidade dentro e entre as seis populações de <i>P. reticulata</i> para os dez <i>primers</i> usados neste estudo.....	33
8 – Estimativas de índice de Shannon de diversidade fenotípica ( $H_0$ ) e subdivisão da diversidade dentro e entre as quatro populações de <i>P. foliolosa</i> para os dez <i>primers</i> usados neste estudo.....	34
9 – Estimativas de variação dentro de populações, calculadas pela AMOVA e pelo índice de diversidade de Shannon, <i>ranking</i> dos valores de diversidade e variância dentro de populações (calculada pela AMOVA) para as seis populações de <i>P. reticulata</i> e para as quatro populações de <i>P. foliolosa</i> .....	36
10 – Análise de variância molecular (AMOVA) para os 139 indivíduos das dez populações de <i>P. reticulata</i> e <i>P. foliolosa</i> , avaliadas em conjunto e separadamente....	37
11 – Valores de $\phi_{ST}$ calculados para cada um dos pares de populações (hemimatriz inferior) e número de migrantes ( $Nm$ ) entre populações dentro de espécies calculado a partir dos valores de $\phi_{ST}$ (hemimatriz superior).....	39

## RESUMO

*Plathymenia reticulata* (vinhático do campo) e *P. foliolosa* (vinhático da mata) são duas espécies arbóreas tropicais encontradas, respectivamente, em áreas de Cerrado e Mata Atlântica, dois biomas extremamente ameaçados pela ação antrópica. As duas espécies apresentam madeira de excelente qualidade e potencial para regeneração de áreas degradadas e apesar de sua importância, muito pouco se sabe quanto aos seus aspectos genéticos ou ecológicos. A grande semelhança morfológica dificulta bastante a identificação de indivíduos das duas espécies, principalmente a partir de coleções de herbário. Marcadores moleculares do tipo RAPD foram utilizados para investigar a diversidade e a estrutura genética de seis populações de *P. reticulata* ( $n=117$ ) e quatro populações de *P. foliolosa* ( $n=22$ ) e ainda para diferenciar as duas espécies ao nível molecular. Através da utilização de dez *primers* foram obtidos 84 marcadores para as duas espécies, 72 marcadores para *P. reticulata*, sendo 51 (70,8%) polimórficos e 74 marcadores para *P. foliolosa*, sendo 48 (64,9%) polimórficos. Os marcadores polimórficos permitiram determinar 139 perfis de amplificação únicos, não havendo portanto dois indivíduos iguais. A análise de variância molecular (AMOVA) e o índice de diversidade de Shannon foram utilizados para a determinação dos níveis de diversidade genética dentro e entre populações. Para as duas espécies, a maior parte da variação genética foi atribuída à diferenças entre indivíduos dentro de populações. Os níveis de diversidade genética intrapopulacional foram em geral maiores para as populações de *P. reticulata*. Entretanto, uma das populações de *P. foliolosa* se mostrou a mais variável para todos os índices considerados. A AMOVA indicou que, para *P. reticulata*, 12,3% da variação genética foi atribuída à diferenças entre populações, enquanto para *P. foliolosa* essa proporção foi de 33,7%. O número de migrantes ( $Nm$ ) estimado entre as populações está de acordo com esta estrutura genética, havendo um fluxo gênico maior entre as populações de *P. reticulata* do que entre as populações de *P. foliolosa*. Alguns *primers* utilizados produziram marcadores que claramente permitem diferenciar as duas espécies e a AMOVA indicou que cerca de 60% da variação genética encontrada poderia ser atribuída à diferenças entre as espécies. Uma das populações analisadas de *P. foliolosa*, situada em uma região onde as duas espécies co-ocorrem, apresentou diversos marcadores típicos de *P. reticulata*, sugerindo a possível ocorrência de fluxo gênico entre as duas espécies. Neste trabalho serão discutidas hipóteses para explicar a estrutura genética das populações e a história evolutiva das duas espécies.

## **ABSTRACT**

*Plathymenia reticulata* (vinhático do campo) e *P. foliolosa* (vinhático da mata) are two tropical woody trees native to the Brazilian Cerrado and the Atlantic Forest of Brazil, respectively, two ecosystems that are extremely endangered by extensive human impact. The wood from both species is of very high quality and both can be used for the recovery of degraded forest regions. Despite their importance little is known about their ecological or genetic traits. *P. reticulata* and *P. foliolosa* have many very similar morphological characteristics and it is difficult to separate the two species from herbarium specimens. RAPD markers were used to assess the genetic variation and structure in six populations of *P. reticulata* ( $n=117$ ) and four populations of *P. foliolosa* ( $n=22$ ) and to characterize the two species at the molecular level. Ten different primers provided 84 reliable markers for the two species, 72 markers for *P. reticulata* of which 51 (70.8%) were polymorphic, and 74 markers for *P. foliolosa* of which 48 (64.9%) were polymorphic. Those polymorphic markers allowed 139 RAPD phenotypes to be distinguished, i.e. every tree had a unique multiband phenotype. The analysis of molecular variance (AMOVA) and the Shannon's index of diversity were used to determine the levels of genetic diversity within and among populations. For both species, most of the variation occurred between individuals within populations. The levels of intrapopulation variability were higher for the populations of *P. reticulata*. However, one of the populations of *P. foliolosa* exhibited the highest levels of within population diversity for all the considered parameters. The AMOVA indicated that the among-population component accounted for 12.3% of the overall variation in *P. reticulata* and 33.7% in *P. foliolosa*. The effective number of migrants ( $Nm$ ) is in agreement with the genetic structure estimated, the gene flow between *P. reticulata* populations being higher than that between *P. foliolosa* populations. Some primers generated amplification products which clearly discriminates between *P. reticulata* and *P. foliolosa* and the AMOVA indicated that 60% of the genetic variation was attributable to species differences. One of the analysed populations of *P. foliolosa*, located in a region where the two species co-occur, showed many markers that were characteristic for *P. reticulata*, suggesting the occurrence of gene flow between the two species. In this study some hypothesis will be discussed to explain the genetic structure of the populations and the evolutionary history of both species.

## 1 INTRODUÇÃO

A Biologia da Conservação é uma área multidisciplinar que vem recebendo atenção cada vez maior nos últimos anos. A crescente destruição de ecossistemas pela ação do homem visando, na maioria das vezes, a expansão das fronteiras agrícolas ou a exploração de espécies arbóreas nativas para produção de madeira ou outros subprodutos (Stuart e Heywood, 1992; Chatelain *et al.*, 1996) tem promovido a crescente demanda por informações científicas oriundas desta área. Estudos ecológicos, demográficos e genéticos são as principais ferramentas utilizadas para determinar as prioridades de conservação de populações de plantas e animais silvestres.

Especial atenção tem sido dada aos estudos no campo da Genética de Populações e da Genética da Conservação. É cada vez mais clara a noção de que a preservação de uma espécie passa obrigatoriamente pela preservação da diversidade genética. Somente apresentando variação genética uma espécie tem condições de responder às pressões do ambiente, evoluir e sobreviver à longo prazo (Holsinger e Gottlieb, 1991; Frankham, 1996; Godt *et al.*, 1996). Godt *et al.* (1997) destacam que, embora haja alguns exemplos de espécies sobrevivendo por várias gerações com baixos níveis de variação genética, a ausência de variação normalmente representa maior dificuldade de adaptação às mudanças do ambiente aumentando, portanto, as chances de extinção de uma espécie. Assim, a determinação dos níveis de variação genética e de como esta variação está distribuída dentro e entre populações é fundamental não apenas para o delineamento de estratégias de conservação *in situ* e *ex situ* (Holsinger e Gottlieb, 1991; Rossetto *et al.*, 1995; Morden e Loeffler, 1999), como também para o estabelecimento de formas de utilização racional das populações naturais de plantas (Reis, 1996), uma vez que a exploração econômica de uma espécie depende de seleção e melhoramento genético, processos possíveis somente se existir suficiente variação genética no conjunto gênico da espécie (Chalmers *et al.*, 1992).

Os estudos na área de Genética de Populações, através do uso de marcadores genéticos como RAPD e isoenzimas, têm permitido estabelecer os padrões de variação genética dentro e entre as populações naturais. A partir dos conhecimentos adquiridos é possível fazer inferências sobre importantes parâmetros da biologia dessas espécies, como sistema de cruzamentos, fluxo gênico e tamanho efetivo populacional (Milligan *et al.*, 1994). Além disso, o uso de marcadores moleculares muitas vezes permite inferir sobre

processos históricos que modularam a estrutura genética da espécie (Palacios e Gonzáles-Candelas, 1997).

A determinação das consequências da redução e do isolamento das populações decorrentes da fragmentação de habitats, uma realidade dos dias de hoje que ocorre em todas as partes do mundo, também têm merecido grande atenção. Entretanto, muito pouco se sabe a respeito das consequências que essa modificação do habitat pode trazer à estrutura genética de populações de plantas (Young *et al.*, 1996; Aldrich *et al.*, 1998). Considerando-se que é pouco provável que haja uma redução significativa da intervenção do homem sobre a natureza, populações fragmentadas continuarão surgindo a cada dia, portanto, é preciso conhecer e prever as possíveis consequências desta alteração do ambiente as populações naturais. Dessa forma poderão ser desenvolvidas estratégias criativas de conservação e exploração a fim de prevenir prejuízos maiores à espécie como um todo (Shaffer, 1995; Turner e Corlett, 1996).

Nos últimos anos, têm sido conduzidos diversos estudos sobre espécies arbóreas, com especial atenção para os níveis de variação genética (Newton *et al.*, 1999). É possível encontrar vários trabalhos sobre espécies de plantas de clima temperado, mas pouco tem sido publicado sobre espécies tropicais (Nason *et al.*, 1997). Na verdade, Turner e Corlett (1996) estimam que a diversidade biológica nas áreas tropicais é tão ampla que grande parte das espécies de plantas e animais não tem ainda uma classificação taxonômica definida. Apesar da maior parte dos estudos genéticos realizados com arbóreas ser feito apenas em espécies de interesse comercial, Carvalho (1994) afirma que a escassa literatura disponível não permite a conservação e o aproveitamento de todo o potencial de determinadas espécies tropicais.

*Plathymenia reticulata* Benth. e *Plathymenia foliolosa* Benth. (Leguminosae) são duas espécies arbóreas tropicais avaliadas neste estudo. Essas duas espécies pertencem a dois biomas bastante diferentes, porém igualmente importantes do ponto de vista da biodiversidade e igualmente ameaçados. A primeira é uma espécie típica de Cerrado enquanto a outra aparece principalmente em fragmentos de Mata Atlântica. Estes dois biomas foram recentemente incluídos em uma lista da Organização Não-Governamental (ONG) *Conservation International* que aponta os 25 *hotspots* de conservação mundial, ou seja, os 25 ecossistemas mais ameaçados do planeta necessitando de medidas urgentes para sua preservação (Mittermeier *et al.*, 1999).

Apesar dos esforços internacionais no sentido de preservar esses dois biomas, o desmatamento e as queimadas para a formação de pastagens ou para o plantio de monoculturas e a exploração extrativista de espécies continuam em ritmo acelerado. É evidente que não se pode calcular o que isso pode representar para as futuras gerações. Sabe-se apenas que muitas das populações ou espécies que desaparecem levam consigo genes que poderiam representar avanços importantes nas áreas de medicina, agricultura, seleção e melhoramento genético de plantas e animais (Schaal *et al.*, 1991).

Algumas publicações recentes têm procurado criar alternativas para o manejo sustentado das florestas tropicais (Reis, 1996; Bawa e Seidler, 1998). A idéia central se baseia na exploração racional de espécies ao mesmo tempo garantindo a manutenção de alguns indivíduos no ambiente, permitindo a renovação das populações. Montagnini *et al.* (1995) e Bawa e Seidler (1998) sugerem ainda a urgente necessidade de se recuperar as áreas degradadas, permitindo o reaproveitamento destas e evitando assim que sejam formadas novas áreas para exploração econômica. As duas espécies avaliadas neste estudo, além de serem passíveis de exploração comercial pela alta qualidade de sua madeira, são consideradas bastante eficientes na tarefa de recuperação do solo (Lorenzi, 1992; Montagnini *et al.*, 1995; Almeida *et al.*, 1998).

A escassa literatura disponível sobre a genética de arbóreas tropicais e a importância das espécies *P. reticulata* e *P. foliolosa* evidenciam a necessidade de mais estudos nessa área. O presente trabalho tem, portanto, os seguintes objetivos:

- avaliar os níveis de variação genética existentes dentro e entre populações naturais de *Plathymenia reticulata* e *P. foliolosa* através de marcadores moleculares do tipo RAPD, procurando avaliar os possíveis efeitos da fragmentação de habitats sobre a estrutura genética destas populações e colaborando para o entendimento da estrutura genética de arbóreas tropicais;
- contribuir para a biosistemática e para o entendimento da evolução dessas duas espécies.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Estrutura e diversidade genética de plantas

A variação genética em populações naturais apresenta-se estruturada no tempo e no espaço, sendo profundamente influenciada por fatores históricos e pela biologia da espécie (Loveless e Hamrick, 1984). Hamrick e Godt (1989), em uma das revisões mais citadas e mais completas sobre a estrutura genética de plantas, estabeleceram diversas características das espécies que contribuem para a determinação dos níveis de variação genética dentro e entre populações. Forma de vida da planta, distribuição geográfica, sistema de cruzamento e de dispersão de pólen e sementes foram alguns dos critérios utilizados para agrupar as espécies estudadas em diferentes categorias e assim estabelecer associações entre história de vida e biologia com os padrões de diversidade genética encontrados. É importante ressaltar, entretanto, que as oito características consideradas por Hamrick e Godt (1989) explicam cerca de 25% da variação dentro de espécies e dentro de populações e 47% da variação entre populações, indicando que, apesar de muitas das associações feitas pelos autores serem válidas e estatisticamente significativas, boa parte da variação genética encontrada permanece não esclarecida (Newton *et al.*, 1999).

Todos os estudos considerados por Hamrick e Godt (1989) foram feitos através de marcadores isoenzimáticos e diversos parâmetros genéticos, como porcentagem de loci polimórficos, número de alelos por locus, diversidade genética dentro e entre populações, foram determinados para espécies e para populações. A partir destes dados, os autores puderam então fazer algumas generalizações que frequentemente servem de padrão para comparações com dados obtidos em outras espécies de plantas e através de outras metodologias além de isoenzimas, como RAPD, RFLP e microsátélites. Uma conclusão importante, obtida a partir deste estudo, é que a diversidade genética calculada para populações reflete, de forma bastante precisa, a diversidade existente ao nível da espécie.

Para espécies de plantas, de uma maneira geral, Hamrick e Godt (1989) determinaram que, em média, 50% dos loci isoenzimáticos analisados são polimórficos. Além disso, a diversidade gênica média (heterozigosidade) fica em torno de 0,150 sendo a maior parte da variação mantida dentro de populações (78%). Espécies de ampla distribuição geográfica, de vida longa, que se reproduzem principalmente por fecundação

cruzada e cujas sementes são dispersas fundamentalmente por animais, tendem a apresentar maiores níveis de variação genética. As diferenças entre os níveis de variação de espécies tropicais e de clima temperado não são significativas.

Em nível intrapopulacional, Hamrick e Godt (1989) concluíram que o sistema de cruzamento e a distribuição geográfica são os fatores mais importantes na determinação dos níveis de variação genética. Mais uma vez, espécies de ampla distribuição geográfica e de reprodução mista ou cruzada, com polinização pelo vento, apresentam populações com maior proporção de loci polimórficos (43–54,4%) e com maiores níveis de diversidade gênica (0,148–0,198). É interessante observar que espécies de reprodução assexuada apresentam praticamente a mesma quantidade de variação genética dentro de populações que espécies de reprodução sexuada. Espécies lenhosas de vida longa também tendem a apresentar cerca de 50% de loci polimórficos e elevados níveis de diversidade gênica (0,148).

Ainda segundo Hamrick e Godt (1989), a distribuição geográfica praticamente não representa nenhuma importância em relação aos níveis de variação genética entre populações. Na determinação do  $G_{ST}$  (proporção da diversidade total atribuída a diferenças entre populações), o fator mais importante é, mais uma vez, o sistema de cruzamento da espécie. Espécies de fecundação cruzada ou mista, com dispersão de pólen feita pelo vento, apresentam em média apenas cerca de 10% da variação entre populações, podendo chegar a 20% se a dispersão for promovida principalmente por animais. Por outro lado, espécies que se reproduzem por auto-fecundação apresentam em média 51% da variação entre populações. Apesar desta diferença no  $G_{ST}$  dos dois tipos de espécies, ambas apresentam praticamente o mesmo nível de diversidade genética total. Além disso, espécies de vida longa tendem a apresentar menos de 10% da variação entre populações, enquanto que em espécies de vida curta esta proporção fica em torno de 20% e em espécies anuais 36%.

Hamrick e Loveless (1989) estabeleceram também algumas generalizações para arbóreas tropicais. Segundo os autores, os níveis de variação genética destas espécies tendem a ser iguais ou superiores aos de espécies temperadas. Os valores médios de porcentagem de loci polimórficos (60%) e de heterozigidade (0,211) são superiores aos apresentados por muitas outras angiospermas (31% e 0,113, respectivamente) e superiores também aos apresentados por Hamrick e Godt (1989) para espécies de clima tropical (49% e 0,148, respectivamente). Os autores sugerem que arbóreas tropicais mantêm maiores níveis de variação genética do que outras espécies de angiospermas de porte herbáceo com

mecanismos similares de dispersão de pólen e sementes. De uma maneira geral, pode-se dizer que espécies lenhosas apresentam maiores níveis de variação.

Hamrick e Loveless (1989) estabeleceram ainda que, assim como em muitas espécies de plantas, a maior parte da variação genética em arbóreas tropicais tende a ser mantida dentro de populações com valores de  $G_{ST}$  variando entre 3% e 9% ( $P < 0,01$ ), indicando pouca diferença entre as populações. Reis (1996), Nason *et al.* (1997) e Aldrich *et al.* (1998) concordam com essa afirmação e completam sugerindo que os baixos níveis de variação genética entre populações separadas por quilômetros de distância indicam tamanho de vizinhança grande como típico de muitas arbóreas tropicais. Apesar da grande variação entre espécies, as estimativas do número de migrantes ( $Nm$ ) feitas por Hamrick e Loveless (1989) confirmam esta suposição. Reis (1996) afirma que em espécies tropicais é comum encontrar valores de  $Nm$  superiores a 1,0.

Hamrick e Loveless (1989) destacam ainda que, conhecendo-se os mecanismos de dispersão de pólen e sementes, diversas previsões podem ser feitas quanto a estrutura genética das espécies. As espécies que apresentam maior diversidade entre populações (maior  $G_{ST}$ ) são aquelas cuja polinização é feita pelo vento ou por polinizadores que percorrem curtas distâncias e têm as sementes dispersas de forma “explosiva”. Os autores concordam com trabalhos anteriores que indicam que, em arbóreas tropicais, os animais são os principais responsáveis pela dispersão de pólen e sementes, muitos deles sendo capazes de percorrer longas distâncias. Estudos recentes mostram ainda que a maioria das árvores tropicais, dentre as poucas analisadas, se reproduz principalmente por fecundação cruzada (Bawa, 1990; Nason *et al.*, 1997; Aldrich *et al.*, 1998), o que está de acordo com os baixos níveis de  $G_{ST}$  encontrados por Hamrick e Loveless (1989).

## **2.2 Fragmentação de habitats**

Um dos principais aspectos da ação antrópica sobre as áreas naturais é a fragmentação de habitats, que vem transformando áreas de vegetação contínua em fragmentos menores e isolados em várias regiões do mundo (Foré e Guttman, 1999). Somente a partir da década de 80 é que se iniciaram os primeiros estudos ecológicos enfocando estes fragmentos (Stuart e Heywood, 1992) e as evidências sugerem que, com o passar do tempo, habitats fragmentados tendem a apresentar uma queda na diversidade de espécies de plantas e animais que abrigam (Kattan *et al.*, 1994; Turner, 1996). Entretanto,

pouco se sabe sobre as consequências genéticas da fragmentação em populações de plantas (Turner, 1996; Young *et al.*, 1996; Aldrich *et al.*, 1998).

Aldrich *et al.* (1998) destacam que a teoria e alguns trabalhos já publicados levam a crer que a fragmentação de habitats esteja levando à perda de variação genética em diversas populações de espécies arbóreas, mas a importância relativa de diferentes processos causais tem sido pouco explorada. Não se sabe ao certo como mudanças no tamanho ou no grau de isolamento dos fragmentos afetam as taxas de dispersão de pólen e sementes e nem se conseguiu definir ainda como certas características da planta (como *status* sucessional, forma de crescimento, requisitos ambientais e mecanismos de fluxo gênico) afetam o número de indivíduos dentro dos fragmentos e a subsequente taxa de migração (Nason *et al.*, 1997).

Supõe-se que muitas espécies arbóreas tropicais permaneçam por muitas décadas em áreas fragmentadas apenas em decorrência de sua longevidade (Turner e Corlett, 1996). Aldrich *et al.* (1998) afirmam que esta característica dificulta bastante a realização de estudos sobre estrutura genética de espécies arbóreas pré e pós-fragmentação. Como muitos dos espécimes adultos localizados em fragmentos já estavam nestas áreas quando elas ainda eram contínuas, estudos feitos a partir destes indivíduos irão revelar mais sobre a estrutura genética pré-existente do que sobre os efeitos da fragmentação. Os autores destacam que essa é de qualquer forma uma informação importante, pois permite prever e entender as trajetórias a serem seguidas pelas populações daí em diante.

Nason *et al.* (1997) fazem algumas considerações interessantes a esse respeito. Segundo os autores se os fragmentos formados são maiores do que as áreas de vizinhança existentes anteriormente, a variação genética tende a ser maior dentro dos fragmentos do que entre, e a manutenção dessa estrutura irá depender principalmente das taxas de migração *versus* extinção e recolonização e da correlação genética entre os indivíduos migrantes. Por outro lado, se os fragmentos são menores que as áreas de vizinhança anteriores a perturbação, a variação genética entre os fragmentos tende a ser maior do que dentro deles. Aldrich *et al.* (1998) consideram que populações de arbóreas se diferenciam umas das outras, à princípio, somente em função da interação dos fragmentos formados com a estrutura genética pré-existente. Segundo estes autores, mudanças subsequentes nos padrões de dispersão de pólen e sementes exacerbariam as diferenças e somente algumas gerações mais tarde é que seria possível perceber os efeitos da deriva genética, mas essa

não seria realmente necessária para promover a diferenciação entre as populações fragmentadas.

Sobre a redução do tamanho efetivo das populações ( $N_e$ ) decorrente da fragmentação, Nason *et al.* (1997) argumentam que, como a maioria das arbóreas tropicais tende a apresentar baixa densidade populacional, fatalmente ocorrerá uma redução do  $N_e$ . Populações pequenas irão sofrer os efeitos da depressão de endogamia e da deriva de forma bastante pronunciada, tendo como consequência uma diminuição da variação genética e da heterozigosidade dentro das populações e um aumento da variação entre populações. Como muitas arbóreas tropicais se reproduzem principalmente por fecundação cruzada (Hamrick e Loveless, 1989; Bawa, 1990; Nason *et al.*, 1997), é esperado uma alta carga genética nestas espécies, de forma que o aumento da endogamia pode levar à depressão endogâmica e consequente redução da adaptação (*fitness*) destas populações (Alvarez-Buylla *et al.*, 1996). Carga genética se refere ao conjunto de alelos recessivos deletérios da espécie ocultos nos indivíduos heterozigotos (Crow e Kimura, 1970).

O fluxo gênico é um outro fator importante a ser considerado em relação aos efeitos da fragmentação sobre a estrutura e diversidade genética de arbóreas tropicais. Levando-se em conta que a dispersão de pólen e sementes, em muitas destas espécies, é feita principalmente por animais (Bawa, 1990), a integração demográfica e genética entre os diversos fragmentos irá depender, basicamente, da abundância e comportamento dos vetores (Nason *et al.*, 1997). Plantas cuja dispersão de pólen ou sementes ocorre principalmente pelo vento podem apresentar inclusive uma melhora no fluxo gênico entre suas populações, já que a fragmentação pode melhorar a ventilação das áreas e facilitar a dispersão (Nason *et al.*, 1997; Aldrich *et al.*, 1998).

### **2.3 As espécies estudadas**

O gênero *Plathymenia* (família Leguminosae, subfamília Mimosoideae) foi primeiramente descrito por George Bentham em 1842 (Heringer, 1956). Lewis (1987) comenta sobre a existência de duas a quatro espécies do gênero na América do Sul e, de acordo com Goldblatt (1981), as espécies desse gênero apresentam 26 cromossomos ( $2n=26$ ).

*Plathymania reticulata* Benth. recebe os nomes populares de vinhático, vinhático do campo, vinhático do cerrado, vinhático rajado, vinhático orelha-de-macaco, vinhático testa-de-boi, candeia, pau-de-candeia, acende-candeia, amarelinho, amarelo, paricazinho e oiteira (Almeida *et al.*, 1998). A espécie ocorre em áreas de Cerrado e Campo Cerrado desde o Amapá até São Paulo, sendo encontrada em todos os estados da região Centro-Oeste (Almeida *et al.*, 1998). Heringer e Ferreira (1972) afirmam que *P. reticulata* pode ser considerada uma espécie que se adaptou à ecologia do cerrado e da caatinga. Trata-se de uma planta decídua e heliófita (Lorenzi, 1992), aparecendo normalmente em agrupamentos de densidades moderadas, variando de 2 até 24 indivíduos/ha (Almeida *et al.*, 1998). Miranda (1999), realizando um estudo sobre a fenologia da espécie, determina o período de floração como sendo de setembro até dezembro e o de frutificação entre outubro e abril. A árvore adulta pode atingir de 6 a 12 metros de altura com diâmetro do tronco variando entre 30 e 50 cm (Figura 1). A casca do tronco apresenta-se profundamente sulcada, com aspecto bastante característico. *P. reticulata* apresenta folhas compostas, bipinadas, com 4 a 8 pares de pinas opostas e 10 a 15 folíolos por pina (Miranda, 1999). A inflorescência apresenta aproximadamente 100 flores com cerca de 6 mm de comprimento (Almeida *et al.*, 1998). As pétalas e estames são de coloração esbranquiçada a creme. Os frutos são do tipo legume deiscente com 12 a 20 cm de comprimento por 2 cm de largura, apresentado 10 a 18 sementes envolvidas por um pergaminho destacável de cor palha (Miranda, 1999). Quando maduros abrem-se proporcionando a dispersão pelo vento (anemocoria) (Heringer e Ferreira, 1972), apresentando-se a planta nesta época completamente destituída de folhagem. Antônio Rodrigues de Miranda (EMBRAPA - CENARGEN, comunicação pessoal) observou um grande número de abelhas visitando as flores de *P. reticulata* durante seus trabalhos de coleta, sugerindo que a polinização talvez seja feita principalmente por estes insetos.

A árvore adulta é usada em ornamentação e paisagismo (Almeida *et al.*, 1998). É uma planta pioneira e, sendo adaptada a terrenos pobres, é ótima para plantios mistos destinados à recomposição de áreas degradadas (Lorenzi, 1992). Heringer e Ferreira (1972) consideraram *P. reticulata* uma das espécies nacionais mais indicadas para o reflorestamento do cerrado. Imaña-Encinas *et al.* (1995), ao realizarem um estudo fitossociológico em áreas de cerrado de uma propriedade particular no estado do Maranhão, estabeleceram esta espécie como uma das mais importantes sob o aspecto silvicultural e ecológico, usando como critérios de avaliação a posição fitossociológica e o

índice do valor de importância de 41 espécies desta área. A madeira, além de apresentar excelente qualidade para utilização na construção civil e naval, mobiliário fino, forros, tábuas para assoalhos, tacos e portas (Almeida *et al.*, 1998), é extremamente resistente ao fogo e ao ataque de fungos e cupins, sendo este um dos motivos pelos quais é intensamente utilizada na confecção de postes (mourões) para cercas de arame (Heringer e Ferreira, 1972). A casca retirada do tronco da planta fornece tinta amarela usada para a coloração de fios de algodão (Mirandola Filho e Mirandola, citado por Almeida *et al.*, 1998) e apresenta propriedades medicinais, sendo muito usada como cicatrizante nas zonas rurais dos estados onde ocorre (Miranda, 1999). Por todas as suas qualidades e possibilidade real de aproveitamento econômico, *P. reticulata* foi recentemente incluída em uma publicação da EMBRAPA que lista 110 espécies de Cerrado consideradas úteis sob este aspecto (Almeida *et al.*, 1998). A intensa ação antrópica sobre as áreas de Cerrado desde meados deste século e a própria exploração intensiva e extrativista da espécie têm deixado muitas vezes algumas populações bastante pequenas e fragmentadas.

*Plathymenia foliolosa* Benth. recebe muitos dos nomes populares citados para *P. reticulata*, sendo mais frequentemente conhecida como vinhático da mata. Esta árvore pode ser encontrada em toda a região Sudeste até o estado de Pernambuco, ocorrendo principalmente em áreas de floresta pluvial atlântica nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Lorenzi, 1992). Trata-se também de uma planta decídua e heliófita. A floração ocorre entre os meses de novembro e dezembro e a frutificação de julho a agosto (Lorenzi, 1992). A planta adulta pode atingir de 15 até 30 metros de altura com diâmetro do tronco variando entre 40 e 70 cm (Lorenzi, 1992), podendo atingir até 1,20 m (Heringer e Ferreira (1972) e observação pessoal) (Figura 2). Assim como *P. reticulata*, apresenta folhas compostas e bipinadas, com 4 a 14 pares de pinas opostas e 10 a 20 folíolos por pina, porém estes são um pouco menores. As flores e os frutos são também muito similares àqueles descritos para *P. reticulata* (Heringer e Ferreira, 1972), sugerindo que as duas espécies podem apresentar os mesmos mecanismos de dispersão de pólen e sementes.

*P. foliolosa* apresenta praticamente as mesmas possibilidades de uso descritas para a outra espécie, como ornamentação e exploração da madeira de alta qualidade para diversas finalidades (Lorenzi, 1992). Montagnini *et al.* (1995), em um estudo avaliando o potencial de vinte espécies arbóreas nativas na recuperação de áreas degradadas, concluíram que *P. foliolosa* e outras quinze espécies produziram efeitos benéficos nos

solos analisados. Comprovou-se, neste estudo, que *P. foliolosa* contribui para o aumento de C e N no solo, sendo recomendado seu uso, em combinação com outras espécies, visando o aumento da fertilidade de solos degradados. Por ser uma espécie de Mata Atlântica, *P. foliolosa* é também frequentemente encontrada em áreas fragmentadas.

Considerando-se as características descritas é possível perceber que a diferenciação das duas espécies nem sempre é uma tarefa simples. Heringer (1956), Heringer e Ferreira (1972), Matos *et al.* (1984) e Lewis (1987) comentam sobre o material armazenado em herbário ser tão semelhante que realmente torna-se difícil a identificação das duas espécies a partir destas coleções. Lewis (1987) destaca a necessidade de um registro cuidadoso do hábito e do habitat dos espécimes no momento da coleta de material a fim de garantir uma correta classificação das coleções de herbário. Este mesmo autor propõe como diferencial a presença de pêlos na raqui da inflorescência: *P. reticulata* apresenta raqui densamente pubescente enquanto em *P. foliolosa* a raqui apresenta-se glabrescente ou glabra. Heringer (1956) e Heringer e Ferreira (1972) mostram listas mais completas de características que permitem diferenciar as duas espécies, entre elas o fruto um pouco maior e de superfície áspera apresentado por *P. foliolosa*. Matos *et al.* (1984) procuraram compostos químicos na madeira das duas espécies que pudessem facilitar a diferenciação taxonômica das mesmas. Os autores puderam distinguir dois compostos secundários (ésteres de diterpenos) presentes em ambas espécies, apenas em proporções diferentes, predominando o acetato de vinhacetil em *P. reticulata* e o metil vinhaticoato em *P. foliolosa*, e concluíram que mais estudos químicos seriam necessários a fim de se estabelecer a validade destes compostos como marcadores taxonômicos do gênero. Heringer e Ferreira (1972) destacam que estas substâncias diterpênicas, já descritas anteriormente, só foram encontradas nestas duas espécies, confirmando a existência de afinidades filogenéticas entre as duas. De qualquer forma, apesar da semelhança entre *P. reticulata* e *P. foliolosa* para várias características, Heringer (1956) conclui que as diferenças existentes são suficientes para permitir a classificação das mesmas como espécies diferentes do gênero *Plathymania*. Heringer e Ferreira (1972) destacam que as duas espécies podem ser encontradas lado a lado quando aparecem manchas de Mata Atlântica dentro da região do Cerrado no estado de Minas Gerais.





**Figura 1** Indivíduo adulto de *P. reticulata* com aproximadamente 6 metros de altura.



**Figura 2** Indivíduo adulto de *P. foliolosa* com aproximadamente 20 metros de altura.

## 2.4 A técnica de RAPD

Nos últimos 30 anos, as isoenzimas têm representado os principais tipos de marcadores usados para análise de variação genética em populações de plantas (Hamrick e Godt, 1989). Com a possibilidade de realização automatizada da reação de polimerase em cadeia, ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a partir de meados da década de 80 houve uma verdadeira revolução em termos de pesquisas genéticas (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Newton *et al.*, 1999). Os avanços dos estudos moleculares trouxeram um aumento significativo dos conhecimentos na área de Genética de Populações, com diversas aplicações em estudos evolutivos (Excoffier *et al.*, 1992), permitindo avaliar a diversidade genética diretamente ao nível de DNA, livre de influências do ambiente ou do estágio de desenvolvimento do organismo analisado. Entretanto, a necessidade de conhecimentos prévios sobre a sequência de nucleotídeos da espécie a ser estudada, os custos elevados para a obtenção destes conhecimentos e para a realização das análises, limitaram durante alguns anos a aplicação das novas técnicas desenvolvidas baseadas em PCR (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Segundo Hadrys *et al.* (1992), foi com o desenvolvimento de técnicas de amplificação de DNA utilizando *primers* pequenos e de sequência arbitrária que o uso da PCR se popularizou por todo o mundo, permitindo a análise genética de diversas espécies à um custo relativamente baixo e de forma bastante simplificada. Dentre estas, a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), descrita por Williams *et al.* em 1990, se tornou amplamente utilizada.

A técnica de RAPD consiste na amplificação de DNA genômico em PCR utilizando-se *primers* de sequência arbitrária com cerca de 10 nucleotídeos, praticamente não tendo sofrido modificações desde que foi descrita pela primeira vez. Tipicamente usa-se apenas um tipo de *primer* em cada reação, com um conteúdo de G+C entre 50 e 70% (Fritsch e Rieseberg, 1996). O princípio da técnica é muito simples: o *primer* se liga a sequências complementares em fitas opostas do DNA alvo e ocorre a amplificação *in vitro* do segmento de DNA entre dois *primers* adjacentes com o auxílio da enzima *Taq* polimerase. Os sítios de ligação dos *primers* devem estar separados por no máximo 3 a 4 mil pares de bases, uma vez que a enzima não é capaz de percorrer segmentos maiores nas condições normalmente usadas durante a amplificação (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Fritsch e Rieseberg, 1996). Por serem pequenos, é grande a possibilidade de que os *primers* encontrem várias regiões do genoma para se ligarem, fazendo com que diversos

fragmentos de tamanhos diferentes resultem de uma reação (Williams *et al.*, 1990). A quantidade de fragmentos a serem produzidos para uma análise é virtualmente ilimitada, dependendo apenas do número de *primers* utilizados, e um perfil RAPD será formado pelo conjunto dos produtos de amplificação de diversos *primers* diferentes (Stewart e Excoffier, 1996). Os polimorfismos produzidos têm natureza binária e são decorrentes de alterações de nucleotídeos nos sítios de ligação dos *primers*, deleções destes sítios e inserções ou deleções entre dois sítios de anelamento adjacentes, provocando a ausência de amplificação ou a amplificação de um fragmento de tamanho diferente, aparecendo como uma nova banda no gel (Williams *et al.*, 1990). Bandas de tamanhos diferentes são consideradas loci diferentes. Estes marcadores são dominantes, o que significa que indivíduos homozigotos dominantes para um determinado locus e indivíduos heterozigotos não podem ser diferenciados a partir do perfil de amplificação uma vez que ambos serão representados pela presença de uma banda no gel. Além disso, os marcadores RAPD são considerados neutros e aparentemente estão distribuídos ao acaso por todo o genoma (Williams *et al.*, 1993), representando desde sequências de cópia única até sequências altamente repetitivas (Williams *et al.*, 1990; Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Entre as vantagens frequentemente citadas para a técnica de RAPD pode-se destacar: simplicidade, rapidez, baixo custo (em relação a outros marcadores de DNA), demanda de quantidades mínimas de DNA para realização das análises, possibilidade de estudo de espécies sobre as quais não se tem nenhum tipo de informação genética e espécies com pouco ou nenhum polimorfismo em loci isoenzimáticos.

Penner (1996) considera o fato de normalmente se utilizar uma quantidade mínima de DNA por reação (cerca de 10 a 25 ng) uma das principais vantagens da técnica de RAPD. Esta característica faz com que este tipo de análise seja especialmente atraente para o estudo genético de plantas, dado as dificuldades encontradas para a obtenção de grandes quantidades de DNA de boa qualidade para as análises (Kazan *et al.*, 1993b; Jun *et al.*, 1997; Rath *et al.*, 1998). Da mesma forma, também torna a técnica interessante para o estudo de espécies raras ou ameaçadas e de porte muito alto, nas quais pode ser bastante complicado obter material, normalmente folhas, em quantidade suficiente para a extração de maior quantidade de DNA (Brauner *et al.*, 1992; Fritsch e Rieseberg, 1996; Black-Samuelsson *et al.*, 1997).

A possibilidade de realizar uma análise genética diretamente ao nível de DNA sem a necessidade de nenhum conhecimento prévio sobre a espécie a ser estudada tornam a

técnica de RAPD extremamente apropriada para o estudo de diversas espécies sobre as quais praticamente não há nenhum tipo de informação sobre características genéticas, demográficas ou ecológicas, incluindo-se nesse grupo boa parte das arbóreas tropicais (Carvalho, 1994; Nason *et al.*, 1997).

Heun *et al.* (1994) destacam que provavelmente a contribuição mais importante trazida por estes marcadores seja a possibilidade de determinar de forma mais acurada as relações entre indivíduos e populações semelhantes demais para serem diferenciados por isoenzimas. É possível encontrar na literatura inúmeros exemplos que ilustram esta afirmação (Brauner *et al.*, 1992; Haig *et al.*, 1994; Bielawsky e Pumo, 1997; Lázaro e Aguinagalde, 1998). Trabalhando-se com a técnica de RAPD facilmente se obtém um número enorme de marcadores, frequentemente mais de 80, enquanto que estudos genéticos feitos através da utilização de isoenzimas dificilmente conseguem obter mais do que 30 ou 40 loci para análise (Brauner *et al.*, 1992). Além dessa vantagem da técnica de RAPD em relação às isoenzimas, pode-se destacar ainda que a primeira consiste de uma amostragem mais arbitrária do genoma, enquanto as isoenzimas refletem apenas regiões codificadoras (Hadrys *et al.*, 1992; Lynch e Milligan, 1994; Fritsch e Rieseberg, 1996).

Entre as limitações da técnica, duas podem ser consideradas mais importantes. Em primeiro lugar aparece a característica dominante dos marcadores RAPD que não permite a diferenciação de indivíduos heterozigotos. Em segundo lugar, e com certeza bem menos importante atualmente, aparece a questão da baixa repetibilidade de algumas bandas.

A característica dominante da técnica de RAPD certamente traz alguns inconvenientes, principalmente do ponto de vista da análise estatística. Clark e Lanigan (1993), Lynch e Milligan (1994) e Stewart e Excoffier (1996) são alguns autores que têm procurado desenvolver metodologias de análise dos dados visando contornar o problema da dominância. Comparada com marcadores co-dominantes, como as isoenzimas e o RFLP, a quantidade de informação obtida por locus RAPD é sem dúvida menor (Fritsch e Rieseberg, 1996). Além disso, esta característica dificulta a determinação acurada de muitos parâmetros importantes do ponto de vista da Genética de Populações como frequências alélicas e genóticas e heterozigosidade (Brauner *et al.*, 1992).

A baixa repetibilidade de algumas bandas é frequentemente citada na literatura como uma das principais limitações da técnica. Em função disso, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de esclarecer melhor a natureza destes marcadores (Heun e

Helentjaris, 1993; Ayliffe *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 1998), avaliar os principais fatores que interferem na qualidade das ampliações (Ellsworth *et al.*, 1993; Meunier e Grimont, 1993; Park e Kohel, 1994; Halldén *et al.*, 1996) e sugerir protocolos considerados mais eficientes (Yu e Pauls, 1992; Caetano-Anollés *et al.*, 1994). Muitos destes estudos destacam que alterações nas concentrações de cloreto de magnésio, DNA genômico, *primer* e *Taq* polimerase são as principais causas do aparecimento de bandas consideradas artefatuais. Entretanto, a grande maioria deles também concorda que a realização de estudos prévios para a escolha dos *primers* mais adequados para a espécie alvo do estudo, o estabelecimento das concentrações ótimas dos reagentes e do programa de PCR e uma cuidadosa atenção aos detalhes, reduzem bastante a possibilidade de se obter bandas de baixa repetibilidade (Hadrys *et al.*, 1992; Heun e Helentjaris, 1993; Virk *et al.*, 1995; Parker *et al.*, 1998). Desta maneira é possível se obter um número ilimitado de marcadores nítidos, facilmente comparáveis entre os indivíduos, de alta repetibilidade e consistência, permitindo estabelecer parâmetros bastante interessantes do ponto de vista genético, a despeito da incapacidade da técnica em diferenciar os indivíduos heterozigotos (Fritsch e Rieseberg, 1996).

Desde seu surgimento, inúmeros trabalhos têm sido publicados mostrando a utilidade da técnica de RAPD para diversas finalidades. Estes marcadores têm sido utilizados na determinação da estrutura e da diversidade genética em populações de plantas (Chalmers *et al.*, 1992; Rossetto *et al.*, 1995; Stewart e Porter, 1995; Bonnin *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1998; Cardoso *et al.*, 1998) e animais (Gibbs *et al.*, 1994; Nusser *et al.*, 1996; Mockford *et al.*, 1999), visando não apenas a caracterização genética como também a conservação e o melhoramento de algumas destas espécies. Hadrys *et al.* (1992) e Aagaard *et al.* (1995) destacam que, devido ao grande número de marcadores produzidos, é comum encontrar alguns específicos de gêneros, espécies, subespécies ou raças, tornando a técnica portanto bastante recomendada para o estabelecimento de relações taxonômicas, havendo diversos exemplos na literatura deste tipo de aplicação (Van Buren *et al.*, 1994; Linfante e Aguinagalde, 1996; Rath *et al.*, 1998; Wolff e Morgan-Richards, 1998).

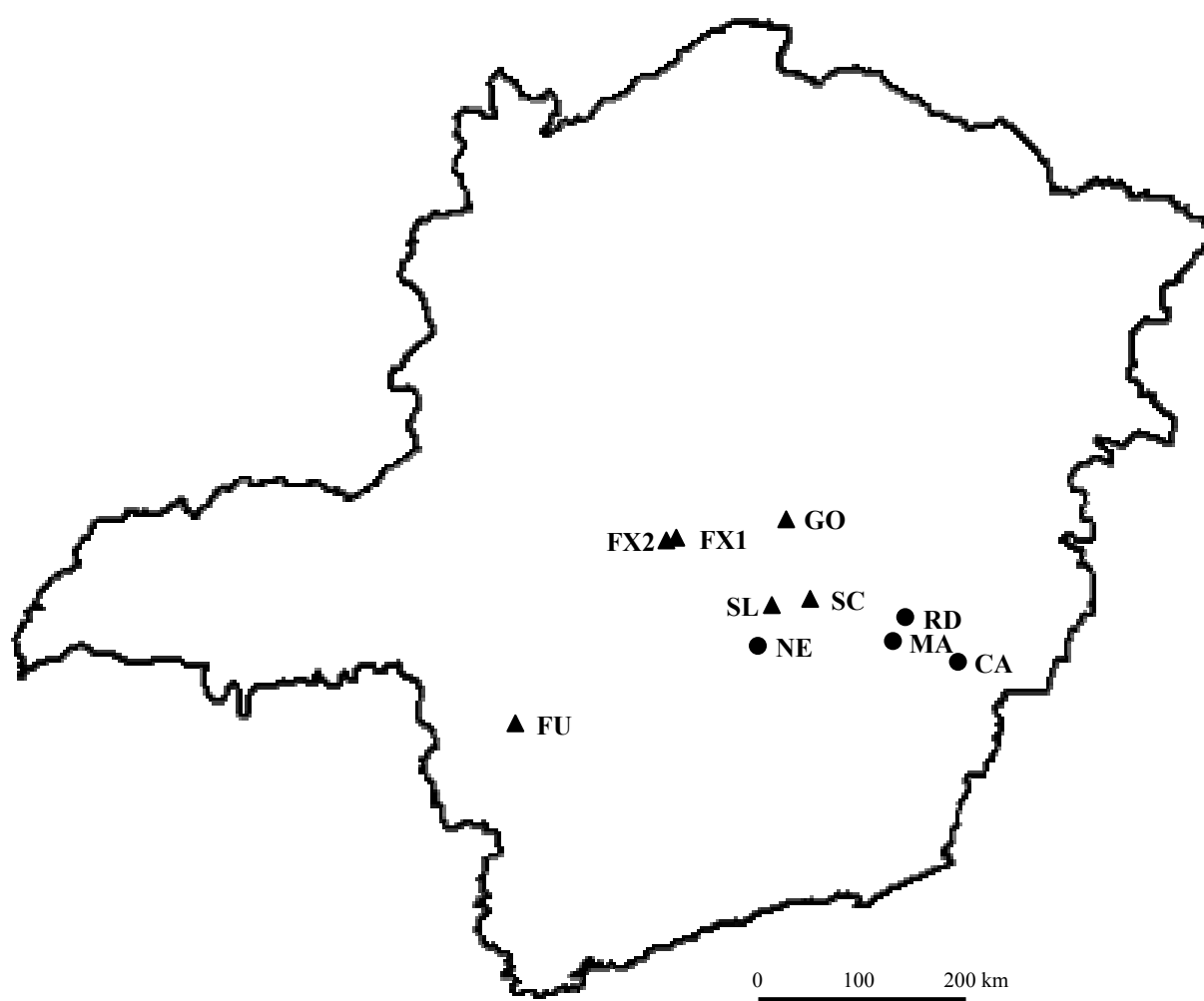
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostragem populacional

Para este estudo foram coletadas folhas jovens de indivíduos adultos de seis populações de *Plathymenia reticulata* e quatro populações de *P. foliolosa*, todas localizadas dentro do estado de Minas Gerais (Figura 3). A Tabela 1 mostra os locais de coleta, o número de indivíduos analisados, o tipo de vegetação predominante e a localização aproximada de cada uma das dez populações. Três entre as dez áreas de coleta estão situadas próximas ou dentro de grandes áreas de preservação, enquanto todas as outras populações podem ser consideradas localizadas em fragmentos pequenos. A população denominada “Serra do Cipó” (SC) foi coletada próxima ao Parque Nacional da Serra do Cipó, região que se caracteriza por apresentar uma cobertura vegetal diversificada, variando conforme a altitude e o tipo de solo. Acima de 1000 m de altitude o cerrado é substituído por campos rupestres e campos de altitude (Landau *et al.*, 1998). A população “Rio Doce” (RD) foi coletada dentro do Parque Estadual do Rio Doce, sendo este a maior área de Mata Atlântica do Estado de Minas Gerais, cobrindo cerca de 36.000 ha. A população “Caratinga” (CA) foi coletada dentro da Estação Biológica de Caratinga, uma área de aproximadamente 1.200 ha às margens do Rio Manhuaçu. A vegetação destas duas últimas áreas é principalmente composta por florestas primárias e secundárias, com características semi-decídua e decídua situando-se entre 300 e 800 metros de altitude (Rizzini, 1979). As outras duas populações de *P. foliolosa*, “Marlieria” (MA) e “Ribeirão das Neves” (NE), estão localizadas às margens de fragmentos de mata, sendo esta última situada em uma área onde é possível encontrar tanto elementos de Mata Atlântica quanto de Cerrado, incluindo-se aí espécimes de *P. reticulata*. As populações “Felixlândia 1” (FX1), “Felixlândia 2” (FX2), “Sete Lagoas” (SL) e “Furnas” (FU) foram coletadas dentro de áreas particulares, atualmente mantidas sob preservação. Finalmente, a população “Gouveia” (GO) foi coletada às margens da rodovia BR-259, entre os municípios de Gouveia e Presidente Juscelino.

Estabeleceu-se uma distância mínima de 5 m entre os indivíduos coletados e uma altura mínima de 2 m para exemplares de *P. reticulata* e 10 m para exemplares de *P. foliolosa*. Durante as coletas evitou-se ao máximo o contato manual direto com tecido foliar, folhas mais jovens e sem sinais de parasitismo ou predação por insetos foram

selecionadas. As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos, devidamente lacrados e identificados e mantidas em caixas de isopor com gelo até a transferência para um *freezer* a  $-20^{\circ}\text{C}$ , onde foram mantidas até o momento da extração de DNA. O pequeno número de indivíduos coletados por população para *P. foliolosa* deve-se ao fato da planta adulta normalmente apresentar estatura bastante elevada, dificultando a coleta de folhas ainda que com a utilização de um podão, e apresentar baixa densidade populacional. Todas as coletas foram realizadas entre os meses de setembro de 1998 a março de 1999.



**Figura 3** Mapa de Minas Gerais com a localização aproximada de cada uma das seis populações de *P. reticulata* (▲) e das quatro populações de *P. foliolosa* (●).

**Tabela 1** Locais de coleta, número de indivíduos analisados, tipo de vegetação predominante no local e localização aproximada das seis populações de *P. reticulata* e das quatro populações de *P. foliolosa* utilizadas neste estudo. Os diversos tipos de cerrado foram classificados de acordo com Ribeiro *et al.*, 1998.

Local de coleta (Sigla)	Número de indivíduos analisados	Tipo de vegetação	Latitude e Longitude
<i>P. reticulata</i>			
Serra do Cipó (SC)	25	cerrado rupestre	19°20'S 43°40'O
Furnas (FU)	22	cerrado denso	20°40'S 46°20'O
Gouveia (GO)	18	cerrado rupestre	18°35'S 43°50'O
Felixlândia 1 (FX1)	20	cerradão	18°45'S 44°45'O
Felixlândia 2 (FX2)	13	cerradão	18°45'S 44°45'O
Sete Lagoas (SL)	19	cerrado denso	19°30'S 44°10'O
Sub-total	117		
<i>P. foliolosa</i>			
Rio Doce (RD)	5	Mata Atlântica	19°35'S 42°30'O
Marlândia (MA)	3	borda de fragmento de Mata	19°40'S 42°40'O
Caratinga (CA)	6	Mata Atlântica	19°45'S 42°10'O
Ribeirão das Neves (NE)	8	borda de fragmento de Mata	19°40'S 44°20'O
Sub-total	22		
TOTAL	139		

### 3.2 Extração de DNA

O protocolo adotado para a extração de DNA das folhas de *P. reticulata* e *P. foliolosa* utiliza o detergente catiônico CTAB (*cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*) e se baseia no protocolo originariamente descrito por Doyle e Doyle (1987) com algumas modificações sugeridas por Ferreira e Grattapaglia (1995) e outras testadas no próprio laboratório. O tampão de extração utilizado teve a seguinte composição: 100mM de Tris-HCl pH 8,0, 2% de CTAB, 1,4M de NaCl, 20mM de EDTA (*ethylenediaminetetraacetate*), 1% de PVP (*polyvinylpyrrolidone*) e 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Foram testadas concentrações de PVP variando de 1 a 4%, não sendo possível observar diferenças significativas na quantidade ou na qualidade do DNA obtido.

A seguir estão descritos todos os passos da técnica de extração de DNA adotada:



1. Macerar em cadinho 200 mg de folhas verdes em nitrogênio líquido. Adicionar ao macerado 2 ml de tampão de extração ( $\beta$ -mercaptoetanol adicionado imediatamente antes do uso). Homogeneizar bem com a ajuda do pistilo.

2. Transferir o material para dois tubos de 2 ml e colocá-los em banho-maria a 60°C por 45 a 90 minutos. A cada 10-15 minutos verter algumas vezes os tubos a fim de permitir que o tampão esteja em contato com todo o material macerado. Retirar os tubos do banho-maria e deixar 5 minutos a temperatura ambiente.

3. Completar o volume de cada tubo com clorofórmio álcool-isoamílico 24:1. Homogeneizar bem por alguns minutos e centrifugar em seguida por 10 minutos (todos os passos de centrifugação foram realizados à 13.000 rpm).

4. Pipetar cuidadosamente o sobrenadante para novo tubo. Adicionar ao material pipetado cerca de 2 volumes de etanol absoluto gelado e 1/10 do volume de acetato de sódio 3M (pH 8,0). Deixar à -20°C *over night*.

5. Retirar os tubos do *freezer* e centrifugar por 10 minutos. Descartar o sobrenadante, deixando secar o precipitado por alguns minutos.

6. Lavar o precipitado com 300-500 $\mu$ l de etanol 70% gelado, deixando os tubos à temperatura ambiente por 5 a 10 minutos. Centrifugar por 5 minutos, descartar o sobrenadante e deixar secar por alguns minutos.

7. Repetir o item anterior mais uma ou duas vezes, deixando secar muito bem após a última vez.

8. Ressuspender o precipitado em 40-80  $\mu$ l de TE-RNAse (10 $\mu$ g/ml), conforme o tamanho do mesmo. Transferir para um único tubo todo o material pertencente à um mesmo indivíduo.

9. Deixar os tubos em banho-maria à 37°C por 2 horas.

10. Para quantificação, correr de 1 a 5 $\mu$ l do material em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (1 $\mu$ g/ml).

Após a quantificação, o DNA de cada indivíduo foi diluído em TE para uma concentração final de 5ng/ $\mu$ l para ser usado na reação de PCR. Tanto o DNA estoque quanto o diluído foram armazenados em *freezer* a -20°C.

### 3.3 Reação de PCR

Estudos iniciais foram feitos a fim de otimizar as concentrações de cada um dos componentes da PCR (DNA genômico, *primers*, dNTPs e MgCl<sub>2</sub>), estabelecendo-se assim as condições ideais para a realização das ampliações nas espécies estudadas. Dessa forma, as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20µl contendo tampão de reação com 10mM de Tris-HCl pH 8,0, 50mM de KCl, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM de cada dNTP, 1 unidade de *Taq* polimerase, 0,25µM de *primer* e 1ng/µl de DNA genômico.

O programa utilizado no termociclador (PTC-100<sup>TM</sup>, *M.J. Research, Inc.*) consistiu de um ciclo inicial de desnaturação de 95°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de 94°C por 10 segundos, 36°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, e um ciclo de extensão final de 72°C por 7 minutos. Após corrida eletroforética em gel de agarose 1%, coloração em solução de brometo de etídio (1µg/ml) e lavagem em água corrente durante 20 a 40 minutos para retirada do excesso de brometo e melhora do contraste, os produtos do PCR foram visualizados e fotografados sob luz UV. Todas as corridas foram realizadas em tampão TBE 1X (89mM de Tris-HCl pH 8,0, 89mM de ácido bórico e 2mM de EDTA) a 100V durante aproximadamente 3 horas.

Os DNAs de todos os indivíduos de uma população foram amplificados com um determinado *primer* na mesma reação de PCR e a corrida eletroforética dessa ampliações foi realizada no mesmo gel. Para cada reação sempre foi feito um controle negativo (todos os componentes da reação, exceto o DNA), verificando-se assim a possível ocorrência de contaminação. A fim de possibilitar comparações mais precisas entre os diferentes géis e permitir um controle constante da repetibilidade da técnica, à cada reação utilizava-se o DNA de um indivíduo de uma população diferente, já amplificado, visualizado e fotografado anteriormente em um outro gel. Para se estabelecer o tamanho aproximado de cada fragmento amplificado usou-se como marcador de peso molecular o *DNA-Ladder 100bp* (*Life Technologies*). A preparação de reagentes para PCR e todas as reações foram feitas próximas à chama e utilizando-se luvas de látex descartáveis, procurando-se dessa forma evitar contaminação das reações e amplificação de fragmentos artefatuais durante a realização da PCR.

### 3.4 Estudo piloto: seleção de primers

Além de cuidadosa padronização das concentrações dos componentes do PCR, da utilização de controles negativos em todas as reações e da repetição sistemática de alguns indivíduos em diferentes reações e géis, adotou-se neste trabalho um esquema de seleção de *primers* semelhante ao sugerido por Clark e Lanigan (1993) e Palacios e Gonzáles-Candelas (1997). Dessa forma, procurou-se minimizar os problemas de repetibilidade discutidos na literatura e permitir a seleção daqueles *primers* que resultassem em um melhor perfil de amplificação para as espécies estudadas, ou seja, que produzissem um maior número de bandas nítidas, distintas e bem coradas e melhor repetibilidade em duas repetições da reação, independente do grau de polimorfismo. Para essa seleção, DNAs extraídos de quatro indivíduos escolhidos ao acaso, oriundos de quatro diferentes populações, foram amplificados com 30 *primers* dos kits OPA (1-20) e OPL (1-10) (*Operon Technologies Inc.*). Dentre estes, dez *primers* foram selecionados para a realização das amplificações em todos os indivíduos das dez populações.

### 3.5 Análises estatísticas

A análise cuidadosa das fotografias dos géis permitiu a construção de uma matriz fenotípica composta de 0 e 1, sendo 0 a ausência da banda e 1 a presença. Bandas com coloração fraca e pouco definidas ou que não apresentaram repetibilidade não foram consideradas na análise final. Bandas de mesmo tamanho foram consideradas homólogas mesmo quando apareciam em indivíduos de espécies diferentes. A partir dessa matriz estabeleceu-se a frequência da cada banda para cada população e para cada espécie separadamente. Um locus foi considerado polimórfico para a população quando a banda correspondente estava presente (ou ausente) em no máximo 95% dos indivíduos e polimórfico para a espécie quando foi assim classificado em pelo menos uma das populações analisadas.

Dois tipos de análises foram utilizadas visando determinar a estrutura genética das populações das duas espécies e determinar os níveis de diversidade genética dentro de cada uma delas. A primeira se baseia no índice de Shannon de diversidade fenotípica ( $H_o$ ) e a segunda na análise de variância molecular (AMOVA - *Analysis of molecular variance*) desenvolvida por Excoffier *et al.* (1992).

O índice de Shannon, usado com frequência em estudos ecológicos considerando diversidade de espécies por área (Krebs, 1989), foi introduzido na genética de populações por Lewontin (1972). Embora para dados moleculares tenha sido usado primeiramente em um estudo utilizando RFLPs como marcadores (King e Schaal, 1989), é possível encontrar na literatura diversos trabalhos utilizando este índice para dados de RAPD (Wachira *et al.*, 1995; Wolff *et al.*, 1997; Cardoso *et al.*, 1998). A partir da determinação das frequências de cada banda, o índice de Shannon foi então estimado como sendo  $H_o = (-\sum p_i \log_2 p_i) / n$ , onde  $p_i$  representa a frequência da presença ou da ausência da banda  $i$  e  $n$ , o número de bandas consideradas (Yeh *et al.*, 1995).  $H_o$  foi calculado para cada população considerando os marcadores obtidos a partir de cada um dos *primers* separadamente e considerando todos os marcadores em conjunto. A diversidade média das populações ( $H_{pop}$ ) é calculada pela média dos valores de  $H_o$ . A diversidade total para a espécie ( $H_{sp}$ ) é calculada pela fórmula acima, onde  $p$  representa a média da frequência da presença ou da ausência de cada banda nas populações. A partir desses índices foi possível determinar a estrutura genética das populações, calculando-se a proporção da diversidade presente dentro ( $H_{pop}/H_{sp}$ ) e entre populações ( $(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$ ) (Chalmers *et al.*, 1992; Wachira *et al.*, 1995; Wolff *et al.*, 1997).

A análise de variância molecular (AMOVA), primeiramente descrita para análise de haplótipos de DNA mitocondrial (Excoffier *et al.*, 1992), tem sido intensamente usada, de forma direta, para dados de RAPD em estudos realizados tanto em plantas quanto em animais (Huff *et al.*, 1993; Palacios e Gonzáles-Candelas, 1997; Hogbin *et al.*, 1998; Mockford *et al.*, 1999). A idéia central desta análise consiste em extrair componentes de variância à partir de uma matriz de distâncias Euclidiana entre todos os pares de indivíduos. Essa medida de distância pode ser definida simplesmente como o número de diferenças entre um par de haplótipos. Para produzir esta matriz utilizou-se o programa AMOVA-PREP (Miller, 1997), desenvolvido exclusivamente para simplificar a realização da AMOVA ao se trabalhar com marcadores dominantes, como RAPD e AFLP. Finalmente, a fim de verificar a existência de homogeneidade de variância molecular (HOMOVA) entre as populações analisadas, realizou-se um teste baseado na Estatística de Bartlett. AMOVA e HOMOVA são duas análises incluídas no programa WINAMOVA 1.55 (Excoffier, 1995). A significância de todos os cálculos realizados por este programa é testada através de procedimentos de permutação não-paramétricos, nos quais indivíduos são aleatoriamente posicionados em populações e grupos diferentes. A distribuição nula de cada componente

de variância foi então estimada a partir de 1000 realizações independentes deste processo, conforme sugerido por Excoffier *et al.* (1992). A AMOVA foi realizada para cada uma das duas espécies separadamente e para as duas em conjunto. Esta última objetivou verificar o quanto da variação encontrada poderia ser atribuída à diferenças entre as duas espécies. Esta mesma análise foi feita para cada um dos dez *primers* selecionados separadamente, visando verificar quais *primers* poderiam ser considerados mais ou menos informativos na diferenciação molecular das duas espécies.

Ao fazer a AMOVA, o programa calcula ainda para cada par de populações uma medida análoga ao  $F_{ST}$  de Wright (1951) e sua significância (determinada também a partir de 1000 permutações). Esta medida, denominada  $\phi_{ST}$ , foi utilizada para a construção de um dendograma pelo método *neighbor-joining* e ainda para a estimativa indireta do número de migrantes ( $Nm$ ) entre as populações. O dendograma foi construído através do programa NEIGHBOR dentro do pacote PHYLIP 3.5c (Felsenstein, 1993) e visualizado através do programa TREEVIEW (Page, 1996). O cálculo de  $Nm$  assume que duas populações de tamanho  $N$  trocam uma fração  $m$  de migrantes a cada geração, sendo a taxa de mutação insignificante se comparada à taxa de migração e ainda que existe um equilíbrio entre migração e deriva. Este cálculo foi feito através do programa ARLEQUIN 1.1 (Schneider *et al.*, 1997), da mesma forma que Cardoso *et al.* (1998), e de acordo com a seguinte fórmula:

$$2Nm = \frac{1 - \phi_{ST}}{2\phi_{ST}}$$

Finalmente, com o objetivo de determinar agrupamentos de indivíduos em função da distância genética entre eles, foi feita uma Análise Discriminante através do programa SPSS (Norusis, 1993). Esta análise, aplicável a dados de presença e ausência (Chatfield e Collins, 1996), permite determinar a importância relativa de cada locus para a separação dos indivíduos, das populações e das espécies e testar a significância estatística de grupos centróides, aqui definidos pelas populações. A visualização gráfica desta análise é feita com base na distribuição dos indivíduos de acordo com as duas primeiras funções de correlação canônica, fundamentadas na matriz de presença e ausência de bandas polimórficas.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Padrões gerais de variação dos marcadores RAPD para *P. reticulata* e *P. foliolosa*

Em praticamente todos os géis analisados, foi possível observar diferenças quantitativas na intensidade de algumas bandas. Essas diferenças não foram consideradas neste estudo por serem muitas vezes de baixa repetibilidade (Heun e Helentjaris, 1993) e na verdade de natureza pouco compreendida (Fritsch e Riesenbergs, 1996). Alguns autores acreditam que intensidades diferentes de coloração sejam um reflexo do tipo de região amplificada do genoma, ou seja, com mais ou menos sequências repetitivas, ou de pareamentos incorretos dos *primers* (Williams *et al.*, 1993; Thormann *et al.*, 1994). Outros autores atribuem essas diferenças a um tipo de manifestação co-dominante, ou seja, bandas mais claras estariam representando indivíduos heterozigotos e mais coradas indivíduos homozigotos dominantes (Lynch e Milligan, 1994; Parker *et al.*, 1998).

Os controle negativos utilizados não resultaram na amplificação de nenhum fragmento ou apenas na amplificação de bandas extremamente fracas, sem homologia com o perfil produzido na amplificação dos DNAs das espécies analisadas. Este é um fenômeno relativamente comum na técnica de RAPD e em outras técnicas baseadas em PCR (Williams *et al.*, 1990; Hadrys *et al.*, 1992; Pan *et al.*, 1997) e não apresenta maiores consequências uma vez que, ao se adicionar DNA para as análises, por competição estas bandas “fantasmas” deixam de aparecer.

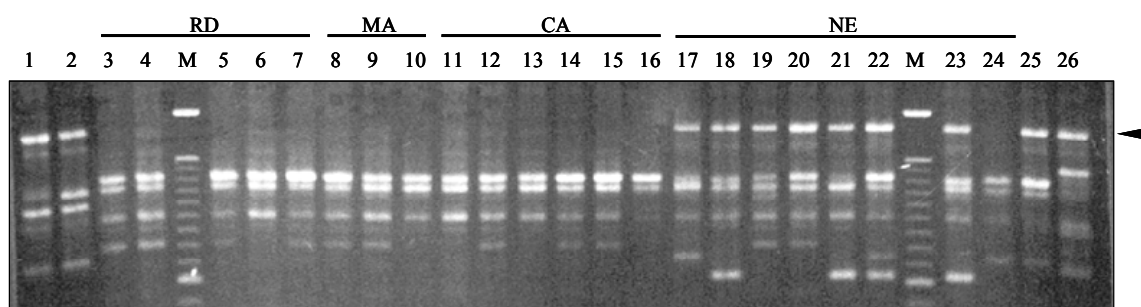
A observação criteriosa das repetições de amplificações feitas para alguns indivíduos permite afirmar que a repetibilidade das análises foi bastante satisfatória. Os dez *primers* selecionados resultaram em um total de 84 marcadores para as duas espécies, com tamanho variando entre 380 e 2200 pares de base (Tabela 2). As Figuras 4, 5, e 6 mostram exemplos dos perfis de amplificação obtidos com os *primers* OPA-2, OPA-4 e OPA-18, respectivamente. Cada *primer* produziu 3 a 12 bandas, com uma média de 8,4 bandas/*primer*.

A partir das frequências com que apareciam em uma ou outra espécie, algumas bandas receberam a seguinte nomenclatura: bandas exclusivas (polimórficas em uma espécie e completamente ausentes na outra), bandas espécie-específicas (apareceram em todos os indivíduos de uma espécie e em nenhum indivíduo da outra) e bandas

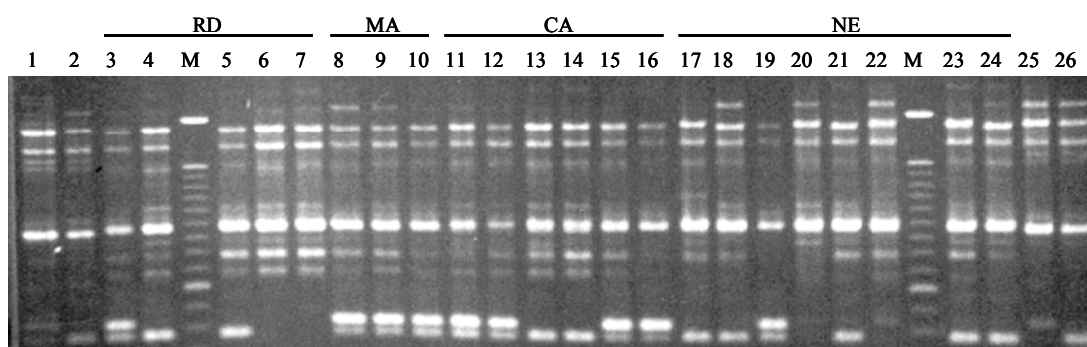
monomórficas para as duas espécies (presentes em todos os 139 indivíduos analisados). Dos 84 marcadores considerados para as duas espécies, 22 (26,2%) foram considerados exclusivos de uma ou outra espécie, 4 (4,8%) foram considerados espécie-específicos e 9 (10,7%) monomórficos para as duas espécies (Tabela 3). Dentre os 72 marcadores considerados para *P. reticulata*, 10 (14%) eram exclusivos desta espécie, enquanto para *P. foliolosa* dos 74 marcadores considerados, 12 (16%) eram exclusivos. O *primer* OPA-18 produziu três bandas exclusivas de *P. foliolosa*, sendo uma delas considerada espécie-específica, permitindo diferenciar com bastante nitidez as duas espécies (Figura 6). Algumas bandas não foram consideradas exclusivas de *P. reticulata* pois além de aparecerem em alguns indivíduos desta espécie, em maior ou menor frequência conforme a população, apareceram também em alguns indivíduos da população NE e apenas nesta população de *P. foliolosa*. A Figura 4 mostra um exemplo típico, em que uma banda (indicada pela seta) produzida pelo *primer* OPA-2 que aparece em todos os indivíduos de *P. reticulata* (frequência de 100%), aparece também em 87% dos indivíduos de NE e em nenhum indivíduo das outras populações de *P. foliolosa*. Esse mesmo fato ocorreu para 21 dos 84 marcadores considerados para as duas espécies, variando apenas a frequência com que estas bandas apareciam nas populações de *P. reticulata* e na população NE, permitindo que algumas hipóteses fossem levantadas em relação a diferenciação genética destas duas espécies.

**Tabela 2** *Primers* selecionados, suas sequências de nucleotídeos e faixa de tamanho dos fragmentos.

<b>Primer</b>	<b>Sequência de nucleotídeos (5'-3')</b>	<b>Tamanho dos fragmentos produzidos (pb)</b>
OPA-02	TGCCGAGCTG	640-1900
OPA-04	AATCGGGCTG	380-1900
OPA-07	GAAACGGGTG	550-1350
OPA-10	GTGATCGCAG	850-1750
OPA-13	CAGCACCCAC	720-1600
OPA-18	AGGTGACCGT	520-1700
OPL-02	TGGGCGTCAA	640-1450
OPL-03	CCAGCAGCTT	550-2200
OPL-04	GACTGCACAC	400-1550
OPL-05	ACGCAGGCAC	710-2200

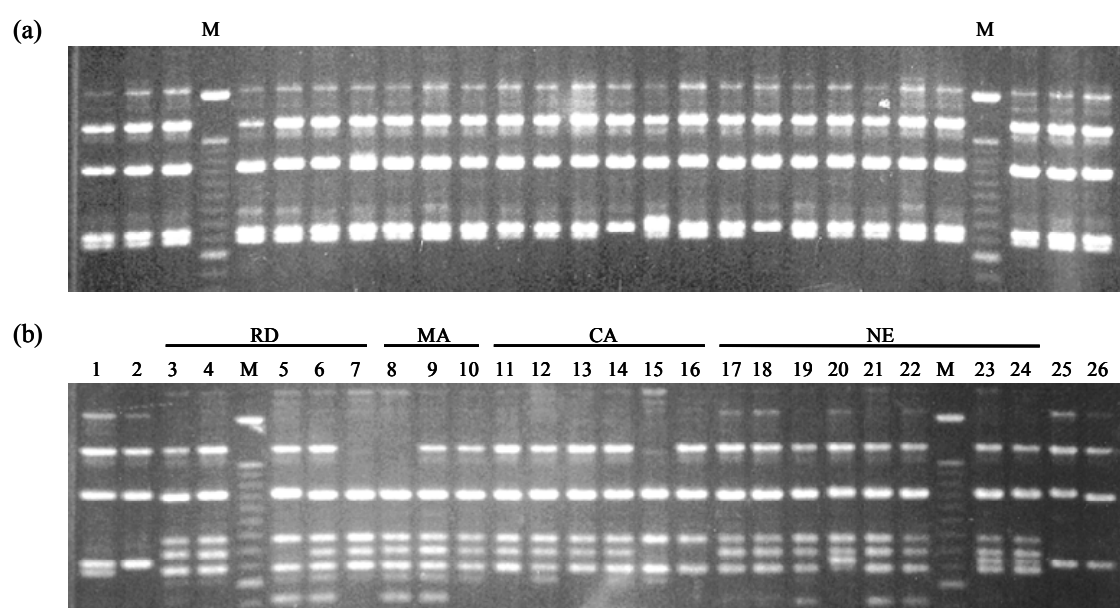


**Figura 4** Perfis de amplificação com o *primer* OPA-2. M: marcador de peso molecular. Colunas 1, 2, 25 e 26: *P. reticulata*. Colunas 3-24: *P. foliolosa* (populações indicadas pelas siglas RD, MA, CA e NE). A seta indica um fragmento típico de *P. reticulata* que apenas aparece na população NE de *P. foliolosa*.



**Figura 5** Perfis de amplificação com o *primer* OPA-4. M: marcador de peso molecular. Colunas 1, 2, 25 e 26: *P. reticulata*. Colunas 3-24: *P. foliolosa* (populações indicadas pelas siglas RD, MA, CA e NE).





**Figura 6** Perfis de amplificação com o *primer* OPA-18. M: marcador de peso molecular. a) *P. reticulata* (população SC); b) Colunas 1, 2, 25 e 26: *P. reticulata*. Colunas 3-24: *P. foliolosa* (populações indicadas pelas siglas RD, MA, CA e NE).

**Tabela 3** Bandas exclusivas, espécie-específicas e monomórficas para *P. reticulata* e *P. foliolosa* produzidas pelos dez *primers* selecionados para este estudo (ver definições no texto).

<i>Primer</i>	Bandas exclusivas de <i>P. reticulata</i>	Bandas exclusivas de <i>P. foliolosa</i>	Bandas espécie- específicas	Bandas monomórficas para as duas espécies
OPA-02	3	0	0	0
OPA-04	0	0	0	1
OPA-07	1	2	0	0
OPA-10	1	2	0	0
OPA-13	0	0	0	3
OPA-18	0	3	1	1
OPL-02	2	2	1	0
OPL-03	0	0	0	1
OPL-04	0	2	1	1
OPL-05	3	1	1	2
Total	10	12	4	9

#### 4.2 Diversidade genética dentro e entre populações de *P. reticulata* e *P. foliolosa*

Os dez *primers* utilizados neste estudo permitiram estabelecer 139 perfis de amplificação únicos, ou seja, não existiam dois indivíduos iguais, ainda que pertencentes a uma mesma espécie, um indicativo da existência de variação genética nas populações. A capacidade dos *primers* de diferenciar entre indivíduos variou bastante, sendo possível encontrar desde apenas nove (OPA-4 e OPA-7) até 45 (OPL-5) fenótipos distintos, considerando as duas espécies (Tabela 4). Considerando somente *P. reticulata* o *primer* OPL-5 novamente foi o que diferenciou o maior número de fenótipos (39) enquanto os *primers* OPA-7 e OPA-18 diferenciaram apenas 3 e 4 fenótipos respectivamente.

A porcentagem de loci polimórficos para a espécie indica que *P. reticulata* e *P. foliolosa* apresentam níveis similares de polimorfismo (70,8% e 64,9%, respectivamente) (Tabelas 5 e 6). Entretanto, ao se considerar a porcentagem de loci polimórficos por população, percebe-se uma grande variação entre as duas espécies. Todas as populações de *P. reticulata* apresentaram níveis de polimorfismo semelhantes e elevados, variando de 41,7% (FX2) a 55,6% (GO). *P. foliolosa* apresentou maior diferença entre populações, tendo sido encontrado desde 8,1% de loci polimórficos, para a população MA, até 56,8% para NE.

As Tabelas 7 e 8 mostram as estimativas de diversidade calculadas através do índice de Shannon. As populações de *P. reticulata* apresentaram valores médios de diversidade similares e em geral maiores do que os apresentados pelas populações de *P. foliolosa*, concordando portanto com os resultados obtidos pelo cálculo de porcentagem de loci polimórficos. Para a primeira, os valores variaram de 0,301 (FU) até 0,367 (FX1), com uma média para todas as seis populações de 0,332. *P. foliolosa* apresentou um valor médio de diversidade de 0,202, sendo que em três das quatro populações os índices variaram entre 0,074 (MA) e 0,177 (RD), e a população NE apresentou um valor de diversidade consideravelmente elevado (0,441), maior inclusive do que os apresentados pelas populações de *P. reticulata*. A última linha destas duas tabelas (Média geral) apresenta a média calculada desconsiderando a subdivisão feita para os *primers*, ou seja, obedece à fórmula  $H_o = (-\sum p_i \log_2 p_i) / n$ , onde  $n$  representa o número total de marcadores considerados para a espécie (72 para *P. reticulata* e 74 para *P. foliolosa*).

**Tabela 4** Número de fenótipos distintos obtidos através de cada um dos dez *primers* considerando-se as duas espécies e apenas *P. reticulata* (todas as populações em conjunto e cada uma separadamente).

<i>Primer</i>	Nº total de fenótipos distintos nas duas espécies	Nº de fenótipos distintos por população de <i>P. reticulata</i>						Nº de fenótipos distintos em <i>P. reticulata</i>
		SC	FU	GO	FX1	FX2	SL	
OPA-02	23	10	8	6	10	3	7	20
OPA-04	9	4	5	6	5	5	5	9
OPA-07	9	1	2	2	2	3	1	3
OPA-10	17	3	2	7	7	4	6	11
OPA-13	14	7	2	6	4	3	4	8
OPA-18	14	3	2	4	3	2	3	4
OPL-02	10	6	2	5	4	2	5	7
OPL-03	32	5	11	6	6	8	7	21
OPL-04	33	8	6	11	15	8	11	25
OPL-05	45	19	11	9	10	11	8	39
Todos os <i>primers</i>	139	25	22	18	20	13	19	117

**Tabela 5** Número de loci considerados, número de loci polimórficos, total e por população (proporção de loci polimórficos), para as seis populações de *P. reticulata*, considerando-se os dez *primers* selecionados.

<i>Primer</i>	Nº de loci	Nº de loci polimórficos	Nº de loci polimórficos por população					
			SC	FU	GO	FX1	FX2	SL
OPA-02	8	7 (0,875)	5 (0,625)	7 (0,875)	4 (0,500)	6 (0,750)	2 (0,250)	4 (0,500)
OPA-04	6	5 (0,833)	3 (0,500)	3 (0,500)	5 (0,833)	3 (0,500)	3 (0,500)	3 (0,500)
OPA-07	3	2 (0,667)	1 (0,333)	1 (0,333)	1 (0,333)	1 (0,333)	2 (0,667)	0 (0,000)
OPA-10	5	4 (0,800)	3 (0,600)	2 (0,400)	4 (0,800)	4 (0,800)	3 (0,600)	4 (0,800)
OPA-13	9	4 (0,444)	3 (0,333)	1 (0,111)	4 (0,444)	3 (0,333)	2 (0,222)	2 (0,222)
OPA-18	5	2 (0,400)	2 (0,400)	1 (0,200)	2 (0,400)	2 (0,400)	1 (0,200)	2 (0,400)
OPL-02	5	4 (0,800)	3 (0,600)	1 (0,200)	3 (0,600)	3 (0,600)	1 (0,200)	4 (0,800)
OPL-03	12	9 (0,750)	4 (0,333)	5 (0,417)	4 (0,333)	4 (0,333)	5 (0,417)	5 (0,417)
OPL-04	9	6 (0,667)	4 (0,444)	4 (0,444)	6 (0,667)	6 (0,667)	6 (0,667)	5 (0,556)
OPL-05	10	8 (0,800)	6 (0,600)	6 (0,600)	7 (0,700)	7 (0,700)	5 (0,500)	4 (0,400)
Total	72	51	34	31	40	39	30	33
% de polimorfismo		70,8	47,2	43,1	55,6	54,2	41,7	45,8

**Tabela 6** Número de loci considerados, número de loci polimórficos, total e por população (proporção de loci polimórficos), para as quatro populações de *P. foliolosa*, considerando-se os dez *primers* selecionados.

<i>Primer</i>	Nº de loci	Nº de loci polimórficos	Nº de loci polimórficos por população			
			RD	MA	CA	NE
OPA-02	5	3 (0,600)	0 (0,000)	0 (0,000)	0 (0,000)	3 (0,600)
OPA-04	6	3 (0,500)	2 (0,333)	0 (0,000)	1 (0,167)	3 (0,500)
OPA-07	4	4 (1,000)	1 (0,250)	1 (0,250)	2 (0,500)	3 (0,750)
OPA-10	6	6 (1,000)	2 (0,333)	0 (0,000)	1 (0,167)	5 (0,833)
OPA-13	9	4 (0,444)	1 (0,111)	0 (0,000)	0 (0,000)	4 (0,444)
OPA-18	8	5 (0,625)	3 (0,375)	2 (0,250)	3 (0,375)	3 (0,375)
OPL-02	5	3 (0,600)	1 (0,200)	0 (0,000)	0 (0,000)	1 (0,200)
OPL-03	12	10 (0,833)	3 (0,250)	2 (0,167)	2 (0,167)	10 (0,833)
OPL-04	11	7 (0,636)	1 (0,091)	0 (0,000)	0 (0,000)	7 (0,636)
OPL-05	8	3 (0,375)	2 (0,250)	1 (0,125)	1 (0,125)	3 (0,375)
Total	74	48	16	6	10	42
% de polimorfismo		64,9	21,6	8,1	13,5	56,8

**Tabela 7** Estimativas de índice de Shannon de diversidade fenotípica ( $H_0$ ) e subdivisão da diversidade dentro ( $H_{pop}/H_{sp}$ ) e entre ( $(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$ ) as seis populações de *P. reticulata* para os dez *primers* usados neste estudo.

<b>Primer</b>	<b>SC</b>	<b>FU</b>	<b>GO</b>	<b>FX1</b>	<b>FX2</b>	<b>SL</b>	<b><math>H_{pop}</math></b>	<b><math>H_{sp}</math></b>	<b><math>H_{pop}/H_{sp}</math></b>	<b><math>(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}</math></b>
OPA-02	0,401	0,497	0,304	0,472	0,173	0,357	0,367	0,435	0,845	0,155
OPA-04	0,289	0,358	0,481	0,305	0,380	0,410	0,370	0,434	0,853	0,147
OPA-07	0,134	0,147	0,168	0,241	0,261	0,000	0,158	0,182	0,870	0,130
OPA-10	0,515	0,309	0,553	0,619	0,522	0,572	0,515	0,558	0,924	0,076
OPA-13	0,280	0,110	0,308	0,207	0,087	0,203	0,199	0,243	0,821	0,179
OPA-18	0,129	0,189	0,299	0,288	0,199	0,259	0,227	0,299	0,759	0,241
OPL-02	0,359	0,115	0,361	0,351	0,178	0,447	0,302	0,342	0,883	0,117
OPL-03	0,137	0,359	0,192	0,177	0,287	0,282	0,239	0,306	0,782	0,218
OPL-04	0,354	0,279	0,483	0,541	0,538	0,428	0,437	0,500	0,873	0,127
OPL-05	0,500	0,425	0,439	0,495	0,462	0,366	0,448	0,551	0,813	0,187
Média geral	0,315	0,301	0,357	0,367	0,314	0,339	0,332	0,396	0,840	0,160

**Tabela 8** Estimativas de índice de Shannon de diversidade fenotípica ( $H_0$ ) e subdivisão da diversidade dentro ( $H_{pop}/H_{sp}$ ) e entre ( $(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$ ) as quatro populações de *P. foliolosa* para os dez *primers* usados neste estudo.

<b>Primer</b>	<b>RD</b>	<b>MA</b>	<b>CA</b>	<b>NE</b>	<b><math>H_{pop}</math></b>	<b><math>H_{sp}</math></b>	<b><math>H_{pop}/H_{sp}</math></b>	<b><math>(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}</math></b>
OPA-02	0,000	0,000	0,000	0,509	0,127	0,369	0,345	0,655
OPA-04	0,282	0,000	0,153	0,385	0,205	0,305	0,672	0,328
OPA-07	0,180	0,230	0,392	0,510	0,328	0,653	0,502	0,498
OPA-10	0,282	0,000	0,108	0,674	0,266	0,523	0,509	0,491
OPA-13	0,059	0,000	0,000	0,377	0,109	0,248	0,439	0,561
OPA-18	0,302	0,230	0,321	0,307	0,290	0,449	0,646	0,354
OPL-02	0,194	0,000	0,000	0,191	0,096	0,466	0,206	0,794
OPL-03	0,201	0,153	0,167	0,623	0,286	0,463	0,618	0,382
OPL-04	0,088	0,000	0,000	0,542	0,158	0,300	0,526	0,474
OPL-05	0,212	0,115	0,115	0,318	0,190	0,307	0,618	0,382
Média geral	0,177	0,074	0,117	0,441	0,202	0,390	0,518	0,482

A Tabela 9 apresenta comparações entre as medidas de variância dentro de populações calculadas pela AMOVA e os valores de diversidade obtidos pelo índice de Shannon. É interessante observar que, apesar das duas metodologias serem totalmente diferentes, há uma nítida relação entre elas, ou seja, as populações menos diversas para o primeiro índice são também as menos diversas para o segundo e vice-versa (observar *Ranking*). A medida de variância dentro de populações ( $\sigma^2_{dentro}$ ) calculados pela AMOVA também indica menor variação genética dentro das populações de *P. foliolosa* (5,359) do que dentro das populações de *P. reticulata* (5,706). Supondo que a diferença entre estas duas medidas não tenha sido maior por causa da população NE, que apresenta alta diversidade, foi feita uma outra AMOVA excluindo-se esta população da análise. Como previsto, sem a população NE, a diversidade dentro de populações para *P. foliolosa* cai para 2,939, confirmando que esta população contribui para elevar a variação genética dentro de populações estimada para a espécie. O teste pareado de Bartlett, para verificação da heterogeneidade de variância molecular, mostrou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre todos os 45 pares avaliados, indicando que todas as populações de ambas espécies diferem umas das outras na quantidade de variação que apresentam.

Em termos de estrutura genética, tanto a AMOVA (Tabela 10) quanto o índice de Shannon (Tabelas 7 e 8) permitiram o cálculo de índices análogos ao  $F_{ST}$  de Wright (1951). Para *P. reticulata* essas duas medidas foram muito semelhantes, ( $\phi_{ST}=0,123$  e  $(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}=0,160$ ), e indicam que a maior parte da variação genética pode ser atribuída à diferenças entre os indivíduos dentro de populações (87,7% e 84%, respectivamente). Para *P. foliolosa* os resultados dos dois métodos não foram tão similares, com a AMOVA indicando que 33,7% da variação está entre populações, e 66,3% dentro de populações, e o índice de Shannon indicando respectivamente 48,2% e 51,8%. A ausência de uma correspondência nesse caso provavelmente se deve ao fato de o  $F_{ST}$  calculado pela AMOVA ( $\phi_{ST}$ ) sofrer menos influência de tamanho amostral do que o  $F_{ST}$  calculado pelo índice de Shannon, uma vez que o primeiro deriva de uma análise de variância que considera os graus de liberdade, neutralizando parcialmente as diferenças entre as várias populações decorrentes de tamanho amostral (Weir e Cockerham, 1984). O índice de Shannon por sua vez, baseia-se nas frequências das bandas nas várias populações analisadas e medidas de frequência sempre são influenciadas por tamanho amostral. Assim é possível que o  $\phi_{ST}$  calculado pela AMOVA reflita melhor a real estrutura genética destas



populações do que o outro índice. Os testes de permutação realizados pela AMOVA indicam que, a despeito da maior parte da variação genética estar dentro de populações para as duas espécies, a variação detectada entre populações é altamente significativa ( $P < 0,001$ ).

**Tabela 9** Estimativas de variação dentro de populações, calculadas pela AMOVA e pelo índice de diversidade de Shannon, *ranking* dos valores de diversidade e variância dentro de populações (calculada pela AMOVA) para as seis populações de *P. reticulata* e para as quatro populações de *P. foliolosa*.

<b>População</b>	<b>Variâncias (AMOVA)</b>	<b>Ranking</b>	<b><math>H_0</math> (índice de Shannon)</b>	<b>Ranking</b>
<i>P. reticulata</i>				
SC	5,313	5	0,315	4
FU	5,149	6	0,301	6
GO	6,072	2	0,357	2
FX1	6,268	1	0,367	1
FX2	5,705	4	0,314	5
SL	5,942	3	0,339	3
$\sigma^2_{dentro}$	5,706 <sup>***</sup>		-	
<i>P. foliolosa</i>				
RD	4,000	2	0,177	2
MA	2,000	4	0,074	4
CA	2,467	3	0,117	3
NE	9,161	1	0,441	1
$\sigma^2_{dentro}$	5,359 <sup>***</sup>		-	

\*\*\*  $P < 0,001$

**Tabela 10** Análise de variância molecular (AMOVA) para os 139 indivíduos das dez populações de *P. reticulata* e *P. foliolosa*, avaliadas em conjunto e separadamente. (GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio)

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Componentes da variância	% do total	Valor de P
<i>P. reticulata</i> x <i>P. foliolosa</i>						
Entre espécies	1	395,778	395,778	10,294	60,5	<0,001
Entre populações/dentro de espécies	8	165,143	20,643	1,063	6,2	<0,001
Entre indivíduos/dentro de populações	129	730,806	5,665	5,665	33,3	<0,001
<i>P. reticulata</i>						
Entre populações	5	105,707	21,142	0,797	12,3	<0,001
Dentro de populações	111	633,388	5,706	5,706	87,7	<0,001
<i>P. foliolosa</i>						
Entre populações	3	59,405	19,802	2,724	33,7	<0,001
Dentro de populações	18	96,458	5,359	5,359	66,3	<0,001

A fim de verificar se o pequeno tamanho de amostra poderia estar influenciando na determinação da estrutura genética das populações de *P. foliolosa*, foi feita uma simulação com *P. reticulata* repetindo-se a AMOVA com as seis populações apresentando apenas 8 indivíduos cada (exclusão ao acaso de alguns indivíduos). A nova análise manteve praticamente a mesma estrutura genética anterior (13% da variação entre populações e 87% dentro), sugerindo que o tamanho de amostra usado para *P. foliolosa*, embora pequeno, foi grande o bastante para se estabelecer o padrão de estrutura genética existente. Para verificar se a população NE poderia estar contribuindo para aumentar a porcentagem da variação atribuída à diferenças entre as populações de *P. foliolosa*, uma nova AMOVA foi feita retirando-se essa população da análise. O valor de  $\phi_{ST}$  obtido dessa forma praticamente não sofreu alteração, passando de 0,337 para 0,313, indicando que a maior estruturação genética apresentada por *P. foliolosa* deve ser realmente uma característica da espécie.

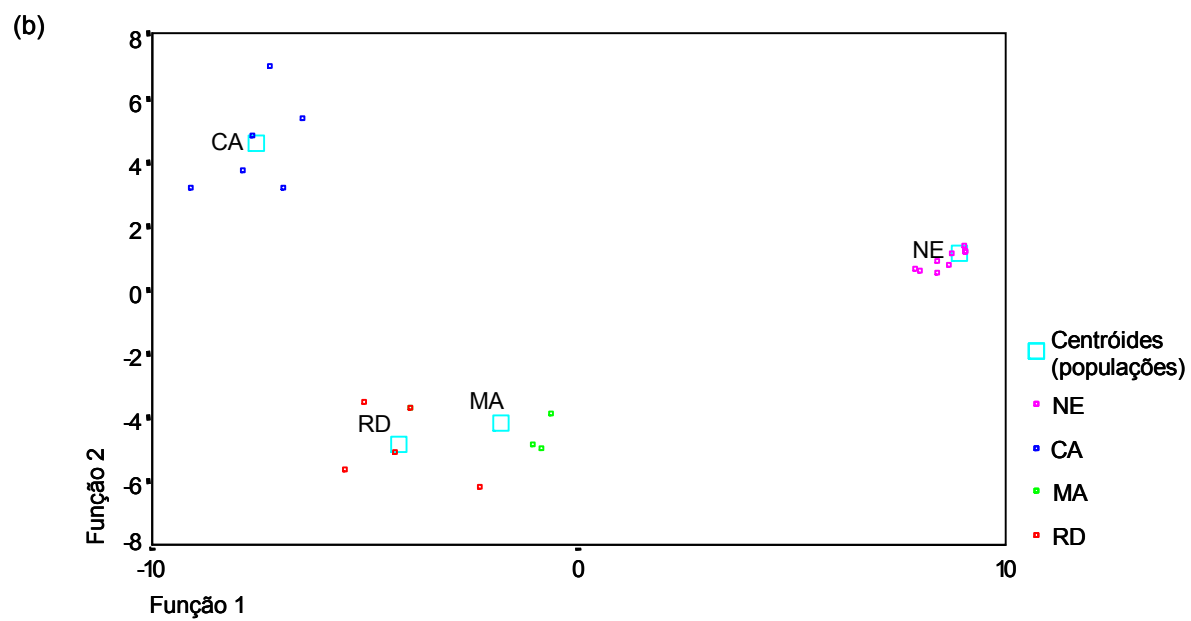
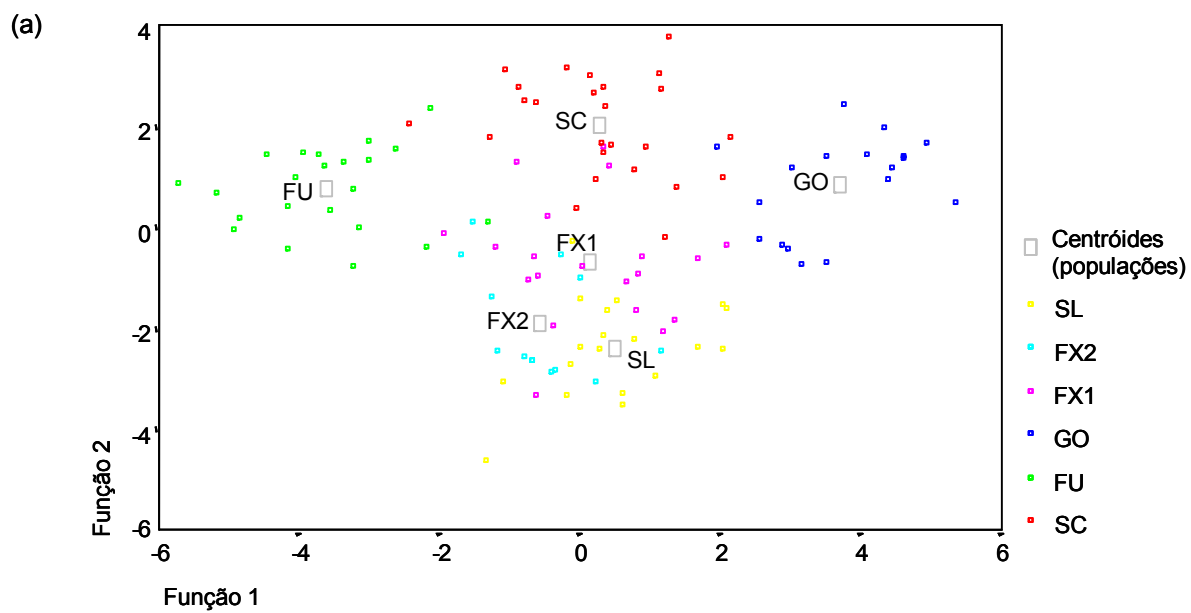
Os valores de  $\phi_{ST}$ , calculados para cada par de populações foram todos significativos ( $P < 0,05$ ), com exceção do  $\phi_{ST}$  entre RD e MA que se aproximou da significância ( $P = 0,0519$ ), indicando que praticamente todas as populações podem ser consideradas significativamente diferentes umas das outras do ponto de vista genético (Tabela 11). A Tabela 11 mostra também as medidas de fluxo gênico ( $Nm$ ) entre as populações de cada uma das espécies calculadas a partir dos valores de  $\phi_{ST}$ . Facilmente se percebe que, em geral, o número de migrantes foi maior entre as populações de *P. reticulata* (0,946-7,364) do que entre as populações de *P. foliolosa* (0,292-0,848). É interessante observar que as duas populações geograficamente mais próximas (FX1 e FX2) apresentaram um valor de  $Nm$  consideravelmente maior do que aqueles apresentados por todos os outros pares (7,364).

A Análise Discriminante feita para cada uma das espécies separadamente ilustra a maior diferenciação encontrada entre as populações de *P. foliolosa* (Figura 7b), porém mostra que a maioria dos indivíduos de *P. reticulata* também pode ser separada de acordo com a população a que pertence (Figura 7a). Para esta última as duas primeiras funções explicam 60,2% da variação encontrada (Função 1: 39,2%,  $\chi^2 = 532,9$ ,  $P < 0,001$ ; Função 2: 21,0%,  $\chi^2 = 374,6$ ,  $P < 0,001$ ), enquanto para *P. foliolosa* apenas a Função 1 já explica 75,9% da variação (Função 1:  $\chi^2 = 81,3$ ,  $P < 0,01$ ; Função 2: 21,4%,  $\chi^2 = 40,2$ ,  $P > 0,05$ ).

**Tabela 11** Valores de  $\phi_{ST}$  calculados para cada um dos pares de populações (hemimatriz inferior) e número de migrantes ( $Nm$ ) entre populações dentro de espécies calculado a partir dos valores de  $\phi_{ST}$  (hemimatriz superior).

População	SC	FU	GO	FXI	FX2	SL	RD	MA	CA	NE
SC	-	1,418	3,534	2,057	1,193	1,776	-	-	-	-
FU	0,1499 <sup>***</sup>	-	0,946	1,601	1,334	1,245	-	-	-	-
GO	0,0661 <sup>***</sup>	0,2090 <sup>***</sup>	-	3,298	1,552	2,459	-	-	-	-
FXI	0,1084 <sup>***</sup>	0,1350 <sup>***</sup>	0,0705 <sup>***</sup>	-	7,364	3,280	-	-	-	-
FX2	0,1733 <sup>***</sup>	0,1579 <sup>***</sup>	0,1387 <sup>***</sup>	0,0328 <sup>*</sup>	-	2,076	-	-	-	-
SL	0,1234 <sup>***</sup>	0,1672 <sup>***</sup>	0,0923 <sup>***</sup>	0,0708 <sup>***</sup>	0,1075 <sup>***</sup>	-	-	-	-	-
RD	0,7342 <sup>***</sup>	0,7422 <sup>***</sup>	0,6987 <sup>***</sup>	0,6960 <sup>***</sup>	0,7206 <sup>***</sup>	0,7135 <sup>***</sup>	-	0,605	0,848	0,574
MA	0,7547 <sup>***</sup>	0,7652 <sup>***</sup>	0,7234 <sup>***</sup>	0,7147 <sup>***</sup>	0,7452 <sup>***</sup>	0,7377 <sup>***</sup>	0,2925 <sup>NS</sup>	-	0,292	0,430
CA	0,7440 <sup>***</sup>	0,7525 <sup>***</sup>	0,7195 <sup>***</sup>	0,7118 <sup>***</sup>	0,7419 <sup>***</sup>	0,7345 <sup>***</sup>	0,2277 <sup>***</sup>	0,4615 <sup>***</sup>	-	0,473
NE	0,5565 <sup>***</sup>	0,5694 <sup>***</sup>	0,4955 <sup>***</sup>	0,5159 <sup>***</sup>	0,5291 <sup>***</sup>	0,5419 <sup>***</sup>	0,3033 <sup>***</sup>	0,3678 <sup>***</sup>	0,3459 <sup>***</sup>	-

<sup>\*\*\*</sup>  $P < 0,001$ , <sup>\*</sup>  $P < 0,05$ , <sup>NS</sup>  $P > 0,05$



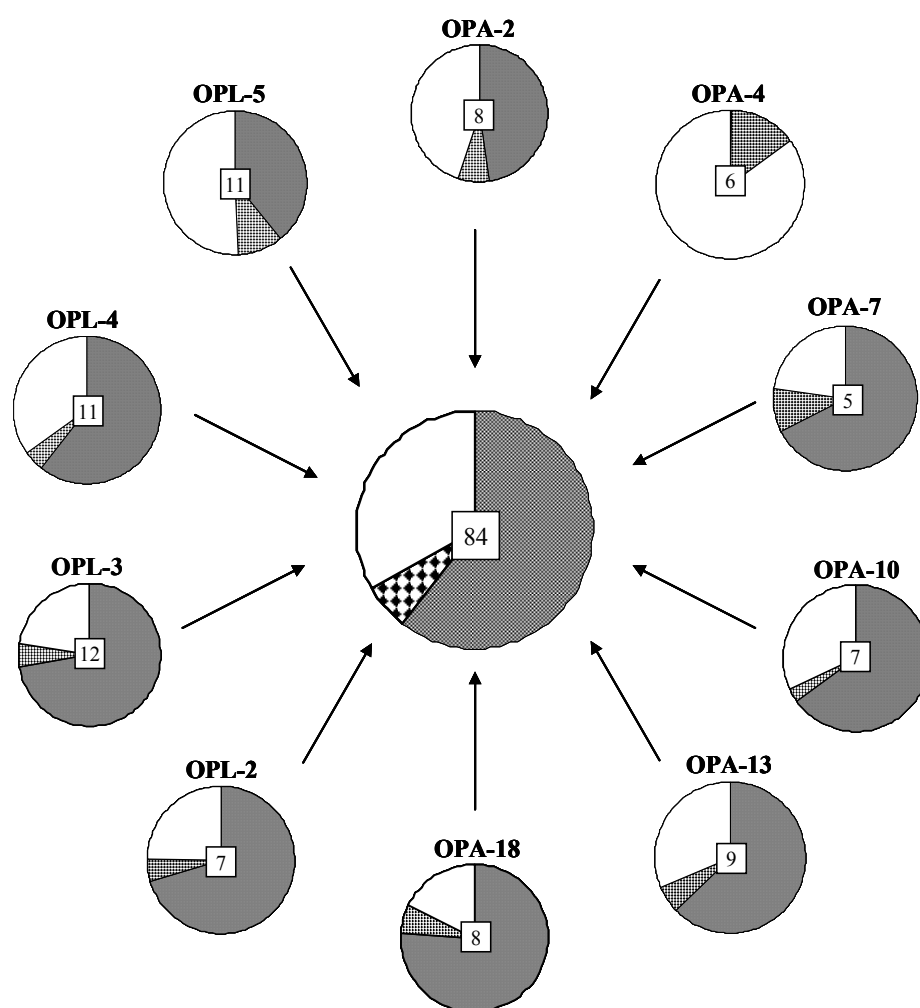
**Figura 7** Análise Discriminante das seis populações de *P. reticulata* (a) e das quatro populações de *P. foliolosa* (b).

### 4.3 Diferenciação genética entre *P. reticulata* e *P. foliolosa*

A AMOVA realizada em três níveis (espécies-populações-indivíduos), indicou que a maior parte da variação encontrada, cerca de 60% ( $P < 0,001$ ), pode ser atribuída à diferenças entre as duas espécies (Tabela 10). Retirando-se da análise a população NE, que apresentou diversas bandas em comum com as populações de *P. reticulata*, esta porcentagem de diferenciação entre as duas espécies sobe para 68%, indicando que, de fato, as características particulares desta população podem ter contribuído para reduzir esta diferença.

A análise de variância molecular em três níveis foi feita também considerando cada um dos dez *primers* selecionados separadamente. A Figura 8 mostra que, para vários *primers*, a análise produziu resultados muito similares àquele obtido a partir dos 84 marcadores considerando os dez *primers* analisados em conjunto. Entretanto, é possível observar que alguns *primers*, como o OPA-4, resultaram em proporções bastante diferentes. A partir da análise dos géis das amplificações produzidas por este *primer* não é possível separar os indivíduos pertencentes à *P. reticulata* ou *P. foliolosa* (Figura 5). Este resultado demonstra que a utilização de um número muito reduzido de *primers* pode levar a conclusões incorretas quando se pretende diferenciar espécies próximas.

Observando novamente a Tabela 11 é possível perceber que os valores de  $\phi_{ST}$  entre populações de *P. reticulata* e *P. foliolosa* são maiores que os valores observados entre populações da mesma espécie. Entretanto, é fácil constatar também que a diferenciação entre as populações de *P. reticulata* e a população NE é menor do que a diferenciação entre as populações de *P. reticulata* e as outras populações de *P. foliolosa*, no primeiro caso o  $\phi_{ST}$  variando entre 0,4955 e 0,5694 (média=0,5347) e no segundo variando de 0,6960 até 0,7652 (média= 0,7290). É preciso deixar claro entretanto, que o valor médio do  $\phi_{ST}$  entre NE e as outras populações de sua espécie é menor do que entre NE e as populações de *P. reticulata* (0,3389 e 0,5347, respectivamente).

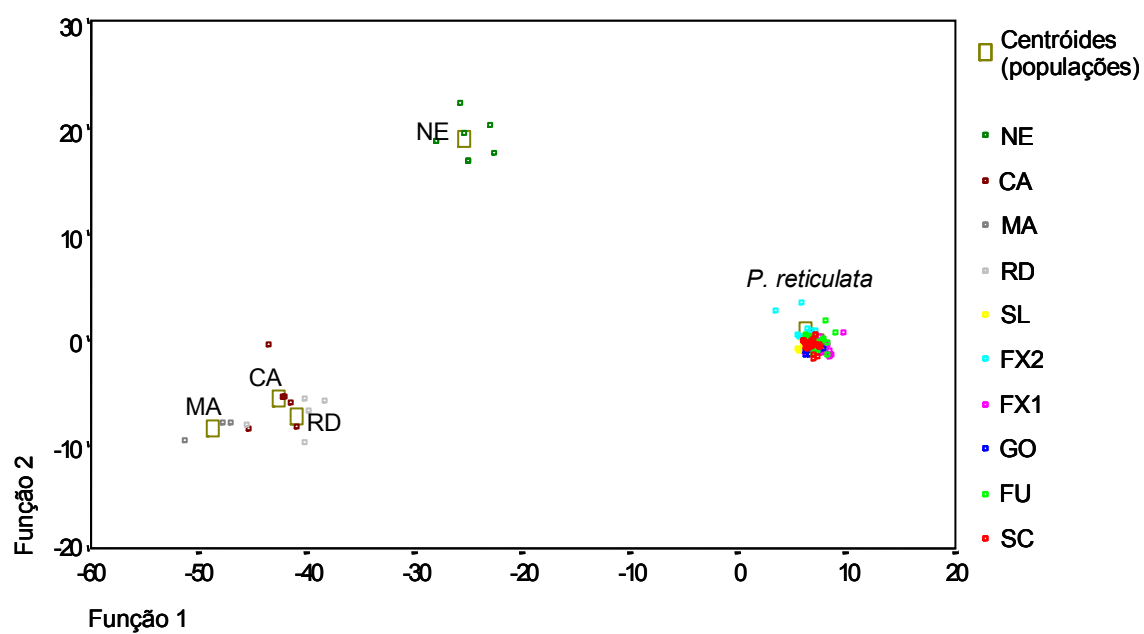


**Figura 8** Gráficos mostrando, para cada *primer*, a proporção da variação atribuída à diferenças entre as espécies (●), entre populações de cada espécie (◐) e entre indivíduos dentro de populações (○). Os números ao centro representam o número de marcadores considerados na análise. O gráfico central ilustra o resultado global, ou seja, considerando-se todos os 84 marcadores obtidos a partir dos dez *primers*.

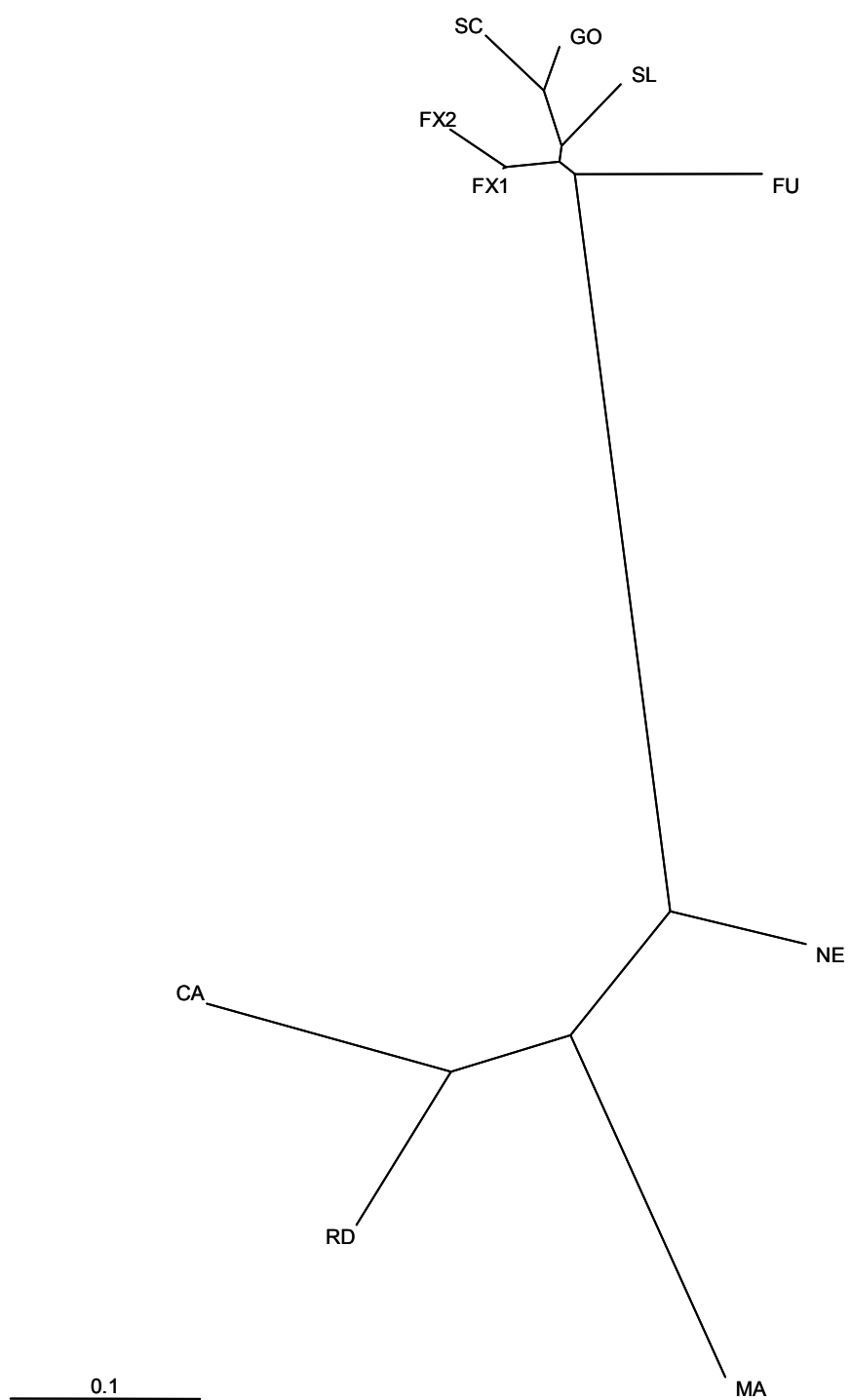
Com o objetivo de verificar se seria possível obter uma configuração espacial entre as dez populações das duas espécies que ilustrasse este fato (a população NE apresentando-se menos diferenciada das populações de *P. reticulata* do que as outras populações de *P. foliolosa*) foi feita uma nova Análise Discriminante, agora com os dados das duas espécies consideradas em conjunto, sendo os grupos centróides definidos apenas pelas populações. Observando a Figura 9 é possível perceber que, de fato, considerando a Função 1, que explica 85,6% da variação encontrada (Função 1:  $\chi^2=1831,2$ ,  $P<0,001$ ; Função 2: 8,3%,  $\chi^2=1256,5$ ,  $P<0,001$ ), NE surgiu em uma posição intermediária entre dois grupos distintos, o primeiro formado pelas seis populações de *P. reticulata* e o segundo formado pelas outras três populações de *P. foliolosa*. A partir deste resultado, uma segunda Análise Discriminante foi feita agora definindo-se apenas três grupos centróides: o primeiro formado por todos os indivíduos da espécie *P. reticulata*, o segundo formado por todos os indivíduos da espécie *P. foliolosa* exceto os indivíduos da população NE que formam o terceiro grupo. A nova análise resultou em uma representação gráfica muito similar a anterior (não apresentada), entretanto a Função 1 passou a explicar 93% da variação (Função 1:  $\chi^2=1102,5$ ,  $P<0,001$ ; Função 2: 7%,  $\chi^2=416,3$ ,  $P<0,001$ ), indicando que realmente NE é uma população que se diferencia de todas as outras.

O dendograma construído pelo método *neighbor-joining*, a partir dos valores de  $\phi_{ST}$  obtidos através da AMOVA (Tabela 11), revela uma nítida separação entre as duas espécies (Figura 10). Configuração bastante similar foi obtida através do método UPGMA (não apresentada). Percebe-se também através desta árvore que as populações FX1 e FX2 compõem um único ramo, havendo na verdade uma distinção genética muito pequena entre elas. A configuração da árvore deixa claro que, de maneira geral, a distância entre as populações de *P. reticulata* é menor do que entre as populações de *P. foliolosa*, como já havia sido indicado pelos cálculos de estrutura genética e demonstrado através da Análise Discriminante (Figura 7). Novamente é possível observar que a distância da população NE para as populações de *P. reticulata* é menor do que a distância das outras populações de *P. foliolosa* para as populações de *P. reticulata*.





**Figura 9** Análise discriminante das dez populações estudadas, considerando as duas espécies. (*P. foliolosa*: populações NE, CA, MA e RD; *P. reticulata*: populações SL, FX2, FX1, GO, FU e SC).



**Figura 10** Dendrograma construído pelo método de *neighbor-joining* a partir dos valores de  $\phi_{ST}$  entre as seis populações de *P. reticulata* (SC, FU, GO, FX1, FX2 e SL) e as quatro populações de *P. foliolosa* (RD, MA, CA e NE).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Diversidade e estrutura genética de populações de *P. reticulata* e *P. foliolosa*

Marcadores RAPD foram utilizados neste estudo para avaliar os níveis de variação genética dentro e entre populações de *Plathymenia reticulata* e *P. foliolosa*. A dificuldade na obtenção de DNA de boa qualidade a partir de folhas de arbóreas tropicais devido à presença de taninos, compostos fenólicos, pigmentos, polissacarídeos e metabólitos secundários é frequentemente citada na literatura (Kazan *et al.*, 1993b; Jun *et al.*, 1997; Swoboda e Bhalla, 1997; Rath *et al.*, 1998). É possível encontrar ainda uma grande variedade de protocolos de extração que visam a obtenção de DNA de plantas em quantidade e de boa qualidade (p. ex. Doyle e Doyle, 1987; Deragon e Landry, 1992; Guidet, 1994; Kim *et al.*, 1997). O método de extração adotado neste estudo permitiu a obtenção rápida e eficiente de DNA de boa qualidade para a realização das ampliações, porém em quantidades pequenas. Este fato, aliado a ausência total de informação genética sobre as duas espécies estudadas e à alta capacidade dos marcadores RAPD em diferenciar espécies próximas (Kazan *et al.*, 1993a; Linfante e Aguinagalde, 1996; Wolff e Morgan-Richards, 1998), foram os principais fatores que motivaram a escolha desta técnica para a realização deste estudo.

A análise de variância molecular (AMOVA) e o índice de diversidade de Shannon foram os dois métodos escolhidos para determinar a diversidade e a estrutura genética das espécies estudadas. Diversos trabalhos utilizando marcadores do tipo RAPD estimam as frequências gênicas  $p$  e  $q$  a partir da raiz quadrada da frequência de homocigotos nulos ( $q^2$ ), assumindo portanto que as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Liu e Furnier, 1993; Smith e Pham, 1996; Aagaard *et al.*, 1998; Morden e Loeffler, 1999). Entretanto, como muitas vezes essa premissa não corresponde à realidade, principalmente para espécies de plantas que frequentemente se reproduzem de forma não casual (endogamia e autofecundação), estas estimativas são frequentemente pouco acuradas, especialmente quando baseadas em um tamanho pequeno de amostra (Gibbs *et al.*, 1994; Haig *et al.*, 1994; Lynch e Milligan, 1994; Stewart e Excoffier, 1996). Evidentemente esse tipo de cálculo pode resultar em estimativas bastante precisas se a situação de equilíbrio tiver sido verificada anteriormente através de estudos das mesmas populações com

marcadores co-dominantes, como as isoenzimas. Um dos motivos que levaram à escolha do índice de Shannon e da AMOVA para serem usados neste estudo reside justamente no fato de não ser necessário assumir que as populações estão em equilíbrio de HW (Fritsch e Rieseberg, 1996), o que seria bastante imprudente a partir das poucas informações disponíveis sobre as espécies estudadas, inclusive sobre sistema de cruzamento. As análises realizadas a partir de fenótipos de RAPD, permitiram uma subdivisão hierárquica da variação encontrada através da AMOVA e do índice de Shannon, sem a necessidade de se assumir condições em relação às populações analisadas sobre as quais não se tem certeza. Fritsch e Rieseberg (1996) destacam que a AMOVA pode ser um dos métodos mais interessantes e promissores para a análise de dados de RAPD visando a avaliação de estrutura e diversidade genética de populações porque determina a significância dos valores obtidos. Os testes de permutação não-paramétricos, usados para a determinação desta significância, exigem poucos pré-requisitos estatísticos que poderiam ser inválidos sob muitas circunstâncias (Excoffier *et al.*, 1992; Haig *et al.*, 1994).

À despeito da suposição de Clark e Lanigan (1993) de que a inabilidade da técnica de RAPD em diferenciar indivíduos heterozigotos e homozigotos para um dado fragmento, poderia resultar em uma sub-estimativa da diversidade genética, quando comparada com os resultados obtidos através de marcadores co-dominantes, diversos estudos populacionais considerando isoenzimas, RFLP, microsátélites e RAPD têm mostrado padrões bastante similares (Heun *et al.*, 1994; Thormann *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 1998). Estes resultados levam a conclusão de que algumas comparações podem ser feitas entre os resultados aqui apresentados, os diversos trabalhos baseados em marcadores co-dominantes e as generalizações feitas por Hamrick e Godt (1989) e Hamrick e Loveless (1989) baseadas em dados de isoenzimas.

Estudos realizados em plantas, utilizando a técnica de RAPD, apresentam bastante variação em relação à porcentagem de loci polimórficos. Normalmente espera-se um percentual alto, pela própria característica da técnica, entretanto é possível encontrar estudos com níveis de polimorfismo tão baixos para a espécie quanto 20 a 30% (Brauner *et al.*, 1992; Lakshimi *et al.*, 1997; Palacios e Gonzáles-Candelas, 1997) e ainda menores, como 7% (Black-Samuelsson *et al.*, 1997), até quase 100% de loci polimórficos (Rossetto *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 1995). Os níveis de polimorfismo apresentados por *P. reticulata* e *P. foliolosa* podem ser considerados altos (%P>65%), entretanto, houve grande variação

entre a porcentagem de loci polimórficos por população apresentada pelas duas espécies. De uma maneira geral pode-se dizer que as populações de *P. reticulata* apresentaram níveis de polimorfismo altos (%P>42%), enquanto que as populações de *P. foliolosa*, com exceção de NE, apresentaram níveis de polimorfismo relativamente baixos (%P<22%), especialmente se comparado ao polimorfismo dentro de populações para loci RAPD obtido por Cardoso *et al.* (1998) para uma outra leguminosa tropical de Mata Atlântica (25-55%).

A comparação dos níveis de diversidade dentro de populações apresentados por *P. reticulata* e *P. foliolosa* com resultados de outros autores não é uma tarefa simples. Além da escassa literatura disponível sobre diversidade genética de arbóreas tropicais utilizando a técnica de RAPD, muitas análises diferentes são empregadas, dificultando comparações diretas entre os resultados. Yeh *et al.* (1995), utilizando o índice de Shannon exatamente da mesma forma como foi descrita aqui, estabeleceram valores de diversidade dentro de populações variando entre 0,651 e 0,733. A espécie estudada por estes autores (*Populus tremuloides*), uma planta lenhosa que se reproduz principalmente de forma clonal e apresenta ampla distribuição geográfica, mostrou níveis elevadíssimos de diversidade genética, tanto para RAPD quanto para isoenzimas. Palacios e González-Candelas (1998), analisando uma outra espécie de reprodução clonal (*Limonium dufourii*) porém rara, ameaçada e de distribuição restrita, obtiveram medidas de variância dentro de populações calculadas pela AMOVA entre 0,311 e 4,684 ( $\sigma^2_{dentro}=1,878$ ). Comparando os resultados apresentados pelas espécies acima com a diversidade intrapopulacional estimada para *P. reticulata* através destas duas metodologias (0,301-0,357 e 5,149-6,268, respectivamente), pode-se concluir que as populações desta espécie apresentam níveis consideráveis de variação genética dentro de populações, enquanto as populações analisadas de *P. foliolosa*, excluindo-se NE, apresentaram níveis menores de variação dentro de populações (0,074-0,177 e 2,000-4,000).

Algumas explicações podem ser levantadas para justificar essas diferenças nos níveis de diversidade intrapopulacional entre *P. reticulata* e *P. foliolosa*. Em primeiro lugar poderia-se pensar que o menor número de indivíduos analisados por população de *P. foliolosa*, decorrente das dificuldades encontradas durante a coleta de material, poderia estar influenciando esses resultados. Cardoso *et al.* (1998) comentaram sobre o fato de amostras pequenas, como as utilizadas por eles, poderem afetar as estimativas do índice de Shannon. Entretanto, no estudo aqui apresentado, a população com maior diversidade

entre todas, NE, medida pelo índice de Shannon e pela AMOVA, foi uma das populações com menor número de indivíduos analisadas ( $n=8$ ), e a população de *P. reticulata* com menor tamanho de amostra, FX2 ( $n=13$ ), apresentou praticamente o mesmo valor de diversidade de Shannon da população com maior tamanho de amostra (SC,  $n=25$ ), ou seja, 0,314 e 0,315 respectivamente. Resultados muito semelhantes foram observados por Cardoso *et al.* (1998). Na literatura são encontrados diversos exemplos de trabalhos feitos com a técnica de RAPD utilizando tamanho de amostra tão pequeno quanto o utilizado para *P. foliolosa* (Sulaiman e Hasnain, 1996; Lakshmi *et al.*, 1997; Wolff *et al.*, 1997). Além disso, Fritsch e Rieseberg (1996) consideram a técnica de RAPD especialmente recomendada para amostras de tamanho pequeno. Embora seja preciso levantar a possibilidade de que as amostras analisadas no presente trabalho não representem bem as populações em que foram coletadas, ou porque são pequenas ou porque não abrangem toda a área ocupada pela população, especialmente no caso das populações RD e CA (coletadas em áreas de reserva), as considerações feitas acima indicam que não é este o caso. É mais provável que as populações de *P. foliolosa* realmente apresentem menores níveis de variação genética do que as populações de *P. reticulata*. A presença de bandas típicas de *P. reticulata* em muitos dos indivíduos analisados pertencentes à população NE deve ter contribuído para elevar os níveis de variação genética apresentados por esta população.

De acordo com Hamrick e Godt (1989) a variação genética dentro de populações tende a ser menor em espécies que se reproduzem principalmente por auto-fecundação, de forma que ocorrência de algum grau de endogamia dentro das populações de *P. foliolosa* poderia estar contribuindo para a redução de diversidade genética nestas populações. Uma outra hipótese, e provavelmente mais plausível, é que as populações de *P. foliolosa* podem estar sofrendo as consequências da fragmentação e redução de tamanho há cerca de 400 anos, em decorrência da intensa ação antrópica nas regiões de Mata Atlântica durante todo este período. A antiga fragmentação dessas populações pode estar efetivamente contribuindo para a redução do  $N_e$  e, conseqüentemente, aumentando a probabilidade de ocorrência de deriva genética e endogamia, o que leva à redução da variação genética dentro de populações e o aumento da diversidade entre populações. Por outro lado, o Cerrado, área de ocorrência de *P. reticulata*, somente foi ocupado de forma intensiva a partir da década de 70 (Almeida *et al.*, 1998), de forma que os efeitos da fragmentação sobre essas populações, dificilmente pode ser percebido a partir da análise de indivíduos

adultos, especialmente considerando-se a longevidade desta espécie. De qualquer forma, o fato de nenhum dos indivíduos analisados, das duas espécies, ser geneticamente igual a outro, considerando-se todos os marcadores RAPD produzidos, evidencia que ambas espécies apresentam níveis consideráveis de variabilidade intrapopulacional.

Quanto à estrutura genética, pode-se dizer que a baixa frequência de bandas exclusivas para determinadas populações indica que a maior parte da divergência entre populações, determinada por estes marcadores, deve-se à variações nas frequências das bandas mais do que à presença de bandas exclusivas ou específicas. Estas variações permitiram detectar diferenças estatisticamente significativas entre as populações de cada uma das espécies, através da análise de variância molecular (AMOVA). De acordo com Wright (1978), citado por Hartl e Clark (1997), valores de  $F_{ST}$  entre 0 e 0,05 indicam pequena diferenciação genética, entre 0,05 e 0,15 indicam moderada diferenciação, entre 0,15 e 0,25 a diferenciação genética pode ser considerada grande e acima de 0,25 muito grande. Seguindo esta interpretação, a diferenciação genética entre as populações de *P. reticulata* pode ser considerada moderada ( $\phi_{ST}=0,123$ ) enquanto que entre as populações de *P. foliolosa* pode-se considerar que existe uma diferenciação genética muito grande ( $\phi_{ST}=0,337$ ).

Segundo Hamrick e Godt (1989), espécies que se reproduzem principalmente por fecundação cruzada tendem a apresentar entre 10 e 20% da variação genética entre populações, dependendo do tipo de agente polinizador, enquanto espécies que se reproduzem principalmente por auto-fecundação apresentam em média 50% da variação entre populações. O fato da maioria dos trabalhos sobre sistema de cruzamento em arbóreas tropicais revelarem uma alta taxa de fecundação cruzada (Bawa, 1990; Nason *et al.*, 1997; Aldrich *et al.*, 1998) e a comparação dos valores de  $F_{ST}$  apresentados por *P. reticulata* e *P. foliolosa* com as generalizações feitas por Hamrick e Godt (1989) e ainda com outros trabalhos em espécies que se reproduzem principalmente por fecundação cruzada, realizados de uma forma muito similar à apresentada aqui (Huff *et al.*, 1993; Rossetto *et al.*, 1995), permitem sugerir que *P. reticulata* e *P. foliolosa* se reproduzem principalmente dessa forma. Supondo que a polinização das flores de ambas espécies é feita principalmente por abelhas e a dispersão de sementes feita pelo vento, valores de  $F_{ST}$  entre 0,10 e 0,20 são esperados (Hamrick e Godt, 1989). O fato de *P. foliolosa* ter apresentado uma alta proporção da diversidade genética entre populações, assim como

ocorreu com uma outra leguminosa de Mata Atlântica, estudada por Cardoso *et al.* (1998) ( $\phi_{ST}=0,58$ ), pode novamente ser explicado pelo fato de que estas populações estão fragmentadas e isoladas há muito mais tempo do que as populações de *P. reticulata*.

A observação dos valores de  $Nm$  estimados para cada par de populações permite fazer algumas considerações. O fluxo gênico entre as populações analisadas de *P. reticulata* ( $Nm$  entre 0,946 e 7,364) foi consideravelmente maior do que entre as populações de *P. foliolosa* ( $Nm$  entre 0,292 e 0,848). Os valores apresentados pelas populações de *P. reticulata* estão dentro do esperado para arbóreas tropicais segundo Hamrick e Loveless (1989), que encontraram valores de  $Nm$  entre 2,53 e 11,11 (média = 5,12), e segundo Reis (1996), que constatou que valores de  $Nm$  acima de 1,0 são comuns entre populações de arbóreas tropicais. As populações FX1 e FX2 (*P. reticulata*) apresentaram uma estimativa de fluxo gênico bastante elevada ( $Nm=7,364$ ) indicando que, à despeito do  $F_{ST}$  entre elas ser estatisticamente significativo (0,038,  $P<0,05$ ), intenso fluxo gênico deve ter ocorrido no passado e talvez ainda esteja ocorrendo, entre estas duas populações. Há alguns anos, FX1 e FX2 formavam uma única população contínua e apesar de hoje estarem separadas por alguns poucos quilômetros de plantações de eucaliptos, talvez ainda possam ser consideradas uma única população, uma vez que Hartl e Clark (1997) sugerem que valores de  $Nm$  superiores a 4,0 indicam que as populações se comportam como um única população panmítica. Estas duas populações foram as únicas das duas espécies a ultrapassar este valor. Os valores de  $Nm$  estimados para *P. foliolosa* (0,292-0,848) podem ser comparados com as estimativas de fluxo gênico obtidas para outras duas espécies de Mata Atlântica. *Caesalpinia echinata* apresentou valores de  $Nm$  entre 0,311 a 1,086 (Cardoso *et al.*, 1998) e o  $Nm$  estimado para populações de *Cryptocarya moschata* foi igual a 0,9 (Moraes *et al.*, 1999). O fluxo gênico entre populações dessas espécies e de *P. foliolosa* pode ser considerado relativamente baixo se comparado com os valores apresentados por outras arbóreas tropicais, e segundo Wright (1951) não seria suficiente para prevenir os efeitos da deriva e impedir a divergência genética entre as populações.



## 5.2 Diferenciação de *P. reticulata* e *P. foliolosa*

Os marcadores RAPD utilizados neste estudo permitiram diferenciar as espécies *P. reticulata* e *P. foliolosa*, relatadas na literatura disponível como de difícil diferenciação à partir de caracteres morfológicos, o que acontece com diversas outras espécies arbóreas (Rath *et al.*, 1998). Foram detectados 4 marcadores espécie-específicos e 22 marcadores exclusivos, à despeito dos perfis de amplificação das duas espécies serem muito semelhantes. Tanto a partir da análise de variância molecular quanto pela configuração do dendograma, percebe-se que há considerável diferença entre *P. reticulata* e *P. foliolosa*. Portanto, os resultados aqui apresentados estão de acordo com a separação taxonômica das duas espécies.

Huff *et al.* (1993) consideram que, mesmo para a diferenciação de linhagens de uma mesma espécie através da técnica de RAPD, não seria necessário a utilização de um grande número de *primers*. O resultados obtidos a partir da AMOVA feita com cada *primer* separadamente (Figura 8) indicam que realmente poucos *primers* seriam suficientes para diferenciar *P. reticulata* e *P. foliolosa*. Os *primers* OPL-4 e OPA-13 por exemplo, bastariam para se obter um resultado muito próximo àquele revelado pelos dez *primers* analisados em conjunto, e *primers* como o OPA-18 cumprem ainda melhor esta tarefa de diferenciação molecular das duas espécies. Por outro lado, quando se trabalha com um pequeno número de *primers* corre-se o risco de se fazer inferências incorretas sobre as espécies ou populações estudadas. Por exemplo: se a análise tivesse sido realizada apenas com o *primer* OPA-4 é possível que as duas espécies tivessem sido consideradas como uma única pois, para este, a variação encontrada dentro de populações supera a variação entre espécies e pela simples observação das fotos dos géis ficaria realmente muito difícil separá-las. Entretanto, a partir desse estudo já se torna possível considerar a possibilidade de utilização de um número reduzido de *primers*. Em trabalhos futuros, apenas aqueles *primers* que resultaram em melhor diferenciação das duas espécies poderão ser utilizados para a identificação de indivíduos coletados no campo ou de coleções de herbário e talvez ainda possam servir como marcadores taxonômicos do gênero *Plathymenia*. As Análises Discriminantes permitiram identificar quais loci tiveram maior peso na separação das populações e das espécies, e estes poderão servir como referência para outros trabalhos com as duas espécies.

A grande semelhança morfológica entre *P. reticulata* e *P. foliolosa*, a existência de substâncias diterpênicas presentes na madeira apenas destas duas espécies (Heringer e Ferreira, 1972) e a observação de diversos marcadores RAPD compartilhados pela duas indicam haver uma grande proximidade entre elas e sugere uma separação recente. A “Teoria dos Refúgios” tem sido utilizada para explicar eventos de especiação em muitas plantas tropicais (Newton *et al.*, 1999). De acordo com essa teoria, durante o Pleistoceno (50.000-13.000 anos A.P.), caracterizado por longos períodos de clima frio e seco (estádios glaciais) alternados por períodos de clima quente e úmido (estádios interglaciais), ocorreram retrações e expansões da floresta tropical úmida. Durante os períodos mais secos houve expansão das formações vegetais xéricas e redução das áreas florestais tropicais aos sítios mais úmidos e quentes, fragmentos denominados refúgios (Whitmore e Prance, 1987; Ab’Sáber, 1990; Ridley, 1996). É possível imaginar, a partir destas informações, que esses eventos tenham tido importância no fenômeno de especiação envolvendo o ancestral comum de *P. reticulata* e *P. foliolosa*. Populações restritas aos fragmentos úmidos poderiam ter se diferenciado em *P. foliolosa* enquanto as populações nas áreas xéricas teriam originado *P. reticulata*. A retropicalização que ocorreu entre 12.000 e 9.000 anos A.P. permitiu uma nova expansão das florestas tropicais e gradualmente estabeleceram-se as condições da vegetação, semelhante ao que se observa nos dias de hoje.

Apesar de ter sido possível nesse trabalho separar claramente as duas espécies, é preciso observar que a população NE apresentou algumas características diferentes das outras populações de *P. foliolosa*. Conforme citado anteriormente, esta população fica situada em uma área considerada de transição, onde é possível encontrar exemplares de espécies típicas de Mata Atlântica e de Cerrado. Na verdade, ao passar por esta região é possível detectar inúmeros espécimes de *P. reticulata*, o que não ocorre nas regiões onde foram coletadas as outras populações de *P. foliolosa*. Heringer e Ferreira (1972) já haviam observado a ocorrência das duas espécies lado a lado em outros locais do estado de Minas Gerais (Curvelo e Paraopeba). A ocorrência de 21 marcadores RAPD em indivíduos da população NE que apenas apareciam na espécie *P. reticulata*, em maior ou menor frequência, evidencia a peculiaridade desta população. De fato, os valores de  $\phi_{ST}$  entre populações das duas espécies e a Análise Discriminante demonstraram claramente que, em comparação com as outras populações de *P. foliolosa*, NE é geneticamente mais similar às

populações de *P. reticulata*. Uma hipótese para explicar este fato seria a possível ocorrência de fluxo gênico entre indivíduos das duas espécies nessa região onde elas co-ocorrem. A enorme semelhança entre as flores das duas espécies e a sobreposição dos períodos de florescimento, associada à possibilidade de compartilhamento de polinizadores nessa região, indicam que isso seria possível. Pode-se supor que, durante a especiação o isolamento das populações não tenha sido completo e eventos esporádicos de fluxo gênico teriam ocorrido no passado e/ou estariam ocorrendo ainda hoje nas áreas onde as duas espécies podem ser encontradas, como acontece na região da população NE. Desta forma, esta população poderia estar localizada em uma “zona híbrida”, ou seja, uma região onde populações geneticamente distintas se encontram e inter cruzam (Ridley, 1996; Futuyma, 1997).

Mais estudos necessitam ser feitos para reforçar a hipótese de que fluxo gênico ocorre entre as duas espécies na natureza. Experimentos de cruzamentos artificiais entre *P. reticulata* e *P. foliolosa* e análises de outras populações das duas espécies, oriundas de regiões onde elas co-ocorrem e de regiões centrais de distribuição, poderão ajudar a esclarecer melhor a evolução dessas espécies. Diversos trabalhos utilizando a técnica de RAPD conseguem comprovar a ocorrência de eventos de hibridização e introgressão na natureza, na maioria das vezes confirmando suspeitas a partir de observações morfológicas (Arnold *et al.*, 1991; Liu e Furnier; 1993; Linfante e Aguinagalde, 1996; Daehler e Strong, 1997). Entretanto, a natureza dos fragmentos RAPD de mesmo tamanho observados em duas espécies diferentes deve ser melhor investigada. Apesar de Thormann *et al.* (1994) e Rieseberg (1996) terem demonstrado que de 80 a 90% dos fragmentos de mesmo tamanho produzidos por esta técnica são homólogos, mesmo quando pertencentes à espécies diferentes e próximas, a comprovação da homologia das bandas exibidas por *P. reticulata* e *P. foliolosa* só seria possível através de experimentos de hibridização Southern-Blot.

### **5.3 Implicações para a conservação das duas espécies**

Considerando-se a longevidade das duas espécies estudadas, os possíveis efeitos genéticos da fragmentação, resultando em isolamento das populações e consequente redução do fluxo gênico, podem demorar muito tempo para serem detectados. A diversidade genética mantida dentro de uma espécie é uma função de eventos históricos e

processos evolutivos recentes e, como normalmente muito pouco se sabe sobre a história ecológica e evolutiva de uma espécie, explicações para os níveis de diversidade encontrados normalmente baseiam-se em inferências (Godt *et al.*, 1996). A menor diversidade genética dentro de populações e a grande divergência entre populações apresentada por *P. foliolosa*, pode ser um reflexo de uma fragmentação mais antiga ou ainda de características da biologia reprodutiva da espécie que a tornam diferente de *P. reticulata*. Por outro lado, os efeitos genéticos da fragmentação muito mais recente das áreas de Cerrado talvez ainda não possam ser percebidos nas características genéticas de *P. reticulata*. Um acompanhamento da evolução destas populações ou talvez uma análise genética a partir de indivíduos jovens ou sementes possa indicar mudanças nos padrões de diversidade genética pós-fragmentação. Aldrich *et al.* (1998) verificaram diferenças na estrutura genética de sementes em relação à plantas jovens e adultas da espécie arbórea *Symphonia globulifera*, diferenças estas que os autores consideraram serem decorrente de alterações no sistema de acasalamento pós-fragmentação, um evento ainda recente nessas populações.

Conforme discutido inicialmente, as duas espécies pertencem a dois ecossistemas profundamente ameaçados pela ação antrópica. Pode-se considerar que a Mata Atlântica, atualmente, está restrita à fragmentos mantidos principalmente em áreas de parques e reservas e espera-se que estas áreas possam realmente estar cumprindo seus objetivos de conservação e sendo protegidas contra novos desmatamentos. As áreas de Cerrado também se encontram bastante fragmentadas, mas ainda ocupam uma grande área do Planalto Central do Brasil. Se estes fragmentos puderem ser preservados, os níveis de diversidade genética encontrados nas populações analisadas de *P. reticulata* e *P. foliolosa* levam a crer que essas populações poderão se manter a longo prazo. Como dito anteriormente, é possível que muitas arbóreas tropicais consigam sobreviver como metapopulações por várias gerações, devido à alta capacidade de movimentação de muitos vetores de pólen e sementes. Além disso, sabe-se que muitos fragmentos são importantes componentes dos demes de arbóreas tropicais e reservatórios de variação genética, bem como focos de manutenção de polinizadores e dispersores de sementes (Nason *et al.*, 1997), o que ressalta a importância da preservação dessas áreas.

A região onde a população NE ocorre e outras populações com características similares que venham a ser detectadas, devem receber atenção especial, não apenas no

sentido de serem preservadas, como também melhor investigadas, pois podem representar importantes áreas para a manutenção da diversidade genética ao nível da espécie. Tem sido demonstrado que a variação genética mantida nas zonas híbridas pode ser extremamente vantajosa, contribuindo para a adaptação da espécies (Futuyma, 1997).

Este estudo fornece uma base de dados genéticos que poderão ser usados para monitorar populações de *P. reticulata* e *P. foliolosa* além de permitir acompanhar e compreender melhor as consequências genéticas da fragmentação em espécies arbóreas, contribuindo para o entendimento da genética de arbóreas tropicais de uma maneira geral, tema sobre o qual poucas informações estão disponíveis na literatura.

## 6 CONCLUSÕES

A partir da análise genética de populações de *Plathymenia reticulata* e *P. foliolosa* através de marcadores moleculares do tipo RAPD foi possível chegar às seguintes conclusões:

- A maior parte da variação genética nas duas espécies analisadas pode ser atribuída à diferenças entre os indivíduos dentro de populações.
- Os níveis de variação genética intrapopulacional foram diferentes para as duas espécies analisadas. De maneira geral, as populações de *P. foliolosa* apresentaram menor variação do que as populações de *P. reticulata*. A população NE foi uma exceção entre as populações de *P. foliolosa* pois apresentou os níveis mais elevados de diversidade genética para todos os parâmetros analisados, ou seja, apresentou maior porcentagem de loci polimórficos e maior diversidade calculada pelo índice de Shannon e pela AMOVA.
- A porcentagem de variação genética atribuída à diferenças entre as populações também foi bastante diferente para as duas espécies analisadas. A estruturação genética apresentada por *P. foliolosa* foi mais evidente do que a apresentada por *P. reticulata*, mas em ambas espécies houve diferenças significativas entre as populações analisadas.
- Os valores estimados de fluxo gênico ( $Nm$ ) foram maiores entre as populações de *P. reticulata* do que entre as populações de *P. foliolosa*, o que está de acordo com a estrutura genética observada. *P. reticulata* apresentou valores de  $Nm$  dentro da faixa prevista para a maioria das arbóreas tropicais.
- As diferenças de diversidade e estrutura genética entre as duas espécies podem ser atribuídas à diferenças na biologia reprodutiva e nos processos históricos que levaram à formação das populações analisadas. É possível que as duas espécies analisadas apresentem diferentes taxas de fecundação cruzada e ainda que as populações de *P. reticulata* tenham sido submetidas à fragmentação em um período mais recente de sua história. Mais estudos serão necessários para determinar com certeza se as duas espécies apresentam diferenças quanto à sua biologia reprodutiva.
- *P. reticulata* e *P. foliolosa*, duas espécies com vários caracteres morfológicos muito semelhantes, puderam ser diferenciadas através de marcadores RAPD. Essa técnica

permitiu a obtenção de marcadores espécie-específicos e exclusivos que poderão ser usados no futuro para a classificação de indivíduos e de coleções de herbário.

- Uma das populações analisadas da espécie *P. foliolosa* (população NE), coletada em uma área onde as duas espécies co-ocorrem, apresentou diversos marcadores típicos de *P. reticulata*, sugerindo a ocorrência de fluxo gênico entre as duas espécies e que esta população pode estar localizada em uma zona híbrida. Novos estudos deverão ser realizados a fim de determinar se este fato ocorre também em outras populações localizadas em áreas onde as duas espécies podem ser encontradas.
- Os níveis de variação genética apresentados pelas populações analisadas indicam que estas poderão se manter por muitas gerações desde que os fragmentos onde ocorrem possam ser preservados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aagaard, J.E., Volmer, S.S., Sorensen, F.C. and Strauss, S.H.** (1995). Mitochondrial DNA products among RAPD profiles are frequent and strongly differentiated between races of Douglas-fir. *Mol. Ecol.* 4: 441-447.
- Aagaard, J.E., Krutovskii, K.V. and Strauss, S.H.** (1998). RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. *Heredity* 81: 69-78.
- Ab'Sáber, A.N.** (1990). Paleoclimas quaternários e pré-história da América Tropical I. *Rev. Bras. Biol.* 50: 805-820.
- Aldrich, P.R., Hamrick, J.L., Chavarriaga, P. and Kochert, G.** (1998). Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Mol. Ecol.* 7: 933-944.
- Almeida, S.P., Proença, C.E.B. and Sano, S.M.** (1998). *Cerrado: Espécies Vegetais Úteis*. EMBRAPA-CPAC, Planaltina.
- Alvarez-Buylla, E.R., García-Barrios, R., Lara-Moreno, C. and Martínez-Ramos, M.** (1996). Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest tree species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27: 387-421.
- Arnold, M.L., Buckner, C.M. and Robinson, J.J.** (1991). Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1398-1402.
- Ayliffe, M.A., Lawrence, G.J., Ellis, J.G. and Pryor, A.J.** (1994). Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. *Nucleic Acids Res.* 22: 1632-1636.
- Bawa, K.S.** (1990). Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21: 399-422.
- Bawa, K.S. and Seidler, R.** (1998). Natural forest management and conservation of biodiversity in tropical forests. *Conserv. Biol.* 12: 46-55.



- Bielawski, J.P. and Pumo, D.E.** (1997). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. *Heredity* 78: 32-40.
- Black-Samuelsson, S., Eriksson, G., Gustafsson, L. and Gustafsson, P.** (1997). RAPD and morphological analysis of the rare plant species *Vicia pisiformis* (Fabaceae). *Biol. J. Linnean Soc.* 61: 325-343.
- Bonnin, I., Huguet, T., Gherardi, M., Prosperi, J.M. and Olivieri, I.** (1996). High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species, *Medicago truncatula* (Leguminosae), shown using RAPD markers. *Am. J. Bot.* 83: 843-855.
- Brauner, S., Crawford, D.J. and Stuessy, T.F.** (1992). Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae. *Am. J. Bot.* 79: 1436-1439.
- Caetano-Anollés, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M.** (1994). Buffer components tailor DNA amplification with arbitrary primers. *PCR Methods Appl.* 4: 59-61.
- Cardoso, M.A., Provan, J., Powell, W., Ferreira, P.C.G. and Oliveira, D.E. de** (1998). High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinea echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae). *Mol. Ecol.* 7: 601-608.
- Carvalho, P.E.R.** (1994). *Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira*. EMBRAPA-CNPQ/SPI, Brasília.
- Chalmers, K.J., Waugh, R., Sprent, J.I., Simons, A.J. and Powell, W.** (1992). Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69: 465-472.
- Chatelain, C., Gautier, L. and Spichiger, R.** (1996). A recent history of forest fragmentation in southwestern Ivory Coast. *Biodiv. Conserv.* 5: 37-53.
- Chatfield, C. and Collins, A.J.** (1996). *Introduction to Multivariate Analysis*. Chapman & Hall, London.
- Clark, A.G. and Lanigan, C.M.S.** (1993). Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. *Mol. Bio. Evol.* 10: 1096-1111.
- Crow, J.F. and Kimura, M.** (1970). *An introduction to population genetics theory*. Harper and Row Publishers, New York.

- Daehler, C.C. and Strong, D.R.** (1997). Hybridization between introduced smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*; Poaceae) and native California cordgrass (*S. foliosa*) in San Francisco Bay, California, USA. *Am. J. Bot.* 84: 607-611.
- Deragon, J.-M. and Landry, B.S.** (1992). RAPD and other PCR-based analysis of plant genomes using DNA extracted from small leaf disks. *PCR Methods Appl.* 1: 175-180.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L.** (1987). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Ellsworth, D.L., Rittenhouse, K.D. and Honeycutt, R.L.** (1993). Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques* 14: 214-217.
- Excoffier, L.** (1995). WINAMOVA, ver. 1.55. Genetics and Biometry Lab., Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. and Quattro, J.M.** (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Felsenstein, J.** (1993). PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.
- Ferreira, M.E. and Grattapaglia, D.** (1995). *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética*. EMBRAPA/CENARGEN, Brasília.
- Foré, S.A. and Guttman, S.I.** (1999). Genetic structure of *Helianthus occidentalis* (Asteraceae) in a preserve with fragmented habitat. *Am. J. Bot.* 86: 988-995.
- Frankham, R.** (1996). Relationships of genetic variation to population size in wildlife. *Conserv. Biol.* 10: 1500-1508.
- Fritsch, P. and Rieseberg, L.H.** (1996). The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: *Molecular Genetic Approaches in Conservation* (Smith, T.B. and Wayne, R.K., eds.). Oxford Univ. Press, New York, pp. 54-73.
- Futuyma, D.J.** (1997). *Evolutionary Biology*. 3 ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland.

- Gibbs, H.L., Prior, K.A. and Weatherhead, P.J.** (1994). Genetic analysis of populations of threatened snake species using RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3: 329-337.
- Godt, M.J.W., Johnson, B.R. and Hamrick, J.L.** (1996). Genetic diversity and population size in four rare southern Appalachian plant species. *Conserv. Biol.* 10: 796-805.
- Godt, M.J.W., Walker, J. and Hamrick, J.L.** (1997). Genetic diversity in the endangered lily *Harperocallis flava* and a close relative, *Tofieldia racemosa*. *Conserv. Biol.* 11: 361-366.
- Goldblatt, P.** (1981). Cytology and the phylogeny of Leguminosae. In: *Advances in Legume Systematics Part 2* (Polhill, R.M. and Raven, P.M., eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 427-463.
- Guidet, F.** (1994). A powerful new technique to quickly prepare hundreds of plant extracts for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Res.* 22: 1772-1773.
- Hadrys, H., Balick, M. and Schierwater, B.** (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1: 55-63.
- Haig, S.M., Rhymer, J.M. and Heckel, D.G.** (1994). Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers *Picoides borealis*. *Mol. Ecol.* 3: 581-595.
- Halldén, C., Hansen, M., Nilsson, N.-O., Hjerdin, A. and Säll, T.** (1996). Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1185-1192.
- Hamrick, J.L. and Loveless, M.D.** (1989). The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. In: *The Evolutionary Ecology of Plants* (Bock, J.H. and Linhart, Y.B., eds.). Westview Press, Boulder, pp. 129-146.
- Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W.** (1989). Allozyme diversity in plant species. In: *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources* (Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. and Weir, B.S., eds.). Sinauer Associates Inc., Sunderland, pp. 43-63.
- Hartl, D.L. and Clark, A.G.** (1997). *Principles of Population Genetics*. 3 ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland.

- Heringer, E.P.** (1956). O gênero *Plathymenia*. In: *Annais da Sociedade Botânica do Brasil*, São Paulo, pp. 55-64.
- Heringer, E.P. and Ferreira, M.B.** (1972). Árvores úteis no cerrado (I): Vinhático – o gênero *Plathymenia* Benth. *P. foliolosa* Benth. e *P. reticulata* Benth., vinhático da mata e vinhático do campo (par vicariante). *Cerrado* 5: 28-34.
- Heun, M. and Helentjaris, T.** (1993). Inheritance of RAPDs in F<sub>1</sub> hybrids of corn. *Theor. Appl. Genet.* 85: 961-968.
- Heun, M., Murphy, J.P. and Phillips, T.D.** (1994). A comparison of RAPD and isozyme analyses for determining the genetic relationships among *Avena sterilis* L. accessions. *Theor. Appl. Genet.* 87: 689-696.
- Hogbin, P.M., Ayre, D.J. and Whelan, R.J.** (1998). Genetic variation and reproductive success of road verge populations of the rare shrub *Grevillea barklyana* (Proteaceae). *Heredity* 80: 180-186.
- Holsinger, K.E. and Gottlieb, L.D.** (1991). Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In: *Genetics and Conservation of Rare Plants* (Falk, D.A. and Holsinger, K.E., eds.). Oxford Univ. Press, New York, pp. 195-223.
- Huang H., Dane, F. and Kubisiak, T.L.** (1998). Allozyme and RAPD analysis of the genetic diversity and geographic variation in wild populations of the American chestnut (Fagaceae). *Am. J. Bot.* 85: 1013-1021.
- Huff, D.R., Peakall, R. and Smouse, P.E.** (1993). RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theor. Appl. Genet.* 86: 927-934.
- Imaña-Encinas, J., Paula, J.E. de and Sugimoto, N.** (1995). Análise fitossociológica do cerrado da Fazenda Marflora. *Pesq. Agropec. Bras.* 30: 577-582.
- Jun, Y.H., Dai S.L. and Wu, N.H.** (1997). RAPD analysis of natural populations of *Acanthopanax brachypus*. *Cell Res.* 7: 99-106.
- Kattan, G.H., Álvarez-Lopez, H. and Giraldo, M.** (1994). Forest fragmentation and bird extinctions: San Antônio eighty years later. *Conserv. Biol.* 8: 138-146.

- Kazan, K., Manners, J.M. and Cameron, D.F.** (1993a). Genetic relationships and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. *Genome* 36: 43-49.
- Kazan, K., Manners, J.M. and Cameron, D.F.** (1993b). Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in an interspecific cross in the genus *Stylosanthes*. *Genome* 36: 50-56.
- Kim, C.S., Lee, C.H., Chung, Y.S. and Hyung, N.I.** (1997). A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Res.* 25: 1085-1086.
- King, L.M. and Schall, B.A.** (1989). Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. *Evolution* 43: 1117-1119.
- Krebs, C.J.** (1989). *Ecological Methodology*. Harper Collins Publishers, New York.
- Landau, E.C., Gonçalves-Alvim, S.J., Fagundes, M. and Fernandes, G.W.** (1998). Riqueza e abundância de herbívoros em flores de *Vellozia nivea* (Velloziaceae). *Acta Bot. Bras.* 12: 403-409.
- Lakshmi, M., Rajalakshmi, S., Parani, M., Anuratha, C.S. and Parida, A.** (1997). Molecular phylogeny of mangroves I. Use of molecular markers in assessing the intraspecific genetic variability in the mangrove species *Acanthus ilicifolius* Linn. (Acanthaceae). *Theor. Appl. Genet.* 94: 1121-1127.
- Lázaro, A. and Aguinagalde, I.** (1998). Genetic diversity in *Brassica oleracea* L. (Cruciferae) and wild relatives ( $2n=18$ ) using RAPD markers. *Ann. Bot.* 82: 829-833.
- Lewis, G.P.** (1987). *Legumes of Bahia*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Lewontin, R.C.** (1972). The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.* 6: 381-398.
- Linfante, Z.D. and Aguinagalde, I.** (1996). The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers for the study of taxonomical relationships among species of *Asphodelus* sect. *verinea* (Asphodelaceae). *Am. J. Bot.* 83: 949-953.
- Liu, Z. and Furnier, G.R.** (1993). Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theor. Appl. Genet.* 87: 97-105.

- Lorenzi, H.** (1992). *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. Editora Plantarum, Nova Odessa.
- Loveless, M.D. and Hamrick, J.L.** (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95.
- Lu, M.-Z., Wang, X.-R. and Szmit, A.E.** (1997). Molecular properties of RAPDs in *Pinus sylvestris* (L.) and their implications for genetic analysis. *Forest Genet.* 4: 227-234.
- Lynch, M. and Milligan, B.G.** (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3: 91-99.
- Matos, F.J.A., Craveiro, A.A. and Maurera, M.A.M.A.** (1984). Furan diterpenes of the *Plathymenia* genus. *J. Nat. Prod.* 47: 581-584.
- Meunier, J.-R. and Grimont, P.A.D.** (1993). Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144: 373-379.
- Miller, M.P.** (1997). AMOVA-PREP: a program for the preparation of input files for Laurent Excoffier's AMOVA software. Computer software distributed by author.
- Milligan, B.G., Leebens-Mack, J. and Strand, A.E.** (1994). Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Mol. Ecol.* 3: 423-435.
- Miranda, A.R.** (1999). Fenologia, aspectos ecofisiológicos da germinação e conservação de sementes de *Plathymenia reticulata* Benth. Fabaceae-Mimosoideae. Tese de Doutorado, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Mirandola Filho, A. and Mirandola, N.S.A.** (1991). *Vegetais Tintoriais do Brasil Central*. Ed. Líder, Goiânia *apud Almeida, S.P., Proença, C.E.B. and Sano, S.M.* (1998). *Cerrado: Espécies Vegetais Úteis*. EMBRAPA-CPAC, Planaltina.
- Mittermeier, R.A., Myers, N., Gil, P.R. and Mittermeier, C.G.** (1999). *Hotspots: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions*. CEMEX, Mexico City.
- Mockford, S.W., Snyder, M. and Herman, T.B.** (1999). A preliminary examination of genetic variation in a peripheral population of Blanding's turtle, *Emydoidea blandingii*. *Mol. Ecol.* 8: 323-327.

- Montagnini, F., Fanzeres, A. and Vinha, S.G. da** (1995). The potentials of 20 indigenous tree species for soil rehabilitation in the Atlantic forest region of Bahia, Brazil. *J. Appl. Ecol.* 32: 841-856.
- Moraes, P.L.R., Monteiro, R. and Vencovsky, R.** (1999). Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. *Rev. Bras. Bot.* 22: 237-248.
- Morden, C.W. and Loeffler, W.** (1999). Fragmentation and genetic differentiation among subpopulations of the endangered Hawaiian mint *Haplostachys haplostachya* (Lamiaceae). *Mol. Ecol.* 8: 617-625.
- Nason, J.D., Aldrich, P.R. and Hamrick, J.L.** (1997). Dispersal and the dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations. In: *Tropical Forest Remnants: Ecology, Management and Conservation of Fragmented Communities* (Laurence, W.F. and Bierregaard Jr., R.O., eds.). University of Chicago Press, Chicago, pp. 304-320.
- Newton, A.C., Allnut, T.R., Gillies, A.C.M., Lowe, A.J. and Ennos, R.A.** (1999). Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends Ecol. Evol.* 14: 140-145.
- Norusis, M.J.** (1993). SPSS for Windows release 6.0. SPSS Inc., USA.
- Nusser, J.A., Goto, R.M., Ledig, D.B., Fleischer, R.C. and Miller, M.M.** (1996). RAPD analysis reveals low genetic variability in the endangered light-footed clapper rail. *Mol. Ecol.* 5: 463-472.
- Page, D.M.** (1996). TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Available from <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>.
- Palacios, C. and González-Candelas, F.** (1997). Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). *Mol. Ecol.* 6: 1107-1121.
- Pan, Y.-B., Burner, D.M., Ehrlich, K.C., Grisham, M.P. and Wei, Q.** (1997). Analysis of primer-derived, nonspecific amplification products in RAPD-PCR. *BioTechniques* 22: 1071-1077.

- Park, Y. and Kohel, R.J.** (1994). Effect of concentration of MgCl<sub>2</sub> on random-amplified DNA polymorphism. *BioTechniques* 16: 652-655.
- Parker, P.G., Snow, A.A., Schug, M.D., Booton, G.C. and Fuerst, P.A.** (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-382.
- Penner, G.A.** (1996). RAPD analysis of plant genomes. In: *Methods of Genome Analysis in Plants* (Jauhar, P.P., ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 252-268.
- Pérez, T., Albornoz, J. and Dominguez, A.** (1998). An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Mol. Ecol.* 7: 1347-1357.
- Rath, P., Rajaseger, G., Goh, C.J. and Kumar, P.P.** (1998). Phylogenetic analysis of dipterocarps using random amplified polymorphic DNA markers. *Ann. Bot.* 82: 61-65.
- Reis, M.S.** (1996). Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais em plantas. *Braz. J. Genet.* 19: 37-47.
- Ribeiro, J.F. and Walter, B.M.T.** (1998). Fitofisionomias do bioma cerrado. In: *Cerrado: Ambiente e Flora* (Sano, S.M. and Almeida, S.P., eds.). EMBRAPA-CPAC, Planaltina, pp. 89-166.
- Ridley, M.** (1996). *Evolution*. 2 ed. Blackwell Science, Cambridge.
- Rieseberg, L.H.** (1996). Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Mol. Ecol.* 5: 99-105.
- Rizzini, C.T.** (1979). *Tratado de Fitogeografia do Brasil: Aspectos Sociológicos e Florísticos*. HUCITEC, São Paulo.
- Rossetto, M., Weaver, P.K. and Dixon, K.W.** (1995). Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). *Mol. Ecol.* 4: 321-329.
- Schaal, B.A., Leverich, W.J. and Rogstad, S.H.** (1991). A comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. In: *Genetics and Conservation of Rare Plants* (Falk, D.A. and Holsinger, K.E. eds.). Oxford Univ. Press, New York, pp. 123-134.



- Schneider, S., Kueffer J.-M., Roessli, D. and Excoffier, L.** (1997). ARLEQUIN: a software for population genetic data analysis. Ver. 1.1. Genetics and Biometry Lab., Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Shaffer, C.L.** (1995). Values and shortcomings of small reserves. *BioScience* 45: 80-88.
- Smith, J.F. and Pham, T.V.** (1996). Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae). *Am. J. Bot.* 83: 717-726.
- Stewart Jr., C.N., and Porter, D.M.** (1995). RAPD profiling in biological conservation: an application to estimating clonal variation in rare and endangered *Iliamna* in Virginia. *Biol. Conserv.* 74: 135-142.
- Stewart Jr., C.N., and Excoffier, L.** (1996). Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). *J. Evol. Biol.* 9: 153-171.
- Stuart, S.N. and Heywood, V.H.** (1992). Species extinctions in tropical forests. In: *Tropical Deforestation and Species Extinction* (Sayer, J.A. and Whitmore, T.C., eds.). Chapman & Hall, London, pp. 91-117.
- Sulaiman, I.M. and Hasnain, S.E.** (1996). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers reveal genetic homogeneity in the endangered Himalayan species *Meconopsis paniculata* and *M. simplicifolia*. *Theor. Appl. Genet.* 93: 91-96.
- Sun, G.-L., Díaz, O., Salomon, B. and von Bothmer, R.** (1998). Microsatellite variation and its comparison with allozyme and RAPD variation in *Elymus fribrosus* (Schrenk) Tzvel. (*Poaceae*). *Hereditas* 129: 275-282.
- Swoboda I. and Bhalla, P.L.** (1997). RAPD analysis of genetic variation in the Australian fan flower, *Scaevola*. *Genome* 40: 600-606.
- Thormann, C.E., Ferreira, M.E., Camargo, L.E.A., Tivang, J.G. and Osborn, T.C.** (1994). Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor. Appl. Genet.* 88: 973-980.
- Toledo, J., Dehal, P., Jarrin, F., Hu, J., Hermann, M., Al-Shehbaz, I. and Quiros, C.F.** (1998). Genetic variability of *Lepidium meyenii* and other Andean *Lepidium* species (Brassicaceae) assessed by molecular markers. *Ann. Bot.* 82: 523-530.

- Turner, I.M.** (1996). Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. *J. Appl. Ecol.* 33: 200-209.
- Turner, I.M. and Corlett, R.T.** (1996). The conservation value of small, isolated fragments of lowland tropical rain forest. *Trends Ecol. Evol.*, 11: 330-333.
- Van Buren, R., Harper, K.T., Andersen, W.R., Stanton, D.J., Seymon, S. and England, J.L.** (1994). Evaluating the relationship of Autumn Buttercup (*Ranunculus acriformis* var. *aestivalis*) to some close congeners using random amplified polymorphic DNA. *Am. J. Bot.* 81: 514-519.
- Virk, P.S., Ford-Lloyd, B.V., Jackson, M.T. and Newbury, H.J.** (1995). Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity* 74: 170-179.
- Wachira, F.N., Waugh, R., Hackett, C.A. and Powell, W.** (1995). Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. *Genome* 38: 201-210.
- Weir, B.S. and Cockerham, C.C.** (1984). Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Whitmore, T.C. and Prance, G.T.** (1987). *Biogeography and Quaternary History in Tropical America*. Clarendon Press, Oxford.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K, Rafalski, J.A. and Tingey, S.V.** (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol.* 218: 704-740.
- Wolff, K., El-Akkad, S. and Abbott, R.J.** (1997). Population substructure in *Alkanna orientalis* (Boraginaceae) in the Sinai Desert, in relation to its pollinator behaviour. *Mol. Ecol.* 6: 365-372.
- Wolff, K. and Morgan-Richards, M.** (1998). PCR markers distinguish *Plantago major* subspecies. *Theor. Appl. Genet.* 96: 282-286.
- Wright, S.** (1951). The genetic structure of populations. *Ann. Eugenics* 15: 395-420.

- Wright, S.** (1978). *Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4. Variability within and among Natural Populations.* University of Chicago Press, Chicago *apud*
- Hartl, D.L.** and **Clark, A.G.** (1997). *Principles of Population Genetics.* 3 ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Yeh, F.C., Chong, D.K.X.** and **Yang, R.-C.** (1995). RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. *J. Heredity* 86: 454-460.
- Young, A., Boyle, T.** and **Brown, T.** (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol. Evol.* 11: 413-418.
- Yu, K.** and **Pauls, K.P.** (1992). Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucleic Acids Res.* 20: 2606.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)