

Vânia Gomes da Silva

**DISTRIBUIÇÃO INTRA E INTERPOPULACIONAL DA
VARIABILIDADE GENÉTICA DA ESPÉCIE
ENDÊMICA E AMEAÇADA *BACCHARIS CONCINNA*
(ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Genética 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.

Orientador: Prof. Dr. G. Wilson Fernandes

Belo Horizonte
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas
2001

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	6
Área de estudo.....	6
Material vegetal e extração de DNA.....	9
Reações RAPD.....	10
Análise dos dados.....	11
RESULTADOS.....	15
Polimorfismo de marcadores RAPD.....	15
Variabilidade genética intra e interpopulacional em populações de <i>B. concinna</i>	20
Similaridade genética entre populações de <i>B. concinna</i>	20
DISCUSSÃO.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

LISTA DE TABELAS

- 1 - Localização geográfica, altitude e número de indivíduos femininos e masculinos de *Baccharis concinna* amostrados em cada população na Serra do Cipó, MG7
- 2 - Matriz de distância geográfica (em quilômetros) entre as populações de *B. concinna* na Serra do Cipó, Brasil.....14
- 3 - Relação dos oligonucleotídeos selecionados, suas seqüências de bases e número absoluto de marcadores polimórficos obtidos em *Baccharis concinna*.....15
- 4 - Relação de marcadores restritos nas populações de *Baccharis concinna* estudadas e suas frequências absolutas por população.....18
- 5 - Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) com dados RAPD de 335 indivíduos de *Baccharis concinna* distribuídos em seis populações.....20
- 6 - Distribuição da variabilidade genética de populações de espécies endêmicas e/ou ameaçadas de extinção.....28

LISTA DE FIGURAS

1 - Ramos de <i>Baccharis concinna</i>	5
2 - Mapa da área de estudo e localização das populações de <i>Baccharis concinna</i> , na Serra do Cipó, Minas Gerais.....	8
3 - Gel de quantificação do DNA extraído de indivíduos de <i>B. concinna</i>	10
4 - Esquema de divisão das populações de <i>B. concinna</i> , de acordo com o gradiente altitudinal e com a expressão sexual dos indivíduos.....	13
5 - Polimorfismo de marcadores RAPD exibido pelo primer OPY20, na população 1100a.....	16
6 - Distribuição de frequência dos polimorfismos de marcadores RAPD ao longo das seis populações de <i>Baccharis concinna</i>	17
7 - Análise de Agrupamento UPGMA de similaridade genética para 6 populações de <i>Baccharis concinna</i> utilizando-se marcadores RAPD.....	21
Figura 8 - Fatores que podem estar influenciando na variabilidade genética de <i>B. concinna</i>	25

LISTA DE ABREVIATURAS

CTAB: Cetil Trimetil Amonio Bromide

DNA: Desoxirribonucleic Acid – Ácido Desoxirribonucleico

PCR: Polimerase Chain Reaction – Reação da Polimerase em Cadeia

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA – DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso

UPGMA: Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages – Método de Agrupamento Par usando Médias Aritméticas.

RESUMO

Baccharis concinna (Asteraceae) é um arbusto dióico, endêmico e ameaçado de extinção da Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais, onde se distribui ao longo de um gradiente altitudinal. Neste estudo, através de marcadores RAPD, verificou-se a variabilidade genética intra e interpopulacional de seis populações (335 indivíduos) de *B. concinna*, tendo sido propostas as questões: (i) como se distribui a variabilidade genética dentre e entre populações de *B. concinna*?; (ii) como se distribui a variabilidade genética entre diferentes altitudes?; e (iii) como se distribui a variabilidade genética entre indivíduos femininos e masculinos nas populações estudadas? O isolamento do DNA da espécie foi feito utilizando-se o protocolo CTAB padrão para extração de DNA vegetal. Dos 113 marcadores RAPD utilizados, cerca de 90% apresentaram padrão polimórfico em todas as populações. Dos marcadores restritos a algumas populações, 4 a 10% foram totalmente ausentes em algumas populações, enquanto 0,9 a 3% dos marcadores estiveram presentes em todos os indivíduos de algumas populações. A maior parte da variabilidade genética em *B. concinna* está retida dentro das populações (82,58%, Amova; $p < 0,001$), estando apenas 16,95% da variabilidade genética desta espécie distribuída entre populações (Amova; $p < 0,001$). A similaridade entre populações foi alta, variando de 66 a 74%. O gradiente altitudinal não influenciou a distribuição da variabilidade genética de *B. concinna*, enquanto o sexo da planta contribuiu com 0,47% da variação (Amova; $p < 0,05$). A dioícia associada à polinização e dispersão de sementes realizadas pelo vento possivelmente constituem os fatores mais importantes que contribuem para a alta variabilidade genética encontrada dentro das populações de *B. concinna* e para a menor variabilidade entre populações.



ABSTRACT

Molecular markers have been successfully used to study the genetic variability within and among plant populations. We used RAPD markers to study the genetic variability in six populations of *Baccharis concinna* (Asteraceae), an endemic, threatened and dioecious species found the Espinhaço Mountain, Minas Gerais. The studied populations were found along an altitudinal gradient ranging from 950 to 1300m above sea level in Serra do Cipó. DNA was isolated using the standard CTAB protocol to extract plant DNA. We found 113 RAPD markers of which 90% were polymorphic in all populations, 4 to 10% were totally absent in some populations, whereas 0,9 to 3% were present in all individuals of some populations. Genetic variability within populations was approximately 83% (Amova; $p < 0,001$) and 17% (Amova; $p < 0,05$) among populations. The similarity between populations was high, ranging from 65 to 74%. The variation in the altitudinal gradient was not related to the distribution of the genetic variability found in the *B. concinna* populations, while the sex contribute with 0,47% (Amova; $p < 0,05$). Wind pollinization and dispersion are postulated to be the most important factors that influence the distribution of the genetic variability in this species.

INTRODUÇÃO

Estudos de variabilidade genética em plantas contribuem para a compreensão dos mecanismos envolvidos na dinâmica populacional, adaptação e especiação, e assim nos processos de manutenção da diversidade e fluxo gênico (Ayres & Ryan 1999, Bussel 1999). Além disso, estudos de genética de populações são considerados prioritários para programas de conservação, pois fornecem dados fundamentais sobre a capacidade de sobrevivência da espécie por ocasião de possíveis mudanças ambientais (Prathepha & Baimai 1999). Por exemplo, é geralmente aceitável que populações com variabilidade genética reduzida podem ser mais susceptíveis a doenças e, assim, a sobrevivência da espécie poderia estar ameaçada (O'Brien & Evermann 1988). Por apresentar hábito relativamente séssil, plantas têm sua variabilidade genética associada a várias características de sua história de vida, destacando-se o sistema de reprodução (Loveless & Hamrick 1984). Espécies vegetais, cuja reprodução é feita predominantemente por polinização cruzada, tendem a apresentar populações geneticamente mais variáveis e menor diferenciação entre populações. Destaque especial deve ser dado às espécies dióicas, devido ao sistema de reprodução ser obrigatoriamente heterogâmico (Loveless & Hamrick 1984, Primack 1993).

Estudos de genética de populações de plantas raras têm aumentado nos últimos anos, devido à sua necessidade em biologia da conservação (e.g. Smith & Pham 1996, Prathepha & Baimai 1999, Esselman et al. 2000, Kang et al. 2000). Espécies endêmicas (consideradas raras por serem geograficamente restritas) apresentam-se geneticamente depauperadas, pois as populações são geralmente pequenas e tendem à homogeneidade, devido ao isolamento e deriva genética (Hamrick et al. 1979, Ledig & Conkle 1983,

Loveless & Hamrick 1984). Embora vários trabalhos corroborem essa premissa (e.g. Hickey et al. 1991, Ayres & Ryan 1999, Wolf et al. 2000), estudos recentes têm se mostrado contraditórios. Algumas espécies endêmicas apresentam altas porcentagens de variabilidade genética (Kang et al. 2000), principalmente quando comparadas a espécies congênicas de distribuição geográfica ampla (Smith & Pham 1996). Em muitos casos, os níveis de diversidade genética encontrados em espécies raras são quase os mesmos daqueles vistos em espécies congênicas amplamente distribuídas (veja revisão feita por Gitzendanner & Soltis 2000). Tais resultados podem sofrer influência da metodologia empregada, uma vez que a análise de isoenzimas dá uma boa caracterização fenotípica das espécies, enquanto técnicas que utilizam fragmentos de DNA, tais como RAPD, dão uma melhor caracterização genética. Por exemplo, os estudos das populações de quatro espécies de trevos do gênero *Trifolium* (Hickey et al. 1991) e da espécie *Calystegia collina* (Convolvulaceae) (Wolf et al. 2000) foram feitos utilizando isoenzimas. Os autores verificaram que as espécies endêmicas apresentavam baixa diversidade genética em suas populações. Apesar de serem marcadores co-dominantes e permitirem cálculos de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, as isoenzimas possuem um número limitado de locos polimórficos (Ferreira & Grattapaglia 1998). Além disso, por possuírem função metabólica, estes marcadores estão sujeitos a variações ambientais e, conseqüentemente às pressões seletivas. Por outro lado, o trabalho de Ayres & Ryan (1999) comparou a variabilidade genética entre duas endêmicas espécies do gênero *Wyethia* (Asteraceae) utilizando RAPD e isoenzimas. Eles verificaram que ambas espécies possuíam baixa variabilidade genética.

A rápida e agressiva destruição e fragmentação de habitats tem sido uma das principais causas de extinção de espécies de plantas endêmicas e raras (Primack 1993).

Grevillea scapigera A. S. George (Proteaceae), por exemplo, é uma espécie endêmica da Austrália, cujo habitat vem sendo substituído por extensas áreas para agricultura. A diversidade genética entre populações desta espécie é baixa e a destruição de seu habitat e banco de sementes é suficiente para justificar planos para sua conservação (Rosseto et al. 1995).

O rápido desenvolvimento de técnicas baseadas na PCR (Polimerase Chain Reaction; Mullis 1990) e a crescente facilidade de acesso a elas têm sido fundamentais para o estudo da estrutura genética de populações, sendo o RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA; Williams et al. 1990) uma das técnicas mais utilizadas. O RAPD utiliza oligonucleotídeos (9 ou 10 nucleotídeos) de seqüência arbitrária como "primers", o que é uma das maiores vantagens da técnica, pois não requer informação alguma sobre seqüência do DNA alvo (Rafalski et al. 1996, Parker et al. 1998, Reis 1999). Outras vantagens do RAPD são o baixo custo, sua alta abundância e distribuição uniforme no genoma, simplicidade, rapidez da reação e grande quantidade de polimorfismos gerados (Ferreira & Grattapaglia 1998). Vários estudos recentes mostram a eficiência desta técnica como ferramenta em estudos de genética de populações de plantas raras e ameaçadas de extinção (Zhuravlev et al. 1998, Gugerli et al. 1999, Maki & Horie 1999, Morden & Loeffler 1999, Prathepha & Baimai 1999, Kang et al. 2000). Por outro lado, pelo fato da herança destes marcadores ser dominante, não é possível identificar indivíduos heterozigotos utilizando este marcador. Para a obtenção de dados confiáveis, estima-se que devam ser utilizados acima de 30 marcadores RAPD, uma vez que um maior número de marcadores proporciona um maior impacto na variação genética (Bartish et al. 1999).

Baccharis concinna Barroso (Asteraceae) (Fig. 1) é um arbusto dióico e endêmico da Cadeia do Espinhaço (Barroso 1976), cuja floração e crescimento vegetativo são

contínuos ao longo do ano (Marques et al. 2001). A fauna de insetos associada a *B. concinna* é altíssima e possui um dos maiores números de insetos galhadores dos trópicos (Fernandes et al. 1996, Marques et al. 2001). Apesar de apresentar crescimento e floração contínuos ao longo do ano e de produzir grande quantidade de aquênios, *B. concinna* apresenta baixas taxas de germinação em condições laboratoriais (Gomes et al. 2001). No entanto, apresenta alto potencial colonizador, o que a torna apta para reabilitar áreas degradadas na Cadeia do Espinhaço. Na Serra do Cipó, esta espécie se distribui ao longo do gradiente altitudinal de 900 a 1500m. Vários estudos têm sido realizados sobre a biologia de *B. concinna*, uma vez que esta espécie é um excelente modelo para o entendimento da dinâmica de insetos galhadores na região tropical. Marques (1997), estudando populações de *B. concinna* a 1000, 1200 e 1400m, verificou que plantas femininas possuem maiores áreas foliares, maior número de inflorescências e de estômatos, maior biomassa do ramo apical e conteúdo de nutrientes por biomassa do que plantas masculinas. Tal fato foi atribuído a um possível caráter genético mantido nas populações, independentemente do fator ambiental, uma vez que não foi verificada diferença significativa dessas variáveis em relação à altitude. Carneiro et al. (2001) observaram que a altitude e sexo da planta influenciaram na riqueza total de insetos galhadores: plantas masculinas apresentaram maior riqueza de insetos galhadores (Cecidomyiidae) em relação às femininas e, em altitudes intermediárias foi observado um pico no número total de espécies galhadoras, bem como na riqueza de cecidomídeos. Marques et al. (2001) observaram que a biomassa e fenologia da planta não influenciam na dinâmica da fauna de insetos galhadores em *B. concinna*. Além do interesse ecológico já demonstrado, o habitat de *B. concinna* vem sendo agressivamente destruído, o que reforça seu status de espécie ameaçada de extinção. Assim, o estudo da variabilidade genética de suas populações é de

fundamental importância para a conservação de *Baccharis concinna*, bem como para sua utilização em projetos aplicados de reabilitação de áreas degradadas.



Figura 1 – Indivíduo masculino adulto de *B. concinna*, arbusto dióico e endêmico da Cadeia do Espinhaço.

O presente estudo teve como objetivo estudar a variabilidade genética intra e interpopulacional em *B. concinna*. Especificamente, foram propostas as seguintes questões: a) como se distribui a variabilidade genética dentre e entre populações de *B. concinna* ao longo de um gradiente altitudinal?; b) como se distribui a variabilidade genética entre indivíduos masculinos e femininos nas populações estudadas? e c) há similaridade genética entre populações de *B. concinna*? Em que nível?

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

Seis populações de *B. concinna* foram estudadas ao longo de um gradiente altitudinal na Serra do Cipó, porção meridional da Cadeia do Espinhaço (Fig. 2). O clima desta região é mesotérmico (Cwb na classificação de Köppen), com uma estação seca que dura aproximadamente 4 meses (de maio a agosto) e uma estação chuvosa de oito meses de duração (de setembro a abril) (Giulietti et al. 1987). A precipitação média anual dos últimos 10 anos está em torno de 1300 mm e a temperatura anual varia de 25 a 30°C no verão, enquanto que no inverno a variação da temperatura é de 8 a 18°C (Madeira & Fernandes 1999). A vegetação da Serra do Cipó é caracterizada por cerrado em altitudes entre 700 e 900 metros, enquanto campos rupestres prevalecem em altitudes superiores a 1000m, onde predominam rochas quartzíticas. As plantas estão adaptadas a condições extremas, tais como solos rasos com baixa umidade e nutricionalmente pobres, alta insolação, além das temperaturas que variam grandemente ao longo do ano (Giulietti et al. 1987, Ribeiro & Fernandes 2000). *Baccharis concinna* ocorre em áreas de campo rupestre, em altitudes superiores a 900m acima do nível do mar.

Das seis populações estudadas, três localizam-se ao longo da rodovia MG-010 (Fig. 2, Tab. 1). A população a 950m de altitude situava-se no Km 101 da rodovia e uma considerável parcela desta população encontrava-se exposta aos impactos da estrada. Após este estudo, esta parcela foi totalmente eliminada para a realização do recapeamento asfáltico da rodovia. A 1100m de altitude, foram estudadas duas populações, estando a uma delas (1100a) localizada no Km 105 da MG-010. Esta população, embora estivesse situada à margem da rodovia, encontrava-se protegida dos impactos por uma vegetação

mais marginal e por pertencer a uma propriedade privada, dificultando o acesso de pessoas. A terceira população marginal à rodovia localizava-se numa propriedade privada no Km 107, numa área de campo aberto, com predominância de gramíneas e ciperáceas. A quarta população, 1100b, encontrava-se às margens de uma via secundária à MG-010, próximo ao Km 105 em área de campo aberto, dominado por gramíneas e ciperáceas. A população 1300a localizava-se numa área onde predominavam rochosa, distante cerca de 2 Km da rodovia. A população 1300b situava-se nos domínios do Parque Nacional da Serra do Cipó (Fig. 2, Tab.1). Ambas encontravam-se livres dos impactos causados pelo trânsito de veículos.

Tabela 1 – Localização geográfica, altitude e número de indivíduos femininos e masculinos de *Baccharis concinna* amostrados em cada população na Serra do Cipó, MG.

População / Altitude(m)	Coordenadas geográficas	Nº de indivíduos amostrados		
		Femininos	Masculinos	Total
950	19°18'S e 43°36'W	25	29	54
1100a	19°17'S e 43°36'W	27	29	56
1100b	19°17'S e 43°36'W	23	26	49
1200	19°17'S e 43°35'W	28	30	58
1300a	19°17'S e 43°33'W	30	30	60
1300b	19°14'S e 43°30'W	29	29	58
Total		162	173	335

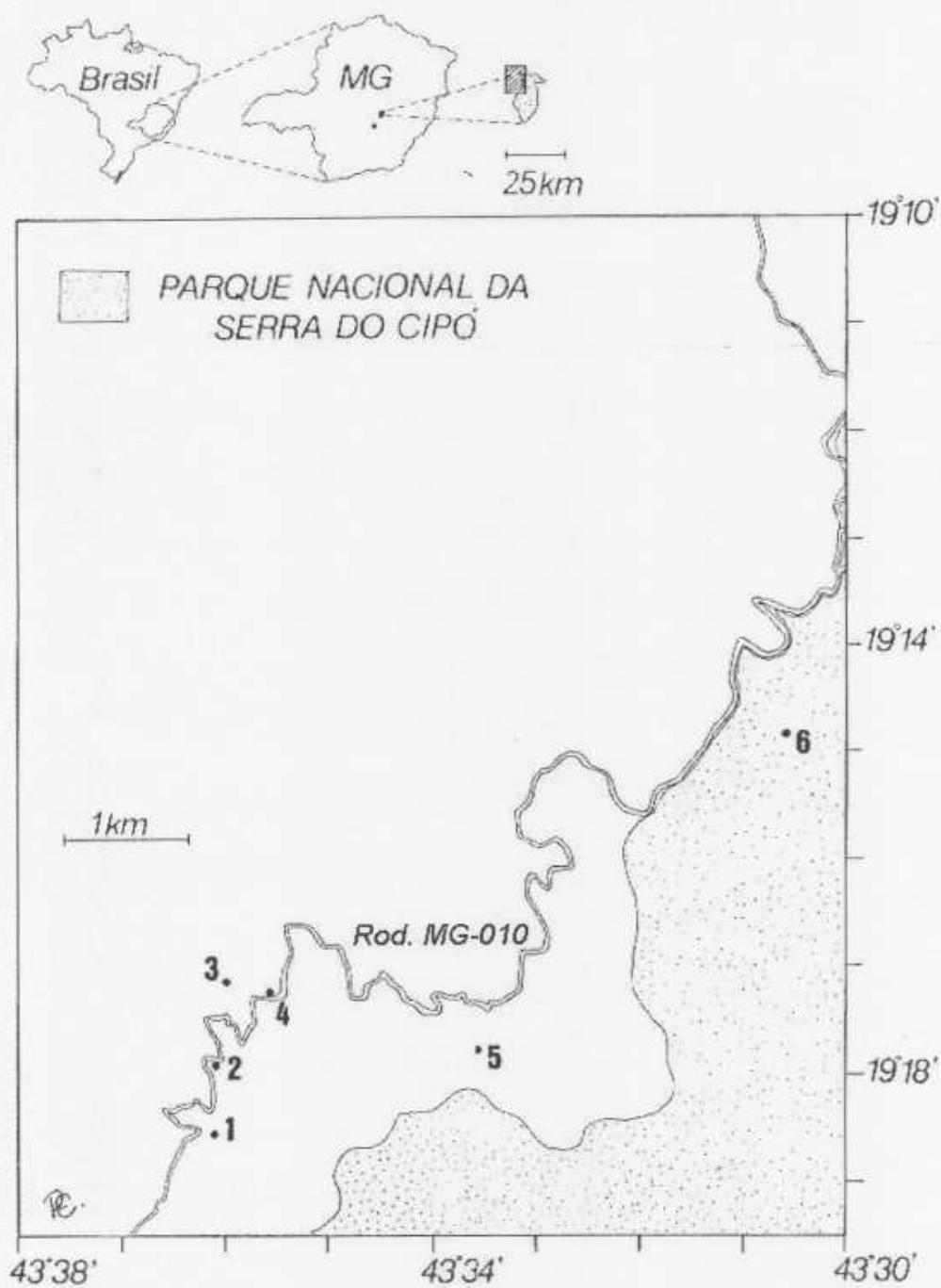


Figura 2 – Mapa da área de estudo e localização das populações de *Baccharis concinna*, na Serra do Cipó, Minas Gerais. 1 – 950m; 2 – 1100mA; 3 – 1100mB; 4 – 1200m; 5 – 1300mA; 6 – 1300mB.

Material vegetal e extração do DNA

Um máximo de 60 indivíduos em cada população de *B. concinna* estudada foram marcados, sendo 30 femininos e 30 masculinões. No entanto, devido à escassez de plantas na população a 950m e à má qualidade do DNA extraído em alguns indivíduos de quatro populações, o total de indivíduos amostrados foi reduzido (veja Tab. 1).

Folhas jovens de cada indivíduo foram coletadas de fevereiro a novembro de 2000, acondicionadas em sacos plásticos e preservadas em uma caixa de isopor contendo gelo, a fim de evitar a degradação do DNA genômico e a oxidação de proteínas. No laboratório, as folhas foram lavadas em água destilada e guardadas em freezer à temperatura média de -70°C .

O DNA genômico de cada indivíduo de *B. concinna* foi extraído a partir de 100 a 150mg de tecido vegetal, conforme protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987), ao qual foi acrescentado proteinase K no tampão CTAB. Além disso, foram feitas adequações nos tempos de armazenamento em freezer e geladeira e a inclusão de cloreto de sódio 2M durante a noite para a retirada mais eficaz de polissacarídeos. Depois de extraído, o DNA obtido foi ressuspendido em 40 μl de tampão TE contendo RNase (10mg/ μl) e acondicionado em freezer à temperatura de -20°C . A quantificação do DNA em suspensão foi feita através de comparação visual com um DNA padrão de peso conhecido em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.



Figura 3 – Gel de quantificação do DNA extraído de indivíduos de *B. concinna*. Canaleta 1: DNA padrão utilizado, cujo peso molecular é 200pb. Demais canaletas: DNA de indivíduos de *B. concinna*, pertencentes à população 950m. F = indivíduos do sexo feminino; M = indivíduos do sexo masculino.

Reações RAPD

Inicialmente, foi feita uma triagem entre 120 “primers” dos kits L, N, W, Y, X e Z da Operon Technologies Inc. (USA) em oito indivíduos de *B. concinna* aleatoriamente distribuídos entre as seis populações. A seguir, foram selecionados aqueles “primers” com padrão polimórfico e de melhor resolução. As reações de amplificação do DNA molde de 335 indivíduos de *B. concinna* foram feitas conforme descrito por Williams et al. (1990) e modificados por Ferreira & Grattapaglia (1998) e detalhado a seguir. O volume total da reação foi 13 μ l, sendo: 3,03 μ l de água bidestilada e autoclavada; 1,30 μ l de tampão de PCR 10X; 0,39 μ l (50mM) de $MgCl_2$; 1,04 μ l de dNTPs (2,5 mM); 1,04 μ l de BSA (Bovin Serum Albumin) 2,5mM purificada; 3,0 μ l de primer (10 ng/ μ l); 0,2 μ l de Taq DNA polimerase (1 unidade) e 3,0 μ l de DNA genômico (3,0 ng/ μ l). Uma inovação da

Este reagente protege a Taq DNA polimerase de possíveis impurezas que possam estar presentes no DNA genômico, proporcionando a obtenção de melhores resultados de amplificação. Inicialmente, foi programada em termociclador uma etapa de desnaturação do DNA molde a 94°C, durante 5 minutos. A seguir, foram programados 40 ciclos com uma etapa de desnaturação a 94°C durante um minuto, seguida de uma etapa de anelamento a 35°C por mais um minuto e uma etapa de extensão, a 72°C por dois minutos. Ao término dos 40 ciclos, seguia-se uma etapa de extensão final a 72°C durante sete minutos. Os produtos da amplificação foram determinados eletroforeticamente em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e em cada gel, 2 ou 3 canaletas eram ocupadas com ladder 100pb (Amersham Pharmacia) para "score" das bandas.. A eletroforese teve duração de três a quatro horas, em tampão TBE 1X, a uma voltagem aproximada de 140V. Cada gel foi fotografado com uma câmera digital e a imagem digitalizada para posterior comparação visual entre as bandas de tamanhos conhecidos do ladder e as bandas dos indivíduos *de B. concinna* obtidas na reação de amplificação ("score").

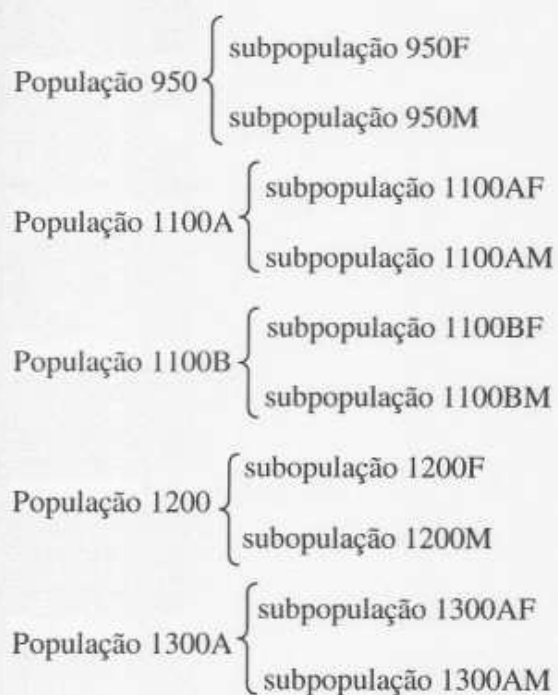
Análise dos dados

Os dados foram computados e interpretados de forma binária, considerando presença e ausência de bandas, uma vez que marcadores RAPD são de natureza dominante. Foram feitas Análises de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992), utilizando o programa Arlequin versão 2000 (Schneider et al. 2000) para testar a distribuição da variabilidade genética entre populações e entre indivíduos de uma mesma população. (entre altitudes) e entre os sexos. A informação das diferenças haplotípicas dos marcadores (neste caso, presença e ausência de bandas) foi obtida a partir de uma matriz de distância Euclidiana. O teste de significância dos componentes da covariância associada com todos

os níveis de estrutura genética possíveis (dentro dos indivíduos, entre indivíduos de uma mesma população, entre populações diferentes e entre grupos de populações) é feito através de permutação não paramétrica (Excoffier et al. 1992). Evidentemente, a análise de variância destes níveis hierárquicos depende do tipo de dados e da estrutura genética que é testada. A análise de variância hierárquica separa a variância total em componentes de covariância devido a diferenças intra-individuais, inter-individuais e/ou interpopulacionais (Schneider et al. 2000).

As seis populações de *B.concinna* estudadas estavam distribuídas ao longo de um gradiente altitudinal, sendo que as populações a 1100 e 1300m possuíram uma réplica, cada. Portanto, considerou-se que a variabilidade entre populações seria a mesma entre as altitudes.

Cada uma das seis populações foi dividida em dois grupo e cada grupo de acordo com o sexo dos indivíduos, resultando em 12 subpopulações (Figura 3).



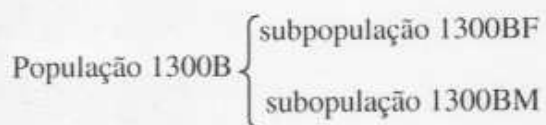


Figura 3: Esquema de divisão das populações de *B. concinna*, de acordo com o gradiente altitudinal e com a expressão sexual dos indivíduos. M = indivíduos do sexo masculino e F = indivíduos do sexo feminino.

Assim, a variância entre grupos expressa a variação entre populações, a variância entre populações dentro de um mesmo grupo expressa a variação entre sexos da mesma população e a variância dentro das populações expressa a variação entre indivíduos do mesmo sexo.

A freqüência de bandas de cada marcador foi calculada em cada população de modo a permitir o cálculo de similaridade entre populações, utilizando-se o índice de Bray-Curtis (Bray & Curtis 1957). O índice varia de 0 (similar) a 1 (dissimilar). O coeficiente *B* obtido é a medida Bray-Curtis de dissimilaridade, tendo sido proposto por Wolda (1981) o uso do complemento da medida de Bray-Curtis ($1 - B$) para definir a similaridade. Este foi o critério adotado neste estudo. Este índice é afetado pelo tamanho da amostra sendo, portanto, indicado em situações em que o tamanho da amostra e a diversidade são pequenos. Neste trabalho, a amostra é pequena (6 populações), porém diversificada (113 marcadores) e o índice de similaridade de Bray-Curtis mostrou-se o mais adequado. A partir da matriz de similaridade obtida utilizando-se o índice de Bray-Curtis, foi feita uma análise de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) das populações de *B. concinna* analisadas neste estudo (Swofford & Olsen 1990). A similaridade entre indivíduos foi calculada através do índice de Dice. O cálculo

é feito através da fórmula: $2a/2a + b + c$. Foi obtida uma matriz de similaridade c , a partir desta, a análise de agrupamento UPGMA dos 335 indivíduos estudados.

Um teste de comparação de matrizes (Teste de Mantel) foi ainda realizado para verificar a relação entre a matriz de similaridade genética das populações estudadas e a matriz de distância geográfica entre elas (Mantel 1967). As distâncias entre as seis populações de *B. concinna* foram obtidas a partir das coordenadas geográficas medidas com o auxílio de um GPS (Garmim) (Tab. 2).

Tabela 2 – Matriz de distância geográfica (em quilômetros) entre as populações de *B. concinna* na Serra do Cipó, Brasil.

	950	1100a	1100b	1200	1300a	1300b
950	0					
1100a	1,22	0				
1100b	2,68	1,45	0			
1200	2,58	1,51	0,87	0		
1300a	4,70	4,46	4,41	3,54	0	
1300b	11,98	11,30	10,48	9,88	7,58	0

RESULTADOS

Polimorfismo de marcadores RAPD

Foram obtidos de 25 a 100ng de DNA genômico por indivíduo de *Baccharis concinna* (n = 335). Muitos oligonucleotídeos apresentaram polimorfismo em todas as populações, mas entre os 120 oligonucleotídeos triados, seis apresentaram amplificação mais robusta e de melhor resolução (Fig. 3), tendo sido encontrado um total de 130 marcadores. Destes, 113 apresentaram bandas mais definidas e de mais fácil interpretação, tendo sido utilizados neste estudo (Tab. 3).

Tabela 3 – Relação dos oligonucleotídeos selecionados, suas seqüências de bases e número absoluto de marcadores polimórficos obtidos em *Baccharis concinna*.

Primer	Seqüência	Marcadores
OPL13	5'ACCGCCTGCT 3'	14
OPN19	5'GTCCGTACTG 3'	21
OPW03	5'GTCCGGAGTG 3'	22
OPW11	5'CTGATGCGTG 3'	17
OPY04	5'GGCTGCAATG 3'	21
OPY20	5'AGCCGTGGAA 3'	18

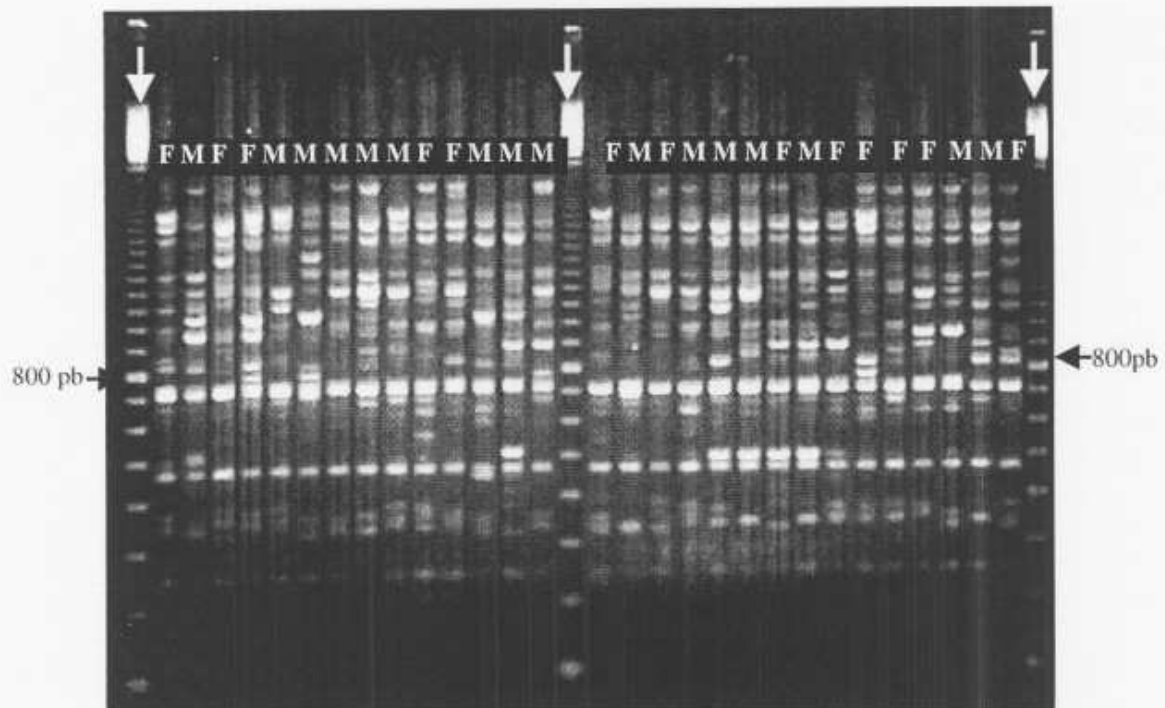


Figura 5 – Polimorfismo de marcadores RAPD exibido pelo oligonucleotídeo OPY20, na população 1100a. As canaletas das extremidades e a canaleta do meio são o ladder padrão utilizado para a comparação visual entre os indivíduos. Este oligonucleotídeo apresentou 18 bandas polimórficas (marcadores). Não há um padrão de bandeamento entre indivíduos masculinos e femininos. Note a clareza das bandas proporcionada pela BSA, reagente incluído na reação de PCR. F = indivíduos do sexo feminino e M = indivíduos do sexo masculino.

Dentre os 113 marcadores utilizados, 36 apresentaram padrão diferenciado, sendo polimórficos em algumas populações e monomórficos em outras. A Tabela 4 apresenta as freqüências de presença de bandas dos marcadores RAPD que exibiram esse padrão diferenciado entre populações. Marcadores que foram totalmente ausentes em determinadas populações tenderam a apresentar freqüências baixas nas populações em que

eram polimórficos. O oposto foi observado em relação aos marcadores presentes em todos os indivíduos de algumas populações: as populações polimórficas apresentaram frequência alta desse marcador. A Figura 6 ilustra a distribuição de polimorfismos ao longo das seis populações estudadas. A maior parte dos 113 marcadores (aproximadamente 90%) apresentou polimorfismo para presença / ausência de bandas em todas as populações. Os 10% restantes apresentaram padrão monomórfico em algumas populações e polimórfico em outras.

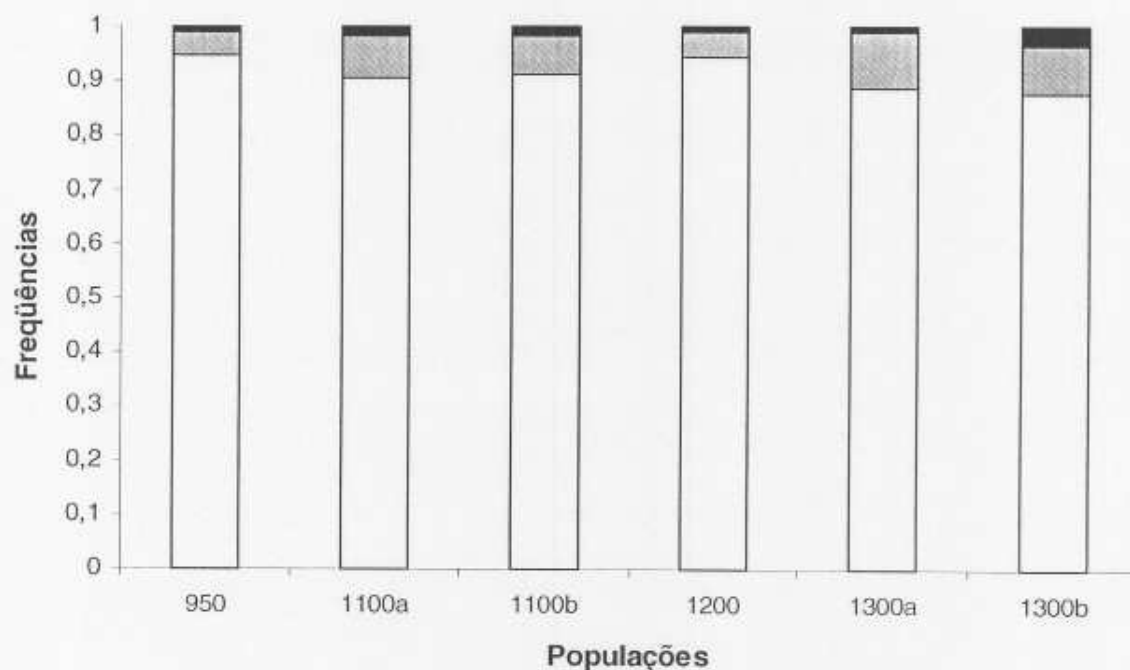


Figura 6 - Distribuição de frequência dos polimorfismos de marcadores RAPD entre as seis populações de *Baccharis concinna*. ■ Marcadores presentes em todos os indivíduos da população; ▨ Marcadores ausentes em todos os indivíduos da população; □ Marcadores polimórficos.

Tabela 4 – Relação de marcadores restritos nas seis populações de *Baccharis concinna* estudadas e suas frequências absolutas por população. Freq = 1: marcador presente em todos os indivíduos; Freq = 0: marcador ausente em todos os indivíduos.

POP	MARCADORES (Frequências)																	
	M3	M6	M7	M15	M18	M22	M24	M29	M31	M32	M34	M35	M40	M41	M47	M51	M57	M58
950	0	1	0,055	0,963	0,963	0,222	0	0,074	0,111	0,111	0	0,055	0,018	0,037	0,222	0,055	0,055	0,574
1100a	0,018	1	0,036	0,911	0,946	0,415	0	0,038	0	0,075	0,038	0,075	0,018	0	0,185	0	0	0,163
1100b	0	1	0,042	1	0,936	0,388	0,531	0,796	0,469	0	0,04	0,347	0	0,224	0,245	0,367	0	0,224
1200	0	1	0	0,603	0,276	0	0,052	0,138	0,276	0,069	0,086	0,052	0,172	0,155	0	0,103	0,259	0,536
1300a	0,017	0,83	0,289	0,881	0,729	0,22	0	0	0,102	0,135	0,119	0	0	0	0,339	0,102	0,102	0,05
1300b	0	1	0	0,579	1	0,561	0,14	0	0,263	0,403	0,438	0,123	0	0	0,035	0,403	0,175	1

Tabela 4 – continuação

POP	MARCADORES (Frequências)																
	M59	M62	M69	M71	M72	M73	M76	M77	M84	M86	M94	M95	M98	M100	M106	M110	M112
950	0,074	0,037	0,111	0	0,037	0,093	0,13	0,204	0,34	0,189	0,113	0,113	0,226	0	0,981	0,407	0,277
1100a	0	0,054	0,109	0	0,036	0,109	0,018	0,236	0	0,589	0,089	0,036	0,392	0	1	0,982	0,161
1100b	0	0,102	0,082	0,224	0,02	0,02	0	0,02	0,271	0,479	0	0,479	0,333	0	0,979	0,812	0,042
1200	0,018	0,036	0,857	0,143	0,518	0,464	0,518	0,428	0,709	0,036	0,218	0,436	0,29	0,362	0,948	0,948	0
1300a	0	0	0	0	0,033	0	0,133	0,033	0,207	0,345	0,431	0	0	0,6	1	0,85	0,167
1300b	0,017	0,017	0,034	0,345	0	0,017	0	0	0,793	0	0,086	0	0,034	0,055	0,981	1	0,145

Variabilidade genética intra e interpopulacional em populações de *B. concinna*

Conforme explicitado na seção "Material e Métodos", a variação entre as populações, distribuídas em diferentes altitudes, corresponderia à variação entre altitudes.

A Análise Molecular de Variância (AMOVA) foi feita segundo o esquema de agrupamento ilustrado na figura 4. A maior parte da variabilidade genética de *B. concinna* está distribuída entre indivíduos de uma mesma população (82,58%), enquanto que 16,95% corresponde à variabilidade entre as diferentes populações. O sexo influencia na variabilidade genética intrapopulacional, mas explica apenas 0,47% desta variabilidade (AMOVA; Tab. 5).

Tabela 5 – Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) com dados RAPD de 335 indivíduos de *Baccharis concinna* distribuídos em seis populações.

Agrupamento	Variação	g.l.	S.Q.	Comp. Var.	% total
Sexo	Entre populações	5	917,41	2,98	16,95 ^a
	Entre sexos da mesma população	6	101,17	0,08	0,47 ^b
	Entre indivíduos do mesmo sexo (mesma população)	323	4700,41	14,55	82,58 ^a
	Total	334	5718,99	17,61	

^a $p < 0,001$; ^b $p < 0,05$; g.l. = graus de liberdade; S.Q. = Soma dos Quadrados

Similaridade genética entre populações de *B. concinna*

A similaridade genética entre populações de *B. concinna* variou de 65 a 74% (Fig. 7). As populações 950, 1100a e 1100b formaram o primeiro agrupamento. As populações

1300a e 1300b unem-se independentemente a este grupo. A população 1200 encontra-se fora do agrupamento mas, apesar disto, é bastante similar às demais populações (Fig. 7).

O teste de comparação entre matrizes (teste Mantel) mostrou que não houve relação entre a similaridade genética das populações de *B. concinna* estudadas e a distância geográfica entre elas. A relação foi extremamente fraca ($r = 0,14$) e não significativa ($p > 0,05$).

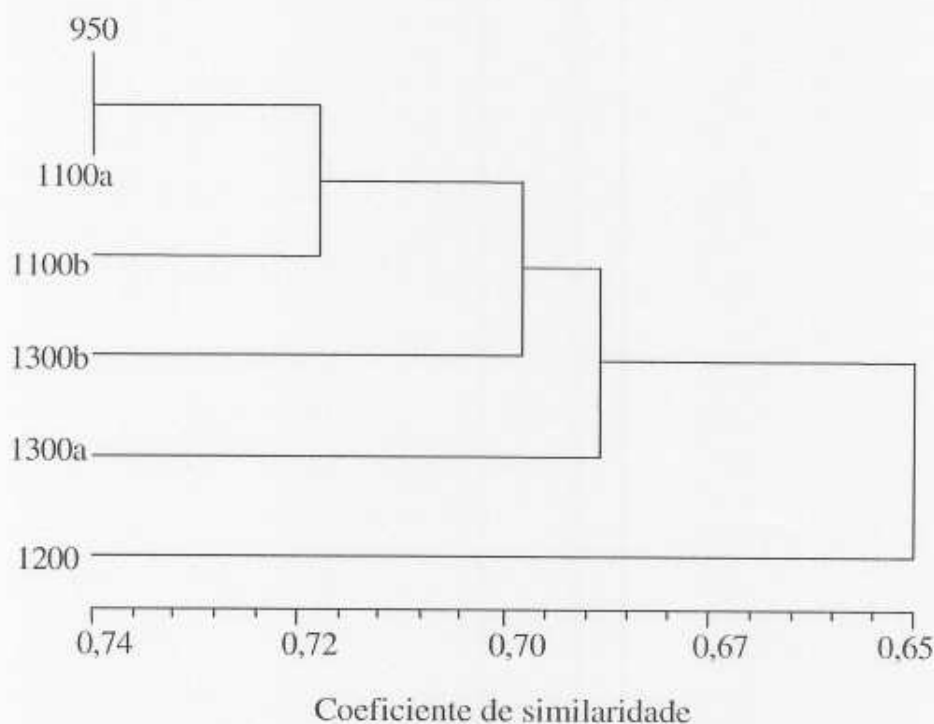


Figura 7 – Análise de Agrupamento UPGMA de similaridade genética para 6 populações de *Baccharis concinna* utilizando-se marcadores RAPD.

A similaridade genética entre todos os indivíduos foi feita utilizando-se o índice de similaridade de Dice (Anexo). Observa-se que os indivíduos de uma mesma população

tendem a agruparem-se, sendo o coeficiente de similaridade alto, variando aproximadamente de 50 a 95%. Não há um padrão de agrupamento entre indivíduos do mesmo sexo. Por outro lado, é possível notar a similaridade entre populações.

DISCUSSÃO

A variabilidade genética de populações de espécies vegetais vem sendo bastante estudada com o uso de marcadores RAPD (Bartish et al. 1999, Heaton et al. 1999, Prathepha & Baimai 1999, Reis 1999), embora sua natureza dominante limite a informação genética por loco, pois apenas um alelo é detectado, dificultando a discriminação de genótipos heterozigotos (Ferreira & Grattapaglia 1998). Apesar disso, a simplicidade e rapidez da técnica e seu baixo custo e a grande quantidade de polimorfismo gerado faz dela uma das mais usadas em estudos de genética de populações. Neste estudo, o uso de marcadores RAPD mostrou-se eficiente para responder as perguntas propostas, tendo sido utilizados mais de 100 marcadores.

O padrão de distribuição de variabilidade genética encontrado em *B. concinna* corrobora os padrões descritos para espécies raras e endêmicas. A maioria dos estudos enfocando a variabilidade genética de espécies vegetais raras e ameaçadas de extinção utilizando marcadores RAPD mostraram que a maior parte da variabilidade genética destas espécies está retida dentro das populações. *Grevillea scapigera*, por exemplo, uma espécie tropical rara, apresenta a maior parte de sua variabilidade genética (86,95%) retida dentro de suas populações, e somente 13,05% da variabilidade total está distribuída entre as populações (Rosseto et al. 1995). *Hippophae rhamnoides* L. (Elaeagnaceae), espécie dióica e pioneira de regiões frias do hemisfério norte, possui 15,1% da variabilidade genética total distribuída entre populações, estando 84,9% da variabilidade retida dentro de populações (Bartish et al. 1999).

A distribuição da variabilidade genética em *B. concinna* pode ser explicada pelo sistema de reprodução da espécie. O fato de *B. concinna* ser dióica contribui decisivamente

para a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações, pois em plantas dióicas, o sistema de acasalamento é obrigatoriamente heterogâmico. Além disso, esta espécie não apresenta qualquer tipo de reprodução clonal (V. Gomes, observação pessoal), o que faz com que todos os indivíduos sejam originados de sementes provenientes de reprodução sexuada. A fecundação cruzada mantém os níveis de variabilidade genética altos (Hamrick et al. 1979) e, juntamente com o movimento de pólen, reduz a diferenciação entre populações (Loveless & Hamrick 1984). Assim, a alta variabilidade genética dentro de populações de *B. concinna* pode ser explicada pela dioiccia e, conseqüentemente, pela fecundação cruzada.

Outros importantes fatores que influenciam a distribuição da variabilidade genética em *B. concinna* são a polinização e a dispersão de sementes. Embora ainda não tenham sido realizados estudos sobre estes fatores em *B. concinna*, observações casuais no campo indicam que ambos são feitos pelo vento. As flores desta espécie não apresentam nectários florais, não exalam odor e são pequenas e brancas. O pólen aparenta ser seco, o que facilitaria a polinização anemófila (Fig. 8a). Além disso, não foram observados insetos visitando flores de *B. concinna* durante o período deste estudo. Seus aquênios são dotados de "pappus" piloso (Fig. 8b), facilitando sua dispersão anemocórica (Barroso 1976). O vento, agindo como agente polinizador e dispersor, promove pouca dispersão à longa distância, mas suficiente para impedir divergência entre populações (Loveless & Hamrick 1984). Assim, a baixa variabilidade genética entre populações de *B. concinna* pode ser explicada por estes fatores.

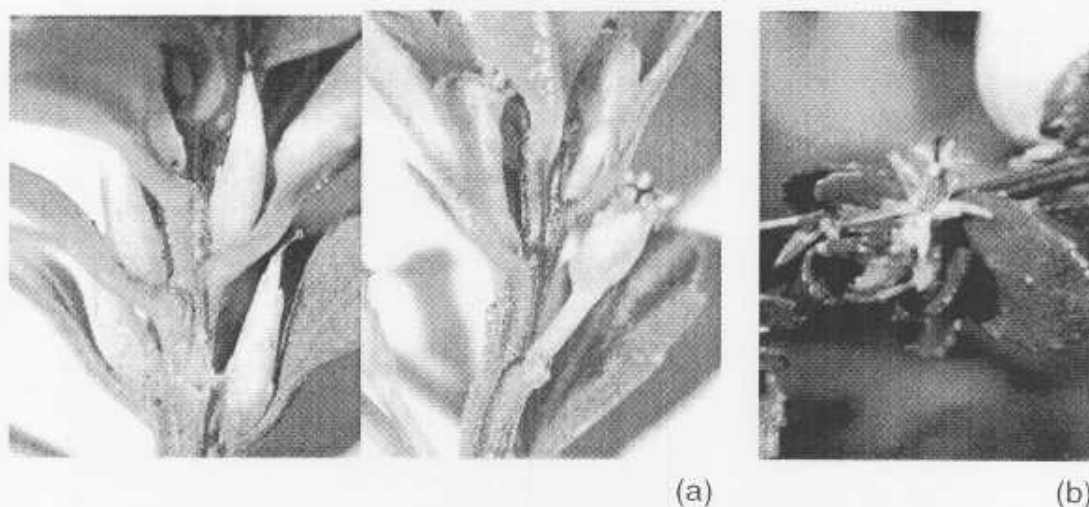


Figura 8: Fatores que podem estar influenciando na variabilidade genética de *B. concinna*. (a) Inflorescências femininas e masculinas – notar a ausência de nectários florais e outros atrativos para polinizadores como a coloração das flores, sugerindo que a polinização nesta espécie é anemófila. (b) Aquênio de *B. concinna* – fruto seco, dotado de “pappus” piloso, facilitando a dispersão anemocórica.

Os resultados da análise de agrupamento UPGMA mostram que as populações de *B. concinna* estudadas são bastante similares, como já sugerido pela AMOVA (veja Tab. 5), não havendo diferenças consideráveis entre altitudes. Alguns fatores poderiam estar relacionados a esse padrão. Um gradiente de 400m pode não ser suficiente para produzir diferenças genéticas, corroborando os dados encontrados para insetos galhadores (Carneiro et al. 2001).

A distância geográfica entre as populações de *B. concinna* estudadas não teve relação com a similaridade genética entre elas. As distâncias geográficas entre as seis populações estudadas não são maiores do que 12 quilômetros (veja Tab. 2), distâncias que, provavelmente, não interferiram no fluxo gênico entre as populações. Embora não tenham

sido realizados estudos sobre fluxo gênico, a baixa diferença entre populações (AMOVA 16,95%) e a altíssima similaridade entre elas (veja Fig. 7) sugerem que há um intenso fluxo gênico entre as seis populações de *B. concinna* aqui analisadas.

Os dados de variabilidade genética em *B. concinna* encontrados neste estudo, os aspectos de história de vida observados nesta espécie e a pequena distância geográfica entre as seis populações estudadas, sugerem a possibilidade de estarmos lidando com uma metapopulação e suas subpopulações. No entanto, são necessários estudos mais detalhados sobre a biologia desta espécie, bem como da dinâmica de suas populações (ou subpopulações).

A variabilidade genética em populações é fundamental para que ocorram mudanças evolutivas a curto prazo, uma vez que, frente a mudanças ambientais é a condição pré-existente necessária para possibilitar a adaptação da espécie (Kang et al. 2000). Portanto, a existência de níveis elevados de variabilidade genética dentro das populações de *B. concinna* é um fator de encorajamento em relação à sua conservação. A idéia de que espécies vegetais geograficamente restritas são geneticamente depauperadas é amplamente divulgada, mas vários trabalhos (veja Gitzendanner & Soltis 2000), incluindo o presente estudo, refutam esta afirmação (Tab. 6) .

Por outro lado, a fragmentação de habitats pode levar à perda de variação genética, por criar “gargalos” genéticos que reduzem o pool gênico das populações remanescentes e pela perda de alelos por deriva genética (Young et al. 1996). Todas as populações analisadas neste estudo localizam-se em uma área onde atividades antrópicas como o turismo têm sido estimuladas, levando à fragmentação de vastas áreas ao longo da rodovia MG-010. Este fator torna a situação de *B. concinna* preocupante, já que a rápida destruição de habitats na Serra do Cipó “exige” que a espécie seja “capaz” de se adaptar a curto prazo

frente aos impactos provenientes da ação humana. Considerando-se os resultados obtidos no presente estudo, espera-se que populações de *B. concinna* estejam aptas a responder às mudanças ambientais geradas pela ação antrópica. Entretanto, o declínio de populações espécies silvestres devido a causas antropogênicas produz efeitos genéticos e ecológicos que agem diretamente na dinâmica das populações, colocando-as em risco de extinção. Diante da forte e agressiva intervenção antrópica nos habitats naturais, a persistência de muitas espécies no futuro próximo dependerá da manutenção de ampla variação genética em suas populações (Lande 1998). Assim, faz-se urgente e necessária a aplicação de um plano de conservação que garanta a permanência de *B. concinna* em seu habitat, bem como estudos adicionais sobre sua ecofisiologia e biologia reprodutiva, dada sua importância ecológica e aplicada.

Tabela 6: Distribuição da variabilidade genética de populações de espécies endêmicas e/ou ameaçadas de extinção. Em todos os trabalhos foram utilizados marcadores RAPD.

Espécie	Sist. Reprodutivo	Variabilidade Genética		Referência
		Interpopulacional	Intrapopulacional	
<i>Grevillea scapigera</i>	Heterogâmica	13%	17%	Rosseto et al. 1995
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Heterogâmica (dióica)	15%	85%	Bartish et al. 1999
<i>Saxifraga oppositifolia</i>	Heterogâmica	5%	95%	Gurgeli et al. 1999
<i>Cerastium fisherianum</i> var. <i>molle</i>	Endogâmica	35%	65%	Maki & Hore 1999
<i>Prunus africana</i>	Predominantemente heterogâmica	23,2%	76,8%	Dawson & Powell 1999
<i>Ranunculus reptans</i>	Heterogâmica e clonal	22,5%	77,5%	
<i>Prunus mahaleb</i>	Heterogâmica	26%	74%	Fischer et al. 2000
<i>Digitalis minor</i>	Heterogâmica	16,5%	81,8%	Jordano & Godoy 2000 (*)
<i>Baccharis concinna</i>	Heterogâmica (dióica)	29,6%	71,4%	Sales et al. 2001
		17%	83%	Este estudo

(*) O restante da variabilidade genética está distribuída entre diferentes regiões analisadas neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayres, D. R. and Ryan, F. J. (1999) Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi* (Asteraceae) using RAPD and allozyme techniques. *Am. J. Bot.* 86: 344-353.
- Barroso, G. M. (1976) Compositae – Subtribo Baccharinidae Hoffman – Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. *Rodriguésia* 40: 3-273.
- Bartish, J. V., Jeppsson, N. and Nybom, H. (1999) Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mol. Ecol.* 8: 791-802.
- Bray, J. R. and Curtis, J. T. (1957) Na ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27: 325-349.
- Bussel, J. D. (1999) The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Mol. Ecol.* 8: 775-789.
- Carneiro, M. A. A., Fernandes, G. W. and DeSouza, O. F. F. (2001) Convergence in regional and local galling species richness. *Biotropica*. (submetido)
- Dawson, I. K. and Powell, W. (1999) Genetic variation in the Afromontane tree *Prunus africana*, an endangered medicinal species. *Mol. Ecol.* 8: 151-156.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Esselman, E. J., Crawford, D. J., Brauner, S., Stuessy, T. F., Andreson, G. J. and Silva, O. M. (2000) RAPD marker diversity within and divergence among species of *Dendroseris* (Asteraceae: Lactuceae). *Am. J. Bot.* 87: 591-596.

- 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. *Gene*. 131: 479-491.
- Fernandes, G. W., Carneiro, M. A. A., Lara, A. C. F., Allain, L. R., Andrade, G. I., Julião, G. R., Reis, T. R. and Silva, I. M.** (1996) Gallling insects on neotropical species of *Baccharis* (Asteraceae). *Tropical Zoology* 9: 315-332.
- Ferreira, M. E. and Grattapaglia, D.** (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3 rd edn. Embrapa. Brasília.
- Fischer, M., Husi, R., Prati, D., Peintinger, M., van Kleunen, M. and Schmid B.** RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *Am. J. Bot.* 87: 1128-1137.
- Giulietti, A. M., Menezes, N. L., Pirani, J. R., Meguro, M. and Wanderley, M. G. L.** (1987) Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 9: 1-151.
- Gomes, V., Souza, Q. S. and Fernandes, G. W.** (2001) Germinação de sementes de *Baccharis concinna* (Asteraceae) (em preparação).
- Gitzendanner, M. A. and Soltis, P. S.** (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Am. J. Bot.* 87: 783-792.
- Gugerli, F., Eichenberger, K. and Schneller, J. J.** (1999) Promiscuity in populations of the cushion plant *Saxifraga oppositifolia* in the Swiss Alps as inferred from random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Mol. Ecol.* 8: 453-461.
- Hamrick, J. L., Linhart, Y. B. and Mitton, J. B.** (1979) Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. of Ecol. Syst.* 10: 173-200.

- Heaton, H. J., Whitkus, R. and G6mes-Pompa, A.** (1999) Extreme ecological and phenotypic differences in the tropical tree chicozapote (*Manilkara zapota* (L.) P. Royen) are not matched by genetic divergence: a random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Mol. Ecol.* 8: 627-632.
- Hickey, R. J., Vincent, M. A. and Guttman, S. I.** (1991) Genetic variation in running buffalo clover (*Trifolium stoloniferum*, Fabaceae). *Cons. Biol.* 5: 309-316.
- Jordano, P. and Godoy, J. A.** (2000) RAPD variation and population genetic structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae), an animal-dispersed tree. *Mol. Ecol.* 9, 1293-1305.
- Kang, U., Chang, C. S. and Kim, Y. S.** (2000) Genetic structure and conservation considerations of rare endemic *Abeliophyllum distichum* Nakai (Oleaceae) in Korea. *J. Plant Res.* 113: 127-138.
- Lande, R.** (1998) Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation. *Res. Pop. Ecol.* 40: 259-269.
- Ledig, F. T. and Conkle, M. T.** (1983) Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic, torrey pine (*Pinus torreyana* Parry ex Carr.). *Evol.* 37: 79-85.
- Loveless, M. D. and Hamrick, J. L.** (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95.
- Madeira, J. A. and Fernandes, G. W.** (1999) Reproductive phenology of sympatric taxa of *Chamaecrista* (Leguminosae) in Serra do Cip6, Brazil. *J. Trop. Ecol.* 15: 463-479.
- Maki, M. and Horie, S.** (1999) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers reveal less genetic variation in the endangered plant *Cerastium fischerianum* var. *molle* than in the widespread conspecific *C. fischerianum* var. *fischerianum* (Caryophyllaceae). *Mol. Ecol.* 8: 145-150.

- Mantel, N.** (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220.
- Marques, A. R.** (1997) *Sexo, distribuição espacial e alocação de recursos em Baccharis concinna, uma espécie dióica e endêmica do Espinhaço*. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre, UFMG, Belo Horizonte.
- Marques, E. S. A., Fernandes, G. W., Cornelissen, T. G. and Castro, F. M. C.** (2001) Altitude, sex, biomass and the galling insects on *Baccharis concinna* (Asteraceae). *Biotropica* (submetido).
- 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.
- Mullis, B.** (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scient. Am. April:* 56-65.
- O'Brien, S.J., Evermann, J.F.** (1988) Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *TREE* 3: 254-259.
- 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. *Ecol.* 79: 361-382.
- Prathepha, P. and Baimai, V.** (1999) Genetic differentiation in Thai populations of the rare species *Afgekia sericea* Craib (Leguminosae) revealed by RAPD-PCR assays. *Gene.* 105: 193-202.
- Primack, R. B.** (1993) *Essentials of Conservation Biology*. 1 st. Sinauer Associates, Sunderland.

- Rafalski, J. A., Vogel, J. M., Morgante, M., Powell, W., Andre, C. and Tingey, S. V.** (1996) Generating and using DNA markers in plants. In: *NonMammalian Genomic Analysis: a practical guide* (Birren, B. and E. Lai, ed.) edn. Academic Press, New York, pp75-134.
- Reis, A. M. M.** (1999) *Distribuição da variabilidade genética em aroeira (Myracrodruon urundeuva – Anacardiaceae) por marcadores RAPD e polimorfismo de sequência de cpDNA*. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre à Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, USP, São Paulo.
- Ribeiro, K. T. & Fernandes, G. W.** (2000) Patterns of abundance of a narrow endemic species in a tropical and infertile montane habitat. *Plant Ecology 147*: 205-218.
- 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.
- Sales, E., Nebauer, S. G., Mus, M. and Segura, J.** (2001) Population genetic study in the Balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers. *Am. J. Bot. 88*: 1750-1759.
- Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L.** (2000) *Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva. Switzerland.
- Swofford, D. L. and Olsen, G. J.** (1990) Phylogeny reconstruction. In: *Molecular Systematics* (Hillis D. M. and C. Moritz, ed.) edn. Sinauer Associates, Sunderland, pp. 411-501.
- Smith, J. F. and Pham, T. V.** (1996) Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae). *Am. J. Bot. 83*: 717-726.

- 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. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Wolda, H.** (1981) Similarity indices, sample size and diversity. *Oecol.* 50: 296-302.
- Wolf, A. T., Howe, R. W. and Hamrick, J. L.** (2000) Genetic diversity and population structure of the serpentine endemic *Calystegia collina* (Convolvulaceae) in Northern California. *Am. J. Bot.* 87: 1138-1146.
- Young, A., Boyle, T. and Brown, T.** (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol. Evol.* 11: 413-418.
- Zhuravlev, Y. N., Reunova, G. D., Artyukova, E. V., Kozyrenko, M. M. and Muzarpk, T. I.** (1998) Genetic variation of wild ginseng populations (RAPD analysis). *Mol. Biol.* 32: 910-914.

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](#)