



JOELMA APARECIDA RABELO DE PÁDUA

**GENÉTICA DA PAISAGEM: ÁREAS
PRIORITÁRIAS PARA MANEJO E A
CONSERVAÇÃO DE *Eremanthus erythropappus*
(DC.) MACLEISH NO ESTADO DE MINAS
GERAIS**

LAVRAS – MG

2011

JOELMA APARECIDA RABELO DE PÁDUA

**GENÉTICA DA PAISAGEM: ÁREAS PRIORITÁRIAS PARA MANEJO
E A CONSERVAÇÃO DE *Eremanthus erythropappus* (DC.) MACLEISH
NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Manejo Ambiental, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora
PhD. Dulcinéia de Carvalho

LAVRAS - MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Pádua, Joelma Aparecida Rabelo de.

Genética da paisagem : áreas prioritárias para manejo e a
conservação de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish no
Estado de Minas Gerais / Joelma Aparecida Rabelo de Pádua. –
Lavras : UFLA, 2011.

80 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Dulcinéia de Carvalho.

Bibliografia.

1. Candeia. 2. Marcadores moleculares. 3. Variabilidade
genética. 4. Diversidade genética. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 634.97355

JOELMA APARECIDA RABELO DE PÁDUA

**GENÉTICA DA PAISAGEM: ÁREAS PRIORITÁRIAS PARA MANEJO
E A CONSERVAÇÃO DE *Eremanthus erythropappus* (DC.) MACLEISH
NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Manejo Ambiental, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2011.

Dr. Fábio de Almeida Vieira UFLA

Dra. Rosângela Alves Tristão Borém UFLA

PhD. Dulcinéia de Carvalho

Orientadora

LAVRAS - MG

2011

AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que permitiu que estivesse aqui para cumprir mais essa etapa de minha vida.

Ao meu pai Pádua, por sempre acreditar, confiar e investir em minhas idéias e decisões, pela presença constante em minha vida e pelo amor incondicional. Pai te agradeço por tudo o que sou e tudo o que faço, você é o meu herói, sem você nada disso seria possível, você é o melhor pai do mundo.

A minha mãe que mesmo não estando mais aqui é uma presença viva em meus pensamentos e com certeza me acompanha e fica feliz com mais essa vitória.

Ao Dimas pelo companheirismo, paciência, carinho e amor. Você se fez presente e essencial nessa etapa sempre me ajudando estimulando a seguir em frente. Você foi meu presente de mestrado.

A professora Dulcinéia de Carvalho pela orientação, oportunidade e acima de tudo pela amizade e confiança.

Aos amigos do Laboratório: Murilo, Eduardo, Dani, Alvaro, Anna, Rute, Alison, Hugo, Renata, Allan. Com você compartilhei muitos momentos de descontração e tive uma amizade sincera, formamos uma família.

As companheiras de mestrado Jaqueline e Maria Fernanda, meninas vocês foram essenciais nesses dois anos. Obrigada pela amizade, pelas dicas, ajuda na extração, nas análises, em tudo o mais, formamos um ótimo trio.

A Vanessa, pelos momentos de descontração, demos muita gargalhada juntas!!!!

Aos professores do Departamento de Ciências Florestais - DCF.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Florestais – DCF, especialmente a Chica (minha “Mãe Chicoza”); Rose e Meire pela amizade.

Ao José Carlos pelas coletas.

Aos amigos que mesmo distantes participaram desta etapa importante em minha vida, sempre torcendo por mim.

A todos que não foram citados mais que colaboraram e fizeram parte de minha convivência nesse período meu muito obrigada!

RESUMO

Eremanthus erythropappus, conhecida popularmente como candeia, é uma espécie florestal característica da paisagem do estado de Minas Gerais. Sua madeira é valorizada, devido à sua durabilidade natural e produção de óleo, cujo princípio ativo (alfa-bisabolol) é utilizado em indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Pela importância econômica, essa espécie vem sendo explorada de maneira indiscriminada ao longo dos anos. A exploração de *E. erythropappus*, é caracterizada por práticas predatórias e certamente levará a reduções drásticas no tamanho de suas populações naturais, alterando o seu comportamento. Com o objetivo de caracterizar a variabilidade genética e de fornecer informações que possam ser utilizadas para a manutenção e conservação da espécie realizou-se o estudo em 200 indivíduos distribuídos em dez populações da espécie no Estado de Minas Gerais. Foram utilizados nove *primers* ISSR que geraram 72 locos polimórficos. Os resultados indicam diversidade média dentro das populações (62,20%). A heterozigosidade esperada (H_e) e índice de Shannon(I) foram de 0,30 e 0,44, respectivamente. O fluxo alélico para o conjunto de populações foi baixo ($N_m = 1,4$). Houve correlação positiva e significativa entre distâncias genética e geográfica ($r = 0,632$; $P = 0,001$) entre as populações. Mediante análise bayesiana observou-se média diversidade entre as populações ($\Theta^B = 0,24$) e que as dez populações amostradas são distintas entre si.. O correlograma de Mantel e análises do limite genético e descontinuidade genética entre as populações estudadas definiu-se as dez populações como unidades operacionais, porém pela inviabilidade econômica definiu-se cinco unidades operacionais para a conservação de *Eremanthus erythropappus* no Estado de Minas Gerais. Com esses dados será possível implantar estratégias de conservação da espécie de maneira efetiva com poucos gastos e esforços amostrais.

Palavras-chave: Marcadores moleculares. Candeia. Variabilidade Genética.

ABSTRAT

Eremanthus erythropappus, known popularly as candeia, is a forest species characteristic of the landscape of the state of Minas Gerais. Its wood is prized because of its natural durability and production of oil, whose active ingredient (alpha-bisabolol) is used in pharmaceutical and cosmetic industries. Due to its economic importance, this species has been exploited indiscriminately over the years. The exploitation of *E. erythropappus*, is characterized by predatory and will surely lead to drastic reductions in the size of their natural populations by altering their behavior. Aiming to characterize the genetic variability and to provide information that could be used for the maintenance and conservation of the species was carried out the study of 200 individuals from ten populations of the species in the state of Minas Gerais. Nine ISSR primers were used which yielded 72 polymorphic loci. The results indicate intermediate diversity within populations (62,20%). The expected heterozygosity (H_e) and Shannon index (I) were 0.30 and 0.44, respectively. The gene flow to the set of populations was low ($N_m = 1.4$). There was a positive correlation and significant correlation between genetic and geographic distances ($r = 0.632$, $P = 0.001$) among populations. The Bayesian analysis indicated a intermediate diversity among populations ($\Theta^B = 0.24$), and also that the ten sampled populations are distinct from each other. Through the Mantel correlogram and analysis of genetic discontinuity ten populations were defined as operational units for conservation, but not economically feasible for the set up five operational units for *E. erythropappus* conservation. These data are important to help and enhance the conservation strategies of *E. erythropappus*.

Keywords: Molecular markers. Candeia. Genetic Variability.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Área de ocorrência do gênero <i>Eremanthus</i> em Minas Gerais.....	19
Figura 2	Indivíduo de <i>Eremanthus erithropappus</i>	21
Figura 3	Dupla coloração da folha de <i>Eremanthus erithropappus</i> ..	21
Figura 4	Inflorescência de <i>Eremanthus erithropappus</i>	22
Figura 5	Candeal no município de Delfim Moreira- MG.....	23
Figura 6	Localização das populações naturais de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) Macleish em Minas Gerais (Brasil). DM = Delfim Moreira, SR=Santa Rita do Sapucaí, B = Baependi, ST= São Tomé das Letras, L= Luminárias, C= Carrancas, Carrancas, I= Ingaí, MP = Morro do Pilar,D = Diamantina, FS=Francisco Sá.....	34
Figura 7	Padrão de fragmentos produzidos pelo <i>primer</i> Manny em indivíduos de <i>Eremanthus erythropappu</i> (DC.) Macleish.....	45
Figura 8	Coefficiente de correlação e número ótimo de locos para <i>Eremanthus erythropappu</i> (DC.) Macleish.....	54
Figura 9	Dendrograma UPGMA das populações de <i>Eremanthus erythropappu</i> (DC.) Macleish calculado de acordo com a identidade genética de Nei(1978).Os números acima dos nós indicam a consistência dos mesmos, após 1.000 permutações. DM = Delfim Moreira, SR=Santa Rita do Sapucaí, B = Baependi, ST= São Tomé das Letras, L= Luminárias, C= Carrancas, I= Ingaí, MP = Morro do Pilar,D = Diamantina, FS=Francisco Sá.....	59
Figura 10	Número provável de populações distintas de <i>Eremanthus erythropappus</i> , de acordo com a metodologia de Falush et al. (2003). LnP(D)= probabilidade log de dados mostrando dez populações como o número de populações distintas.....	61
Figura 11	Distribuição dos 200 indivíduos de <i>Eremanthus erythropappus</i> de acordo com análise do Structure (K=10)	64
Figura 12	Possibilidade para a definição de Unidades Operacionais para <i>E. erythropappus</i> definidas com base em correlograma multivariado levando em conta a presença de limite genético e descontinuidade genética.....	65

Figura 13 Definição final de Unidades Operacionais de
Eremanthus erythropappus..... 66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Coeficiente de correlação e número ótimo de locos para <i>Eremanthus erythropappu</i> (DC.) Macleish.....	46
Gráfico 2	Número provável de populações distintas de <i>Eremanthus erythropappus</i> , de acordo com a metodologia de Falush et al. (2003). $\ln P(D)$ = probabilidade log de dados mostrando dez populações como o número de populações distintas.....	57
Gráfico 3	Correlograma de Mantel construído com base nas distâncias genética e geográfica em populações de <i>E. erythropappus</i>	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lista de espécies do gênero <i>Eremanthus</i> , segundo MacLeish (1987).....	18
Tabela 2	Município, Código da População e coordenadas geográficas das populações de <i>Eremanthus erythropappus</i> amostradas no estado de Minas Gerais.....	35
Tabela 3	Esquema da análise de variância molecular (AMOVA).....	40
Tabela 4	Nome, sequência e número de fragemntos produzidos pelos 9 primers ISSR selecionados para a amplificação de <i>Eremanthus erythropappus</i>	44
Tabela 5	Estimativas genéticas populacionais das dez populações naturais de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) Macleish amostradas. N _a : número de alelos observados; N _e : número de alelos efetivos; I: Índice de Shannon He: diversidade genética de Nei; P: porcentagem de locos polimórficos; () : Desvio padrão.....	48
Tabela 6	Análise de variância molecular (AMOVA) em 10 populações de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) Macleish. GL: graus de liberdade; SQ: soma do quadrado dos desvios.....	50
Tabela 7	Fluxo alélico entre pares de populações de <i>E. erythropappus</i> (baixo da diagonal), distâncias geográficas entre pares de população (acima da diagonal). DM = Delfim Moreira, SR = Santa Rita do Sapucaí, B = Baependi, ST = São Tomé das Letras, L= Luminárias, C=Carrancas, I= Ingaí, MP = Morro do Pilar, D = Diamantina, FS=Francisco Sá.....	51
Tabela 8	Estimativas de identidade(acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei(1978), entre as populações de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) Macleish. DM = Delfim Moreira, SR=Santa Rita do Sapucaí, B = Baependi, ST= São Tomé das Letras, L= Luminárias, C= Carrancas, I= Ingaí, MP = Morro do Pilar,D = Diamantina, FS=Francisco Sá.....	52
Tabela 9	Resultado da análise bayesiana de divergência entre dez populações de <i>Eremanthus erythropappus</i> , modelos testados, as estimativas Θ^B , f e DIC (<i>Deviant Information Criterion</i>).....	55

Tabela 10	Resultados da análise bayesiana de divergência entre dez populações de <i>Eremanthus erythropappus</i> , incluindo as estimativas de f , Θ^{β} , a medida de informação I_e e a distância H-d entre a distribuição a posteriori e uma distribuição B, para os modelos testados.....	56
Tabela 11	Resultados da análise bayesiana de divergência entre dez populações de <i>Eremanthus erythropappus</i> , incluindo as estimativas de f , Θ^{β} , a medida de informação I_e e a distância H-d entre a distribuição a posteriori e uma distribuição B, para os modelos testados.....	56
Tabela 12	Número de populações (K) , valores de Log-likelihood, $\log(\text{LnP(D)})$	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	<i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) Macleish.....	18
2.2	Diversidade e estrutura genética.....	24
2.3	Marcadores ISSR.....	27
2.4	Manejo e diversidade genética de espécies arbóreas.....	29
2.5	Genética da paisagem.....	30
2.6	Unidades evolutivas significativas e unidades operacionais.....	31
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	Locais de coleta e amostragem.....	34
3.2	Extração e amplificação do DNA genômico.....	35
3.3	Separação e genotipagem dos fragmentos.....	38
3.4	Análise da diversidade genética.....	38
3.5	Análise da estrutura genética.....	39
3.6	Análise de descontinuidade genética.....	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1	Teste e seleção de <i>primers</i> ISSR.....	44
4.2	Número ótimo de locos polimórficos.....	45
4.3	Diversidade genética.....	47
4.4	Estrutura genética.....	49
4.5	Definição de unidades operacionais para a conservação da variabilidade genética.....	60
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
6	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

A exploração dos recursos madeireiros, a substituição da cobertura vegetal para expansão das fronteiras agrícola e pecuária somada a crescente necessidade de recursos naturais tem levado a destruição e fragmentação de ecossistemas naturais. Portanto, o desenvolvimento e a implantação de estratégias para minimizar ou evitar a perda da diversidade biológica torna-se um dos grandes desafios da atualidade.

Em populações naturais de espécies arbóreas, os estudos genéticos possibilitam o conhecimento da variabilidade genética e como essa variabilidade está distribuída entre e dentro das populações. Além disso, é possível um melhor entendimento de como processos naturais ou antrópicos atuam na adaptação ao ambiente, pois quanto maior a variabilidade genética em uma população maior a chance de perpetuação da espécie.

Os rápidos avanços na área de biologia molecular têm fornecido uma série de novos métodos para estudos genéticos e de evolução de plantas. Muitos desses métodos fornecem meios para a obtenção de informações genéticas relevantes a serem empregadas em programas de conservação genética. Estas informações são fundamentais para a implantação de programas de conservação de uma espécie. Estimando-se vários parâmetros genéticos torna-se possível o acesso a informações desconhecidas para grande parte das espécies arbóreas tropicais.

O conhecimento ecológico e genético é essencial para o entendimento da estrutura genética de populações nativas para o delineamento de estratégias de conservação, melhoramento e manejo sustentável envolvendo atividades para a definição do tamanho de reservas, manejo adequado das espécies, recuperação de áreas degradadas e coletas de sementes para plantio de espécies nativas (KAGEYAMA et al., 2003).

Somado ao conhecimento genético utiliza-se a genética da paisagem que é uma nova abordagem que agrupa dados genéticos a dados do ambiente, gerando informações de como a paisagem pode estar interferindo na diversidade genética de espécies.

Entre as espécies arbóreas tropicais, *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish, conhecida popularmente como candeia, é uma espécie florestal que ocorre nos campos e pastagens abertas do Centro Oeste (Goiás, Distrito Federal) e do Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) (LOEUILLE, B. 2010).

E. erythropappus está sob regime de manejo no Estado de Minas Gerais. Contudo, pouco se conhece sobre a diversidade genética, dessa espécie. Essa informação é de fundamental importância para o delineamento de estratégias para a conservação, exploração florestal sustentada de espécies arbóreas.

A hipótese levantada, portanto é se a ampla e restrita distribuição da espécie, a descontinuidade genética definem adequadamente as áreas prioritárias para o seu manejo e a sua conservação.

Considerando que o conhecimento da estrutura e da diversidade genética de uma espécie, bem como a compreensão de outros fatores relacionados é um ponto chave para a adoção de estratégias de manejo mais adequadas para a conservação genética, o conduziu-se este trabalho com o objetivo geral de caracterizar a variabilidade genética e fornecer informações que possam ser utilizadas para a manutenção e conservação de *E. erythropappus*.

De maneira específica, buscou-se neste trabalho:

- a) descrever os níveis de diversidade genética intra e interpopulacional em populações naturais de *E. erythropappus*;

- b) estudar os padrões espaciais por meio de técnicas de análise multidimensional e autocorrelação, de modo a fornecer informações importantes para programas de conservação e manejo da espécie, delineando as possíveis unidades operacionais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish

O gênero *Eremanthus*, pertencente à família Asteraceae, compreende 18 espécies entre árvores e arbustos (Tabela 1), que são conhecidas popularmente como candeias.

Tabela 1 Lista de espécies do gênero *Eremanthus*, segundo MacLeish (1987)

	Espécie
1	<i>Eremanthus glomerulatus</i> Less.
2	<i>Eremanthus goyanensis</i> (Gardner) Schutz-Bip
3	<i>Eremanthus matogrossensis</i> Kuntze.
4	<i>Eremanthus rondoniensis</i> MacLeish & Shumacher
5	<i>Eremanthus argenteus</i> MacLeish & Shumacher
6	<i>Eremanthus ariculatus</i> MacLeish & Shumacher
7	<i>Eremanthus cinctus</i> Baker
8	<i>Eremanthus incanus</i> (Less.) Less
9	<i>Eremanthus seidelli</i> MacLeish & Shumacher
10	<i>Eremanthus elaeagnus</i> (C. Martius ex DC.) Schultz-Bip
11	<i>Eremanthus pohli</i> (Baker in C. Martius) MacLeish
12	<i>Eremanthus graciellae</i> MacLeish & Shumacher
13	<i>Eremanthus brasiliensis</i> (Gardner) MacLeish
14	<i>Eremanthus polycephalus</i> (DC.) MacLeish
15	<i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish
16	<i>Eremanthus uniflorus</i> MacLeish & Shumacher
17	<i>Eremanthus capitatus</i> (Sprengel) MacLeish
18	<i>Eremanthus arboreus</i> (Gardner) MacLeish

Dentre as espécies, a escolhida para ser alvo desse trabalho foi a *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish, sendo esta uma espécie florestal característica da paisagem do Estado de Minas Gerais (Figura 1).

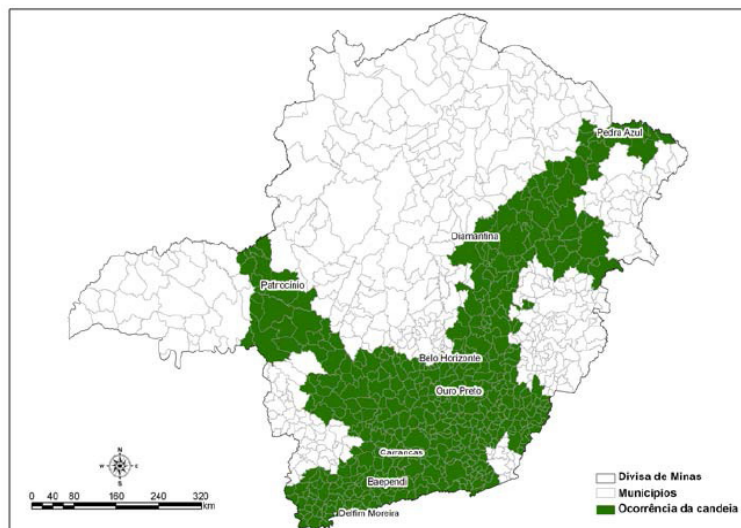


Figura 1 Área de ocorrência do gênero *Eremanthus* em Minas Gerais
Fonte: Andrade, 2009

Nas regiões de Minas Gerais, onde se desenvolvem as candeias o clima segundo Köppen, é mesotérmico úmido do tipo Cwb, tropical de altitude, com verões suaves. A temperatura do mês mais quente, dependendo da altitude do local considerado, varia de 22°C a 30°C, a temperatura média anual varia entre 18°C e 20°C, e a média anual de precipitação pluviométrica entre 1.400 e 1.550mm. Os meses mais chuvosos correspondem a novembro, dezembro, janeiro e fevereiro, e as menores precipitações ocorrem em junho, julho e agosto (IGAM, 2009).

A espécie é considerada por Lorenzi (1992) árvore de *hábitat* especial, pois em áreas nativas é encontrada em altitudes em torno de 1000 m, nas chamadas “terras frias”, onde o solo é classificado como Cambissolo e Litossolo, com afloramento de rochas.

E. erythropappus apresenta bom desenvolvimento em sítios com solos pouco férteis, rasos e, predominantemente, em áreas de campos de altitude, variando entre 1.000 e 1.700m. O crescimento radicular é rápido e, por não ser muito profundo com fuste irregular e curto em relação à copa, se desenvolve no sentido horizontal o que contribui para o processo de dispersão das sementes (CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS - CETEC, 1994).

A madeira dessa espécie é muito valorizada, devido à durabilidade natural e produção de óleo, cujo princípio ativo, o alfabisabolol, é utilizado amplamente em indústrias farmacêuticas e de cosméticos.

A espécie *Eremanthus erythropappus* é considerada precursora na invasão de campos. Ela se desenvolve rapidamente em campos abertos, formando povoamentos mais ou menos puros. Isso também acontece dentro da floresta quando há alguma perturbação, pois é uma espécie heliófila, a qual é beneficiada pela entrada de luz. Geralmente, os indivíduos de *E. erythropappus* encontrados dentro dessas florestas são maiores, devido à competição com as demais espécies por luz e, portanto, crescendo mais que os indivíduos que formam os candeiais (SILVA, 2001). No entanto, à medida que o processo sucessional da floresta avança, ou seja, à medida que a floresta se torna mais estruturada, o número de indivíduos da espécie diminui (PEDRALLI, 1997).

E. erythropappus é uma árvore cuja altura varia de dois a 10 m, podendo seu diâmetro atingir 35cm (Figura 2). Em sítios especiais *Eremanthus erythropappus* pode chegar eventualmente a 16m de altura e 65cm de diâmetro (CORRÊA, 1931).

O tronco dessa árvore possui uma casca grossa e cheia de fendas no fuste e, nos galhos mais novos, a casca torna-se menos rústica. As folhas têm uma característica marcante que é a dupla coloração (Figura 3). Na parte superior são verdes e glabras e na parte inferior possuem um tom branco, tomentoso e são aveludadas (CORRÊA, 1931). As folhas são simples, opostas

com pilosidade cinérea (CHAVES & RAMALHO, 1996). As flores (Figura 4) são hermafroditas e se apresentam em inflorescências de cor púrpura nas extremidades dos ramos. As características das folhas e de inflorescência facilitam a identificação da espécie mesmo a distância.



Figura 2 Indivíduo de *Eremanthus erithropappus*
Fonte: Daniele Arriel



Figura 3 Dupla coloração da folha de *Eremanthus erithropappus*.
Fonte: Daniele Arriel



Figura 4 Inflorescência de *Eremanthus erithropappu*
Fonte: Daniele Arriel

A maioria das espécies de Asteraceae é polinizada por insetos, notadamente abelhas e borboletas, mas há casos de polinização por beija-flores e por vento (LANE 1996). A floração começa quando a planta atinge os três anos de idade (CÂNDIDO, 1991) e, embora a época de floração varie com o lugar e os anos, ela ocorre na época seca, de julho a setembro (CÂNDIDO, 1991). As flores abrem-se de maio a agosto e com pico de floração no mês de julho quando alguns indivíduos já começam a frutificar (CETEC, 1994). O período de frutificação da espécie varia de setembro a outubro (PEDRALLI, 1997), podendo se estender até novembro (CÂNDIDO, 1991; CHAVES, 1994), ou seja, a frutificação se dá de dois a três meses após a floração, apresentando o pico entre os meses de setembro e outubro, quando se inicia a dispersão de sementes ou aquênios (CETEC, 1994). O fruto é do tipo aquênio, com superfície cilíndrica e com dez arestas, de cor pardo-escura, com aproximadamente 2 mm de comprimento.

Os eventos fenológicos da floração e posterior frutificação estão intimamente relacionados às condições ambientais, principalmente à umidade

(CETEC, 1994). Nos anos mais secos, esses eventos ocorrem mais tarde do que em anos de maior precipitação. As condições ambientais também influem na época de amadurecimento das sementes, sendo essa uma característica individual da planta. É comum observarmos indivíduos de *E. erythropapus* próximos apresentando diferentes estágios de floração e frutificação, ou mesmo em um único indivíduo. Essa variação, nos estágios de desenvolvimento floral, pode representar uma estratégia de sobrevivência da planta, uma vez que apresentará, em diferentes épocas, sementes maduras para o seu recrutamento via banco de sementes, quando as condições ambientais forem favoráveis à germinação (SILVA, 2003). A floração da candeia, ocorrendo numa época mais seca e fria, a frutificação ocorrendo com o início da elevação da temperatura e a dispersão das sementes coincidindo com o início das primeiras chuva, representam também uma estratégia de sobrevivência da espécie.

Por estarem relativamente limitadas a áreas de topo de morro (Figura 5), as candeias não apresentam, naturalmente, uma distribuição espacial contínua de suas populações. A alta capacidade de regeneração e colonização de novas áreas se dá pela produção abundante de sementes viáveis e pela eficiente dispersão anemocórica.



Figura 5 Candea no município de Delfim Moreira- MG
Fonte: Arquivo pessoal

Devido à sua importância econômica, essa espécie vem sendo explorada de maneira indiscriminada ao longo dos anos. A exploração de *E. erythropappus*, caracterizada por práticas predatórias, certamente levará a reduções drásticas no tamanho de suas populações naturais, alterando de forma negativa a sua estrutura genética. Dentre os resultados dessas alterações, pode-se mencionar a perda de alelos, reduzindo os níveis de variabilidade genética da espécie e as modificações nas taxas de cruzamento, levando à ocorrência de endogamia intrapopulacional. Como consequência, a manutenção e a utilização da espécie, mesmo de forma sustentada, poderão ser comprometidas devido à erosão genética.

2.2 Diversidade e estrutura genética

Uma condição fundamental para que haja evolução é a existência de diversidade genética. A seleção natural atua entre as variantes dentro das populações em relação à adaptação ao ambiente, proporcionando variabilidade entre populações e, por fim, variabilidade entre espécies (TORGGLER ; CONTEL; TORGGLER., 1995). A diversidade genética de uma espécie ou de uma população deve-se aos efeitos combinados de sua história genealógica e processos evolutivos (COMES & KADEREIT, 1998).

A conservação de espécies tem por base a manutenção dos níveis naturais de variabilidade genética nas populações (YEEH, KANG E CHUNG, 1996), sendo que o conhecer os níveis e distribuição da variação genética é fundamental para se estabelecer práticas conservacionistas efetivas e eficientes.

Em espécies arbóreas, a preservação da diversidade genética é essencial para a sobrevivência das populações às intempéries do meio e faz-se cada vez mais necessária, considerando-se a ocorrência de mudanças climáticas globais.

Devido à sua grande longevidade e ao potencial para elevadas taxas de fluxo de pólen, árvores devem possuir altos níveis de diversidade genética dentro das populações para que possam persistir a períodos de alterações ambientais (HAMRICK, 1983).

Entende-se como estrutura genética a distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações. A estrutura genética de uma espécie é definida como a medida dos padrões de variação dada pela diversidade genética da população, a variação nos níveis de diversidade em diferentes populações e a extensão e variação da correlação ou distância genética entre populações (BROWN, 1978). Desta forma, a estrutura genética é a distribuição não casual de alelos ou genótipos no tempo e no espaço, sendo desprezados outros fatores que possam afetar as frequências alélicas e genotípicas, como a organização do genoma e os processos meióticos.

A estrutura genética é desenvolvida e mantida devido às interações de um complexo conjunto de fatores evolutivos, como variação no conjunto gênico, organização dessa variação em genótipos, distribuição espacial dos genótipos, sistema de reprodução que controla a união de gametas para a formação das progênies, dispersão das progênies, seleção, deriva, mutação, eventos casuais, e processos de crescimento, mortalidade e reposição de indivíduos que darão origem às populações futuras (ALVAREZ-BUYLLA & GARAY, 1994; HAMRICK, 1983; HAMRICK, GODT, 1989; LOVELESS & HAMRICK, 1984). A diferenciação entre populações geralmente deve-se à seleção e deriva genética, sendo o fluxo gênico um fator contrário a essas forças (HAMRICK, 1989).

O conhecimento do nível e da distribuição da variabilidade genética dentro de uma espécie pode propiciar uma melhor compreensão de sua história ecológica e evolutiva (HAMRICK & GODT, 1996). Essa característica da estrutura genética também foi declarada por Weir (1990): o modo como a

diversidade genética é partilhada dentro e entre as populações é de particular interesse para a conservação dos recursos genéticos e fundamental para o manejo racional dos recursos de populações naturais, pois fornece matéria-prima para mudanças evolutivas futuras e níveis diferentes de variação em diferentes populações podem fornecer evidência de eventos evolutivos no passado.

Em espécies de plantas, devido à sua mobilidade limitada, a estrutura genética pode estar associada à distribuição espacial e temporal dos genótipos (BROWN, 1978; LOVELESS & HAMRICK, 1984). Dessa forma, as espécies podem apresentar estruturação como resultado da heterogeneidade ambiental e da pressão seletiva diferencial.

No que diz respeito ao tamanho populacional, quanto maior o tamanho populacional maior a diversidade genética dentro da população e, conseqüentemente, menor a diferenciação entre populações. Desta forma alta diferenciação entre populações e baixa diversidade genética populacional podem ser observadas em espécies com pequenas populações, de autofecundação e ou propagação vegetativa, com limitada dispersão de pólen e sementes (LOVELESS & HAMRICK, 1984; ZANETTI & CAVALLI, 2003). A redução no tamanho populacional tem como fator preocupante a alta susceptibilidade à deriva genética, e conseqüentemente, a redução da diversidade. Além da deriva genética, pequenas populações podem estar mais sujeitas à endogamia, decorrente da maior probabilidade de autofecundação e cruzamentos entre indivíduos aparentados (KAGEYAMA; GANDARA, 1998; KELLER; WALLER, 2002).

A descrição da variabilidade genética nas populações é uma ferramenta importante na genética de populações por possibilitar o estudo dos mecanismos de manutenção dessa variabilidade (NEI, 1987). O incremento nos níveis de diversidade é dado pela ocorrência de mutações, que geralmente ocorrem em taxas muito baixas, restringindo-se a uma perspectiva de longo prazo

(ALLENDORF & LUIKART, 2007). Já a redução nos níveis de diversidade ocorre em ritmo mais acelerado devido a fatores como deriva genética, endogamia, seleção natural (NEI, 1987).

Desta forma, a mensuração dos níveis de diversidade genética é de grande relevância na identificação de espécies e populações prioritárias para a conservação, e avaliações dos níveis de diversidade genética têm sido empregadas como ferramentas para subsidiar a adoção de estratégias de manejo e de conservação genética em inúmeros estudos (BARBOSA et al., 2010; BATISTINI et al., 2009; GAJERA et al., 2010).

São muitos os métodos utilizados para avaliar a estrutura genética de populações e verificar o grau de variabilidade existente em uma dada espécie (BOTTINO, 2006). Com o avanço em melhorias nas técnicas de biologia molecular, é possível observar polimorfismo diretamente na sequência gênica de organismos, ampliando novas perspectivas para pesquisa em conservação (ZUCCHI, 2002). Dentre elas destaca-se as técnicas de microssatélites, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) e cpDNA.

2.3 Marcadores ISSR

Sequências simples repetidas (SSR), ou microssatélites, são pequenas sequências de nucleotídeos de uma a seis bases, repetidas em *tandem*, e que estão distribuídas ao acaso no genoma de eucariotos. Essas sequências são bastante frequentes e por isso tem se tornado um marcador molecular muito utilizado. Contudo, para o uso desses marcadores faz-se necessário um conhecimento prévio da sequência que flanqueia os microssatélites para a construção dos *primers* a serem utilizados nas reações PCR (Reação da

Polimerase em cadeia) (LIU & WENDEL, 2001). O processo para a descoberta e caracterização de grande número de *primers* é bastante oneroso e demorado.

De maneira a contornar a necessidade da informação prévia das sequências flanqueadoras dos SSR, Zietjiewicz, Rafalski e Labuda. (1994) desenvolveram um tipo de marcador, baseado em SSR, em que sequências complementares aos próprios SSRs são utilizados como *primers*. Esses marcadores foram denominados *Inter Simple Sequence Repeats* (intersequências simples repetidas) ou simplesmente ISSR.

O marcador ISSR é considerado semi-arbitrário, possuindo ao final de sua sequência 3' ou 5' de 1 a 4 bases de purina ou pirimidina, com um dinucleotídeo parcialmente degenerado (LIU; WENDEL, 2001; SOUZA et al., 2005). Esses segmentos não repetidos no final do *primer* podem variar entre *primers* que possuam a mesma sequência repetida por exemplo, CA, possuindo diferentes alvos de repetições em diferentes localizações no genoma (ZIETJIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). As sequências-alvo dos ISSR são, assim como os SSRs, abundantes ao longo do genoma de eucariotos e evoluem rapidamente (ESSELMAN et al., 1999; FANG; ROOSE, 1997), comprovando que são úteis em estudos de genética de populações.

A análise desse marcador se assemelha à do marcador RAPD, constituindo-se de marcador dominante, fácil e rápido de trabalhar. Usa-se um único *primer* ISSR por reação PCR gerando um grande número de fragmentos polimórficos (LIU; WENDEL, 2001; SLOTTA; PORTER, 2006).

Marcadores RAPD têm sua confiabilidade questionada em estudos de diversidade genética devido, principalmente, à baixa especificidade dos *primers* e reprodutibilidade dos resultados obtidos (HARRIS, 1999). Em RAPD, por exemplo, *primers* ricos em GC têm vários sítios de ancoragem do DNA ou ancoragens não específicas em baixas temperaturas de anelamento (HARRIS, 1999). Em ISSR os *primers* são mais robustos, apresentando maior superfície de

ancoragem, podendo-se utilizar maiores temperaturas de anelamento, o que aumenta a especificidade com o sítio de ligação, proporcionando alta reprodutibilidade nos resultados obtidos (TSUMURA; OHBA; STRAUSS, 1996).

Marcadores ISSR têm sido usados em diversos estudos para análise de variabilidade entre linhas híbridas de cultivares, complexos híbridos naturais e variabilidade em genética de populações (Hu et al., 2010; Li et al., 2010; Shao et al., 2009).

2.4 Manejo e diversidade genética de espécies arbóreas

O homem converte florestas para uso agrícola e expansão urbana, fragmentando florestas, mudando a demografia destas, degradando e poluindo o ambiente. Essas atividades vêm impactando a diversidade genética, influenciando em processos evolutivos como: extinção, seleção, deriva, fluxo gênico e mutação.

Diversidade genética é que dá condições para a adaptação, evolução e sobrevivência de espécies, especialmente frente a mudanças ambientais e doenças. Espécies arbóreas são espécies chave para os ecossistemas florestais e, por terem vida longa, a diversidade genética tem maior significado. A redução na diversidade genética dessas espécies pode predispor-las a doenças reduzindo a produtividade. Desta forma a diversidade genética é vista como fundamental para a sustentabilidade e estabilidade de ecossistemas florestais.

O manejo florestal sustentado visa à produção contínua de madeira, para atingir as metas os programas de manejo são delineados baseados nas medidas de incremento médio anual e incremento corrente anual. Portanto seria importante considerar também a constituição genotípica dos indivíduos a serem explorados, já que essa constituição é responsável por parte das diferenças de

produtividade, adaptação e reprodução dos indivíduos. No entanto, apesar da grande importância dos fatores genéticos para a exploração sustentada de uma espécie, os planos de manejo em florestas tropicais naturais não tem incorporado esses fatores.

Parâmetros genéticos e ecológicos são importantes para o manejo sustentável das florestas tropicais, na qual a possibilidade de retomada do crescimento (regeneração, recrutamento) de uma população deverá ser conhecida, a fim de proporcionar novos ciclos de exploração, na busca de manter a integridade das populações. Questões referentes à raridade, dimensão da árvore e o material que será explorado deverão ser conhecidas para que o manejo dos recursos da floresta seja sustentável, além de abranger critérios econômicos e sociais (KAGEYAMA, 2000).

2.5 Genética da paisagem

A fragmentação de habitat e alterações climáticas têm tido impactos negativos sobre populações naturais, levando a descontinuidade e perda de habitat. Essa descontinuidade divide populações interrompendo muitas vezes o fluxo alélico, levando ao isolamento e aumentando a probabilidade de extinções locais.

Atualmente existem várias ferramentas disponíveis para inferir a variação genética no tempo e no espaço e sua relação com o ambiente, surgindo um novo campo de pesquisa denominado genética da paisagem.

A nova abordagem denominada genética da paisagem objetiva fornecer informações de como a paisagem e as características do ambiente influenciam a estrutura genética populacional (KIDD; RITCHE, 2006; MANEL et al., 2003; PEARSE; CRANDALL, 2004;). A primeira etapa é analisar o padrão espacial da variação genética e detectar a existência ou não de descontinuidade genética

entre populações locais, conhecendo-se desta forma o impedimento do fluxo alélico, o que poderia estar associado a características da paisagem.

Manel *et al.* (2003) definiram genética da paisagem como uma combinação de ecologia da paisagem e genética de populações.

2.6 Unidades evolutivas significativas e unidades operacionais

Espécies encontram-se distribuídas em populações, podendo estar essas em contato umas com as outras, terem pouco ou nenhum contato, ou estarem geograficamente estruturadas. A ausência de contato entre as populações pode acarretar na diferenciação genética das mesmas, o que se torna necessário que o manejo e conservação das espécies sejam realizados de maneira independente.

De acordo com Eizirik (1996), analisar a divergência genética entre populações e aliar os dados aos padrões espaciais da distribuição dessa divergência permitem identificar Unidades Evolutivamente Significativas (UES) e Unidades Operacionais ou Unidades de Manejo (UM) (*Management Units*)

O conceito de Unidades Evolutivamente Significativas (UES) (*Evolutionarily Significant Units - ESU*) foi introduzido por Ryder em 1986. Esse conceito define uma população ou um grupo de populações que se encontra diferenciadas em termos genéticos, morfológicos e ecológicos de populações próximas (coespecíficas), refletindo um isolamento geográfico em níveis variáveis (RYDER 1986). Segundo Eizirik (1996), essas populações merecem ser consideradas como unidades independentes para conservação por possuírem características próprias. A maneira de definir estas unidades certamente depende de como interpretar os padrões de variação observados entre populações no contexto da história de vida de cada espécie, evolução e biogeografia.

Associado ao conceito de ESU está o de Unidades de Manejo (UM) (*Management Units*) ou Unidades Operacionais (UO). Moritz (1994) define como populações que apresentam divergência significativa na frequência de seus alelos, independente de quanto distintos sejam esses alelos entre si. Há nesse caso uma separação que leva a divergência das frequências alélicas, mesmo assim não resulta em monofilia dos alelos por ser recente e incompleta.

O baixo nível de contato atual entre essas populações tornariam improvável uma recolonização da área de uma delas, no caso de sua extinção, o que implicaria em eliminação de genótipos únicos nos ecossistemas locais, com efeitos deletérios em termos demográficos, ecológicos e mesmo econômicos para as comunidades humanas locais que utilizam esses recursos (EIZIRIK, 1996).

Essas unidades são as mais apropriadas para conservação em curto prazo, pois ocorrem em populações com separação geográfica suficiente para que haja divergência das frequências alélicas (EIZIRICK, 1996). Assim, a definição de Unidades Operacionais é a forma mais adequada de se realizar a conservação genética, não ocorrendo perda de alelos em regiões sujeitas à forte impacto.

Diniz-Filho & Telles (2002) propuseram uma metodologia para definição de unidades operacionais específicas baseada no padrão espacial da variabilidade genética. Essas unidades seriam definidas por populações que mantenham entre si uma distância geográfica mínima a partir da qual as populações passariam a ser consideradas geneticamente independentes. Tal metodologia possibilita a otimização de estratégias de conservação da variabilidade genética intrapopulacional, de forma a definir unidades para conservação *in situ* e delinear esquemas de amostragem para coleção de germoplasma. Essas unidades possuem entre si uma alta divergência genética, o que reduz esforços ou custos para a indicação de áreas prioritárias para a

conservação (MANEL *et al.* 2003; PEARSE & CRANDAL 2004; TELLES *et al.*,2003; TOMIMATSU *et al.* 2004; WATTS *et al.* 2004).

De acordo com Taylor & Dizon (1999), indicar locais que possuem populações com atributos genéticos significativos capazes de garantir a manutenção de parte da herança evolutiva (ESU ou UO), discernindo entre as diferentes populações é uma informação valiosa, pois essas populações seriam prioritárias para a conservação. Esse seria também um estudo importante e pré-requisito fundamental para se estabelecer estratégias eficazes de conservação genética. Assim, como cada população ou espécie apresenta características particulares, como fluxo gênico, história de vida, os objetivos associados à conservação devem ser analisados com atenção, e os rios de extinção devem ser identificados e considerados para que se possam definir as unidades de conservação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de coleta e amostragem

Neste estudo foram utilizadas amostras de DNA provenientes de 200 indivíduos de 10 populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish distribuídas na área de ocorrência da espécie no Estado de Minas Gerais (Figura 6). Assim em cada uma das populações amostradas foram coletadas folhas de 20 árvores.

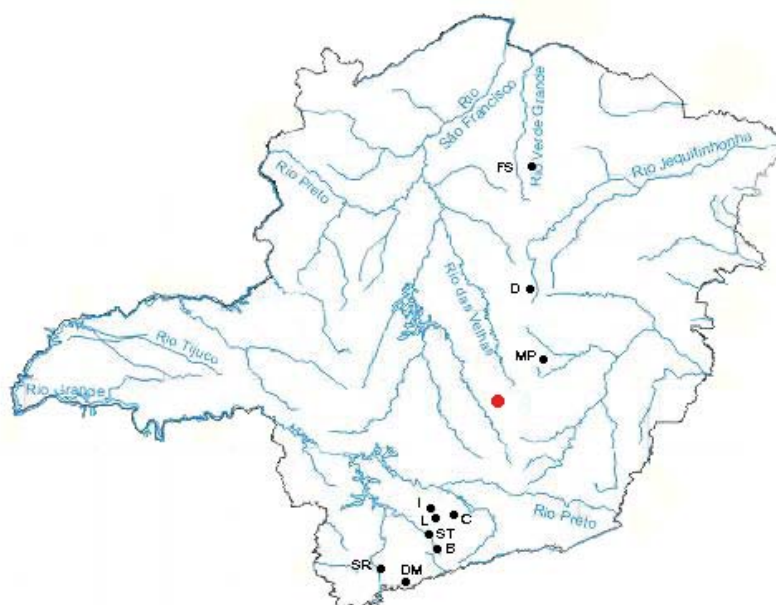


Figura 6 Localização das populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish em Minas Gerais (Brasil). DM = Delfim Moreira, SR=Santa Rita do Sapucaí, B = Baependi, ST= São Tomé das Letras, L= Luminárias, C= Carrancas, Carrancas, I= Ingai, MP = Morro do Pilar, D = Diamantina, FS=Francisco Sá

O material coletado foi identificado, acondicionado em sacos plásticos com sílica gel e encaminhado ao Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas, na Universidade Federal de Lavras, onde foi armazenado a -20°C até o momento da extração do DNA.

Na Tabela 2 verificam-se os dados sobre os municípios, o código da população e as coordenadas.

Tabela 2 Município, Código da População e coordenadas geográficas das populações de *E. erythropappus* amostradas no Estado de Minas Gerais

Município	Código da População	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)
Delfim Moreira	DM	22° 18' 26,51250"	45° 10' 40,04240"	1200
Santa Rita do Sapucaí	SR	22° 11' 17,54073"	45° 35' 31,18036"	826
Baependi	B	21° 58' 31,34129"	44° 46' 09,38253"	893
São Tomé das Letras	ST	21° 42' 13,14629"	44° 59' 16,21553"	1291
Luminárias	L	21° 31' 52,20951"	44° 48' 19,61931"	351
Carrancas	C	21° 27' 01,46192"	44° 39' 33,84086"	1051
Ingaí	I	21° 26' 12,09065"	44° 58' 24,73977"	951
Morro do Pilar	MP	19° 12' 15"	43° 23' 15"	622
Diamantina	D	18° 12' 03,80000"	46° 24' 53,49999"	1114
Francisco Sá	FS	16° 28' 25,68000"	43° 24' 43,2602''	657

A amostragem foi aleatória em todas as populações, as árvores amostradas foram georreferenciadas com aparelho GPS (E-TREX Legend HCx-Garmim) com precisão de 3,5 m. Todas as populações encontram-se em área preservada e de difícil acesso.

3.2 Extração e amplificação do DNA genômico

Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo do CTAB (DOYLE & DOYLE 1990), com modificações. Nesse método, utilizou-se entre 150 e 200

mg de tecido foliar de cada indivíduo para maceração em almofariz, utilizando polivinilpirrolidona (PVP insolúvel). Adicionou-se 800 µL de tampão de extração pré- aquecido a 65°C. O tampão constitui-se de 2% de CTAB (*cationic hexadecy bromide*), Tris HCL 1M (pH 8,0), EDTA (*ethylenediaminetetracetate*) 0,2 M (pH8,0), NaCl 1,4 M, 1% PVP (40) e 0,2 % de β-mercaptoetanol. Após a maceração, o material foi colocado em tubos de 2 ml devidamente identificado, homogeneizado e colocado em banho-maria por 60 minutos a 65°C, com agitações periódicas em intervalos de 10 minutos. Nesta primeira etapa, ocorre a solubilização das membranas celulares.

A primeira extração dos ácidos nucleicos foi realizada com 600 µL de solvente orgânico clorofórmio álcool isoamílico na proporção de 24 partes de clorofórmio para uma parte de álcool isoamílico (CAI 24:1). Em seguida, os tubos foram agitados manualmente, durante 5 minutos. As amostras foram colocadas em centrifugação (12.000 rpm), por 10 minutos, separando-se a fase orgânica da fase aquosa. O sobrenadante (fase aquosa superior) foi retirado, e transferido para novo tubo, no qual se adicionaram 60 µL de solução 10% CTAB e 1,4 M NaCl. Após homogeneização, nova extração com 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foi feita e as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos. A nova fase aquosa superior foi transferida para novo tubo, adicionando-se 450 µL de isopropanol gelado e deixado para precipitar (*overnight*) no freezer.

Após a precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm, a 4°C. Posterior a essa etapa formou-se um *pellet* visível contendo o DNA. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com 100 µL de etanol 70%, por 5 minutos. Após nova centrifugação (10.000 rpm por 5 minutos), o etanol foi descartado. O *pellet* foi lavado novamente com etanol a 100% por 5 minutos. Após a lavagem, as amostras foram secadas em temperatura ambiente até total evaporação do etanol. O DNA foi ressuscitado

em 100 μL de solução TE (1% v/v Tris-HCL 1M pH 8,0 e 0,2% v/v de EDTA 0,5 M pH 8,0 com água ultrapura autoclavada). As amostras de DNA foram acondicionadas em freezer a -20°C .

Realizou-se diluições padronizadas em todas as amostras para realização da reação de amplificação, pegando-se 1 μL do DNA resuspendido e adicionando-se 100 μL de TE (diluição 1:100).

Foram testados 20 *primers* ISSR em quatro amostras de DNA provenientes de quatro populações (1 planta por população). Verificou-se o perfil de amplificação de cada *primer* em gel de agarose após eletroforese. Dos 20 *primers* testados nove amplificaram um maior número de fragmentos com boa resolução selecionado, portanto para a realização do trabalho (Tabela 3).

As reações foram preparadas em microplacas para PCR (PCR – 96 – Axygen Scientific), sendo aplicada, em cada poço, a alíquota de 2 μL do DNA diluído (1:100). Às amostras de DNA foram acrescentados 10 μL de coquetel de reação contendo: 1,2 μL de tampão PCR 10X (constituído de 500 mM de Tris-HCl pH 8,0; 200 mM de KCl; 2,5 ng/mL de BSA; 200mM de Tartazine e 1% de Ficol, 1,2 μL de dNTP + MgCl_2 (dNTP a 2,5mM; MgCl_2 a 25 mM), 0,15 μL de Taq polimerase (5 u/ μL) e 2 μL de *primer* completando o volume final com água ultrapura (5,45 μL).

As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador GeneAmp PCR System 9700, onde as amostras sofreram desnaturação inicial a 94°C , por 2 minutos, seguida de 37 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de 15 segundos a 94°C , 30 segundos a 42°C e 1 minuto a 72°C . Ao final do último ciclo, a extensão final foi por 7 minutos, a 72°C .

3.3 Separação e genotipagem dos fragmentos

Os produtos resultantes da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (5mg/ml). As corridas eletroforéticas foram efetuadas em cuba horizontal (*Bio-Rad Sub-Cell*[®], modelo 192) em tampão TBE 0,5X (Tris-Borato EDTA) com duração de 2 horas e 30 minutos, a 120V. Para estimar o tamanho dos fragmentos, usou-se marcador de peso molecular *ladder* de 1 kb (Amresco).

Após a eletroforese, os géis foram retirados da cuba e levados para transluminador de luz ultravioleta onde foram fotodocumentado por meio do software de análise de imagens *UVP Doc Itls*. Os géis foram interpretados quanto à presença (1) e ausência (0) de fragmentos amplificados de DNA. Com base nesses resultados construiu-se uma matriz de dados binários em que se avaliou o nível de polimorfismo nas populações. Cada fragmento amplificado foi considerado como um loco.

3.4 Análise da diversidade genética

Para análise da diversidade genética intrapopulacional, utilizou-se o programa POPGENE (Versão 1.32) (YEH et al., 1997) em que para dados dominantes de assume que as populações estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Foram estimados o número de alelos observados (N_a), número de alelos efetivos (N_e), o índice de Shannon (I), diversidade genética de Nei (He) (NEI, 1978), porcentagem de locos polimórficos e fluxo alélico.

O programa PopGene (versão 1.32) também foi utilizado para estimar as similaridades genéticas entre as populações, utilizadas para a construção de um dendrograma UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages*), adotando a rotina SAHN (*Sequential Agglomerative, Hierarchical*

and Nested Clustering). O dendrograma foi construído pelo programa NTSYS, versão 2.11 (ROHLF, 2000). A consistência dos agrupamentos do dendrograma foi verificada por meio do programa TFGA (*Tools for Population Genetic Analysis*) versão 1.3 (Miller, 1997), após 1.000 permutações.

3.5 Análise da estrutura genética

A estrutura genética foi obtida pela análise de variância molecular (AMOVA), utilizando o programa ARLEQUIN 3.11 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2007). Nessa análise, assumiu-se que os indivíduos dentro das populações possuem o mesmo padrão de cruzamento, e é calculada uma matriz de distância fenotípica para os pares de comparações, utilizando um coeficiente de similaridade genética (Jaccard).

Para o cálculo da AMOVA, foi utilizado, como coeficiente, o quadrado das distâncias euclidianas, que é análoga às análises de Excoffier, Smouse e Quattro (1992) que introduziu a estatística Φ (HUFF; PEAKALL; SMOUSE, 1993). A análise de variância, denominada AMOVA, produz estimativas dos componentes de variância das análogas estatísticas F , que refletem a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica. O método acomoda diversos tipos de matrizes de entrada fornecidas pelos vários tipos de marcadores moleculares e diferentes tipos de pressuposições evolutivas, sem modificar a estrutura básica da análise. A significância dos componentes de variância e das estatísticas F , é testada pelo uso de permutações.

A AMOVA é aplicável facilmente em diferentes situações e constitui uma estrutura coerente e flexível para análise de dados moleculares. Uma das vantagens da utilização da AMOVA para a análise é que ela não necessita da pressuposição do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

A análise da variância molecular tem como base as distâncias genéticas que são tratadas como desvio da média de um grupo e utiliza os quadrados dos desvios como variância, permitindo a partição da variação genética entre e dentro das populações analisadas. Segundo de Excoffier, Smouse e Quattro (1992) as somas de quadrados convencionais (SQ) podem ser escritas na forma de somas de quadrados de diferenças entre pares de observações. Desta forma, eles construíram uma análise de variância molecular hierárquica, partindo diretamente da matriz das distâncias quadradas de todos os pares de haplótipos.

Na Tabela 3 observam-se os níveis hierárquicos, sendo:

P = número total de populações

N = número total de dados para dado haplótipo.

Tabela 3 Esquema da análise de variância molecular (AMOVA)

Fonte de variação	GL	SQ	QM	E(QM)
Entre populações	P – 1	SQa	QMa	$\sigma_b^2 + 2\sigma_a^2$
Dentro de populações	N – P	SQb	QMb	σ_b^2
Total	N – 1			

$$\sigma^2 = \sigma_b^2 + \sigma_a^2$$

Os componentes de variância de cada nível de hierarquia são obtidos das esperanças dos quadrados médios. De acordo com Cockerham (1969), tem-se:

$$\phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma^2}$$

em que: Φ_{ST} = a proporção da variabilidade molecular de haplótipos entre populações. Esse índice também é denominado F_{ST} .

Utilizou-se o programa HICKORY 1.0 (HOLSINGER; LEWIS, 2003) para o cálculo da estimativa Bayesiana. Nesse programa, o valor da estruturação genética entre as populações é dado pelo índice de Θ^B (análogo ao F_{st}), o qual pode ser calculado por quatro modelos diferentes.

O primeiro modelo chamado *full model*, estima-se o valor de Θ^B e f (coeficiente de endogamia similar ao F_{is}). O segundo e terceiro modelos assumem, respectivamente que Θ^B e f sejam iguais a 0. O quarto modelo assume o valor de f livre para variação uma vez que as estimativas de f são viesadas, quando se baseiam em dados de marcadores dominantes. Nesse caso, esse modelo escolhe valores aleatórios de f para distribuição *a priori*. A distribuição *a posteriori* de Θ^B foi numericamente aproximada pela simulação de Cadeias de Monte Carlo Markov (MCMC).

A análise é realizada utilizando os quatro modelos, ao final os resultados são comparados pelo do DIC (*Deviance Information Criterion*), em que o menor valor de DIC determina o melhor modelo a ser utilizado. Segundo Diniz Filho e Telles (2002) os parâmetros I_c e H-d podem ser utilizados para auxiliar na escolha do melhor modelo. Ainda segundo a autora I_c representa a informação fornecida na estimativa do parâmetro obtido para o conjunto de dados, quanto maior seu valor mais informações foram extraídas dos dados, o valor de H-d consiste na distância ou diferença entre as simulações das distribuições *a posteriori* e a sua aproximação da distribuição β , representando a porcentagem da não sobreposição entre essas distribuições. Quando o valor de H-d tende a zero, significa que as distribuições são idênticas, por outro lado, se tende a um, elas são completamente diferentes.

Foi realizada também uma estimativa de Θ^B entre os pares de populações e realizado adicionalmente o teste de Mantel entre as populações, pelo programa computacional NTSYS 2.0 (ROHLF, 2000), com 1.000 permutações, para teste de correlação entre as distâncias genética e geográfica.

A análise de agrupamento bayesiana foi utilizada também para a avaliação da homogeneidade genética das populações e seu fluxo gênico, para isso foi utilizado o programa STRUCTURE 2.2 (PRITCHARD; WEN, 2002). O número de populações (K) foi estimado usando o modelo de ancestralidade não misturada (*no admixture*) com a frequência de alelos correlacionados, permitindo uma resolução máxima na separação das populações. O número de populações (K) foi estimado, com K variando de um a dez. Doze corridas foram realizadas independentemente com 100.000 repetições em Cadeia de Monte Carlo Markov (MCMC), e um *burn-in* de 50.000, para cada valor de K. Espera-se que o número exato de populações discretas seja o valor K máximo estimado pelo modelo Log-likelihood, $\log(P(X/K))$, em que considera-se mais confiável quando possuir menor número negativo de Ln.

3.6 Análise de descontinuidade genética

Partindo das distâncias genéticas foi feito o acesso a descontinuidade dos dados genéticos em relação ao espaço geográfico. Localizou-se as populações em um mapa respeitando suas posições geográficas, aplicando o método de triangulação de Delaunay para conectá-las em uma rede. Segundo Legendre e Legendre (1998), a rede de Delaunay é formada por um conjunto de três populações (A, B e C), sendo que a ligação entre elas ocorre somente se um círculo que passe sobre elas não inclui nenhuma outra população.

Partindo da rede e das distâncias genéticas, a descontinuidade dos dados multivariados foi obtida pela divisão das distâncias genéticas, associadas a cada ligação entre as populações ABC na rede de Delaunay pela distância geográfica (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998). A análise de descontinuidade é feita mapeando-se uma dada proporção (i.e., 25%) dos valores mais elevados da

distribuição global dessas razões ao longo da rede de Delaunay (LEGENDRE & LEGENDRE; LEGENDRE, 1998; MANEL et al. 2003).

As análises foram realizadas com auxílio do programa Barrier 2.2 (MANNI; GUÉRARD, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste e seleção de *primers* ISSR

Foram testados 16 *primers* ISSR, dos quais nove produziram fragmentos robustos com um bom perfil de amplificação e boa resolução. Os *primers* selecionados geraram um total de 72 fragmentos, havendo uma variação de 5 a 10 locos por *primer*. Pela Tabela 4 observa-se os *primers* selecionados, suas sequências, número de fragmentos produzidos e o valor do PIC (Conteúdo Informativo de Polimorfismo), parâmetro indicativo da qualidade do marcador. Botstein et al. (1980) classifica marcadores com PIC superior a 0,5 como satisfatórios em conteúdo informativo, valores entre 0,25 e 0,50 como mediantemente informativos e valores inferiores a 0,25 pouco informativos. O PIC é calculado pela fórmula $PIC = 2P_i(1-P_i)$, em que P_i é a frequência de fragmentos polimórficos amplificados e $1-P_i$ é a frequência do alelo nulo.

Tabela 4 Nome, sequência e número de fragemntos produzidos pelos 9 *primers* ISSR selecionados para a amplificação de *Eremanthus erythropappus*

Primer	Sequência (5' --3')	Nºde Fragmentos	PIC
JOHN (AG)7-YC	AGA GAG AGA GAG AGY C	7	0,24
MANNY (CAC)4-RC	CAC CAC CAC CAC RC	9	0,25
UBC 807 (AG)8-T	AGA GAG AGA GAG AGA GT	9	0,25
UBC827 (AC)8G	ACACACACACACACACG	7	0,25
UBC 834 (AG)8-YT	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	7	0,21
UBC 835 (AG)8-YC	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	8	0,25
UBC 841 (GA)8-YC	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	5	0,23
UBC 844 (CT)8-RC	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	10	0,25
UBC 857 (AC)8YG	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	10	0,25
Total		72	0,25

R- purina (A ou G)

Y – pirimidina(T ou C)

Neste estudo observa-se que a média do PIC para os nove *primers* foi de 0,24 e a variação foi de 0,21 a 0,25, classificando os locos mediantemente informativos. Os *primers* Manny, UBC 807, UBC 827, UBC 835, UBC 844 e UBC 857 apresentaram maior valor de PIC (0,25) enquanto o *primer* UBC 834 apresentou o menor valor (0,21) e os *primers* UBC 841 e John apresentaram valores de 0,23 e 0,24 respectivamente

De acordo com a Figura 7 verifica-se o padrão de fragmentos gerados por marcador ISSR com o *primer* Manny em amostras foliares de *E. erythropappus*. Fragmentos que apresentaram coloração fraca ou difícil definição foram descartados da análise.

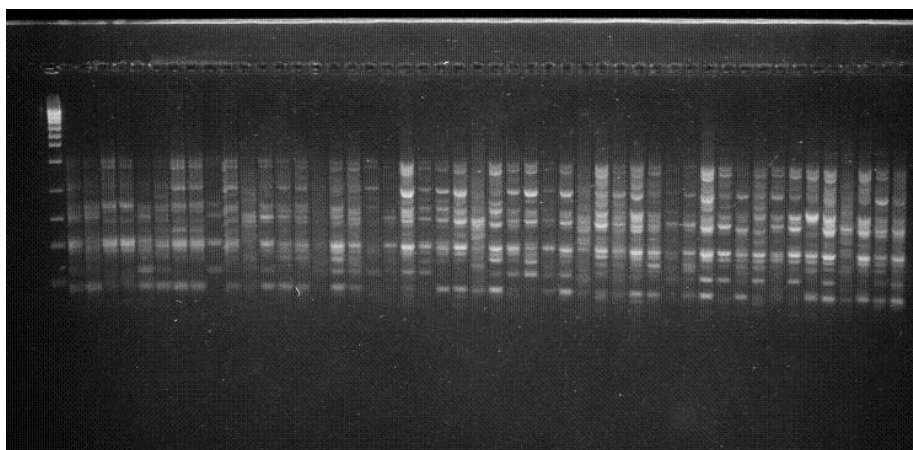


Figura 7 Padrão de fragmentos produzidos pelo *primer* Manny em indivíduos de *Eremanthus erythropappu* (DC.) Macleish

4.2 Número ótimo de locos polimórficos

Na caracterização de espécies florestais o número de locos é muito variável. Em relação à *E. erythropappus*, Arriel (2009) utilizou 123 locos para caracterizar a diversidade e estrutura genética de uma população usando marcador ISSR. Usando marcadores RAPD, Estopa et al. (2006) caracterizou a

espécie com 56 fragmentos polimórficos a partir de 10 *primer*. Hu et al. (2010) estudando *Rheum tanguticum*, uma espécie endêmica na China, trabalhou com 326 locos do mesmo marcador. Jeong et al. (2010) estudando *Megaleranthus saniculifolia* utilizou 14 locos aloenzimáticos e 78 locos ISSR para caracterização da estrutura e diversidade genética da espécie.

Utilizando o programa GENES (CRUZ, 2001), o número ótimo de locos ISSR na caracterização da espécie *E. erythropappus* pela reamostragem *bootstraap* foi estimado em 61 locos (Gráfico 1), em que o valor do estresse foi inferior a 0,05 e a correlação de 0,97. É possível observar pelo Gráfico 1 que a partir de 61 locos a correlação se aproxima do valor máximo (1), sugerindo que o número de locos obtidos foi suficiente para as análises.

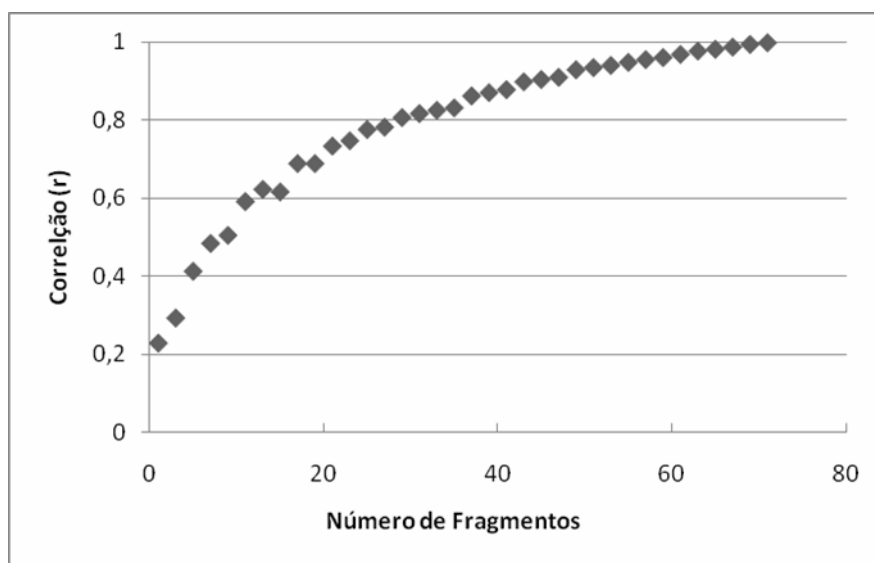


Gráfico 1 Coeficiente de correlação e número ótimo de locos para *Eremanthus erythropappu* (DC.) Macleish

4.3 Diversidade genética

Os nove *primers* ISSR utilizados geraram total de 72 locos, todos polimórficos. Foram considerados polimórficos os locos onde a frequência do alelo mais comum foi menor ou igual a 95% (NEI, 1987). Na Tabela 5 são apresentados os valores de diversidade genética intrapopulacional estimados nas populações de *E. erythropappus*. A porcentagem de locos polimórficos (P) variou de 69,44% nas populações de candeia amostradas em Delfim Moreira (DM) e Diamantina (D), a 95,83% em Morro do Pilar (MP), com média de 78,61%. Nas populações ST, DM, SR, D, FS os valores de P (variando de 69,44% a 73,61%) sendo menos elevados do que nas populações L, C, I, B, MP (variando de 80,56% a 95,83%). Utilizando marcador ISSR, com a espécie *Rheum taguticum* (Hu et al, 2010), obteve 326 locos dos quais 46,51% eram polimórficos. Gajera et al.(2010) estudando *Ricinus communis* L. encontrou 68,0% de locos polimórficos. Usando marcador dominante Black-Samuelsson et al. (1997) estudando *Vicia psiformis* encontrou apenas 7% de locos polimórficos. Em relação a *E. erythropappus*, Moura (2005), utilizando marcador RAPD encontrou 75% de locos polimórficos, Barreira (2005), utilizando isoenzimas encontrou 76,92% de locos polimórficos e Arriel (2009), encontrou 94,31% de locos polimórficos, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Alguns trabalhos com populações naturais (ALEXANDER; LISTON; POPOVICH, 2004; GE; SUN, 2001; XIA et al. ,2007), a porcentagem de locos polimórficos tem sido usada como medida de diversidade genética. No entanto, apesar de se usar o parâmetro como indicador de diversidade genética, observa-se em trabalhos realizados com marcadores dominantes uma alta variação nos percentuais de locos polimórficos. Todos os estudos citados acima utilizaram marcadores dominantes, a variação deve ter ocorrido devido a características

ecológicas das espécies, variação do número de indivíduos e populações e também em função dos marcadores ISSR serem mais polimórficos que RAPD.

Tabela 5 Estimativas genéticas populacionais das dez populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish amostradas. N_a : número de alelos observados; N_e : número de alelos efetivos; I: Índice de Shannon H_e : diversidade genética de Nei; P: porcentagem de locos polimórficos; () : Desvio padrão

População	N_a	N_e	I	H_e	P(%)
DM	1,69 (0,46)	1,47 (0,39)	0,39 (0,20)	0,27 (0,29)	69,44
SR	1,74 (0,44)	1,46 (0,40)	0,39 (0,20)	0,26 (0,28)	73,61
B	1,81 (0,40)	1,50 (0,36)	0,43 (0,19)	0,29 (0,26)	80,56
ST	1,71 (0,46)	1,46 (0,39)	0,39 (0,20)	0,27 (0,20)	70,83
L	1,81 (0,40)	1,47 (0,38)	0,41 (0,19)	0,27 (0,26)	80,56
C	1,89 (0,32)	1,68 (0,32)	0,54 (0,15)	0,38 (0,21)	88,89
I	1,85 (0,36)	1,60 (0,34)	0,50 (0,17)	0,34 (0,23)	84,72
MP	1,96 (0,45)	1,63 (0,33)	0,52 (0,15)	0,36 (0,20)	95,83
D	1,69 (0,46)	1,51 (0,39)	0,42 (0,20)	0,29 (0,29)	69,44
FS	1,72 (0,45)	1,53 (0,41)	0,42 (0,21)	0,29 (0,29)	72,22
Média	1,79 (0,42)	1,53 (0,37)	0,44 (0,19)	0,30 (0,25)	78,61

O número de alelos observados (N_a) variou de 1,69 a 1,96 e o número efetivo de alelos (N_e) variou de 1,46 a 1,68.

O índice de Shannon (I) varia de 0 a 1 e considera-se que quanto mais próximo de zero, mais baixa é a diversidade. Os valores encontrados para o Índice de Shannon (I) apresentaram variação de 0,39 (ST, DM, SR) a 0,54 (C), com média de 0,44. Em estudos realizados com a espécie *E. erythropappus* pode-se observar valores do Índice de Shannon variando de 0,45 a 0,49 (ESTOPA et al., 2006), 0,50 a 0,54 (MOURA, 2005) e 0,53 (ARRIEL, 2009). Portanto, os valores de identidade genética aqui encontrados, são relativamente baixos em relação aos resultados obtidos em outros estudos.

Em relação à diversidade genética de Nei (H_e) observou-se que o menor valor foi encontrado na população de Santa Rita do Sapucaí (0,26) e o maior valor na população Carrancas (0,38). Analisando as 10 populações estudadas a média de diversidade genética foi de 0,30. Os níveis de diversidade genética encontrados neste estudo são semelhantes aos valores apresentados em estudos com a mesma ou diferentes espécies, utilizando do mesmo marcador molecular. Fernandes (2008) estudando *Caryocar brasiliense* por meio de marcadores ISSR obteve índice de diversidade genética de 0,35. Brandão (2008) estudando a espécie *Myrcia splendens* com marcadores ISSR em sistema de corredor e fragmento encontrou valores de diversidade genética iguais a 0,33 e 0,37 respectivamente. Estudando *E. erythropappus* por meio de marcadores RAPD e Isoenzimas, Moura (2005) encontrou valores de H_e que variaram de 0,31 a 0,33. Estopa et al. 2006 utilizando a mesma espécie e marcador (ISSR) encontrou valores de H_e com variação 0,31 a 0,33. Utilizando isoenzimas Barreira et al. (2005), estudou a espécie *E. erythropappus* nas progênies após manejo e encontrou valores de H_e de 0,48 e Arriel (2009) estudando *E. erythropappus* utilizando marcadores ISSR chegou ao valor de 0,36.

4.4 Estrutura genética

Na tabela 6 encontram-se os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para as 10 populações de *E. erythropappus*. Os resultados da AMOVA mostram que a maior diversidade genética encontra-se dentro das populações de *E. erythropappus* (62,20%, $P < 0,001$) (Tabela 6). Loveless & Hanrick (1987) mostraram em seus estudos que as espécies arbóreas tropicais tendem a apresentar níveis altos de variabilidade genética dentro das populações e baixa divergência entre populações. Vários trabalhos confirmam essa hipótese. Zucchi (2002) estudando *Eugenia dysenterica* encontrou variação de 72,97% de

variabilidade dentro das populações. Moura (2005), para a espécie *E. erythropappus* encontrou valor de 96,5% de variabilidade genética dentro das populações. Freita, Lemos e Lovato (2008), estudando oito populações (estágio sucessional diferentes) de *E. erythropappus* por meio de marcador RAPD chegou ao resultado de 85,7% de variabilidade dentro das populações. Brandão (2008) encontrou 96,49% de variabilidade dentro de populações de *Myrcia splendens*. Fernandes (2008), em estudo realizado com a espécie *Caryocar brasiliense* encontrou 86,97% de variabilidade genética dentro das populações estudadas.

Quando se compara os resultados do presente estudo é possível observar uma diferença na magnitude da divergência genética, não se pode, portanto considerá-los coerentes, já que é evidenciado que a diversidade genética dentro das populações é relativamente baixa (62,20%). Neste estudo observa-se que há uma alta diversidade genética entre as populações (30,80%) quando se compara aos trabalhos citados. Segundo Loveless & Hamrick, (1984) se o fluxo alélico for restrito as populações apresentam uma alta divergência entre si. Os resultados observados aqui, são devido ao isolamento pela distância geográfica entre as populações (260 Km em média), o que leva à diminuição do fluxo alélico entre as mesmas. Pode também haver impedimentos como barreiras naturais ou antrópicas que dificultam o fluxo alélico entre as populações estudadas levando a esse resultado.

Tabela 6 Análise de variância molecular (AMOVA) em 10 populações de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish. GL: graus de liberdade; SQ: soma do quadrado dos desvios

Fonte de Variação	GL	SQ	Componentes de variância	Varição(%)	P
Entre populações	9	448,195	2,24	30,80	< 0,0001
Dentro de populações	190	955,50	5,03	62,20	< 0,0001
Total	199	1403,70	7,27	100	

O valor do fluxo alélico (Nm) encontrado para o conjunto das dez populações de *E. erythropappus* foi de 1,4. Esse valor de fluxo alélico não é suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética, já que, segundo Slatkin (1987) e Wrigth (1951) e, fluxo alélico maior que quatro migrantes por geração é o suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética.

Contudo analisando os pares de populações em relação ao fluxo alélico (Tabela 7) é possível perceber a relação entre fluxo alélico e distância geográfica. Sendo assim os pares de populações que apresentaram maior valor de fluxo alélico foram L-ST, L-C, ST-C, ST-I, C-I e I-B. Essas populações estão distantes em média 21 km uma da outra. Não era esperado a ocorrência de fluxo alélico intenso entre populações com maiores distâncias geográficas como foi o caso dos pares I-DM, B-SR, que se encontram a uma distância média de 132,45 Km uma da outra. Devemos considerar que o valor de Nm calculado a partir da divergência genética reflete o fluxo alélico que ocorreu durante um longo período. Não indica que não está havendo troca alélica em determinado evento reprodutivo, mas calcula os níveis de fluxo alélico que devem ter ocorrido no passado para produzir os padrões observados de estrutura genética.

Tabela 7 Fluxo alélico entre pares de populações de *E. erythropappus* (baixo da diagonal), distâncias geográficas entre pares de população (acima da diagonal). DM = Delfim Moreira, SR = Santa Rita do Sapucaí, B = Baependi, ST = São Tomé das Letras, L= Luminárias, C=Carrancas, I= Ingaí, MP = Morro do Pilar, D = Diamantina, FS=Francisco Sá

	DM	SR	B	ST	L	C	I	MP	D	FS
DM	**	35,35	136,66	140,76	150,70	166,70	155,67	431,52	523,58	715,57
SR	2,6	**	109,23	109,76	126,11	136,19	123,41	398,33	489,03	680,59
B	3,3	4,7	**	22,46	20,74	35,36	37,81	301,46	400,59	599,43
ST	2,3	1,8	1,9	**	16,35	26,51	17,75	291,79	387,90	584,99
L	1,7	1,5	1,8	5,4	**	10,46	12,02	276,00	373,04	570,93
C	3,3	2,9	3,5	5,3	4,9	**	19,65	267,29	365,43	564,07

“Tabela 7, conclusão”

I	4,5	3,0	4,2	4,6	3,7	8,1	**	275,99	370,94	567,55
MP	1,9	2,2	2,6	2,0	2,4	3,2	2,8	**	111,18	314,03
D	2,2	1,8	1,9	2,2	1,9	2,7	2,9	2,2	**	203,54
FS	1,7	1,7	1,8	1,7	1,7	2,6	2,3	2,7	2,5	**

Pelas estimativas de identidade e de distância genética de Nei (1978) para as 10 populações de *E. erythropappus*, são mostradas na Tabela 8.

Tabela 8 Estimativas de identidade(acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei(1978), entre as populações de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish DM = Delfim Moreira, SR=Santa Rita do Sapucaí, B = Baependi, ST= São Tomé das Letras, L= Luminárias, C= Carrancas, I= Ingaí, MP = Morro do Pilar,D = Diamantina, FS=Francisco Sá

	DM	SR	B	ST	L	C	I	MP	D	FS
DM	****	0,87	0,89	0,16	0,23	0,14	0,09	0,78	0,84	0,78
SR	0,14	****	0,07	0,21	0,28	0,16	0,14	0,81	0,8	0,79
B	0,12	0,93	****	0,22	0,24	0,14	0,1	0,83	0,79	0,79
ST	0,85	0,81	0,8	****	0,06	0,93	0,92	0,78	0,83	0,78
L	0,8	0,76	0,79	0,94	****	0,92	0,89	0,82	0,8	0,78
C	0,87	0,85	0,87	0,08	0,09	****	0,95	0,83	0,83	0,82
I	0,92	0,87	0,9	0,09	0,11	0,06	****	0,82	0,86	0,81
MP	0,25	0,22	0,19	0,24	0,19	0,19	0,2	****	0,23	0,18
D	0,18	0,23	0,24	0,18	0,22	0,19	0,16	0,8	****	0,85
FS	0,24	0,24	0,24	0,25	0,25	0,2	0,21	0,84	0,16	****

A distância genética média entre as populações foi de 0,18. A menor distância genética (0,06) foi encontrada entre as populações de Carrancas (C) e Ingaí (I) e Luminárias (L) e São Tomé das Letras (ST), enquanto as populações Luminárias (L) e Santa Rita do Sapucaí (SR) apresentaram maior valor de distância genética (0,28). É importante lembrar que menores distâncias genéticas estão associadas a genótipos semelhantes e as maiores distâncias a genótipos

mais divergentes. O valor médio da distância genética (0,18) indica divergência genética intermediária entre as populações estudadas. Esse fato pode decorrer da distância geográfica entre as mesmas, pelo sistema de dispersão e polinização da espécie. Pode ter relação com o fluxo alélico entre as populações (1,4) valor baixo e que não contrapõe os efeitos da deriva genética para o conjunto de populações. Para a redução da divergência genética seria necessário um fluxo alélico maior que quatro migrantes contrapondo assim os efeitos da deriva genética.

A partir da matriz de identidade genética de Nei (1978) entre as populações amostradas construiu-se um dendrograma pelo método UPGMA das populações de *E. erythropappus*. (Figura 8). Analisando o dendrograma observa-se a formação de três grupos principais apresentando consistência máxima do nó (100%), os grupos são formados por quatro (L, ST,C e I), três (DM,B e SR) e três (D,FS e MP) populações.

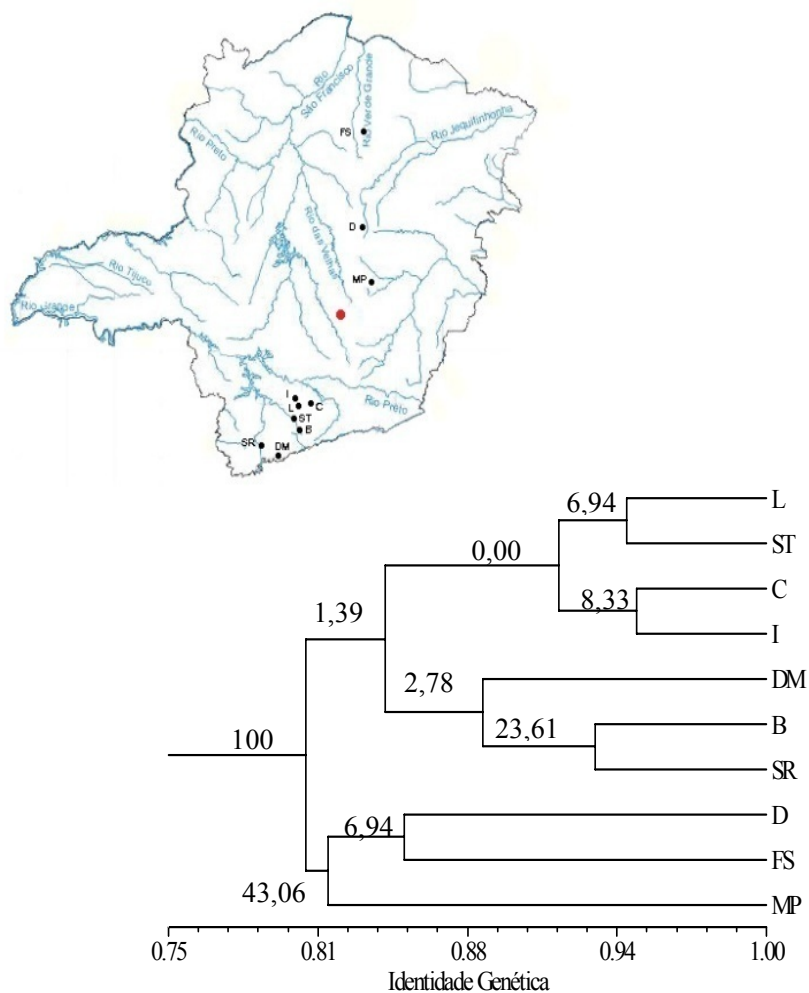


Figura 8 Dendrograma UPGMA das populações de *Eremanthus erythropappu* (DC.) Macleish calculado de acordo com a identidade genética de Nei(1978).Os números acima dos nós indicam a consistência dos mesmos, após 1.000 permutações. DM = Delfim Moreira, SR=Santa Rita do Sapucaí, B = Baependi, ST= São Tomé das Letras, L= Luminárias, C= Carrancas, I= Ingaí, MP = Morro do Pilar,D = Diamantina, FS=Francisco Sá

A divisão em três grupos pode ser associada à localização geográfica das populações estudadas, conforme é possível observar no mapa (Figura 4) em que elas se dividem em três grupos no espaço geográfico do estado de Minas Gerais.

Mediante o resultado do Teste de Mantel, após 1000 permutações, revelou-se haver correlação positiva e significativa entre as distância genética e geográfica, ($r = 0,632$; $P = 0,001$) entre as 10 populações de *E. erythropappus*.

Esse resultado indica que ocorre o isolamento pela distância entre as populações estudadas, as quais estão correlacionadas com a distância genética.

A estatística bayesiana foi utilizada para se estimar os parâmetros de variabilidade genética, dos modelos obtidos pela análise (Tabela 9). O modelo *full model* apresentou menor valor de DIC (2827,85), no qual Θ^B assume valor de 0,24, sugerindo presença de alta divergência genética entre as populações estudadas. Observa-se que o valor de f é alto em todos os modelos testados. Segundo Holsinger & Lewis (2003), esse fato é devido a artefatos gerados pelo pequeno número de populações amostradas.

Tabela 9 Resultado da análise bayesiana de divergência entre dez populações de *Eremanthus erythropappus*, modelos testados, as estimativas Θ^B , f e DIC (*Deviant Information Criterion*)

Modelo	Θ^B	F	DIC
full	0,24	0,32	2827,85
$f=0$	0,20	0,00	2868,14
$\Theta^b =0$	0,00	0,39	5575,13
$f(\text{livre})$	0,27	0,50	3065,77

Os resultados foram confirmados com a análise dos modelos, estimando-se os parâmetros de f e Θ^B (Tabela 10). Na estimativa de f , pelo *full model* o valor de I_e é o maior e a distância (H-d) é a menor no modelo *full* para estimativa f . O parâmetro Θ^B mostrou-se mais estável, sendo que o maior valor

de I_e foi apresentado pelo modelo $f = 0$, entretanto supõe-se que na natureza f seja diferente de zero, sendo escolhido o modelo *full model*, ressaltando que o valor de f possa estar sendo superestimado.

Tabela 10 Resultados da análise bayesiana de divergência entre dez populações de *Eremanthus erythropappus*, incluindo as estimativas de f , Θ^B , a medida de informação I_e e as distância H-d entre a distribuição a posteriori e uma distribuição B, para os modelos testados

Modelo	Full		$f=0$		$\Theta^B=0$		f livre	
	I_e	H-d	I_e	H-d	I_e	H-d	I_e	H-d
f	0,4710	0,0031	-	-	0,7308	0,0011	0,0002	0,0015
Θ^B	2,3673	0,0005	2,5552	0,0010	-	-	2,3860	0,0024

A distância genética média (Tabela 11) entre os pares de populações avaliadas pelo parâmetro Θ^B foi de 0,25. A menor distância genética foi encontrada entre as populações de Carrancas e Ingaí (0,06), enquanto as populações Luminárias e Santa Rita do Sapucaí apresentaram maior valor de distância genética (0,37). Esses valores corroboram com os encontrados na estimativa genética de Nei (1978) (Tabela 8).

Tabela 11 Distâncias genéticas entre pares de populações (Θ^B) de *Eremanthus erythropappus* (abaixo da diagonal) e distância geográfica (acima da diagonal). DM = Delfim Moreira, SR=Santa Rita do Sapucaí, B = Baependi, ST= São Tomé das Letras, L= Luminárias, C= Carrancas, I= Ingaí, MP = Morro do Pilar, D = Diamantina, FS=Francisco Sá

	DM	SR	B	ST	L	C	I	MP	D	FS
DM	**	35,35	136,66	140,76	150,70	166,70	155,67	431,52	523,58	715,57
SR	0,26	**	109,23	109,76	126,11	136,19	123,41	398,33	489,03	680,59
B	0,21	0,12	**	22,46	20,74	35,36	37,81	301,46	400,59	599,43
ST	0,28	0,34	0,33	**	16,35	26,51	17,75	291,79	387,90	584,99
L	0,33	0,37	0,33	0,07	**	10,46	12,02	276,00	373,04	570,93

“Tabela 11, conclusão”

C	0,18	0,25	0,24	0,1	0,14	**	19,65	267,29	365,43	564,07
I	0,12	0,24	0,19	0,14	0,18	0,06	**	275,99	370,94	567,55
MP	0,3	0,3	0,27	0,29	0,26	0,22	0,24	**	111,18	314,03
D	0,27	0,33	0,31	0,28	0,31	0,22	0,22	0,27	**	203,54
FS	0,31	0,32	0,31	0,31	0,32	0,23	0,26	0,21	0,24	**

A análise de agrupamento bayesiana das populações estudadas obtida com o parâmetro *admixture*, utilizando o Programa STRUCTURE 2.2 (PRITCHARD; WEN, 2002) mostrou que as 10 populações são distintas, com $K=10$ (Gráfico 2). Após doze corridas realizadas de maneira independente detectou-se $K=10$ o qual é o mais confiável pois o valor respectivo de $\text{LnP}(D)$ è o menor número negativo como pode ser observado na Tabela 12.

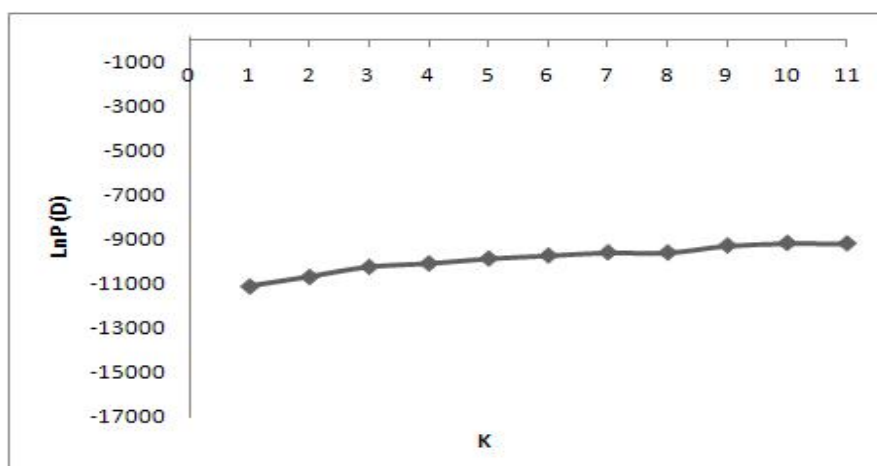


Gráfico 2 Número provável de populações distintas de *Eremanthus erythropappus*, de acordo com a metodologia de Falush et al. (2003). $\text{LnP}(D)$ = probabilidade log de dados mostrando dez populações como o número de populações distintas

A separação em dez populações distintas pode ser explicada pela distância geográfica das mesmas e pela presença de várias cadeias de montanhas

separando as populações o que relaciona com a baixa taxa de fluxo gênico (1,4) entre o conjunto de populações. Analisando o Gráfico 2 é possível observar de forma nítida a presença de dez grupos distintos.

Tabela 12 Número de populações (K) , valores de Log-likelihood, log (LnP(D))

K	LnP(D)
1	-11141
2	-10712
3	-10259
4	-10108
5	-9888,4
6	-9752,3
7	-9613,3
8	-9620,3
9	-9304,3
10	-9191
11	-9210,4

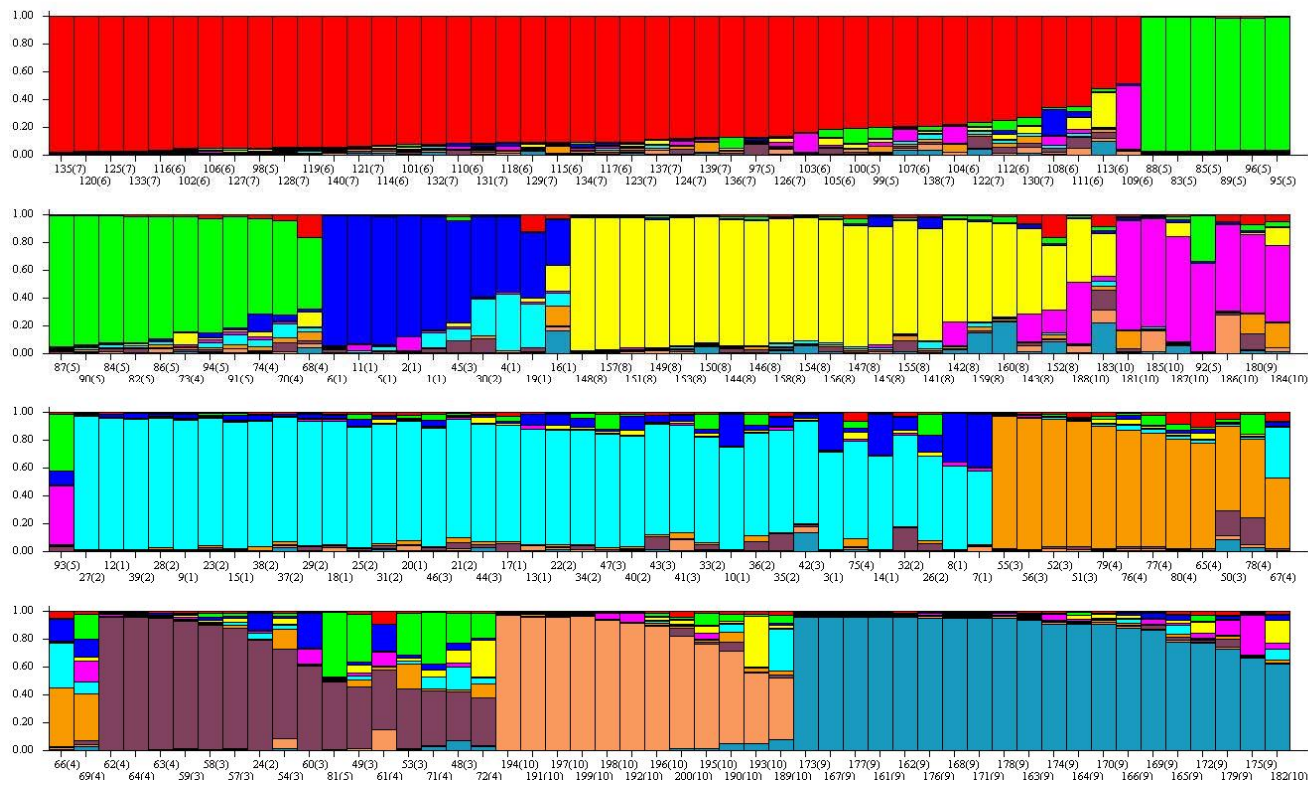


Figura 9 Distribuição dos 200 indivíduos de *Eremanthus erythropappus* de acordo com análise do Structure (K=10)

4.5 Definição de unidades operacionais para a conservação da variabilidade genética

Populações locais distantes entre si a uma distância geográfica maior do que o intercepto do correlograma ($X = 220$ km) podem ser consideradas como Unidades Operacionais, ou seja, unidades genéticas que seriam independentes para a conservação da variabilidade genética (DINIZ-FILHO; TELLES, 2002). Populações situadas a distâncias menores que 220 km seriam semelhantes em relação à variabilidade genética.

No gráfico 3 é possível observar no correlograma a relação entre o coeficiente de correlação matricial com o aumento das distâncias geográficas, indicando que a área “patch” é em torno de 220 km onde o intercepto corta o eixo X. Assim populações situadas abaixo de 220 km tendem a possuir similaridade genética. Coletas de material com o objetivo de conservação, reserva ou amostragem coleção para coleção de germoplasma não poderiam ser próximas a essa distância (220 km). Seria necessário amostrar ou conservar populações ou locais mais distantes de 220 km, permitindo assim capturar a maior parte da variabilidade genética da espécie com menores esforços.

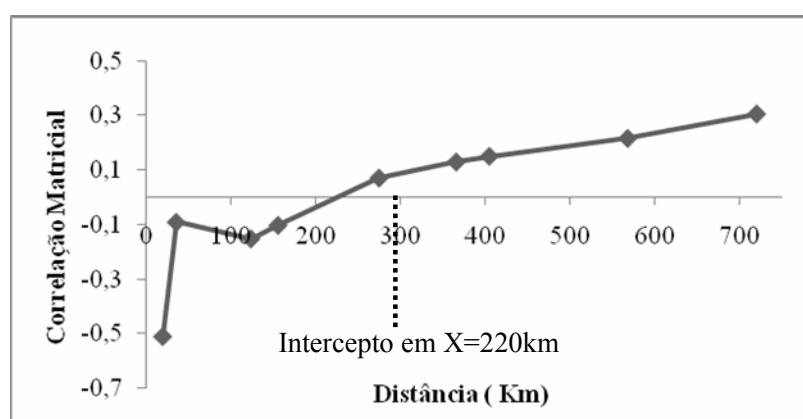


Gráfico 3 Correlograma de Mantel construído com base nas distâncias genética e geográfica em populações de *E. erythropappus*

Analisando o conjunto de populações estudadas e as distâncias geográficas entre elas, indica-se três unidades operacionais que seriam distintas e possuem distância superior a 220 km (Figura 10). Uma formada pelas populações de Luminárias, São Tomé das Letras (ST), Ingai (I), Carrancas(C) e Baependi(B), a segunda seria a população de Morro do Pilar(MP) e a terceira localizada em Francisco Sá (FS).

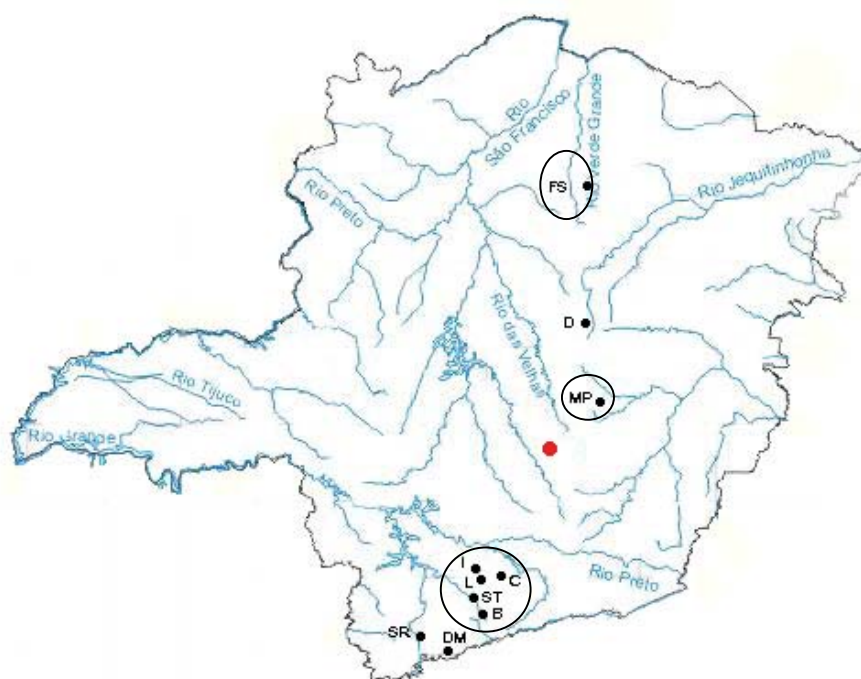


Figura 10 Possibilidade de definição de Unidades Operacionais intraespecíficas de *Eremanthus erythropappus* definida com base em correlograma multivariado

Baseado no procedimento utilizado por Manel et al. (2003) foi acessada a descontinuidade dos dados genéticos no espaço geográfico. As dez populações

foram localizadas em um mapa de acordo com suas coordenadas geográficas e o método de triangulação Delaunay foi utilizado para conectá-las (Figura 12).

É possível observar na Figura 14 a existência de seis pontos de limite genético entre as dez populações estudadas (representadas em verde). O primeiro limite “a” ocorre entre as populações de Delfim Moreira e Santa Rita do Sapucaí, e pode ser explicado pelo fato de Delfim Moreira estar localizada a uma distância significativa de Santa Rita do Sapucaí (35,4 km) e existir entre as duas cidades, vales e montanhas.

O segundo limite “b” ocorre separando a população de Baependi das populações de Luminárias, São Tomé das Letras, Carrancas e Ingaí, e supõe-se que isso ocorra pela presença da serra de São Tomé.

Limite “c” separa as populações de Carrancas e Ingaí das populações de Luminárias, São Tomé das Letras e Baependi. Nesse caso a ocorrência da Serra da Fortaleza e Serra de Luminárias provavelmente seja a barreira física entre essas populações.

Limite “d” separa as populações de Luminárias, São Tomé das Letras, Carrancas, Ingaí, Delfim Moreira, Baependi e Santa Rita do Sapucaí de Morro do Pilar, Diamantina e Francisco Sá, esse limite possivelmente ocorra pela presença da Serra do Espinheiro.

Limite “e” separa a população de Morro do Pilar de Diamantina os possíveis limites nesse caso seriam a Serra do Ouro e a Serra do Gavião.

Por fim o limite “f” que separa as populações de Diamantina e Francisco Sá, ocorra pela presença de pequenas cadeias montanhosas como por exemplo Serra das Almas, Serra dos Poções entre outras. Essas barreiras geográficas podem estar interferindo no fluxo de pólen da espécie em questão, que são realizados por inseto, bem como processo de dispersão realizado pelo vento.

Foi feito o mapeamento dos maiores valores da relação entre as distâncias genética e geográfica, destes 30% dos maiores valores indicam haver

descontinuidade genética entre alguns pares de populações: ST-I ,DM-SR, C-B, I-B, L-ST, ST-C, C-I, ST-SR, L-SR, D-MP, L-DM, ST-DM, I-SR. Para Telles et al. (2002) essa descontinuidade pode levar a uma subestimativa da magnitude da redundância na variabilidade genética medida pelo teste de Mantel. Assim para Diniz Filho e Telles (2002) propõem a necessidade de modificação no procedimento de delimitação de Unidades Operacionais, corrigindo assim essas descontinuidades espaciais.

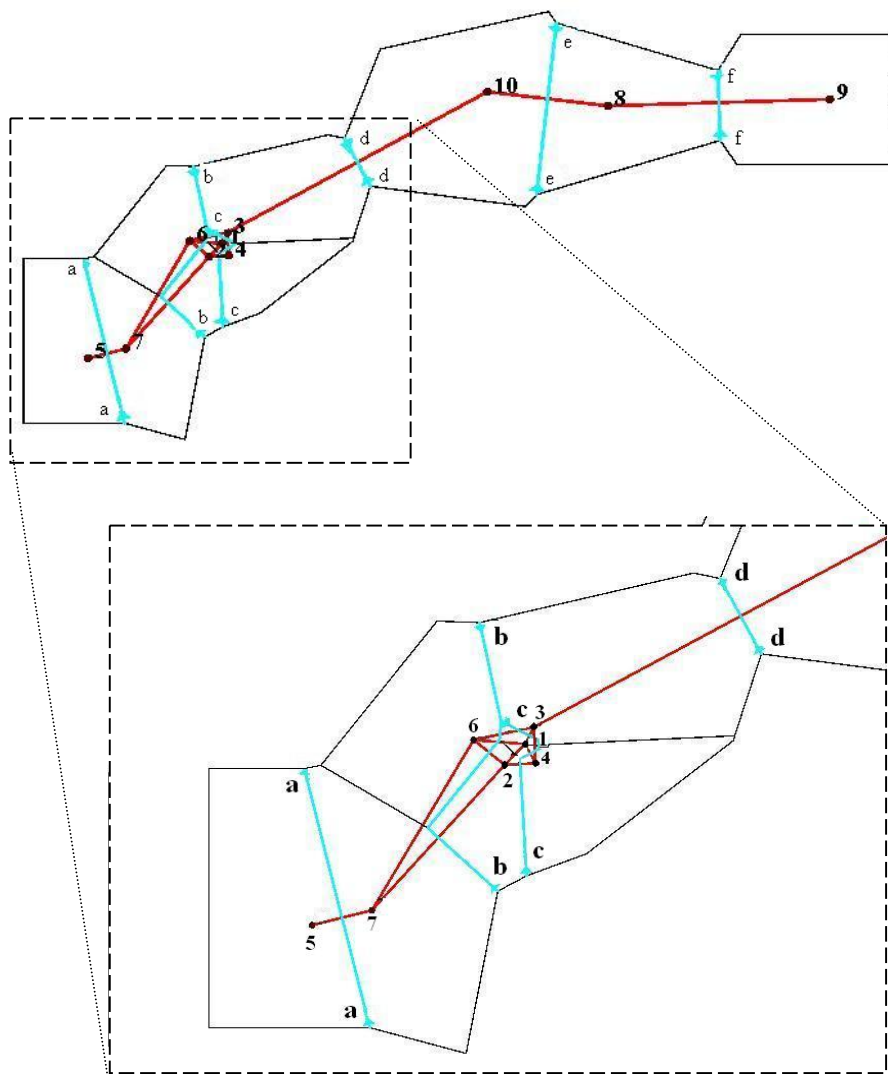


Figura 11 Triangulação de Delaunay com limites genéticos (em azul). No mapa posição das populações no estado de Minas Gerais. 1= Luminárias, 2 = São Tomé das Letras, 3 = Carrancas, 4 = Ingaí, 5 = Delfim Moreira, 6 = Baependi, 7 = Santa Rita do Sapucaí, 8 = Diamantina, 9 = Francisco Sá, 10 = Morro do Pilar

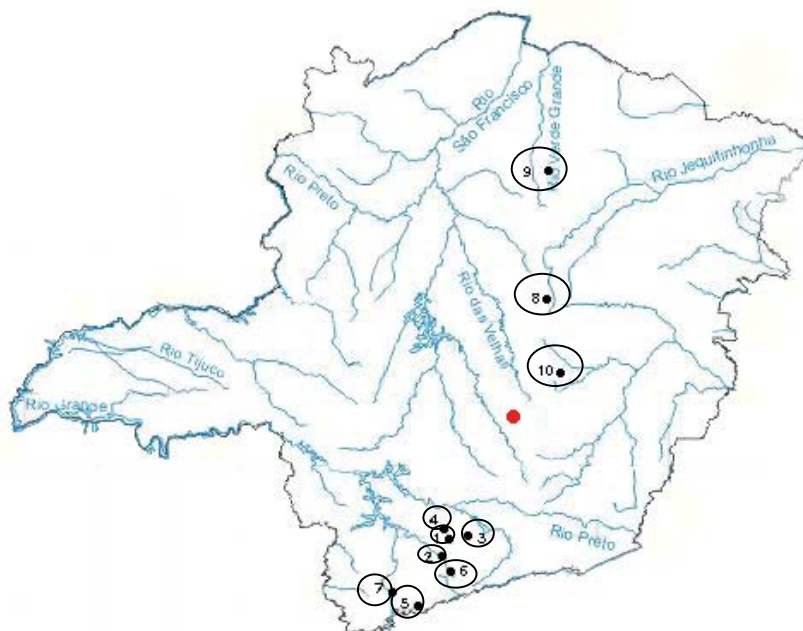


Figura 12 Possibilidade para a definição de Unidades Operacionais para *E. erythropappus* definidas com base em correlograma multivariado levando em conta a presença de limite genético e descontinuidade genética. 1= Luminárias, 2 = São Tomé das Letras, 3 = Carrancas, 4 = Ingaí, 5 = Delfim Moreira, 6 = Baependi, 7 = Santa Rita do Sapucaí, 8 = Diamantina, 9 = Francisco Sá, 10 = Morro do Pilar

Associando os dados de limite genético e geográfico com os de descontinuidade espacial foi formulado um novo mapa, totalizando dez unidades operacionais (Figura 12). Assim cada uma das populações estudadas deve ser considerada uma unidade operacional. Porém torna-se economicamente inviável a criação de dez unidades operacionais. Sugere-se, portanto a criação de cinco unidades operacionais (Figura 13): primeira unidade formada pelas populações de Delfim Moreira e Santa Rita do Sapucaí, segunda formada pelas populações de Baependi, São Tomé das Letras, Luminárias, Carrancas e Ingaí, terceira

unidade constituída pela população de Morro do Pilar, quarta formada pela população de Diamantina e por fim a quinta unidade constituída pela população de Francisco Sá. No entanto é importante que se faça coletas de sementes em todas as populações amostradas permitindo assim a conservação da maior parte da variabilidade genética da espécie.

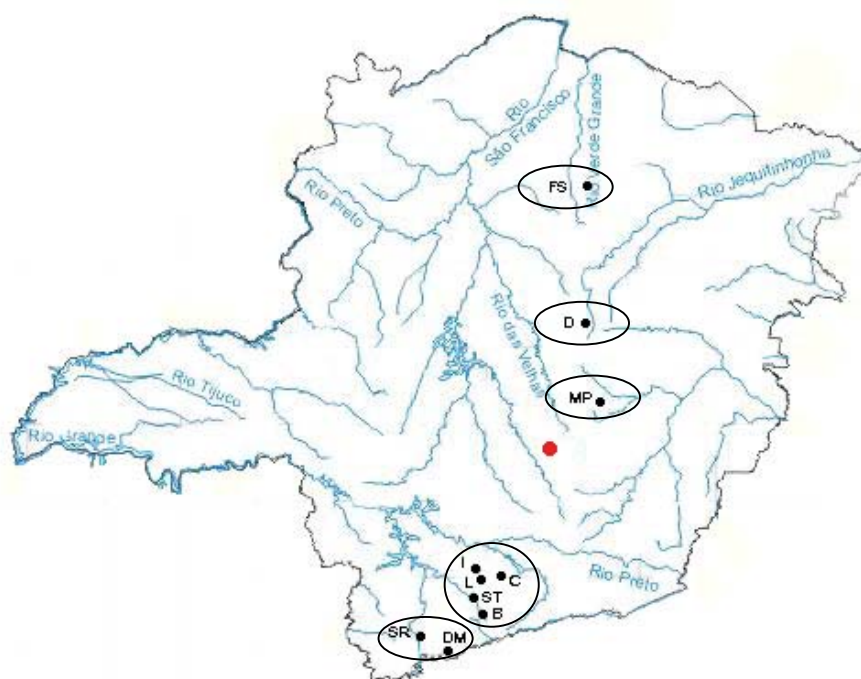


Figura 13 Definição final de Unidades Operacionais de *Eremanthus erythropappus*

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pesquisas em genética de populações são importantes para escolha de estratégias de conservação de espécies florestais. Os processos de fragmentação, exploração desordenada de espécies florestais, presença de barreiras naturais levam a perda da diversidade genética das mesmas por meio do impedimento do fluxo alélico.

Tendo em vista o conjunto de informações geradas ao fim deste estudo é importante e urgente disponibilizá-los e agregá-los a programas de manejo e conservação de *E. erythropappus*. Para estratégias de preservação, é preciso somar os dados resultantes das análises de estruturação espacial dos genótipos, descontinuidade genética e unidades operacionais. Respeitando as distâncias será possível capturar a maior parte da variabilidade genética de *E. erythropappu*, com menos gastos e esforços.

6 CONCLUSÕES

- a) As populações de *Eremanthus erythropappus* estudadas possuem índices relativamente baixos de diversidade genética dentro das populações (62,20%), bem como índices relativamente altos (30,80%) entre populações. Esse resultado é diferente do esperado para espécies arbóreas tropicais que tendem a apresentar altos níveis de diversidade genética dentro das populações e baixa divergência entre populações;
- b) Foi evidenciado um baixo nível de fluxo alélico (1,4), este não sendo suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética nas populações;
- c) Analisando o dendrograma UPGMA pode-se observar a existência de correlação positiva e significativa entre distância genética e distância geográfica, ($r = 0,632$; $P = 0,001$) entre as 10 populações de *Eremanthus erythropappus*, confirmando a hipótese de isolamento por distância;
- d) As populações se dividiram em três grupos podendo essa divisão estar associada à localização geográfica das populações estudadas;
- e) A análise estrutural das populações estudadas obtida com o parâmetro *admixture*, por meio do Programa STRUCTURE 2.2 (PRITCHARD et al., 2002) mostrou que as 10 populações são distintas;
- f) A relação entre o coeficiente de correlação matricial com o aumento das distâncias geográfica indica que a área “patch” é em torno de 220 km;
- g) Levando em consideração limite genético e descontinuidade genética todas as populações estudadas (dez) podem ser consideradas Unidades Operacionais;
- h) Não sendo viável economicamente a criação de dez unidades operacionais para priorizar a conservação da espécie, definiu-se cinco unidades sendo elas: primeira unidade formada pelas populações de

Delfim Moreira e Santa Rita do Sapucaí, segunda formada pelas populações de Baependi, São Tomé das Letras, Luminárias, Carrancas e Ingaí, terceira unidade constituída pela população de Morro do Pilar, quarta formada pela população de Diamantina e por fim a quinta unidade constituída pela população de Francisco Sá.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J. A.; LISTON, A.; POPOVICH, S. J. Genetic diversity of the narrow endemic astragalus oniciformis (Fabaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 91, n. 12, p. 2004-2012, Dec. 2004.

ALLENDORF, F.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. New York: Blackwell, 2007. 642 p.

ALVAREZ-BUYLLA, E. R.; GARAY, A. A. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer species. **Evolution**, Washington, v. 48, n. 2, p. 437-453, Apr. 1994.

ANDRADE, I. S. **Avaliação técnica e econômica de sistemas de manejo de cadeias nativas**. 2009. 121 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ARRIEL, D. A. A. **Diversidade genética e distribuição genética espacial de três espécies de *Eremanthus erythropappus* no parque ecológico Quedas do Rio Bonito, Lavras, Minas Gerais**. 2009. 47 p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

BARBOSA, T. C. S. et al. Genetic characterization of natural population of the medicinal plant *Palicourea coriacea* (Rubiaceae) with molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 2, p. 696-704, Apr. 2010.

BARREIRA, S. **Diversidade genética em população natural de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish como base para o manejo florestal**. 2005. 73 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

BATISTINI, A. P. et al. Genetic diversity of natural population of *Anemopaegma arvense* (Bignoniaceae) in the Cerrado of São Paulo State, Brasil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 52-63, Jan. 2009.

BLACK-SAMUELSSON, S. et al. RAPD and morphological analysis of the rare plant species *Vicia pisiformis* (Fabaceae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 61, n. 3, p. 325-343, July 1997.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, n. 3, p. 314-331, June 1980.

BOTTINO, M. C. **Análise da diversidade genética de populações de *Calophyllum brasilienses* Camb (Clusiaceae) utilizando marcadores AFLP.** 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no sul de Minas Gerais.** 2008. 88 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BROWN, A. H. D. Isozymes, plant populations genetics structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 52, n. 4, p. 145-157, 1978.

CÂNDIDO, J. F. **Cultura da candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Sch. Bip).** Viçosa, MG: UFV, 1991. 7 p. (Boletim de Extensão, 3).
CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Ecofisiologia da candeia.** Belo Horizonte, 1994. 104 p.

CHAVES, M. M. F. **Descrição morfológica de sementes, de plântulas e de mudas de 10 espécies arbóreas pioneiras na microrregião de Viçosa, MG.** 1994. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1994.

CHAVES, M. M. F.; RAMALHO, R. da S. Estudos morfológicos em sementes, plântulas e mudas de duas espécies arbóreas pioneiras da família Asteraceae (*Vanillosmopsis erythropappa* Sch. Bip e *Vernonia discolor* (Spreng.) Less). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 20, n. 1, p. 1-7, jan./mar. 1996.

COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, Washington, v. 23, n. 1, p. 72-84, Feb. 1969.

COMES, H. P.; KADEREIT, J. W. The effect of quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. **Science**, New York, v. 3, n. 11, p. 432-438, 1998.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil.** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931. v. 1, 433 p.

CRUZ, C. D. **Programa GENES versão Windows.** Viçosa, MG: UFV, 2001. 642 p.

DINIZ FILHO, J. A. F.; TELLES, M. P. C. Spatial autocorrelation and the identification of operational units for conservation in continuous populations. **Conservation Biology**, Boston, v. 16, n. 4, p. 924-935, Aug. 2002.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, Feb. 1990.

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 19, p. 23-29, 1996. Supplement.

ESSELMAN, E. J. et al. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *Inesperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, Edinburgh, v. 8, n. 3, p. 443-451, Mar. 1999.

ESTOPA, R. A. et al. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 70, p. 97-106, set. 2006.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **Arlequin**: a software for population data analysis. Version 3.1. Geneva: University of Geneva, 2007. Disponível em: <<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>>. Acesso em: 10 jan. 2007.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 131, n. 2, p. 479-491, June 1992.

FANG, D. Q.; ROOSE, M. L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, n. 3, p. 408-417, Aug. 1997.

FERNANDES, R. C. **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) no Norte de Minas Gerais**. 2008. 73 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

FREITAS, V. L. O.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Contrasting genetic diversity and differentiations of populations of two successional stages in a Neotropical pioneer tree (*Eremanthus erythropappus*, Asteraceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 2, p. 388-398, Apr. 2008.

GAJERA, B. B. et al. Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers. **Industrial Crops and Products**, London, v. 32, n. 3, p. 491-498, Nov. 2010.

GE, X. J.; SUN, M. Population genetic structure of *Ceriops tagal* (Rhizophoraceae) in Thailand and China. **Wetlands Ecology and Management**, Dordrecht, v. 9, n. 3, p. 203-209, June 2001.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M. et al. **Genetics and conservation**. Menlo Park: B. Cummings, 1983. p. 335-348.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L. E. (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, 1989. p. 43-63.

_____. Conservation genetics of endemic plant species. In: AVISE, J. C.; HAMRICK, J. L. (Ed.). **Conservation genetics: case histories from nature**. New York: Chapman & Hall, 1996. p. 281-304.

HARRIS, S. A. RAPDs in systematics: a useful methodology? In: HOLLINGSWORTH, P. M. et al. (Ed.). **Molecular systematics and plant evolution**. London: Taylor and Francis, 1999. p. 211-228.

HOLSINGER, K. E.; LEWIS, P. O. **Hickory**: a package for analysis of population genetic data. Version 1.0. Storrs: The University of Connecticut, 2003. Software.

HU, Y. et al. Genetic diversity of wild populations of *Rheum tanguticum* endemic to China as revealed by ISSR analysis. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 38, n. 12, p. 264-274, Dec. 2010.

HUFF, D. R.; PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchoë dactuloides* (Nutt.) Elgen). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 86, n. 7, p. 927-934, Aug. 1993.

INSTITUTO MINEIRO DE GESTÃO DAS ÁGUAS. **Dados pluviométricos do Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2009. 25 p.

JEONG, J. H. et al. Genetic diversity and structure of the endangered species *Megaleranthis saniculifolia* in Korea as revealed by allozyme and ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 290, n. 2, p. 67-76, Dec. 2010.

KAGEYAMA, P. Y. Uso e conservação de florestas tropicais: qual paradigma? In: SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS BRASILEIROS: CONSERVAÇÃO, 5., 2000, Vitória. **Anais...** São Paulo: ACIESP, 2000. p. 72-82.

KAGEYAMA, P. Y. et al. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 64, p. 93-107, set. 2003.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Circular Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 12, n. 32, p. 65-70, dez. 1998.

KELLER, L. F.; WALLER, D. M. Inbreeding effects in wild population. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 17, n. 5, p. 230-241, May 2002.

KIDD, D. M.; RITCHIE, M. G. Phylogeographic information systems: putting the geography intophylogeography. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1851-1865, Nov. 2006.

LANE, M. A. Pollination biology of compositae. In: INTERNATIONAL COMPOSITAE CONFERENCE, 2., 1996, Kew. **Proceedings...** Kew: Royal Botanic Gardens, 1996. p. 61-80.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical ecology**. Amsterdam: Elsevier, 1998. 853 p.

LI, S. et al. Genetic diversity and differentiation of cultivated ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) population in North-east China revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) marker. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 57, n. 7, p. 1013-1022, Oct. 2010.

LIU, B.; WENDEL, J. F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 205-208, Sept. 2001.

LOEUILLE, B. *Eremanthus in lista de espécies da flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB005312>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Distribucion de la variacion em espécies de arboles tropicales. **Revista Biología Tropicales**, Bogotá, v. 35, n. 1, p. 165-175, 1987.

_____. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 65-95, Nov. 1984.

MACLEISH, N. F. F. Revision of *Eremanthus* (Compositae:Vernonieae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 47, n. 2, p. 265-290, 1987.

MANEL, S. et al. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecological Evolution**, Amsterdam, v. 18, n. 4, p. 189-197, Apr. 2003.

MANNI, F.; GUÉRARD, E.; HEYER, E. **Barrier**: a software to compute geographic barriers from a distance matrix version 2.2. Disponível em: <<http://www.mnhn.fr/mnhn/ecoanthropologie/software/barrier.html>>. Acesso em: 15 jun. 2010.

MILLER, M. P. **Tools for population genetic analysis**. Version 1.3. Flagstaff: Northern Arizona University, 1997. Software.

MORITZ, C. Defining evolutionarily significant units for conservation. **Trends in Ecological Evolution**, Amsterdam, v. 9, n. 10, p. 373-375, Dec. 1994.

MOURA, M. C. O. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish por isoenzimas e RAPD**. 2005. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Madison, v. 89, n. 3, p. 586-590, 1978.
_____. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University, 1987. 512 p.

PEARSE, D. E.; CRANDALL, K. A. Beyond F-ST: analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetics**, Berlin, v. 5, n. 5, p. 585-602, 2004.

PEDRALLI, G. Estrutura diamétrica, vertical e análise do crescimento da 'candeia' (*Vanillosmopsis erythropappa* Sch. Bip) na estação ecológica do Tripuí, Ouro Preto, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 21, n. 2, p. 301-306, abr./jun. 1997.

PRITCHARD, J. K.; WEN, W. **Structure software version 2.3**. Disponível em: <<http://pritch.bsb.uchicago.edu>>. Acesso em: 23 jun. 2010.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.11**. New York: Applied Biostatistic, 2000. 142 p.

RYDER, O. A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 9-10, July 1986.

SHAO, J. et al. Genetic diversity within and among populations of the endangered and endemic species *Primula merrilliana* in China. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 37, n. 12, p. 699-706, Dec. 2009.

SILVA, A. C. da. **Variações genéticas em candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish**: simbiose e desenvolvimento radicular e estabelecimento inicial em áreas degradadas. 2003. 133 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SILVA, E. F. **Caracterização edáfica e fitossociologia em áreas de ocorrência natural de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Sch. Bip)**. 2001. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

SLATKIN, M. The average number of sites separating DNA sequences drawn from a subdivided population. **Theoretical Populations Biology**, London, v. 32, n. 1, p. 42-49, Aug. 1987.

SLOTTA, T. A. B.; PORTER, D. M. Genetic variation within and between *Iliamna corei* and *I. remota* (Malvaceae): implications for species delimitation. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 151, n. 3, p. 345-354, July 2006.

SOUZA, V. Q. et al. Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 569-575, 2005.

TAYLOR, B. L.; DIZON, A. E. First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 11-18, Jan. 1999.

TELLES, M. P. C. et al. Genetic diversity and population structure of *Eugenia dysenterica* DC ('cagaiteira' - Myrtaceae) in Central Brazil: implications for conservation and management. **Conservation Genetics**, Berlin, v. 4, n. 6, p. 685-695, Nov. 2003.

TOMIMATSU, H. et al. Genetic diversity and multilocus genetic structure in the relictual endemic herb *Japonolirion osense* (Petrosaviaceae). **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 117, n. 1, p. 13-18, Feb. 2004.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1995. 186 p.

TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, S. H. Diversity and unheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 92, n. 1, p. 40-45, Jan. 1996.

WATTS, P. C. et al. Molecular and ecological evidence for small-scale isolation by distance in an endangered damselfly, *Coenagrion mercuriale*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 10, p. 2931-2945, Oct. 2004.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data**. Durham: Sunderland, 1990. 337 p.

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

XIA, T. et al. ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 209-214, Apr. 2007.

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Thearaceae) in Korea based on allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Shanghai, v. 37, n. 1, p. 141-146, 1996.

YEH, F. C. et al. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis molecular biology and biotechnology centre**. Edmonton: University of Alberta, 1997. 143 p.

ZANETTINI, M. H. B.; CAVALLI, S. S. Variabilidade genética em função do modo de reprodução. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Ed.). **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 177-187.

ZIETJIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, n. 2, p. 176-183, Mar. 1994.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Engenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 148 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.