

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

mestrado

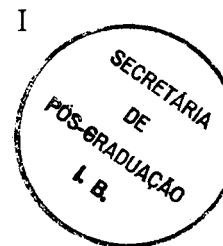
BC/46092

IB/ 81661

INSTITUTO DE BIOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Variabilidade genética em *Proteopsis* Mart. & Zucc. e *Minasia* H. Rob. (Asteraceae: Vernonieae), gêneros endêmicos de campos rupestres

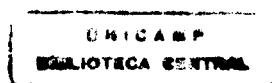
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a)
<i>Flávia Fuchs de Jesus</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.
<i>21/05/01 Vera Nisaka Solferini</i>

Flávia Fuchs de Jesus

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Nisaka Solferini
Coorientador: Prof. Dr. João Semir

2001



UNIDADE IR/81661
 N.º CHAMADA: 7/UNICAMP
5499v
 V. _____ Ex. _____
 TOMBO BC/ 46092
 PROC. 16-392/04
 C ☐ D ☒
 PREC. R\$ 11,00
 DATA 16-08-01
 N.º CPD _____

II

CM00158795-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Jesus, Flávia Fuchs de

J499v Variabilidade em *Proteopsis* Mart. & Zucc. e *Minasia*
 H. Rob. (*Asteraceae: vernonieae*), gêneros endêmicos de
 campos rupestres/Flávia Fuchs de Jesus. - - Campinas, SP.
 [s.n.], 2001.
 54f: illus.

Orientadora: Vera Nisaka Solferini
 Co-Orientador: João Semir
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. Variabilidade genética. 2. Estruturação genética. 3. *Asteraceae*.
 I. Solferini, Vera Nisaka. II. Semir, João. III. Universidade Estadual
 de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

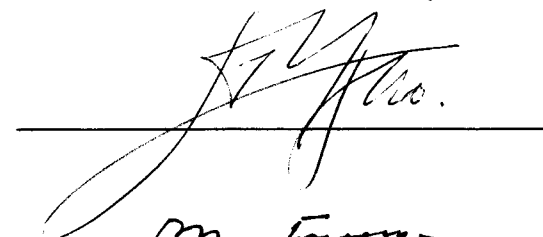
Campinas, 21 de maio de 2001

Banca Examinadora

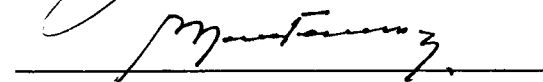
Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini
(orientadora)



Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko



Prof. Dr. Roland Vencovsky



Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel



AGRADECIMENTOS

À Vera, pela orientação durante todos esses anos, pela paciência e calma, e por olhar para cada aluno com “amor pelo seu destino”, buscando a felicidade e a realização de cada um. Por ser modelo de orientadora em muitos aspectos, especialmente por criar um clima de cooperação entre as pessoas no laboratório. Pelo apoio durante todas as minhas dúvidas profissionais e muitas outras dúvidas.

Ao João Semir, pela alegria, pela co-orientação assumida com carinho, por me ensinar um pouco do muito que sabe dessas plantas. Também pela paciência e encorajamento.

Ao Thomas Lewinsohn, por todo o apoio, inclusive meio de “pai” nos primeiros anos de graduação, por ter me incentivado a trabalhar com a Vera, pelo apoio nas coletas, pelo carinho.

Ao Paulo Inácio Prado, por ter me apresentado a essas plantinhas e me convencido a trabalhar com *Proteopsis*, por olhar tudo com tanto entusiasmo, pela infinita calma que me transmitiu nos meus momentos de ansiedade, por todo o incentivo, e pelo modelo de biólogo que é.

Ao Louis Bernard, por ter me apresentado à genética de populações de uma forma tão didática e apaixonante, e por todo estímulo, desde a graduação.

A todos os professores e funcionários, da UNICAMP, que contribuíram para a minha formação.

Aos membros da pré-banca, Dr. Paulo Inácio Prado, Prof. Dr. Flávio Antonio Mães dos Santos e Prof. Dr. Roland Vencovsky, pelas correções e sugestões valiosas, e pela grande disponibilidade.

Aos amigos Thiago L. Carvalho e ao Bruno D. Buys, pelo apoio incondicional nos primeiros passos deste trabalho, inclusive carregando 10 quilos de gelo seco nas primeiras coletas!

A todas as outras pessoas que me ajudaram ou estiveram comigo nas coletas: Thomas, Paulo, Fábio Vitta, Eduardo L. Borba, Veridiana, Karla, Tibúrcio, Juliana Farinaci, Juliana Felix.

Aos colegas de laboratório pelo companheirismo, pela ajuda em muitos momentos, pelo apoio, pela alegria: Veridiana, Juliana Farinaci, Sônia, Fabiana, Juliana Felix, Tibúrcio, Karla, Eduardo, Juliana José, Aluana, Teresinha, Terèse, Flávia Munin, Tiago, Bruno, Allan, Maria Elena.

Em especial, ao Tibúrcio por toda a ajuda com os mapas e figuras e tudo que envolvesse computadores, com uma disponibilidade e gratuidade impressionantes.

À Juzinha, pela ajuda com o dedrograma e com outras figuras.

À Karla pelas fotos, e tantas caronas!

Ao Herbert e ao “Seu Pedro”, por toda ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Genética, em especial à Ana Rita, pelo apoio.

Aos colegas do Departamento de Botânica, por me acolherem, e pelo apoio durante os estudos taxonômicos de *Minasia*.

Ao CNPq e à FAPESP (projetos 94/02837-2, 96/5807-2 e 98/05085-2), pelo apoio financeiro. Este trabalho faz parte do Programa BIOTA/FAPESP – O Instituto Virtual da Biodiversidade (www.biotasp.org.br).

À minha família, em especial meus pais, Cláudio e Beatriz, pelo apoio incondicional, pelo estímulo, pela doação.

Aos companheiros de república, pela convivência, pelo carinho, pela ajuda: Ricardo, Luisinho, Carlos, Marisa, Juliana, Luciana, Ângela Midori, Ângela Albuquerque, Alysson.

Ao Andrés, por todo o amor.

À minha comunidade CVX, por rezarem por mim, por me enviarem e apoiarem na missão, e me ajudarem a encontrar o sentido em tudo isso.

Aos amigos do grupo de oração Charolais, por serem também minha comunidade durante esses anos, “braço forte” nos momentos difíceis. Em especial à Maria Elena, “mãe espiritual” e grande amiga.

A todos os amigos, pelo carinho, pelo apoio, e por compartilharem comigo tantos momentos. Em especial à Juliana, colega de curso, laboratório e república durante tantos anos.

À Fernandinha, pelo enorme carinho, e tantas conversas nos corredores da Genética, tão importantes.

Ao Senhor, que me mostra o caminho, que me dá a vida a cada instante, e me faz perseverar e crescer na liberdade....

RESUMO

Proteopsis Mart. & Zucc. e *Minasia* H.Rob. (Asteraceae: Vernonieae) são gêneros endêmicos dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais, com espécies de distribuição fragmentada. São plantas herbáceas e perenes. A única espécie de *Proteopsis*, *P.argentea*, tem distribuição ampla dentro da Cadeia. As espécies de *Minasia* têm distribuição mais restrita, sendo em geral micro-endêmicas. Neste trabalho investigou-se a variabilidade genética de *P.argentea* (11 populações) e das espécies de *Minasia* (22 populações, no total), utilizando eletroforese de isoenzimas. Encontrou-se baixa variabilidade genética nos dois gêneros, compatível com o esperado para populações de espécies endêmicas. Em *P.argentea*, a população mais isolada geograficamente apresentou alelos exclusivos em dois locos, ao passo que duas populações muito próximas – menos de 2 km – apresentaram frequências invertidas para dois alelos de um loco. A identidade genética média foi alta ($I=0.974$), mas o alto valor de F_{ST} (0,30) encontrado indica que a espécie poderia perder uma parte importante de sua variabilidade genética com a extinção de apenas uma população. Nas espécies de *Minasia*, a estruturação genética foi de moderada a alta ($F_{ST} = 0,057 - 0,315$). Em Diamantina e na Serra do Cipó, as identidades genéticas, mesmo entre populações de espécies diferentes de *Minasia*, foram muito altas ($I > 0,97$), sugerindo divergência recente. Cada espécie ocupa um ambiente específico e fatores ecológicos podem ter sido importantes nos processos de especiação. Encontrou-se evidência genética da existência de pelo menos duas espécies de *Minasia* na Serra do Cabral, apesar de só haver uma espécie descrita para esta serra. Em uma das supostas espécies, duas populações contíguas, com pequena diferenciação morfológica, apresentaram frequências alélicas distintas em três locos, podendo se tratar de duas espécies pouco diferenciadas. Nossos dados sugerem que o padrão de diversidade e endemismo da Cadeia do Espinhaço não pode ser explicado somente por isolamento geográfico entre as manchas de campos rupestres.

ABSTRACT

Proteopsis Mart. & Zucc. and *Minasia* H.Rob. (Asteraceae: Vernonieae) are perennial herbs endemic to the “campos rupestres” of the Espinhaço Range in Minas Gerais, Brazil. In both genera the species have fragmented populational distribution. The only species in *Proteopsis*, *P.argentea*, has wide distribution along the Range, while *Minasia* species are geographically more restrict, usually micro-endemic. In this study *P.argentea* (11 populations) and *Minasia* species (22 populations total) were assayed for isozyme variation. Low genetic variation was found, in accordance to the expectation for endemic species populations. In *P.argentea*, the most geographically isolated population showed exclusive alleles at two loci, whereas two populations less than 2 km apart from each other showed inverted frequencies for two alleles; mean genetic identity was high ($I=0.974$), but the large F_{ST} (0,30) indicates that the species could lose an important part of its genetic variation with the extinction of a single population. In *Minasia* species genetic structuring varied from moderate to large ($F_{ST} = 0,057 - 0,315$); in Diamantina and Serra do Cipó genetic identities were high, even between populations of different species ($I > 0,97$) indicating recent divergence. Each *Minasia* species occupies a different habitat and ecological factors may have been important in speciation events. Genetic evidence was found for the existence of at least two *Minasia* species at Serra do Cabral. In one of the presumed species, two contiguous populations, similar morphologically, presented distinct allele frequencies at three loci, and may actually constitute two species. Our findings indicate that geographic isolation alone cannot explain the pattern of diversity and endemism found in the Espinhaço Range.

ÍNDICE

Introdução Geral	1
Referências Bibliográficas	4
Capítulo 1. Local genetic differentiation in <i>Proteopsis argentea</i> (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil	7
Resumo	8
Abstract	9
Introduction	9
Material and methods	11
Results	12
Discussion	14
References	17
Capítulo 2. Variabilidade genética em <i>Minasia</i> H.Rob (Asteraceae: Vernonieae)	19
Resumo	21
Introdução	21
Metodologia	23
Resultados	28
Discussão	36
Referências	40
Apêndice I - Identidades genéticas entre populações de <i>Minasia</i>	43
Apêndice II - Distâncias geográficas entre populações de <i>Minasia</i>	44
Considerações Gerais	45

INTRODUÇÃO GERAL

A Cadeia do Espinhaço constitui um grupo de serras estendendo-se de Ouro Preto (MG) até a Bahia, onde recebe a denominação de Chapada Diamantina. A cadeia tem formação geológica antiga, com seus blocos estruturais, originários do Pré-Cambriano, tendo sido submetidos a um longo processo de erosão e remodelados pela tectônica mais recente do Terciário (Giulietti et al. 1987, Giulietti & Pirani 1988, Harley 1995). Os altos picos de hoje são os únicos remanescentes das superfícies erodidas mais antigas (Harley 1995).

As serras são normalmente separadas por vales de rios e, nos planaltos mais altos dessas serras (de 1.000 a 1.800 m), encontramos as formações denominadas “campos rupestres”, cujas principais características são a altitude elevada e os solos rasos, com muitos afloramentos rochosos (Joly 1970, Giulietti & Pirani 1988). As plantas podem crescer diretamente sobre as rochas (epilíticas) ou em solos rochosos recentemente decompostos ou, ainda, em solos arenosos.

Existe uma extraordinária variedade de gêneros e espécies nos campos rupestres, sendo, em grande parte, endêmicos (Giulietti et al. 1987; Giulietti & Pirani 1988). Segundo Joly (1970), os campos rupestres possuem um grau de endemismo maior que o de qualquer outro tipo brasileiro de vegetação. Outra característica interessante dos campos rupestres é a extraordinária convergência morfológica observada entre plantas muito distantes filogeneticamente, em geral com adaptações relacionadas a retenção ou diminuição de perda d'água (Joly 1970).

As formações de campos rupestres são interrompidas por regiões de menor altitude, ocupadas originalmente por mata e/ou cerrado, dependendo da região, e as espécies são portanto representadas por populações fragmentadas.

A enorme diversidade de espécies e o alto grau de endemismo dos campos rupestres levou muitos pesquisadores brasileiros e ingleses a estudar a Cadeia do Espinhaço (Harley 1995). Levantamentos florísticos de algumas serras da Cadeia do Espinhaço já foram realizados (Harley & Simmons 1986; Stannard 1995; Giulietti et al. 1987, Pirani et al. 1994, entre outros), bem como um estudo dos padrões de distribuição de algumas espécies (Giulietti & Pirani 1988). Neste último, verificou-se que existem sub-gêneros ou gêneros inteiros endêmicos da Cadeia do Espinhaço bem como, em muitos casos, espécies restritas a apenas uma das serras.

Apesar dos grandes esforços para descrever as floras locais e documentar os níveis de endemismo, pouco se sabe acerca da variabilidade genética das plantas e animais dos campos rupestres. A fauna de *Drosophila* de várias localidades da Cadeia do Espinhaço já foi descrita (Tidon-Sklorz et al 1994, Tidon-Slorz & Sene 1995), e marcadores morfológicos e cromossômicos têm sido utilizados em estudos de diferenciação, principalmente de populações de *Drosophila serido* (Sene et al. 1988, Silva & Sene 1991, Tosi & Sene 1989, entre outros). Entretanto, no início do presente trabalho, nenhum estudo similar havia sido publicado com populações de plantas da Cadeia do Espinhaço.

Medidas de conservação na Cadeia do Espinhaço incluíram a criação de dois Parques Nacionais – Serra do Cipó em Minas Gerais e Chapada Diamantina na Bahia; estudos de genética de populações podem ser de grande importância para futuras medidas de conservação e manejo. O estudo de espécies ocorrendo em ambientes naturalmente fragmentados pode também auxiliar na compreensão dos efeitos da fragmentação de habitats, que é uma das preocupações principais de biólogos hoje em dia (Templeton et al. 1990, Godt & Hamrick 1993).

Além disso, o estudo de algumas espécies congêneras endêmicas de campos rupestres pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de especiação que deram origem a tamanha diversidade de espécies.

Proteopsis Mart.& Zucc. e *Minasia* H.Rob. (Asteraceae, Vernonieae) são gêneros próximos taxonomicamente, endêmicos de campos rupestres, como grande parte dos componentes de sua subtribo, Lychnophorineae (Robinson 1992). *Proteopsis* ocorre na Serra do Grão Mogol, Serra do Cabral, Planalto de Diamantina e Serra do Cipó, em Minas Gerais, e *Minasia* ocorre apenas nas três últimas localidades. São plantas perenes, herbáceas, com folhas dispostas em roseta, e possuem inflorescência em escapo ou pouco ramificadas. Os capítulos são visitados por insetos e beija-flores, e os aquênios dispersos pelo vento. Entretanto, em *Proteopsis* o pappus é caduco, não sendo o aquênio capaz de dispersão a grandes distâncias. Além da reprodução sexuada, é possível que exista também reprodução vegetativa através de estolões, o que é muito comum nessas regiões, em várias espécies de plantas (Faria 1994), apesar de não haver nenhuma informação específica para *Minasia* ou *Proteopsis*.

Proteopsis é um gênero monotípico, com apenas a espécie *P. argentea* descrita até então. *Minasia* é um gênero estabelecido recentemente por Robinson (1992), com cinco espécies já descritas: *M. alpestris* (Gardner) H.Rob., *M. pereirae* H.Rob., *M.*

scapigera H.Rob., *M. spletitiae* H.Rob. e *M. cabralensis* H.Rob. (Robinson 1992, 1995, 1996). Os dois gêneros constituem sistemas bem diferentes de estudo: *P. argentea* é uma espécie com distribuição ampla dentro da parte mineira da Cadeia do Espinhaço, ao passo que as espécies de *Minasia* são em geral microendêmicas, restritas a apenas uma das localidades citadas.

O estudo de isoenzimas, quando associado a estudos morfológicos e/ou ecológicos, tem se mostrado extremamente útil no entendimento de processos evolutivos em geral, exercendo um papel fundamental na conexão entre abordagens organísmicas e moleculares em biologia, e especialmente no estudo de populações naturais (Stebbins 1989). A grande vantagem do uso de eletroforese de enzimas é que os padrões de banda podem ser interpretados em termos genéticos. Pode-se calcular a distância genética entre populações (Nei 1972), baseada nas frequências gênicas encontradas; além disso, grupos de espécies crípticas podem apresentar diferenças nítidas em seu padrão isoenzimático, possibilitando o seu reconhecimento. Sendo assim, a análise de isoenzimas pode ser um instrumento poderoso para determinar se populações pertencem ou não ao mesmo pool gênico, ou seja, à mesma espécie (Crawford 1989). Através do estudo de isoenzimas pode-se também detectar híbridos e eventos de duplicação gênica em espécies diplóides ou duplicação por poliploidia, eventos que podem marcar a separação de duas espécies (Buth 1984).

Mesmo após o desenvolvimento de técnicas moleculares mais modernas, como marcadores de DNA, para o estudo de populações naturais, a análise de isoenzimas apresenta um potencial ainda não totalmente explorado (Torggler et al. 1995), e não deve, de forma alguma, ser descartada, já que pode fornecer informações distintas das obtidas com estudos de DNA (Mitton 1994). Encontra-se indicação na literatura de que para a elucidação de questões evolutivas envolvendo grupos de espécies próximas o método de eletroforese de isoenzimas é, na realidade, o mais adequado (Avisé 1994).

De fato, a eletroforese de isoenzimas vem sendo utilizada com sucesso no estudo de espécies endêmicas (Cosner & Crawford 1994; Crawford et al 1992; Francisco-Ortega et al. 1995; Godt & Hamrick 1993, 1996; Mc.Donald & Hamrick 1996; entre outros) bem como na resolução de questões sistemáticas em Asteraceae (Bayer 1991; Cosner & Crawford 1990; Crawford et al. 1987; Desrochers & Bohm 1995; Lowe & Abbott 1996; Thébaud & Abbott 1995; entre outros).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética intra e inter-populacional de *P.argentea* e das espécies de *Minasia* e verificar sua estruturação genética, utilizando-se a técnica de eletroforese de isoenzimas. Estudou-se também a diferenciação genética das espécies de *Minasia*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVISE, J.C. 1994. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Chapman & Hall, New York. 511 pp.
- BAYER, R.J. 1991. Allozymic and morphological variation in *Antennaria* (Asteraceae: Inuleae) from the Low Arctic of Northwestern North America. **Systematic Botany** 16: 492-506.
- BUTH, D.G. 1984. The application of electrophoretic data in systematic studies. **Annual Review of Ecology and Systematics** 15: 501-522.
- COSNER, M.B. & D.J. CRAWFORD. 1990. Allozyme variation in *Coreopsis* sect. *Coreopsis* (Compositae). **Systematic Botany** 15: 256-265.
- COSNER, M.E. & D.J. CRAWFORD. 1994. Comparisons of isozyme diversity in three rare species of *Coreopsis* (Asteraceae). **Systematic Botany** 19: 350-358.
- CRAWFORD, D.J.; STUESSY, T.F. & M. SILVA O. 1987. Allozyme divergence and the evolution of *Dendroseris* (Compositae: Lactuceae) on the Juan Fernandez Islands. **Systematic Botany** 12: 435-443.
- CRAWFORD, D.J. 1989. Enzyme electrophoresis and plant systematics. In: D.E. Soltis & P.S. Soltis [eds.], **Isozymes in Plant Biology**. Dioscorides Press, Portland, Oregon. pp 146-164.
- CRAWFORD, D.J.; STUESSY, T.F.; HAINES, D.W.; COSNER, M.B.; SILVA, M. & P. LOPEZ. 1992. Allozyme diversity within and divergence among four species of *Robinsonia* (Asteraceae: Senecioneae), a genus endemic to the Juan Fernandez Islands, Chile. **American Journal of Botany** 79: 962-966.
- DESROCHERS, A.M. & B.A. BOHM. 1995. Biosystematic study of *Lasthenia californica* (Asteraceae). **Systematic Botany** 20: 65-84.
- FARIA, G.M. 1994. A flora e a fauna apícola de um ecossistema de capo rupestre, Serra do Cipó – MG, Brasil: Composição, fenologia e suas interações. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 239 pp.
- FRANCISCO-ORTEGA, J.; CRAWFORD, D.; SANTOS-GUERRA, A. & S. SA-FONTINHA. 1995. Genetic divergence among Mediterranean and Macaronesian genera of the subtribe Chrysantheminae (Asteraceae). **American Journal of Botany** 82: 1321-1328.

- GIULIETTI, A.M.; MENEZES, N.L.; PIRANI, J.R.; MEGURO, M. & M.G.L., WANDERLEY. 1987. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e lista das espécies. **Bolm Botânica**, Universidade de São Paulo, **9**:1-151.
- GIULIETTI, A.M. & PIRANI, J.R. 1988. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. *In*: Heyer, W.R. & P.E. Vanzolini [eds.], **Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, RJ. pp39-69.
- GODT, M.J.W. & J.L. HAMRICK. 1993. Genetic diversity and population structure in *Tradescantia hirsuticaulis* (Commelinaceae). **American Journal of Botany** **80**: 959-966.
- GODT, M.J.W. & J.L. HAMRICK. 1996. Genetic diversity and morphological differentiation in *Liatris helleri* (Asteraceae), a threatened plant species. **Biodiversity and Conservation** **5**: 461-471.
- HARLEY, R.M. & N.A. SIMMONS. 1986. **Florula of Mucugê. Chapada Diamantina - Bahia, Brazil**. Royal Botanic Gardens, Kew.
- HARLEY, R.M. 1995. Introduction. *In*: B.L. Stannard [ed.], **Flora of the Pico das Almas: Chapada Diamantina - Bahia, Brazil**. Royal Botanic Gardens, Kew. pp1-40
- JOLY, A.B. 1970. **Conheça a vegetação brasileira**, EDUSP e Polígono, São Paulo, SP.
- LOWE, A.J. & R.J. ABBOTT. 1996. Origins of the new allopolyploid species *Senecio cambrensis* (Asteraceae) and its relationship to the Canary Islands endemic *Senecio teneriffae*. **American Journal of Botany** **83**: 1365-1372.
- MCDONALD, D.B. & J.L. HAMRICK. 1996. Genetic variation in some plants of Florida Scrub. **American Journal of Botany** **83**: 21-27.
- MITTON, J.B. 1994. Molecular approaches to population biology. **Annual Review of Ecology and Systematics** **25**: 45-69.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. **American Naturalist** **106**:283-293.
- PIRANI, J.R.; GIULIETTI, A.M; MELLO-SILVA, R. & MEGURO, M. 1994. Checklist and patterns of geographic distribution of the vegetation of Serra do Ambrósio, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica** **17**: 133-147.
- ROBINSON, H. 1992. Notes on Lychnophorinae from Minas Gerais, Brazil, a synopsis of *Lychnophoriopsis* Shultz-Bip., and the new genera *Anteremanthus* and *Minasia* (Vernonieae: Asteraceae). **Proceedings of the Biological Society of Washington** **105**: 640-652.
- ROBINSON, H. 1995. New combinations and new species in american Vernonieae (Asteraceae). **Phytologia** **78**: 384-399.
- ROBINSON, H. 1996. A new species of *Minasia* from the Serra do Cabral, Minas Gerais, Brazil (Vernonieae; Asteraceae). **Phytologia** **80**: 350-351.

- SENE, F.M.; PEREIRA M.A.Q.R. & VILELA, C.R. 1988. Contrasting patterns of differentiation inferred from traditional genetic markers in the process of speciation. **Pacific Science** 42: 81-88.
- SILVA, A.F.G. & SENE, F.M. 1991. Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 35: 455-468.
- STANNARD, B.L. [ed.]. 1995. **Flora of the Pico das Almas: Chapada Diamantina - Bahia, Brazil**. Royal Botanic Gardens, Kew.
- STEBBINS, G.L. 1989. Introduction. *In*: D.E. Sotis & P.S. Soltis [eds.], **Isozymes in Plant Biology**. Dioscorides Press, Portland, Oregon. .pp1-4.
- TEMPLETON, A.; SHAW, K.; ROUTMAN, E. & SCOTT, K.F. 1990. The genetic consequences of habitat fragmentation. **Annals of the Missouri Botanical Gardens** 77: 13-27.
- TIDON-SKLORZ, R.; VILELA, C.R.; SENE, F.M. & PEREIRA, M.A.Q.R. 1994. The genus *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in the Serra do Cipó, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia** 38: 627-637.
- TIDON-SKLORZ, R. & SENE, F.M. 1995. Fauna of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in the northern area of the "Cadeia do Espinhaço", states of Minas Gerais and Bahia, Brazil: Biogeographical and Ecological aspects". **Iheringia** 78: 85-94.
- THEBAUD, C. & R.J. ABBOTT. 1995. Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: quantitative trait and isozyme analysis. **American Journal of Botany** 82: 360-368.
- TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B. & S.P. TORGGLER. 1995. **Isoenzimas: Variabilidade genética em plantas**. Sociedade Brasileira de Genética, 175pp.
- TOSI, D. & SENE, F.M. 1989. Further studies on chromosomal variability in *Drosophila serido* (Diptera: Drosophilidae). **Revista Brasileira de Genética** 12: 729-746.

CAPÍTULO 1

Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil

Diferenciação genética local em *Proteopsis argentea* (Asteraceae), uma espécie herbácea e perene, endêmica no Brasil

RESUMO: *Proteopsis argentea* (Asteraceae: Vernonieae) é uma espécie herbácea, perene, endêmica dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais, com distribuição fragmentada. Neste trabalho investigou-se a variabilidade genética de suas populações, utilizando eletroforese de isoenzimas. Foram amostradas 11 populações de *P. argentea*, ao longo de toda sua distribuição. Encontrou-se baixa variabilidade genética intrapopulacional ($P = 19,2$; $A = 1,30$; $H_e = 0,058$), ao passo que, no nível de espécie, a variabilidade foi mais alta ($P = 55,5$; $A = 2,0$; $H_e = 0,093$). A população mais isolada geograficamente apresentou alelos exclusivos em dois locos, ao passo que duas populações muito próximas – menos de 2 km – apresentaram frequências invertidas para dois alelos de um loco. A identidade genética média foi alta ($I=0.974$), mas o alto valor de F_{ST} (0,30) encontrado indica que a espécie poderia perder uma parte importante de sua variabilidade genética com a extinção de apenas uma população. Nossos dados indicam que o isolamento geográfico não é suficiente para explicar a diferenciação populacional encontrada: comportamento localizado de polinizador e seleção, por exemplo, podem estar contribuindo para os padrões observados.

Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil

F. F. Jesus¹, V. N. Solferini¹, J. Semir², and P. I. Prado³

¹Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil

²Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil

³Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil

Received February 18, 2000

Accepted November 1, 2000

Abstract. *Proteopsis argentea* (Asteraceae, Vernoniaeae) is a perennial herb endemic to the “campos rupestres” of the Espinhaço Range in Minas Gerais, Brazil, with fragmented populational distribution. Eleven populations were sampled, throughout the entire distribution of the species, and assayed for isozyme variation. Low intra-population genetic diversity was found ($P = 19.2$; $A = 1.30$; $H_e = 0.058$) whereas species level diversity was higher ($P = 55.5$, $A = 2.0$, $H_e = 0.093$). The most geographically isolated population showed exclusive alleles at two loci, whereas two populations less than 2 km apart from each other showed inverted frequencies for two alleles. Mean genetic identity was high ($I = 0.974$), but the large F_{st} (0.30) indicates that the species could lose an important part of its genetic variation with the extinction of a single population. Our findings indicate that geographic isolation alone cannot explain population differentiation: localized pollinator behaviour and selection, for example, may be contributing to the patterns observed.

Key words: *Proteopsis argentea*, Asteraceae, endemism, Espinhaço Range, genetic variation, isozymes.

The Espinhaço Range is a chain of mountains extending from Minas Gerais to Bahia,

Brazil, extremely rich in endemic species (Giulietti et al. 1987, Giulietti and Pirani 1988, Harley 1995). It runs over 1000 km from north to south and 50 to 100 km from east to west (Harley 1995). The building blocks of the Espinhaço Range are from the Pre-Cambrian and have been subjected to large-scale folding and erosion, and further remodelled at the beginning of the Tertiary (Giulietti et al. 1987, Giulietti and Pirani 1988, Harley 1995). Today the highest peaks are all that remain of the old eroded surface (Harley 1995).

Closely associated with this chain of mountains are the “campos rupestres”, which are rocky fields considered to have the greatest degree of endemism among Brazilian vegetation types (Joly 1970). The “campos rupestres” occur on the peaks of the mountains (900–1800 m above sea level) and are characterized by shallow and sandy soils and a high degree of outcropping (Joly 1970, Giulietti and Pirani 1988). Most plants show adaptations related to retention of water or reduction of water loss, and the morphological convergence is astonishing. Perhaps no other region in Brazil shows so many examples of vegetative resemblance

between so many distantly related plant species (Joly 1970).

Since the "campos rupestres" are restricted to the highest areas, they form isolated patches that were originally surrounded by the Brazilian savanna called "cerrado". "Cerrado" vegetation occupied central Brazil, including the lower areas of the Espinhaço Range in Minas Gerais. Today, most of the "cerrado" in Minas Gerais has been replaced by pastures, agricultural fields and *Eucalyptus* plantations (Costa et al. 1998). Many species that are endemic to the "campos rupestres" occur in more than one patch, thus showing fragmented distributions along the Espinhaço Range.

Despite the extensive efforts to describe the local floras (Harley and Simmons 1986, Stannard 1995, Giulietti et al. 1987, Pirani et al. 1994, among others) and the documented level of endemism (Giulietti and Pirani 1988), little is known about the genetic variation of plants and animals in the "campos rupestres". The *Drosophila* fauna from many localities of the Espinhaço Range has been described and morphological as well as genetic markers, have been used in studies of geographic differentiation, mainly of *Drosophila serido* populations (Sene et al. 1988, Silva and Sene 1991, Tidon-Sklorz et al. 1994, Tidon-Sklorz and Sene 1995, Tosi and Sene 1989). However, no corresponding studies on plant populations or other animal species from the Espinhaço Range have been published so far.

Conservation efforts in the Espinhaço Range comprise the creation of two National Parks – Serra do Cipó in Minas Gerais and Chapada Diamantina in Bahia, as well as local efforts, including the creation of environmental protection areas. Population genetic studies are of great importance for future conservation and management strategy design. Also, the study of species occurring in naturally fragmented habitats can be of value for the understanding of habitat fragmentation consequences, which is a main concern of biologists today (Templeton et al. 1990, Godt and Hamrick 1993).

Proteopsis argentea Mart. & Zucc. (Asteraceae, Vernoniaeae), the only species in its

genus, is a perennial herb, endemic to the "campos rupestres" of the Espinhaço Range, as many other species in the subtribe Lychnophorinae (Robinson 1992, 1999). It occurs in four of the numerous elevated areas of "campos rupestres" of Minas Gerais, locally known as Serra do Cipó, Serra do Cabral, Planalto de Diamantina and Serra do Grão Mogol. The leaves are silvery, set in a rosette disposition, and a stalk, which varies in size, suspends the rosette (Fig. 1). The flowers are magenta-coloured and the inflorescence consists of several pedunculated capitula forming glomerules, surrounded by a foliose involucre and suspended by a floral scape. They are visited by bees and occasionally hummingbirds (own field observations). The achenes have a caducous pappus and are probably not capable of long-distance dispersal. There is also some



Fig. 1. Habit of *Proteopsis argentea*. Bar: 30 cm

potential for vegetative reproduction through stolons, which is very common in these environments for several plant species (Faria 1994), although there is no specific information on that issue for *P. argentea*.

The objective of this study was to assess levels of genetic variation within and between populations of *P. argentea* and the genetic structure of this species.

Material and methods

Sampling. Populations of *P. argentea*, as many plant species in "campos rupestres", are very patchy and can be visually delimited. Collecting was done throughout the entire distribution range of the species. A total of 246 individuals were analyzed, from 11 populations sampled at the 4 localities in which the species is known to occur: Serra do Cipó (2 populations), Planalto de Diamantina (4 populations), Serra do Cabral (4 populations) and Serra do Grão Mogol (1 population); for exact locality data and population names see Table 1. Young leaves (the most internal ones in the rosette) were collected and kept on ice during the collecting day. At the end of the day they were frozen in liquid nitrogen and kept there until electrophoresis was performed. Only plants growing at least 3 m apart were sampled, in order to avoid collecting the same clone (plants possibly originated through vegetative reproduction) more than once. For most populations at least 21 plants were sampled; in the smallest populations the largest possible number of plants were sampled,

but still taking the required distance between them into consideration.

Electrophoresis. For enzyme extraction the following buffer was used: 0.1 M tris, 0.2 M sucrose, 0.6% PVP, 1 mM EDTA, 0.15% bovine serum albumin, 0.06 M DIECA (diethyl sodium carbamate), 0.03 M sodium tetraborate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), 0.1% β -mercaptoethanol, pH 7.0 (Sun and Ganders 1990, with modifications). Extracts were absorbed in 1.0×0.3 cm Whatman #3 paper wicks, which were loaded into 8.5% starch gels (Sigma hydrolysed potato starch).

For electrode and gels two buffer systems were used: 1) electrode: 0.3 M boric acid, 60 mM NaOH, pH 8.0/gel: 10 mM tris, pH 8.5 (Shaw and Prasad 1970, with modifications); 2) electrode: 65 mM L-histidine solution adjusted for pH 6.5 with citric acid/gel: electrode solution diluted 1:4 (Stuber et al. 1977, with modifications). Running conditions were 30 mA/3 hours and 200 V/5 hours for buffer systems 1 and 2, respectively. System 1 was used for esterase (EST-EC 3.1.1.1), phosphoglucose isomerase (PGI-EC 5.3.1.9) and leucine aminopeptidase (LAP-EC 3.4.11.1); system 2 was used for phosphoglucomutase (PGM-EC 2.7.5.1). Staining procedures for EST, PGI and LAP were adapted from Brune et al. (1998) and for PGM from Soltis et al. (1983). Modifications were mainly in the amounts of the components used; the exact recipes can be obtained on request.

Data analysis. Banding patterns were genetically interpreted by direct observation of gels. Alleles were identified by their mobility relative to the most common allele in the population used as standard (*cip1*). The genetic variation within each

Table 1. Locality data for populations of *Proteopsis argentea* collected in Minas Gerais, Brazil (latitude and longitude obtained by GPS – "Global Positioning System")

Population	Locality	Latitude (S)	Longitude (W)
<i>cip1</i>	Serra do Cipó	19°15.25'	43°32.42'
<i>cip2</i>	Serra do Cipó	19°15.68'	43°31.98'
<i>dial</i>	Diamantina	18°15.50'	43°38.83'
<i>dia2</i>	Diamantina	18°11.25'	43°33.98'
<i>dia3</i>	Diamantina	18°09.58'	43°42.96'
<i>dia4</i>	Diamantina	18°17.79'	43°50.32'
<i>cab1</i>	Serra do Cabral	17°42.45'	44°11.52'
<i>cab2</i>	Serra do Cabral	17°41.60'	44°11.53'
<i>cab3</i>	Serra do Cabral	17°41.90'	44°16.20'
<i>cab4</i>	Serra do Cabral	17°41.83'	44°16.71'
<i>gmo</i>	Grão Mogol	16°32.49'	42°54.17'

population, as well as the total variation of the species were estimated by the percentage polymorphic loci (P), average number of alleles per locus (A), average number of alleles per polymorphic locus (Ap) and expected heterozygosity (He), the latter calculated according to Nei's unbiased estimate (1978). Deviations from Hardy-Weinberg expectations were checked with exact probability tests and fixation indices were calculated. F-statistics (Wright 1978) were calculated to elucidate how the genetic diversity was structured. A matrix of genetic identities (Nei 1978, "unbiased genetic identity") was produced, as well as a geographic distance matrix, and a UPGMA ("unweighted pair group method") cluster analysis based on the genetic identities. Geographic distances were calculated directly by UTM (Universal Transverse Mercator) coordinate differences, approximated in kilometers. The genetic identity and the geographic

distance matrices were compared by a Mantel test, with 5000 randomized runs. All calculations were done with the BIOSYS-1 program (Swofford and Selander 1981), except for the Mantel test, which was done with the PC-ORD 3.0 program (McCune and Mefford 1997).

Results

Resolution was obtained with 4 enzyme systems, and a total of 9 loci were scored. Five of those (*Pgm-1*, *Pgm-2*, *Pgi-1*, *Est-1*, *Est-2*) were polymorphic in at least one population (95% criterion; Table 2); the loci *Pgm-3*, *Pgi-2*, *Est-3* and *Lap* were monomorphic. At the population level, the mean percentage polymorphic loci (P) was 19.2, mean number of alleles per locus (A) was 1.3, mean number of alleles per

Table 2. Allele frequencies for polymorphic loci in *Proteopsis argentea* (alleles are identified by relative mobility; N sample size)

Locus	Population										
	<i>cip1</i>	<i>cip2</i>	<i>dial</i>	<i>dia2</i>	<i>dia3</i>	<i>dia4</i>	<i>cab1</i>	<i>cab2</i>	<i>cab3</i>	<i>cab4</i>	<i>gmo</i>
<i>Pgm-1</i>											
(N)	32	17	12	7	8	13	19	5	11	13	23
1.00	0.859	0.206	0.083	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1.41	0.141	0.794	0.917	0.929	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.652
1.79	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.348
<i>Pgm-2</i>											
(N)	33	20	12	7	8	15	18	7	12	14	28
1.00	1.000	0.925	0.958	1.000	1.000	1.000	0.917	0.714	0.792	0.929	0.964
1.27	0.000	0.075	0.042	0.000	0.000	0.000	0.083	0.286	0.208	0.071	0.036
<i>Pgi-1</i>											
(N)	55	21	12	14	10	20	21	18	21	21	31
0.14	0.027	0.024	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000	0.000
0.82	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.532
1.00	0.973	0.976	0.958	1.000	0.850	1.000	1.000	0.972	0.929	1.000	0.468
1.42	0.000	0.000	0.000	0.000	0.150	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000
<i>Est-1</i>											
(N)	54	21	10	13	8	21	20	20	18	21	31
0.78	0.019	0.000	0.050	0.000	0.000	0.071	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000
1.00	0.972	1.000	0.700	1.000	0.938	0.929	0.925	1.000	1.000	0.976	1.000
1.15	0.009	0.000	0.250	0.000	0.062	0.000	0.025	0.000	0.000	0.024	0.000
<i>Est-2</i>											
(N)	55	21	12	14	10	21	20	20	19	21	31
1.00	0.955	0.952	0.958	0.857	0.850	1.000	0.975	1.000	1.000	1.000	0.984
1.13	0.045	0.048	0.042	0.143	0.150	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.016

Table 3. Genetic variability of *Proteopsis argentea* (*N* mean sample size per locus; *P* % polymorphic loci; *A* mean number of alleles per locus; *Ap* mean number of alleles per polymorphic locus; *He* mean expected heterozygosity, unbiased estimate (Nei 1978); *Ho* mean observed heterozygosity)

Population	N	P	A	Ap	He	Ho
<i>cip1</i>	43.1	11.1	1.6	2.0	0.049	0.040
<i>cip2</i>	20.0	22.2	1.4	2.0	0.069	0.078
<i>dia1</i>	11.4	22.2	1.7	2.5	0.098	0.091
<i>dia2</i>	11.1	22.2	1.2	2.0	0.044	0.048
<i>dia3</i>	8.3	33.3	1.3	2.0	0.074	0.081
<i>dia4</i>	17.6	11.1	1.1	2.0	0.015	0.016
<i>cab1</i>	19.1	22.2	1.4	2.5	0.039	0.041
<i>cab2</i>	12.4	11.1	1.2	2.0	0.055	0.006
<i>cab3</i>	15.8	22.2	1.2	2.0	0.053	0.044
<i>cab4</i>	17.2	11.1	1.2	2.0	0.021	0.021
<i>gmo</i>	28.9	22.2	1.4	2.0	0.119	0.070
Mean	18.6	19.2	1.3	2.1	0.058	0.049
Species level	205	55.5	2.0	2.8	0.093	0.046

polymorphic locus (*Ap*) was 2.1, and expected heterozygosity (*He*) was 0.058 (Table 3).

Significant departures from Hardy-Weinberg expectations were only observed in 2 out

of 32 tests: *Pgm-1* in population *gmo* and *Pgm-2* in population *cab2*. Fixation indices were 0.617 and 1.000, respectively. For the remaining loci no significant departures were detected.

The population from Serra do Grão Mogol (*gmo*) has exclusive alleles at two loci: *Pgm-1* and *Pgi-1*, and is the most geographically isolated, on the extreme north of the distribution (Fig. 2). On the other hand, the two populations from Serra do Cipó, which are less than 2 km apart, have inverted frequencies for the two alleles at *Pgm-1* (Fig. 2). Other pairs of geographically close populations show small accumulated differences when all loci are considered: *cab1/cab2*, *dia1/dia2* and *dia1/dia3*, for example (Table 2). Mean *Fst* value was 0.300, ranging from 0.067 to 0.527 (Table 4).

Genetic identities between populations were high, above 0.99 for most pairs. Two exceptions occurred: the identities between *cip1* and the remaining ones ranged from 0.901 to 0.950, and those between *gmo* and the others ranged from 0.901 to 0.958 (Table 5, Fig. 3).

Geographic distances between pairs of populations of the same locality (same "cam-

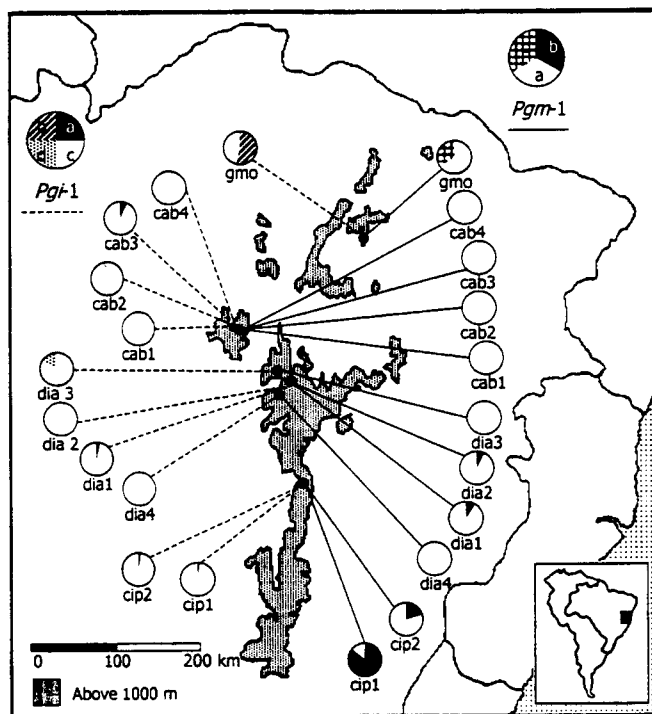


Fig. 2. Allele frequencies in populations of *Proteopsis argentea* at two loci: *Pgi-1* (left of map) and *Pgm-1* (right of map). Populations *cip1* and *cip2* are from Serra do Cipó; *dia1* through 4 are from Planalto de Diamantina; *cab1* through 4 are from Serra do Carbal and *gmo* is from Serra do Grão Mogol. For *Pgi-1* relative mobilities of the alleles are: a = 0.14; b = 0.82; c = 1.00; d = 1.42. For *Pgm-1* relative mobilities are: a = 1.00; b = 1.41 and c = 1.79 (Map adapted from Giulietti and Pirani 1988)

Table 4. Summary of F-statistics for *Proteopsis argentea*

Locus	Fis	Fit	Fst
<i>Pgm-1</i>	0.196	0.620	0.527
<i>Pgm-2</i>	0.341	0.418	0.118
<i>Pgi-1</i>	0.072	0.370	0.321
<i>Est-1</i>	0.017	0.145	0.130
<i>Est-2</i>	-0.119	-0.045	0.067
Mean	0.127	0.389	0.300

pos rupestre" area) ranged from 1.2 km to 31.3 km and between pairs of populations of different localities ranged from 65.9 km to 302.0 km (Table 6).

There was a negative correlation between genetic identities and geographic distances ($r = -0.598$), significant in the Mantel test

($p = 0.018$). However, when populations *cip1* and *gmo* were left out of the analysis, the correlation "dropped" to -0.336 and was no longer significant ($p = 0.075$).

Discussion

Endemic species with small and fragmented populations, like *P. argentea* in the Espinhaço Range, may be subjected to genetic drift, which should reduce intra-population genetic diversity and increase population differentiation. In fact, the genetic variability parameters observed for *P. argentea* populations ($P = 19.2$; $A = 1.30$; $He = 0.058$) are lower than the mean values compiled by Hamrick and Godt (1989) for other endemic species ($P = 26.3$; $A = 1.39$; $He = 0.063$), indicating

Table 5. Genetic identities (Nei 1978) between populations of *Proteopsis argentea*

Population	<i>cip1</i>	<i>cip2</i>	<i>dia1</i>	<i>dia2</i>	<i>dia3</i>	<i>dia4</i>	<i>cab1</i>	<i>cab2</i>	<i>cab3</i>	<i>cab4</i>	<i>gmo</i>
<i>cip1</i>	*****										
<i>cip2</i>	0.950	*****									
<i>dia1</i>	0.923	0.992	*****								
<i>dia2</i>	0.928	0.998	0.993	*****							
<i>dia3</i>	0.911	0.993	0.994	1.000	*****						
<i>dia4</i>	0.915	0.995	0.995	0.998	0.997	*****					
<i>cab1</i>	0.914	0.996	0.996	0.998	0.997	1.000	*****				
<i>cab2</i>	0.906	0.992	0.987	0.990	0.989	0.992	0.997	*****			
<i>cab3</i>	0.909	0.994	0.990	0.994	0.993	0.995	0.999	1.000	*****		
<i>cab4</i>	0.915	0.996	0.995	0.998	0.997	1.000	1.000	0.997	0.999	*****	
<i>gmo</i>	0.901	0.958	0.949	0.955	0.958	0.954	0.953	0.949	0.954	0.954	*****

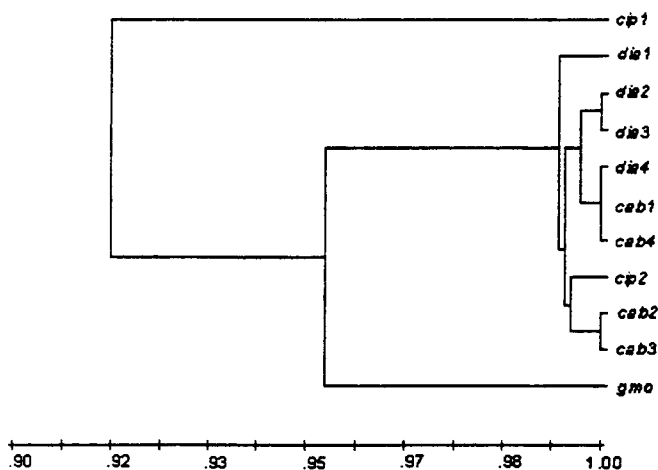
**Fig. 3.** UPGMA cluster analysis based on Nei's (1978) unbiased genetic identities for populations of *Proteopsis argentea* (cophenetic correlation = 0.981)

Table 6. Geographic distances, approximated in km, between populations of *Proteopsis argentea* (calculated directly by UTM (Universal Transverse Mercator) coordinate differences)

Population	<i>cip1</i>	<i>cip2</i>	<i>dia1</i>	<i>dia2</i>	<i>dia3</i>	<i>dia4</i>	<i>cab1</i>	<i>cab2</i>	<i>cab3</i>	<i>cab4</i>	<i>gmo</i>
<i>cip1</i>	*****										
<i>cip2</i>	1.2	*****									
<i>dia1</i>	110.8	111.8	*****								
<i>dia2</i>	118.1	119.0	11.6	*****							
<i>dia3</i>	128.1	129.2	18.7	19.7	*****						
<i>dia4</i>	110.4	111.5	20.7	31.3	23.4	*****					
<i>cab1</i>	184.4	185.5	83.8	84.9	65.9	75.2	*****				
<i>cab2</i>	185.8	186.9	85.0	85.9	66.9	76.5	1.6	*****			
<i>cab3</i>	188.5	189.7	90.4	92.0	72.8	80.4	8.3	8.3	*****		
<i>cab4</i>	189.0	190.1	91.2	92.8	73.6	81.0	9.2	9.2	9.2	*****	
<i>gmo</i>	301.3	302.0	199.3	188.8	188.4	211.8	182.4	181.3	187.9	188.5	*****

a very low intra-population genetic diversity in this species. However, two of the species level parameters are higher in *P. argentea* ($P = 55.5$; $A = 2.00$) than the average ones compiled by the same authors for other endemic species ($P = 40.0$; $A = 1.80$), indicating that the overall genetic variation of this species is not particularly low when compared to other endemics. That can be explained by the fact that the populations of *P. argentea* are quite small (a few hundred individuals, for the largest ones) but there are many populations along the Espinhaço Range, so that diversity may be retained at the species level.

The reproductive biology of the species may also influence its patterns of variability and structure. Barbosa (1997) and Faria (1994), studying the reproductive biology of plant communities in similar environments of Uberlândia (MG) and Serra do Cipó (MG), respectively, discovered that the great majority of plant species in these regions are pollinated by bees. According to Barbosa (1997), the pollinators of the Asteraceae species (which included several Lychnophorinae) in the studied region are usually small or medium sized bees, that tend to explore most of the available resources of an inflorescence before moving on to the next one. Also, the great majority of the plant species, including the Lychnophorinae, studied by Barbosa (1997) turned out to be self-compatible.

The values obtained for F_{st} in *P. argentea* indicate large differentiation between populations, and the mean value (0.300) is considered as “very great” (Wright 1978). Considerable differentiation was also found by Hamrick and Godt (1989) for populations of comparable life-history characteristics (mean $G_{st} = 0.213$ for long-lived perennial herbs and 0.216 for animal pollinated plants with mixed mating systems). In fact, if we observed the allele frequencies (Table 2) we can verify pronounced differentiation between distant populations (*gmo* and the other populations) as well as a marked differentiation between populations that are close to each other (*cip1* and *cip2*). Although we have no direct information about the reproductive biology of *P. argentea*, this species may also be self-compatible and pollinated by bees with the same foraging behaviour as described above; this may explain the low intra-population variability and the high inter-population differentiation.

Based on Nei's genetic identity values, *P. argentea* exhibited a high degree of overall similarity among populations (average $I = 0.974$), even including the most differentiated ones. This value is still in accordance with those compiled for conspecific populations in general (Crawford 1983).

Despite the interpopulation differentiation observed there is evidence that *P. argentea* is a valid species. It occurs only above a certain

altitude, in sandy, grassy fields, where there is at least some outcropping. That seems to indicate that edaphic conditions are important for its establishment. It is likely that *P. argentea* is extremely well adapted to the narrow conditions where it occurs, which may contribute to the cohesion of the species.

The Mantel test indicated a strong negative correlation between genetic identity and geographic distance. However, this correlation is dependent on populations *gmo* and *cip1*, since it is no longer significant when these populations are left out of the analysis. By examining the genetic identity matrix and the UPGMA analysis (Table 5, Fig. 3) we verify that, except for those two populations, most populations are very similar to each other, with genetic identities higher than 0.99.

The population *gmo* has two exclusive alleles; this is easily understood if we take into account its geographic isolation, including the distance in a "straight line", and also the lower altitude regions between this population and the others, with the different vegetation types found in the intervening regions. Most probably, gene flow between the *gmo* population and those from other localities is virtually nonexistent, and genetic drift can be responsible for the differentiation. Similarly, populations that are not so distant from each other, but grow in distinct "campo rupestre islands" – different localities – can be isolated from each other. This possibility is reinforced by the fact that the pappus in *P. argentea* is caducous, reducing the probability of long-distance dispersal.

The populations *cip1* and *cip2* have inverted allele frequencies at locus *Pgm-1*, even though they are less than 2 km apart from each other (Fig. 2). Local genetic differentiation in plants has been observed at very small scales indeed, and cases of differentiation of very close populations (only a few meters from each other) have been associated with selective factors (Huenneke 1991, Linhart and Grant 1996).

In the case of *P. argentea* localized pollinator behaviour coupled with the lack of long-

distance dispersal mechanisms could be responsible for genetic structuring at small spatial scales. Gene flow between populations, despite their geographic proximity, seems to be extremely reduced.

However, we cannot discard the possibility that selection is also occurring and is partly responsible for the observed pattern of differentiation. Population *cip1* is in a more disturbed area than its nearest population *cip2*, and disturbance factors include the proximity to the road and an *Eucalyptus* plantation, as well as occasional fires. Since our first visit to this area, we have noticed that the population has diminished near the road. It is possible that this reduction, if it is indeed occurring, is contributing to a random change in gene frequencies. But it is also possible that some genotypes are being favoured by the disturbance conditions, either at the locus *Pgm-1* or, most likely, at some other locus linked to it.

For the Espinhaço Range, so far, the endemism and micro-endemism and the great diversity of plant species has been proposed to stem mainly from the fact that the "campos rupestres" areas are separated from each other by lower altitude regions with different vegetation types (Joly 1970, Giulietti and Pirani 1988). The geographic isolation certainly contributes to the differentiation of populations in this environment, but it is probably not the only factor, since populations *cip1* and *cip2* reveal a great potential for local differentiation, caused by several other factors, as discussed above.

Although the present study was carried out with only one species, it is the first survey of genetic variability in plant populations of the Espinhaço Range. Other studies are necessary in order to achieve a better understanding of the history and processes that have resulted in such a large number of local endemic species. Some of our findings, however, already have some implications for conservation. It has become clear that effective conservation strategies have to consider the preservation of genetic diversity (Templeton 1991). A relevant part (30%) of the genetic variation of

P. argentea was found to reside between populations, and even populations which are geographically close can have very different allele frequencies. Therefore, even though the species has a relatively wide distribution along the Espinhaço Range, it could certainly lose an important part of its genetic variation with the extinction of a single population. This can be the case in other plant species as well, and should be taken into account in future conservation programs.

The authors thank Dr. Thomas M. Lewinsohn for help in sampling the plants and encouragement throughout this work; Dr. Alan Templeton for valuable comments about the results; Ricardo A. Tibúrcio for invaluable help with the map; Eduardo L. Borba, Juliana M. Felix and Veridiana N. Vaccarelli for collecting some of the samples; Bruno D. Buys and Thiago L. Carvalho for untiring assistance in the field and two anonymous reviewers for corrections on the manuscript. This study represents a portion of the master's dissertation of F. F. Jesus at Universidade Estadual de Campinas. Financial support was provided by FAPESP projects 1996/5807-2 to V. N. Solferini and 94/02837-2 to T. M. Lewinsohn as well as a CNPq fellowship to F. F. Jesus.

References

- Barbosa A. A. A. (1997) Biologia reprodutiva de uma comunidade de campo sujo, Uberlândia/MG. PhD. thesis. Instituto de Biologia, Univ. Estadual de Campinas, Campinas. 180 pp.
- Brune W., Alfenas A. C., Junghans T. G. (1998) Identificações específicas de enzimas em géis. In: Alfenas A. C. (ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Ed. Univ. Federal de Viçosa, Viçosa, pp. 201–328.
- Costa C. M. R., Herrmann G., Martins C. S., Lins L. V., Lamas I. R. (1998) Biodiversidade em Minas Gerais: um Atlas para sua Conservação. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, 94 pp.
- Crawford D. J. (1983) Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. In: Tanksley S. D., Orton T. J. (eds.) Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, pp. 237–287.
- Faria G. M. (1994) A flora e a fauna apícola de um ecossistema de campo rupestre, Serra do Cipó – MG, Brasil: Composição, fenologia e suas interações. PhD thesis. Instituto de Biociências, Univ. Estadual Paulista, Rio Claro. 239 pp.
- Giulietti A. M., Menezes N. L., Pirani J. R., Meguro M., Wanderley M. G. L. (1987) Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e lista das espécies. Bolm Botânica, Univ. de São Paulo, 9: 1–151.
- Giulietti A. M., Pirani J. R. (1988) Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: Heyer W. R., Vanzolini P. E. (eds.) Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, RJ, pp. 39–69.
- Godt M. J. W., Hamrick J. L. (1993) Genetic diversity and population structure in *Tradescantia hirsuticaulis* (Commelinaceae). Amer. J. Bot. 80: 959–966.
- Hamrick J. L., Godt M. J. W. (1989) Allozyme diversity in plant species. In: Brown A. H. D. et al. (eds.) Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp. 43–63.
- Harley R. M., Simmons N. A. (1986) Florula of Mucugê. Royal Botanic Gardens, Kew, 227 pp.
- Harley R. M. (1995) Introduction. In: Stannard B. L. (ed.) Flora of the Pico das Almas: Chapada Diamantina – Bahia, Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 1–40.
- Huenneke L. F. (1991) Ecological implications of genetic variation in plant populations. In: Falk D. A., Holsinger K. E. (eds.) Genetics and Conservation of Rare Plants. Oxford University Press, pp. 31–44.
- Joly A. B. (1970) Conheça a vegetação brasileira. EDUSP e Polígono, São Paulo, SP.
- Linhart Y. B., Grant M. C. (1996) Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. Ann. Rev. Ecol. Syst. 27: 237–277.
- McCune B., Mefford M. S. (1997) PC-ORD for Windows – Multivariate Analysis of Ecological Data, Version 3.0. Gleneden Beach. MjM Software.
- Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583–590.
- Pirani J. R., Giulietti A. M., Mello-Silva R., Meguro M. (1994) Checklist and patterns of

- geographic distribution of the vegetation of Serra do Ambrósio, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Bras. Bot.* 17(2): 133–147.
- Robinson H. (1992) Notes on *Lychnophorinae* from Minas Gerais, Brazil, a synopsis of *Lychnophoropsis* Shultz-Bip., and the new genera *Anteremanthus* and *Minasia* (Vernonieae: Asteraceae). *Proc. Biol. Soc. Washington* 105(3): 640–652.
- Robinson H. (1999) Generic and subtribal classification of American Vernonieae. *Smithsonian Contributions to Botany* 89: 116 pp.
- Sene F. M., Pereira M. A. Q. R., Vilela C. R. (1988) Contrasting patterns of differentiation inferred from traditional genetic markers in the process of speciation. *Pacific Sci.* 42: 81–88.
- Shaw C. R., Prasad R. (1970) Starch gel electrophoresis of enzymes – a compilation of recipes. *Biochem. Genet.* 4: 297–320.
- Silva A. F. G., Sene F. M. (1991) Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.* 35(2): 455–468.
- Soltis D. E., Haufler C. H., Darrow D. C., Gastony G. J. (1983) Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers and staining schedules. *Amer. Fern J.* 73: 9–27.
- Stannard B. L. (ed.) (1995) *Flora of the Pico das Almas: Chapada Diamantina – Bahia, Brazil*, Royal Botanic Gardens, Kew, 853 pp.
- Stuber C. W., Goodman M. M., Johnson F. M. (1977) Genetic control and racial variation of β -glucosidase isozymes in maize (*Zea mays* L.). *Biochem. Genet.* 15: 383–394.
- Sun M., Ganders F. R. (1990) Outcrossing rates and allozyme variation in rayed and rayless morphs of *Bidens pilosa*. *Heredity* 64: 139–143.
- Swofford D. L., Selander R. B. (1981) BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.* 72: 281–283.
- Templeton A., Shaw K., Routman E., Scott K. D. (1990) The genetic consequences of habitat fragmentation. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 77: 13–27.
- Templeton A. (1991) Off-site breeding of animals and implications for plant conservation strategies. In: Falk D. A., Holsinger K. E. (eds.) *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, pp. 182–194.
- Tidon-Sklorz R., Vilela C. R., Sene F. M., Pereria M. A. Q. R. (1994) The genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the Serra do Cipó, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* 38: 627–637.
- Tidon-Sklorz R., Sene F. M. (1995) Fauna of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the northern area of the “Cadeia do Espinhaço”, states of Minas Gerais and Bahia, Brazil: Biogeographical and Ecological aspects.” *Iheringia* 78: 85–94.
- Tosi D., Sene F. M. (1989) Further studies on chromosomal variability in *Drosophila serido* (Diptera: Drosophilidae). *Rev. Bras. Genet.* 12: 729–746.
- Wright S. (1978) *Evolution and the genetics of populations. Vol 4. Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press, Chicago. 580 pp.

Addresses of the authors: Flávia Fuchs de Jesus and Vera Nisaka Solferini, Depto. Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, Campinas – SP, 13083-970, Brazil.; João Semir, Depto. Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, Campinas – SP, 13083-970, Brazil; Paulo Inácio Prado, Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6166, Campinas – SP, 13083-970, Brazil.

CAPÍTULO 2

Variabilidade genética em *Minasia* H.Rob. (Asteraceae: Vernonieae)

Variabilidade genética em *Minasia* H. Rob (Asteraceae: Vernonieae)***F. F. Jesus**

Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil

V. N. Solferini

Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil

e

J. Semir

Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil

* Formato e estilo: Plant Systematics and Evolution

Resumo. O gênero *Minasia* (Asteraceae) é composto por sete espécies herbáceas, perenes, endêmicas da Cadeia do Espinhaço (MG). Foram estudadas 22 populações por eletroforese de isoenzimas. Encontrou-se baixa variabilidade populacional e estruturação genética de moderada a alta. Em Diamantina e na Serra do Cipó, as identidades genéticas, mesmo entre populações de espécies diferentes, foram muito altas ($I > 0,97$), sugerindo divergência recente. Cada espécie ocupa um ambiente específico e fatores ecológicos podem ter sido importantes nos processos de especiação. Encontrou-se evidência genética da existência de pelo menos duas espécies na Serra do Cabral, apesar de haver apenas uma descrita. Em uma das supostas espécies, duas populações contíguas, com pequena diferenciação morfológica, apresentaram frequências alélicas distintas em três locos, podendo se tratar de duas espécies pouco diferenciadas. Nossos dados sugerem que o padrão de diversidade e endemismo da Cadeia do Espinhaço não pode ser explicado somente por isolamento geográfico entre as manchas de campos rupestres.

Palavras-chave: campos rupestres, Asteraceae, *Minasia*, isoenzimas, especiação recente

A Cadeia do Espinhaço é um grupo de serras se estendendo de Ouro Preto (MG) até o norte da Bahia. O tipo de vegetação conhecido como “campos rupestres” é altamente associado às regiões de maior altitude nessa formação, sendo caracterizado por solos rasos, com muitos afloramentos rochosos. Os campos rupestres têm sido amplamente estudados devido à sua grande diversidade de espécies e altíssimo grau de endemismo. Estudos florísticos têm sido amplamente realizados (Harley & Simmons 1986; Stannard 1995; Giuliatti et al. 1987, Pirani et al. 1994, entre outros) e alguns estudos recentes têm abordado também a variabilidade genética de espécies vegetais ocorrendo em campos rupestres (Borba et al. 2001, Farinaci 2001, Jesus et al. 2001).

Esses ambientes são bons laboratórios para estudos de processos evolutivos, já que os picos das montanhas podem ser comparados a ilhas, separadas não por água, mas pelas condições ecológicas diversas que existem nas regiões de baixa altitude, funcionando como barreiras ao fluxo gênico (Harley 1995).

Tem-se sugerido que o isolamento geográfico entre as populações associadas aos campos rupestres seria o principal fator determinante na origem de tantas espécies

endêmicas e micro-endêmicas (Joly 1970, Giulietti & Pirani 1988). O estudo genético de espécies congêneras de campos rupestres pode facilitar a compreensão dos fatores mais importantes nos processos de especiação ocorridos nestas regiões, e, conseqüentemente, contribuir para o entendimento de processos evolutivos em geral.

O gênero *Minasia* H.Robinson (Asteraceae: Vernonieae) é endêmico de campos rupestres, como grande parte das espécies em sua subtribo, Lychnophorinae. Foi estabelecido recentemente por Robinson (1992) a partir de três espécies, sendo duas, *M.alpestris* (Gardn.) H.Rob. e *M.scapigera* H.Rob., anteriormente designadas como pertencentes ao gênero *Vernonia* Schreb., e a terceira, *M.pereirae* H.Rob., descrita naquele momento. Posteriormente, foram descritas outras duas espécies: *M. splettiae* H.Rob. (Robinson 1995) e *M. cabralensis* H.Rob. (Robinson 1996). Atualmente, há então cinco espécies de *Minasia* descritas. Além destas, estão sendo descritas ainda as espécies: *M.cipoensis* e *M.lewinsohni* (Semir & Jesus, inédito).

O gênero ocorre em três localidades da Cadeia do Espinhaço, todas em Minas Gerais: Serra do Cipó, Planalto de Diamantina e Serra do Cabral (Figura 1). Cada espécie, aparentemente, é microendêmica, restrita a apenas uma das localidades. *M.cipoensis* é encontrada somente na Serra do Cipó; *M.alpestris*, *M.pereirae*, *M.scapigera*, *M.splettiae* e *M.lewinsohni* são encontradas somente no Planalto de Diamantina, e *M.cabralensis* é encontrada somente na Serra do Cabral.

Suas espécies ocupam micro-ambientes distintos nos campos rupestres, que não são um tipo de vegetação homogênea, mas um mosaico de comunidades relacionadas. Algumas espécies ocorrem em solos arenosos, outras em solos com pequenos cristais de quartzo ou até diretamente sobre os afloramentos rochosos, fixando-se em suas fendas (Figura 2).

Em todas as espécies as plantas são herbáceas, perenes, com folhas dispostas em roseta e inflorescências em escapo ou pouco ramificadas. A variação fenotípica mais evidente entre as espécies ocorre no tamanho geral da planta, no formato, tamanho e textura das folhas e no padrão de ramificação das inflorescências, com algumas espécies possuindo muitos capítulos agregados em glomérulos, e outras possuindo alguns capítulos pedunculados, separados em pequenos números ou até individuais.

Os capítulos são visitados por insetos e beija-flores, e os aquênios dispersos pelo vento. Além da reprodução sexuada, é possível que exista também reprodução vegetativa através de estolões, o que é muito comum nessas regiões, em várias espécies de plantas (Faria 1994), apesar de não haver nenhuma informação específica para *Minasia*.

Uma contagem cromossômica já foi realizada em uma das espécies do gênero, tratada no trabalho como *Vernonia alpestris* Gardn., tendo sido encontrado $n = 17$ (Demateis 1998). Em um estudo citotaxonômico recente de espécies de *Lychnophora* Mart., gênero pertencente à mesma subtribo que *Minasia*, Mansanares (2000) encontrou uma variação de $n = 17$ até $n = 19$, e apenas uma evidência de poliploidia, em uma população da espécie *L. staavioides* encontrada em Diamantina.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a variabilidade genética intra e inter-populacional das espécies de *Minasia*, através de eletroforese de isoenzimas, verificando sua estruturação genética bem como a diferenciação genética entre suas espécies.

Metodologia

Coletas. As espécies de *Minasia* são compostas por populações geograficamente restritas, e cada mancha populacional pode ser visualmente delimitada, não havendo, em geral, problemas para definir as populações no campo. A única exceção ocorreu na Serra do Cabral, onde em uma mesma mancha populacional dois morfos distintos estavam presentes. Trabalhou-se com a hipótese de serem populações distintas ocorrendo lado a lado, e estabeleceu-se então um nome para cada suposta população: *cab2-a* e *cab2-b*.

No total, foram coletadas amostras de 22 populações de *Minasia* das regiões de Serra do Cipó, Diamantina e Serra do Cabral, incluindo as acima citadas. A localização exata de cada população, obtida por GPS ("Global Positioning System"), bem como sua identificação encontram-se na Tabela 1.

Para a maioria das populações amostraram-se 21 indivíduos, com pelo menos 3m de distância entre cada um, para que fosse diminuído o risco de coletar duas vezes um mesmo clone (plantas possivelmente originadas por reprodução vegetativa). Em populações muito pequenas amostrou-se o maior número possível de indivíduos, respeitando-se a distância mínima entre eles. Foram coletadas folhas jovens (as mais internas na roseta), mantidas em nitrogênio líquido até o momento das análises isozímicas.

Identificação do Material. *M.alpestris* e *M.scapigera* foram identificadas no campo, pois essas espécies são bem definidas morfológicamente. Para *M.pereirae* e *M.splittiae*, o material coletado foi detalhadamente examinado após a coleta, e a comparação com material de outros herbários (SP, SPF) permitiu a confirmação da identificação. Duas espécies novas, *M.cipoensis* e *M.lewinsohni*, foram encontradas durante as coletas, e estão sendo descritas em conjunto com o Prof. Dr. João Semir (Depto.Botânica, IB, Unicamp). Na Serra do Cabral pelo menos duas morfo-espécies foram encontradas, entretanto nenhuma delas pôde ser identificada com segurança como *M.cabralensis*, pelo fato de não haver ilustração na descrição desta espécie (Robinson 1996), e por ainda não termos tido acesso ao tipo. No presente trabalho utilizamos, então, a hipótese inicial de

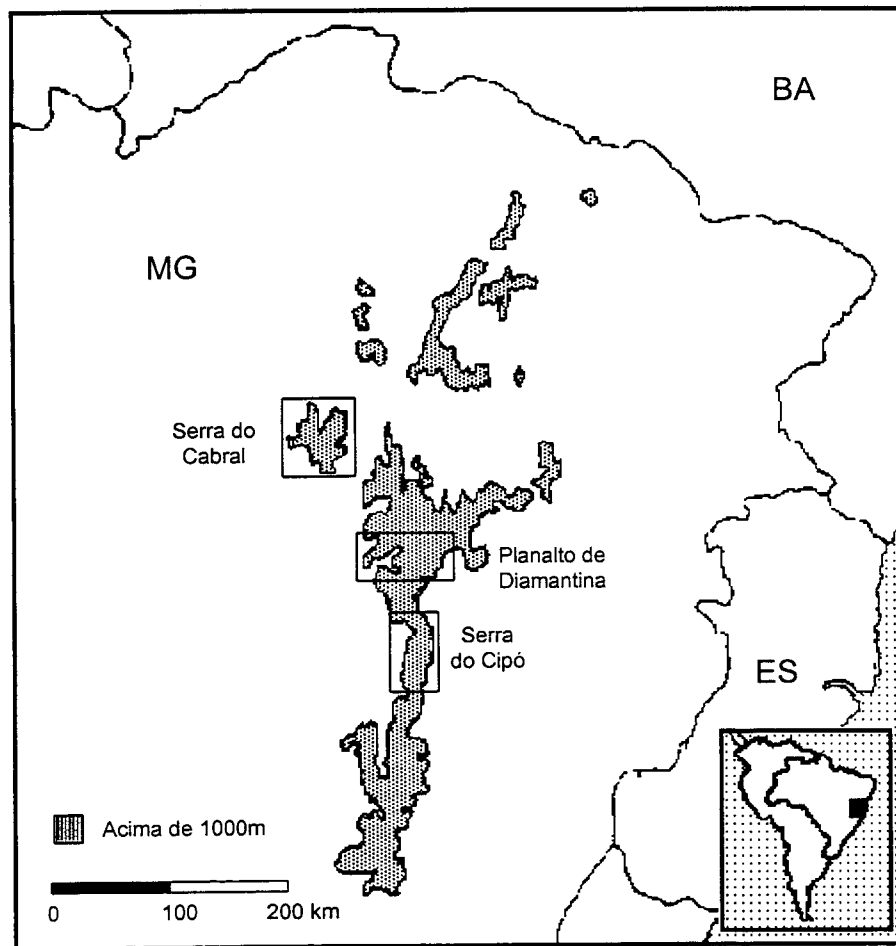


Figura 1. Mapa com as três localidades da Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais, onde são encontradas espécies de *Minasia* (adaptado por Ricardo A. Tibúrcio, a partir de Giulietti & Pirani 1988)

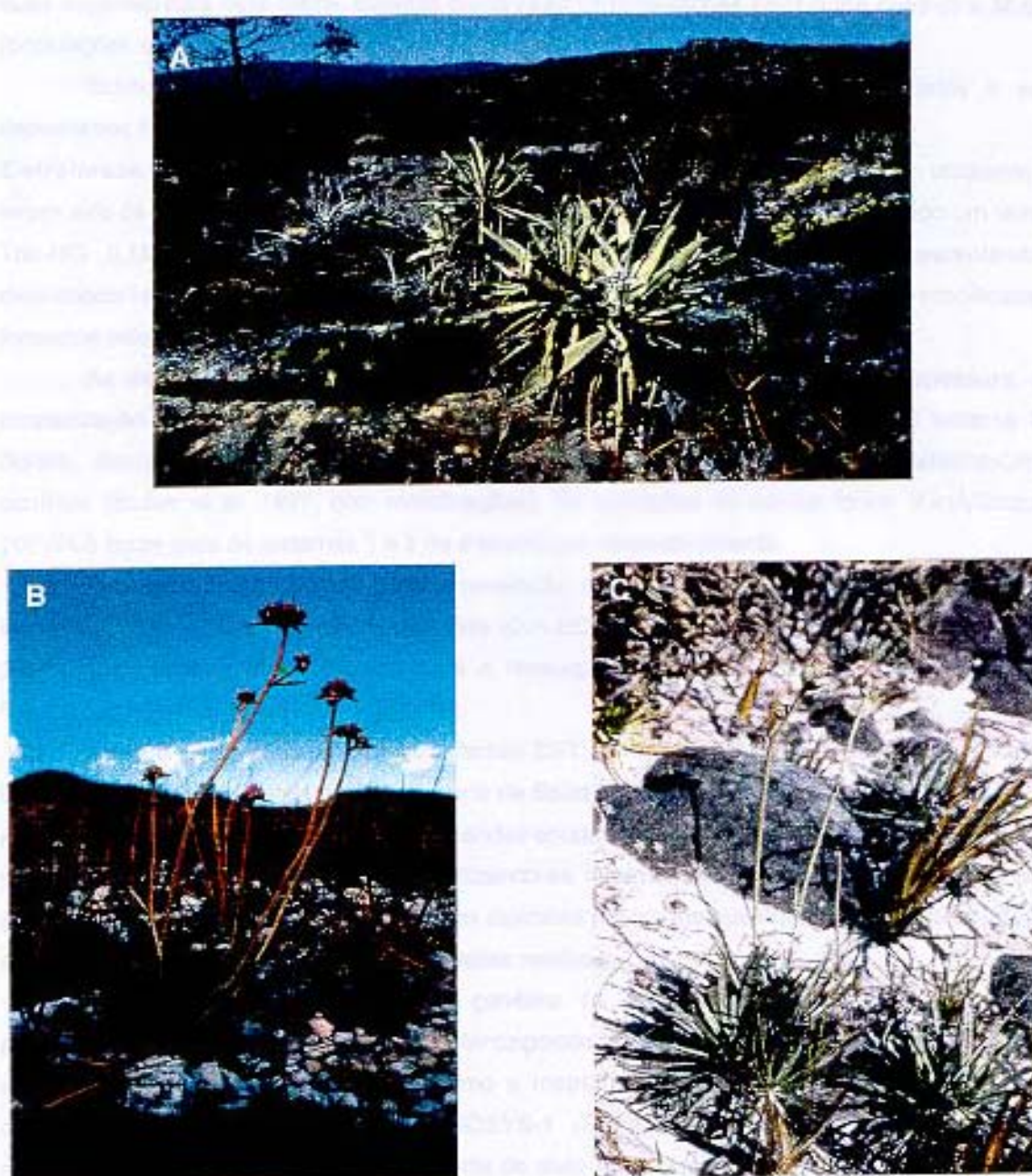


Figura 2. A - *Minasia alpestris* em fendas de afloramentos rochosos (Diamantina); B - *M. cipoensis* em solo raso com cristais de quartzo fragmentado (Serra do Cipó); C - *M. lewinsohnii* em solo arenoso (Fotos: Karla S. C. Yotoko)

duas espécies para esta Serra, tratadas como *M.sp.i.1* (populações *cab1-a* até *cab1-d*) e *M.sp.i.2* (populações *cab2-a* e *cab2-b*)

Espécimes provenientes de cada uma das populações foram herborizados e serão depositados no Herbário UEC.

Eletroforese. De um total de 30 sistemas enzimáticos testados, apenas cinco foram utilizados por terem sido os únicos a apresentar resolução. Para a extração das enzimas foi utilizado um tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0, modificado a partir de Sun & Ganders (1990), acrescentando-se dietilditiocarbamato de sódio (DIECA) 0,06M e borato de sódio 0,03M (a receita modificada foi fornecida pelo Dr. Paulo Sodero Martins, com.pess.).

As eletroforeses foram realizadas em géis de amido Sigma com 1cm de espessura, com concentração de 8,5%. Foram utilizados 2 sistemas de tampão de eletrodo/gel: 1) sistema Tris-Borato, descontínuo (Shaw & Prasad 1970, com modificações); 2) sistema Histidina-Citrato, contínuo (Stubber et al. 1977, com modificações). As condições de corrida foram 30mA/3horas e 200V/4-5 horas para os sistemas 1 e 2 de eletrodo/gel, respectivamente.

O sistema 1 foi utilizado para a revelação de esterases (EST-EC 3.1.1.1), fosfoglicose isomerase (PGI-EC 5.3.1.9), NADH-diaforase (DIA-EC 1.8.1.4) e leucina aminopeptidase (LAP- EC 3.4.11.1). O sistema 2 foi utilizado para a revelação do sistema fosfoglucomutase (PGM-EC 5.4.2.2).

As receitas para revelação dos sistemas EST, PGI, DIA e LAP foram adaptadas a partir de Brune et al. (1998) e do sistema PGM a partir de Soltis et al. (1983).

Análise dos resultados. Os padrões de bandas encontrados foram interpretados geneticamente a partir de observação direta dos géis, utilizando-se informações sobre número de isoenzimas e subunidades ativas encontrados em plantas diplóides (revisados por Weeden & Wendel 1989). Os alelos foram identificados por suas mobilidades relativas.

As estatísticas de variabilidade genética (**A** número médio de alelos por loco; **P** porcentagem de locos polimórficos; **H_o** heterozigosidade observada e **H_e** diversidade gênica), as estatísticas **F** de Wright (1978), bem como a matriz de identidade genética (Nei 1978) foram calculados utilizando-se o programa BIOSYS-1 (Swofford & Selander 1981). Um loco foi considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais comum não ultrapassou 95%. Desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foram verificados com testes de probabilidade exata.

Foi construído um dendrograma a partir das identidades genéticas encontradas, também com o programa BIOSYS-1, utilizando-se o método de UPGMA ("unweighted pair group method with arithmetic averages").

Distâncias geográficas entre as populações foram calculadas diretamente por diferença de coordenadas de UTM ("Universal Transverse Mercator"), expressas em quilômetros, com precisão de 30 m.

Tabela 1. Localização e identificação das populações de *Minasia* amostradas (latitude e longitude obtidas por GPS- "Global Positioning System")

Localidade	Número de coleta	Espécie	População	Latitude (S)	Longitude (W)
Serra do Cipó	97051	<i>M.cipoensis</i>	<i>cip-a</i>	19°17.31'	43°33.98'
Serra do Cipó	97052	<i>M.cipoensis</i>	<i>cip-b</i>	19°15.57'	43°32.04'
Serra do Cipó	FFJ04	<i>M.cipoensis</i>	<i>cip-c</i>	19°15.09'	43°32.48'
Serra do Cipó	FFJ05	<i>M.cipoensis</i>	<i>cip-d</i>	19°15.57'	43°33.18'
Diamantina	97024	<i>M.alpestris</i>	<i>alp-a</i>	18°17.79'	43°50.32'
Diamantina	97033	<i>M.alpestris</i>	<i>alp-b</i>	18°09.58'	43°42.96'
Diamantina	97036	<i>M.alpestris</i>	<i>alp-c</i>	18°09.58'	43°42.96'
Diamantina	97045	<i>M.alpestris</i>	<i>alp-d</i>	18°15.50'	43°38.83'
Diamantina	97048	<i>M.alpestris</i>	<i>alp-e</i>	18°15.45'	43°38.85'
Diamantina	97027	<i>M.scapigera</i>	<i>sca-a</i>	18°06.60'	43°44.04'
Diamantina	97037	<i>M.scapigera</i>	<i>sca-b</i>	18°09.58'	43°42.96'
Diamantina	97038	<i>M.scapigera</i>	<i>sca-c</i>	18°11.91'	43°42.59'
Diamantina	97039	<i>M.scapigera</i>	<i>sca-d</i>	18°11.25'	43°33.98'
Diamantina	97026	<i>M.splettiae</i>	<i>splet</i>	18°17.79'	43°50.32'
Diamantina	97032	<i>M.lewinsohni</i>	<i>lewin</i>	18°09.58'	43°42.96'
Diamantina	97044	<i>M.pereirae</i>	<i>perei</i>	18°15.50'	43°38.83'
Serra do Cabral	97001	<i>M.sp.i.1</i>	<i>cab1-a</i>	17°41.83'	44°16.71'
Serra do Cabral	97013	<i>M.sp.i.1</i>	<i>cab1-b</i>	17°41.86'	44°15.79'
Serra do Cabral	97019	<i>M.sp.i.1</i>	<i>cab1-c</i>	17°41.60'	44°11.53'
Serra do Cabral	97022	<i>M.sp.i.1</i>	<i>cab1-d</i>	17°42.45'	44°11.52'
Serra do Cabral	97010	<i>M.sp.i.2</i>	<i>cab2-a</i>	17°41.90'	44°16.20'
Serra do Cabral	97012	<i>M.sp.i.2</i>	<i>cab2-b</i>	17°41.90'	44°16.20'

Resultados

Variabilidade genética intrapopulacional. Nos cinco sistemas para os quais se obteve resolução foram interpretados nove locos: *Pgi-1*, *Pgi-2*, *Pgi-3*, *Lap*, *Est-2*, *Est-3*, *Dia*, *Pgm-1* e *Pgm-2*. Nos sistemas PGM, EST e DIA foram encontrados locos adicionais (um em cada) que não foram analisados, por falta de atividade e/ou resolução em vários géis. O sistema LAP, além do loco interpretado, apresentou regiões de atividade com coloração forte, mas sem repetibilidade suficiente para interpretação.

Os locos *Lap* e *Dia* apresentaram-se monomórficos em todas as populações, para todas as espécies estudadas. Os locos *Pgm-1*, *Pgi-2*, *Pgi-3* e *Est-3* apresentaram polimorfismo em apenas uma população cada (*perei*, *splet*, *alp-b* e *alp-c* respectivamente), sendo monomórficos em todas as outras (Tabela 2). Entretanto, no loco *Est-3*, o alelo fixado nas populações *cab2-a* e *cab2-b* é distinto do alelo fixado ou mais comum nas demais. Os locos *Pgm-2*, *Pgi-1* e *Est-2* foram os únicos que apresentaram-se polimórficos em mais de uma população (Tabela 2).

Em geral, os parâmetros de variabilidade intrapopulacional encontrados foram baixos, mas algumas populações exibiram níveis mais altos. A porcentagem de locos polimórficos (P) variou de zero a 44,4, ficando entre 11,1 e 22,2 para a maioria das populações. O número médio de alelos por loco (A) variou de 1,1 a 1,6. A diversidade gênica (H_e) encontrada variou de 0,007 a 0,150, ficando em geral abaixo de 0,100. No nível de espécie, P variou de 11,1 a 33,3; A, de 1,3 a 1,7 e H_e variou de 0,036 a 0,150 (Tabela 3).

Só foram encontrados dois desvios significativos do esperado por Hardy-Weinberg, ambos na espécie *M.alpestris*: *Pgi-3* na população *alp-b* e *Est-2* na população *alp-e*. Foram realizados 11 testes para esta espécie, e esperava-se que menos do que um (0,55) teste apresentasse desvio por acaso. Os índices de fixação foram 1,000 e 0,575 respectivamente, ambos indicando deficiência de heterozigotos.

O F_{IS} médio encontrado variou de -0,138, em *M.scapigera* até 0,346, em *M.alpestris*. É importante ressaltar que apenas em *M.scapigera*, *M.sp.i.1* e *M.sp.i.2* os cálculos das estatísticas F de Wright foram realizados tendo como base os mesmos locos (Tabela 4).

Estruturação genética. Nas espécies identificadas com segurança encontraram-se três situações distintas quanto à estruturação, estimada pelo F_{ST} médio: 0,057 em *M.cipoensis*; 0,183 em *M.scapigera* e 0,315 em *M.alpestris*. Nas duas supostas espécies

da Serra do Cabral os valores de F_{ST} médio foram altos: 0,260 em *M.sp.i.1* e 0,205 em *M.sp.i.2* (Tabela 4).

Diferenciação entre espécies. Nas populações de Diamantina e da Serra do Cipó, mesmo de espécies diferentes, a diferenciação genética encontrada foi muito baixa. As identidades genéticas médias entre pares de populações de espécies diferentes, nestas localidades, variaram de 0,973 a 0,999, sendo comparáveis às identidades encontradas entre pares de coespecíficas (Tabela 5).

As populações da Serra do Cabral apresentaram-se mais diferenciadas, sendo que a média das identidades genéticas entre populações de *M.sp.i.1* e as demais variou de 0,749 a 0,886 e entre as supostas populações de *M.sp.i.2* e as demais variou de 0,704 a 0,753 (Tabela 5).

As populações da Serra do Cabral distinguem-se pela presença, nos locos *Pgm-2* e *Pgi-1*, de um alelo em alta frequência que é raro nas populações das outras localidades (Figuras 3 e 4). Os locos *Est-2* e *Est-3*, por sua vez, revelam uma marcada diferenciação das populações *cab2-a* e *cab2-b* em relação às demais populações nesta Serra (Figura 5). Esses dados parecem corroborar a separação das populações da Serra do Cabral em pelo menos duas espécies, o que é evidenciado também no dendrograma (Figura 6).

Entretanto, em *M.sp.i.2*, podemos observar que as frequências alélicas de suas duas supostas populações (*cab2-a* e *cab2-b*) diferem entre si, de forma notável, nos três locos mais polimórficos (Figuras 3, 4 e 5). Apesar de o número de indivíduos incluídos em *cab2-b* ser muito pequeno esta diferenciação parece ser consistente, pois repete-se nos três locos.

Tabela 2. Frequências alélicas para os locos polimórficos nas populações de *Minasia* (alelos estão identificados por mobilidade relativa; **N** tamanho de amostra; as populações estão identificadas na Tabela 1)

Loco	População															
	cip-a	cip-b	cip-c	cip-d	alp-a	alp-b	alp-c	alp-d	alp-e	sca-a	sca-b	sca-c	sca-d	splet	lewin	perei
Pgm-1																
(N)	11	14	6	7	11	12	17	13	19	12	18	18	20	12	20	6
0,57	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,083
1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,917
Pgm-2																
(N)	20	21	18	16	11	13	17	14	20	14	18	19	15	15	20	6
1,00	0,925	0,905	1,000	0,844	0,955	0,962	1,000	0,893	0,950	0,750	0,917	0,842	0,867	0,867	0,700	0,917
1,32	0,075	0,095	-----	0,156	0,045	0,038	-----	0,107	0,050	0,250	0,083	0,158	0,133	0,133	0,300	0,083
Pgi-1																
(N)	17	18	15	16	20	15	20	14	21	14	19	21	21	13	20	5
0,42	-----	0,028	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,024	0,024	0,025	-----
1,00	1,000	0,972	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,976	1,000	1,000	1,000	0,976	0,731	0,975	1,000
1,11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,269	0,269	-----	0,808
1,56	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,024	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Pgi-2																
(N)	16	18	15	15	20	15	20	14	21	14	18	21	21	15	19	4
1,00	1,000	1,000	1,000	0,967	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,867	1,000	1,000
1,41	-----	-----	-----	0,033	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,133	-----	-----
Pgi-3																
(N)	20	20	15	16	20	15	20	14	21	15	20	21	21	16	21	5
1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,933	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
1,11	-----	-----	-----	-----	-----	0,067	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Est-2																
(N)	21	20	16	18	17	19	21	21	21	12	19	21	19	20	20	6
0,95	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,026	-----	-----	-----
0,98	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,119	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1,00	1,000	0,800	0,969	0,917	0,235	0,974	0,905	1,000	0,714	0,458	0,974	1,000	0,763	0,675	1,000	1,000
1,05	-----	0,200	0,031	0,083	0,765	0,026	0,095	-----	0,167	-----	0,026	-----	0,211	0,025	-----	-----
1,07	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,542	-----	-----	-----	0,300	-----	-----
Est-3																
(N)	13	14	4	9	14	16	17	13	21	7	11	13	17	14	11	---
0,96	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,235	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,765	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Tabela 3. Variabilidade genética nas populações de *Minasia* (N: tamanho médio de amostra por loco; A: número médio de alelos por loco; P: porcentagem de locos polimórficos; H_o: heterozigosidade observada; H_e: diversidade gênica)

	N	A	P	H _o	H _e
<i>M.cipoensis</i>					
<i>cip-a</i>	16,1	1,1	11,1	0,017	0,016
<i>cip-b</i>	18,2	1,3	22,2	0,050	0,062
<i>cip-c</i>	11,8	1,1	0,0	0,007	0,007
<i>cip-d</i>	13,6	1,3	22,2	0,061	0,055
Média	14,9	1,2	13,9	0,034	0,035
Nível de espécie	59,7	1,4	22,2	0,033	0,036
<i>M.alpestris</i>					
<i>alp-a</i>	14,0	1,2	11,1	0,049	0,051
<i>alp-b</i>	13,9	1,3	11,1	0,014	0,029
<i>alp-c</i>	17,7	1,2	22,2	0,037	0,061
<i>alp-d</i>	14,1	1,1	11,1	0,008	0,022
<i>alp-e</i>	19,1	1,4	22,2	0,038	0,067
Média	15,8	1,2	15,5	0,029	0,046
Nível de espécie	78,8	1,7	11,1	0,029	0,063
<i>M.scapigera</i>					
<i>sca-a</i>	12,0	1,2	22,2	0,120	0,101
<i>sca-b</i>	16,2	1,2	11,1	0,024	0,023
<i>sca-c</i>	18,0	1,1	11,1	0,035	0,030
<i>sca-d</i>	18,9	1,4	22,2	0,090	0,091
Média	16,3	1,2	16,7	0,067	0,061
Nível de espécie	65,1	1,6	22,2	0,062	0,067
<i>M.spletitiae</i>					
<i>splet</i>	14,0	1,6	44,4	0,143	0,150
<i>M.lewinsohni</i>					
<i>lewin</i>	17,6	1,2	11,1	0,061	0,053
<i>M.pereirae</i>					
<i>perei</i>	4,4	1,2	22,2	0,037	0,037
<i>M.sp.i.1</i>					
<i>cab1-a</i>	15,0	1,2	22,2	0,069	0,079
<i>cab1-b</i>	14,4	1,2	0,0	0,013	0,013
<i>cab1-c</i>	14,6	1,2	22,2	0,100	0,107
<i>cab1-d</i>	12,8	1,2	11,1	0,011	0,011
Média	14,2	1,2	13,9	0,048	0,053
Nível de espécie	56,8	1,4	22,2	0,047	0,067
<i>M.sp.i.2</i>					
<i>cab2-a</i>	15,9	1,3	33,3	0,115	0,131
<i>cab2-b</i>	4,3	1,3	33,3	0,106	0,141
Média	10,1	1,3	33,3	0,111	0,136
Nível de espécie	20,2	1,3	33,3	0,112	0,150

Tabela 4. Estimativas de F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} (Wright 1978) para as espécies de *Minasia* com mais de uma população

Espécie/loco	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
<i>M.cipoensis</i>			
<i>Pgm-2</i>	-0,136	-0,089	0,042
<i>Pgi-1</i>	-0,029	-0,007	0,021
<i>Pgi-2</i>	-0,034	-0,008	0,025
<i>Est-2</i>	0,195	0,260	0,080
Média	0,018	0,074	0,057
<i>M.alpestris</i>			
<i>Pgm-2</i>	0,241	0,261	0,026
<i>Pgi-1</i>	-0,024	-0,005	0,019
<i>Pgi-3</i>	1,000	1,000	0,054
<i>Est-2</i>	0,330	0,625	0,441
<i>Est-3</i>	0,346	0,475	0,198
Média	0,346	0,552	0,315
<i>M.scapigera</i>			
<i>Pgm-2</i>	-0,268	-0,227	0,032
<i>Pgi-1</i>	-0,024	-0,006	0,018
<i>Est-2</i>	0,023	0,339	0,323
Média	-0,138	0,071	0,183
<i>M.sp.i.1</i>			
<i>Pgm-2</i>	-0,081	0,082	0,151
<i>Pgi-1</i>	0,202	0,504	0,378
<i>Est-2</i>	-0,034	-0,015	0,019
Média	0,045	0,294	0,260
<i>M.sp.i.2</i>			
<i>Pgm-2</i>	-0,074	-0,031	0,040
<i>Pgi-1</i>	0,418	0,573	0,267
<i>Est-2</i>	0,132	0,409	0,320
Média	0,132	0,310	0,205

Tabela 5. Identidades genéticas médias entre as populações das diferentes espécies de *Minasia*

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>M.cipoensis</i>	0,999							
2. <i>M.alpestris</i>	0,987	0,975						
3. <i>M.scapigera</i>	0,990	0,979	0,983					
4. <i>M.splettiae</i>	0,984	0,973	0,984	*****				
5. <i>M.lewinsohni</i>	0,994	0,977	0,990	0,979	*****			
6. <i>M.pereirae</i>	0,999	0,984	0,990	0,982	0,996	*****		
7. <i>M.sp.i.1</i>	0,850	0,828	0,857	0,885	0,886	0,852	0,977	
8. <i>M.sp.i.2</i>	0,716	0,731	0,727	0,753	0,720	0,704	0,749	0,935

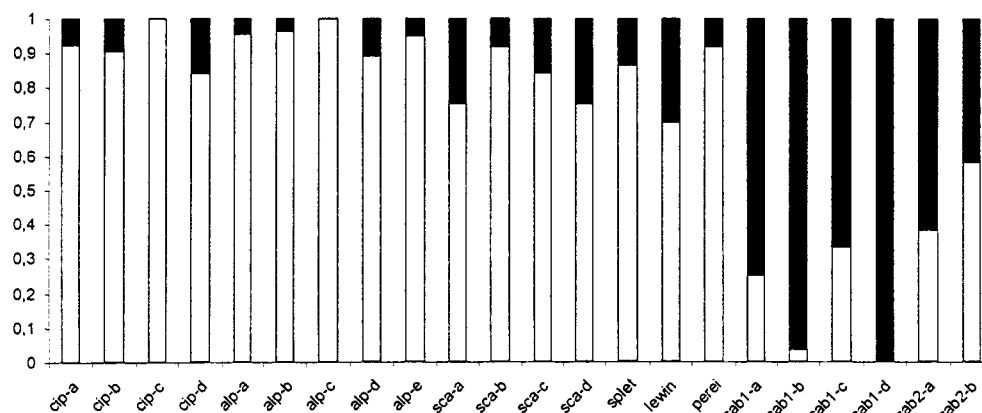


Figura 3 – Frequências alélicas para o loco *Pgm-2* nas populações de *Minasia*. A cor branca representa o alelo 1,00 e a preta o alelo 1,32. As populações estão identificadas na tabela 1.

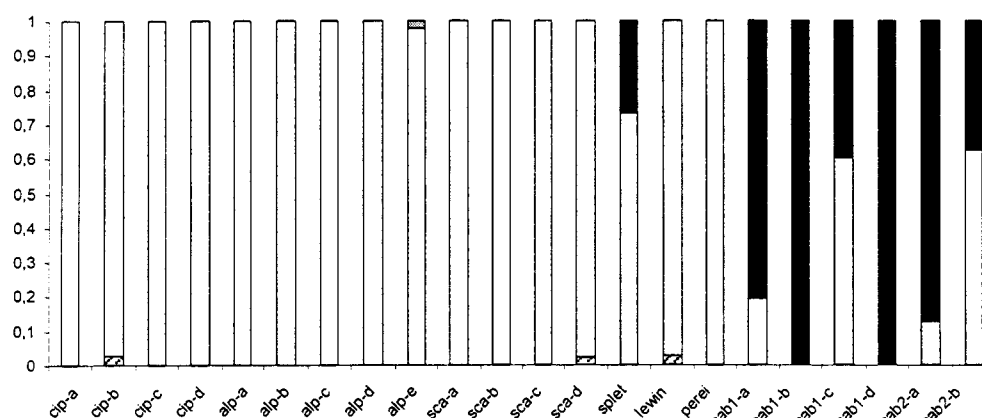


Figura 4 – Frequências alélicas para o loco *Pgi-1* nas populações de *Minasia*. A cor branca representa o alelo 1,00, a preta o alelo 1,11, o hachurado o alelo 0,42 e o cinza 1,56. As populações estão identificadas na tabela 1.

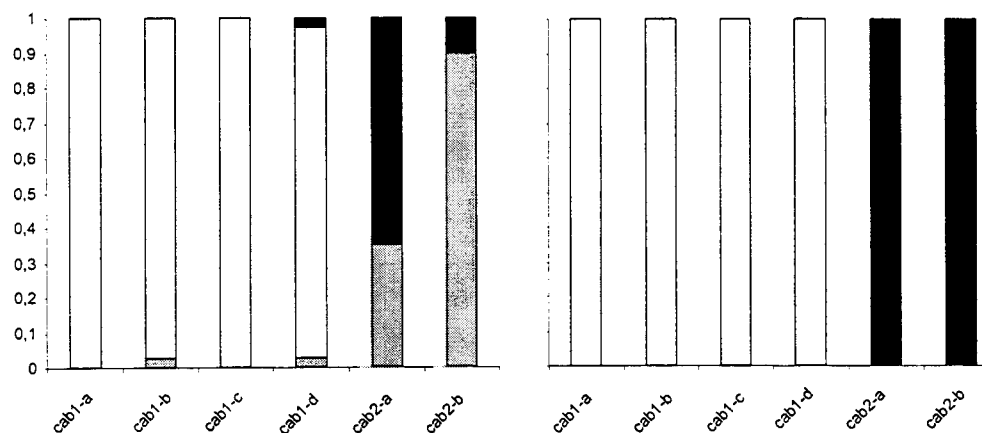


Figura 5 – Frequências alélicas para os locos *Est-2* (esquerda) e *Est-3* (direita) nas populações de *Minasia* da Serra do Cabral. Para *Est-2* a cor branca representa o alelo 1,00, a preta o alelo 1,05 e o cinza 0,95. Para *Est-3* a cor branca representa o alelo 1,00 e a preta o alelo 0,96.

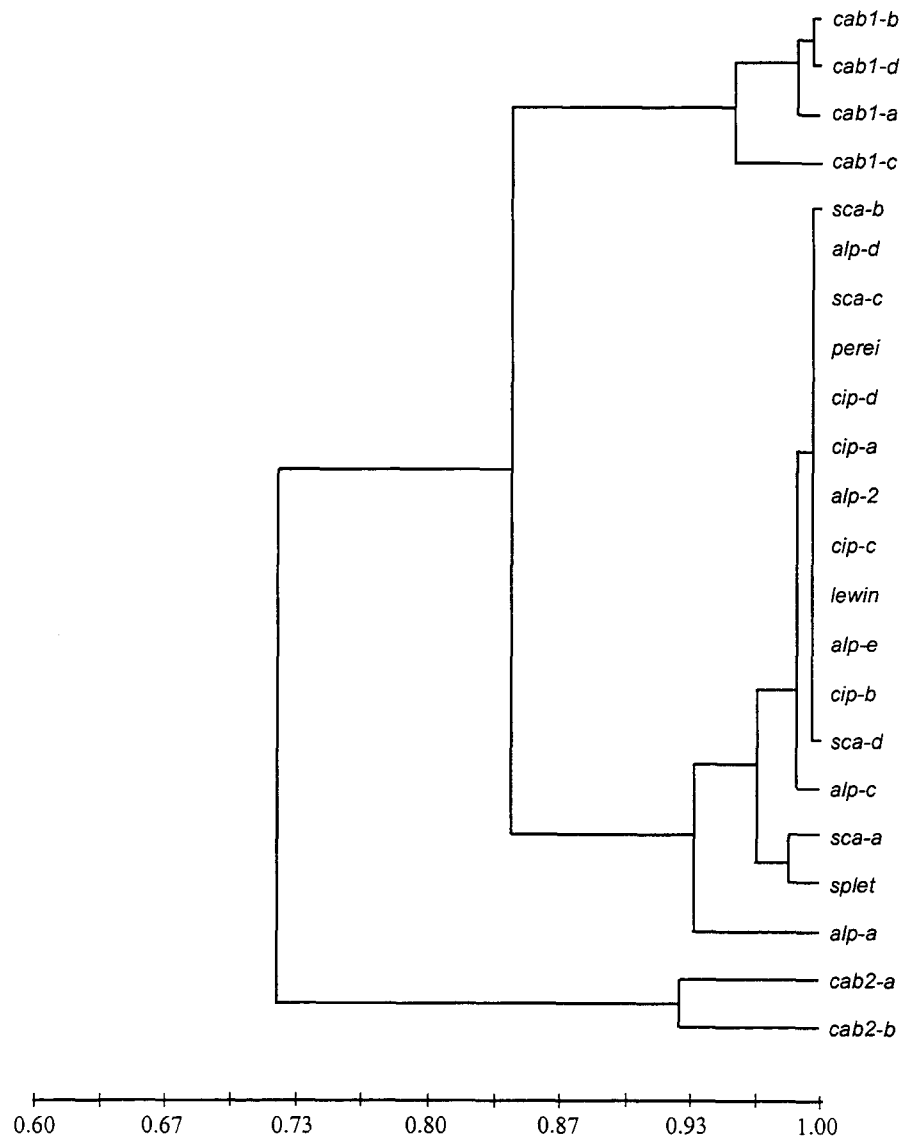


Figura 6. Dendrograma das populações de *Minasia*, construído por UPGMA, a partir das identidades genéticas (Nei 1978) calculadas; correlação cofenética: 0,932

Discussão

Variabilidade genética. O número de locos encontrado em cada sistema enzimático está de acordo com o mais comumente observado em plantas diplóides (revisão por Weeden & Wendel 1989), com exceção do sistema PGI. Para este sistema, o mais comum é encontrarem-se dois locos, e em *Minasia* foram encontrados três. Essa duplicação gênica parece ser característica do gênero, pois é encontrada em todas as suas espécies, não tendo sido encontrada no gênero próximo, *Proteopsis* (Jesus et al. 2001).

Na maioria das espécies de *Minasia* foram encontrados níveis muito baixos de variabilidade genética intra-populacional (Tabela 3), abaixo dos compilados na literatura para populações de espécies endêmicas ($A = 1,39$; $P = 26,3$; $H_e = 0,063$; Hamrick & Godt 1989) e, em alguns casos, abaixo dos encontrados em *Proteopsis argentea* Mart. & Zucc, próxima taxonomicamente de *Minasia*, e também endêmica de campos rupestres ($A = 1,30$; $P = 19,2$; $H_e = 0,058$; Jesus et al. 2001). Essa baixa variabilidade deve-se provavelmente à ação da deriva genética, à qual estão sujeitas espécies endêmicas com tamanhos populacionais pequenos.

Considerando-se que as espécies de *Minasia* têm populações menores e distribuição geográfica mais restrita do que *P. argentea*, é natural encontrarmos, além de uma variabilidade intra-populacional menor, uma variabilidade no nível de espécie também menor. *P. argentea* ocorre em quatro serras da Cadeia do Espinhaço, ao passo que cada espécie de *Minasia* é endêmica de uma das serras. De fato, para dois parâmetros (P e A), a variabilidade no nível de espécie (Tabela 3) foi mais baixa do que a encontrada em *P. argentea* ($A = 2,00$ e $P = 55,5$; Jesus et al. 2001). Entretanto, apenas *M. cipoensis* apresentou, no nível de espécie, diversidade gênica ($H_e = 0,036$) menor do que a de *P. argentea* ($H_e = 0,046$). De qualquer modo, as estimativas dos parâmetros encontradas em *Minasia* estão abaixo dos compilados para espécies endêmicas ($A = 1,80$; $P = 40,0$; $H_e = 0,096$; Hamrick & Godt 1989), indicando uma baixa variabilidade genética em suas espécies.

Este padrão é contrastante com o encontrado em algumas espécies de orquídeas de campos rupestres. No gênero *Pleurothallis* encontrou-se, no nível populacional, número médio de alelos por loco variando de 2,1 a 3,8; porcentagem de locos polimórficos variando de 58 a 83, heterozigosidade observada variando de 0,19 a 0,38 e diversidade gênica de 0,25 a 0,43 (Borba et al. 2001). No gênero *Bulbophyllum* encontrou-se diversidade gênica também muito alta, variando, no nível populacional, de 0,37 a 0,50 (Farinaci 2001). Nos dois trabalhos, atribui-se essa altíssima variabilidade a mecanismos

capazes de reduzir a auto-polinização, bem como a mecanismos eficientes de dispersão e à grande longevidade dos indivíduos, que pode retardar os efeitos de deriva genética.

Nas maioria das espécies de *Minasia*, não foi possível detectar nenhuma forte evidência de endogamia. Entretanto, em *M.alpestris*, além dos desvios às expectativas de Hardy-Weinberg encontrados em duas populações, indicando deficiência de heterozigotos, encontrou-se um F_{IS} médio muito alto (0,346; Tabela 4). Mesmo retirando-se os locos *Pgi-3* e *Est-3*, que não são polimórficos nas outras espécies, o valor do F_{IS} médio permanece alto (0,293). Esse valor é contrastante com os valores de F_{IS} encontrados nas demais espécies.

Os tamanhos populacionais em *M.alpestris* não são menores do que de *M.cipoensis*, por exemplo, em que o F_{IS} médio encontrado foi baixo (0,021 utilizando apenas os locos em comum com as outras espécies). Possíveis hipóteses para explicar esse alto valor de F_{IS} em *M.alpestris* são efeito Wahlund ou cruzamento entre aparentados, por exemplo. Futuros estudos sobre a biologia reprodutiva da espécie, incluindo comportamento de polinizador e a possível contribuição de reprodução vegetativa, poderão auxiliar no esclarecimento dessa questão.

Estruturação genética e diferenciação populacional. Pelo fato de as espécies de *Minasia* apresentarem tamanhos populacionais menores e distribuição geográfica mais restrita do que *P.argentea*, esperava-se encontrar valores de F_{ST} inferiores ao obtido em *P.argentea* (F_{ST} médio = 0,300; Jesus et al. 2001). Este padrão ocorreu em *M.cipoensis*, *M.scapigera*, *M.spi.1* e *M.spi.2*, mas não em *M.alpestris* (F_{ST} médio = 0,315). Em *P.argentea*, o alto valor de F_{ST} médio deveu-se principalmente à diferenciação de duas populações: uma distante geograficamente da maioria, com alelos exclusivos em alta frequência, e a outra distando menos de 2 km da população mais próxima, mas com notável diferenciação genética. Este último caso revelou o potencial para diferenciação genética local existente nestas espécies, que se repete em algumas populações de *Minasia* como *alp-a*, por exemplo, em *M.alpestris*. Essa população apresentou-se mais diferenciada das demais de sua espécie (Figura 6) principalmente pelas frequências alélicas em *Est-2* (Tabela 2).

Em *P.argentea*, levantou-se duas explicações possíveis para a diferenciação local entre populações: 1) deriva genética com baixo fluxo gênico causado por possíveis polinizadores com comportamento localizado, associado à dispersão pouco eficiente, ou 2) seleção ocorrendo no próprio loco em que se notou diferenciação ou sobre algum loco ligado a este. No caso de *Minasia* seria possível que um comportamento localizado de

polinizadores contribuísse para diferenciação entre populações mesmo próximas geograficamente. Entretanto, esperaríamos que, pelo fato do pappus não ser tipicamente caduco neste gênero, a dispersão dos aquênios pudesse ocorrer pelo vento, ocasionando maiores níveis de fluxo gênico.

O valor de F_{ST} encontrado em *M.sp.i.2* (0,205), considerado como “muito alto” (Wright 1978), é também surpreendente, levando-se em conta que as duas “populações” ocorrem de fato lado a lado. Para casos na literatura em que tal diferenciação foi encontrada entre indivíduos tão próximos, em geral, alega-se que a seleção natural estaria sendo importante na manutenção desta diferenciação (Linhart & Grant 1996). No caso encontrado aqui, a diferença ambiental observada foi a maior proximidade dos indivíduos de *cab2-b* a um riacho. Entretanto, a diferenciação encontrada não foi restrita a apenas um loco, sugerindo que alguma forma de isolamento reprodutivo deve haver entre estes indivíduos. É interessante notar que, neste caso, a diferenciação morfológica encontrada no campo foi corroborada pelos dados genéticos. Podemos estar tratando de duas espécies pouco diferenciadas. Estudos mais aprofundados, de cruzamento e citogenética, por exemplo, serão importantes para elucidar o que está ocorrendo nesta localidade.

Diferenciação entre espécies. As identidades obtidas entre populações de espécies diferentes, especialmente em Diamantina e na Serra do Cipó, foram muito altas (Tabela 5), bem acima da média geral encontrada na literatura para congêneras ($I=0,67$; Crawford 1989). Identidades genéticas muito altas (acima de 0,90) têm sido encontradas para espécies congêneras em ilhas oceânicas e em pares de espécies em que se sabe que uma é derivada da outra. Nos dois casos, o que parece haver em comum é uma divergência recente entre as espécies (revisão por Crawford 1989). As altas identidades genéticas encontradas na Serra do Cipó e em Diamantina parecem indicar, portanto, um tempo de divergência recente entre as espécies presentes nestas localidades.

As populações da Serra do Cabral apresentaram uma diferenciação maior (Tabela 5, Figura 6). É interessante observar que a Serra do Cabral está bem isolada de Diamantina e Serra do Cipó (Figura 1), que, por sua vez, formam uma região mais contínua de altitudes elevadas.

Pode-se hipotetizar que entre Serra do Cabral e Diamantina tenha havido pelo menos um evento de especiação alopátrica antigo, em que houve tempo para surgir diferenciação nos genes que codificam para enzimas solúveis. Por outro lado, ao longo do contínuo Cipó-Diamantina, provavelmente ocorreram diversos eventos de especiação

mais recentes, em que fatores ecológicos foram importantes, com cada espécie ocupando um habitat específico. Nestes eventos, a seleção natural pode ter favorecido a adaptação de cada espécie a seu habitat, sem ter havido tempo para a divergência nos genes que codificam para enzimas.

Em Diamantina, mais especificamente, é notável a diversidade de espécies de *Minasia* encontrada, e muitas em simpatria. Cada espécie ocupa um tipo de habitat diferente dentro do mosaico dos campos rupestres. *M.alpestris*, por exemplo, ocorre diretamente sobre os afloramentos rochosos, fixando-se em frestas (Figura 2), ao passo que *M.pereirae* foi coletada em solos arenosos, bem próximos a um afloramento ocupado por *M.alpestris*. Seleção favorecendo a ocupação destes habitats pode ter levado à modificação de caracteres morfológicos sem modificação nos genes de isoenzimas.

Há relatos na literatura de plantas selecionadas para caracteres associados à domesticação em que ocorre divergência morfológica entre o táxon progenitor e o derivado, com pouca divergência em locos de isoenzimas (Crawford 1989). Seleção favorecendo adaptação a ambientes diferentes (pedra, campos arenosos, campos com fragmentos de quartzo, no caso de *Minasia*) também poderia causar um padrão semelhante, de diferenciação morfológica com pouquíssima diferenciação nos genes de isoenzimas. De fato, em ilhas havaianas, espécies de *Tetramolopium* (Asteraceae, Astereae) são altamente divergentes quando se consideram seus padrões morfológicos e de ecologia, ocupando ambientes diferentes (Lowrey & Crawford 1985). Entretanto, as identidades genéticas entre suas espécies são altas - maioria acima de 0,90 – comparáveis com as encontradas para *Minasia* em Diamantina. Atribuiu-se essa alta similaridade genética entre espécies de *Tetramolopium* ao tempo recente de especiação.

Na Serra do Cabral encontramos uma situação contrastante com a de Diamantina. Há uma diferenciação genética notável entre *M.sp.i.1* e *M.sp.i.2*, mesmo entre populações geograficamente muito próximas, mas sem diferenciação morfológica ou ecológica tão nítidas. Observando o dendrograma (Figura 6) verifica-se que não há uma correspondência completa entre padrões geográfico e genético, já que a diferenciação genética entre as espécies da Serra do Cabral é maior do que a encontrada entre estas e as espécies do contínuo Cipó-Diamantina. Uma possível hipótese para explicar isso seria a ocorrência de dois eventos independentes de colonização na Serra do Cabral, por exemplo.

Os casos de diferenciação local entre populações coespecíficas, bem como a evidência de divergência recente entre espécies ocorrendo em simpatria sugerem que o

padrão de diversidade e endemismo da Cadeia do Espinhaço não pode ser explicado somente pelo isolamento geográfico entre as diversas manchas de campos rupestres. Para melhor elucidar os mecanismos responsáveis por tal diversidade e endemismo, futuros estudos devem abordar aspectos da biologia reprodutiva destas espécies, incluindo cruzamentos inter-específicos, bem como contagens cromossômicas para todo o gênero e possivelmente estudos com outros marcadores moleculares.

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Thomas M. Lewinsohn por todo apoio e pela ajuda nas coletas, ao Fábio Vitta pelas coletas na Serra do Cipó, aos Prof. Dr. Paulo I. Prado, Prof. Dr. Flávio A. M. dos Santos e Prof. Dr. Roland Vencovsky pelas valiosas críticas e sugestões ao manuscrito, ao Ricardo A. Tibúrcio pelo mapa e pela ajuda com os gráficos, à Juliana José pela ajuda com o dendrograma, à Karla S.C. Yotoko pelas fotografias e à FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

- Brune W., Alfenas A. C., Junghans T. G. (1998) Identificações específicas de enzimas em géis. In: Alfenas A. C. (ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Ed. Univ. Federal de Viçosa, Viçosa. pp. 201-328.
- Borba E. L., Felix J. M., Solferini V. N., Semir J. (2001) Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *Am. J. Bot.* 88: 418-428.
- Crawford D. J. (1989) Enzyme eletrophoresis and plant systematics. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. In: Sotis D. E., Soltis P. S. (eds.) *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press, Portland, Oregon. pp. 146-164.
- Demateis M. (1998) Chromosome studies of some *Vernonia* species (Asteraceae). *Gen. Mol. Bio.* 21: 381-385.
- Faria G. M. (1994) A flora e a fauna apícola de um ecossistema de campo rupestre, Serra do Cipó – MG, Brasil: composição, fenologia e suas interações. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Univ. Estadual Paulista, Rio Claro. 239 pp.
- Farinaci J. S. (2001) Variabilidade genética em algumas espécies de *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae) de campos rupestres. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 58 pp.
- Giulietti A. M., Menezes N. L., Pirani J. R., Meguro M., Wanderley M. G. L. (1987) Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e lista das espécies. *Bolm Botânica, Univ. de São Paulo*, 9:1-151.
- Giulietti A. M., Pirani J. R. (1988) Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: Heyer W. R., Vanzolini P. E. (eds.) *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, RJ. pp. 39-69.

- Hamrick J. L., Godt M. J. W. (1989) Allozyme diversity in plant species. In: Brown A. H. D. et al. (eds.) Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. pp. 43-63.
- Harley R. M., Simmons N. A. (1986) Florula of Mucugê. Royal Botanic Gardens, Kew. 227 pp.
- Harley R. M. (1995) Introduction. In: Stannard B. L. (ed.) Flora of the Pico das Almas: Chapada Diamantina - Bahia, Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 1-40.
- Jesus F. F., Solferini V. N., Semir J., Prado P.I. (2001) Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. Plant Syst. Evol. 226: 59-68.
- Joly A. B. (1970) Conheça a vegetação brasileira, EDUSP e Polígono, São Paulo, SP.
- Lowrey T. K., Crawford D. J. (1985) Allozyme divergence and evolution in *Tetramolopium* (Compositae: Astereae) on the Hawaiian Islands. Syst. Bot. 10: 64-72.
- Linhart Y. B., Grant M. C. (1996) Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. Ann. Rev. Ecol. Syst. 27: 237-277.
- Mansanares M. E. (2000) Estudo citotaxonômico de espécies do gênero *Lychnophora* Mart. (Asteraceae: Vernonieae) em Minas Gerais. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 69 pp.
- Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.
- Pirani J. R., Giuliatti A. M., Mello-Silva R., Meguro M. (1994) Checklist and patterns of geographic distribution of the vegetation of Serra do Ambrósio, Minas Gerais, Brazil. Rev. Bras. Bot. 17 (2): 133-147.
- Robinson H. (1992) Notes on Lychnophorinae from Minas Gerais, Brazil, a synopsis of *Lychnophoriopsis* Shultz-Bip., and the new genera *Anteremanthus* and *Minasia* (Vernonieae: Asteraceae). Proc. Biol. Soc. Washington 105(3): 640-652.
- Robinson H. (1995) New combinations and new species in american Vernonieae (Asteraceae). Phytol. 78: 384-399.
- Robinson H. (1996) A new species of *Minasia* from the Serra do Cabral, Minas Gerais, Brazil (Vernonieae; Asteraceae). Phytol. 80: 350-351.
- Shaw C. R. and Prasad R. (1970) Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. Biochem. Genet. 4: 297-320.
- Soltis D. E., Haufler C. H., Darrow D. C., Gastony G. J. (1983) Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers and staining schedules. Amer. Fern J. 73: 9-27.

- Stannard B. L. (ed.). (1995) Flora of the Pico das Almas: Chapada Diamantina - Bahia, Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew. 853 pp.
- Stuber C. W., Goodman M. M., Johnson F. M. (1977) Genetic control and racial variation of β -glucosidase isozymes in maize (*Zea mays* L.). Biochem. Genet. 15: 383-394.
- Sun M., Ganders F. R. (1990) Outcrossing rates and allozyme variation in rayed and rayless morphs of *Bidens pilosa*. Heredity 64: 139-143.
- Swofford D. L., Selander R. B. (1981) BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. J. Hered. 72: 281-283.
- Weeden N. F., Wendel J. F. (1989) Genetics of plant isozymes. In: Sotis D. E., Soltis P. S. (eds.) Isozymes in Plant Biology. Dioscorides Press, Portland, Oregon. pp. 46-72.
- Wright S. (1978) Evolution and the genetics of populations. Vol 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago. 580 pp.

Endereços dos autores: Flávia Fuchs de Jesus e Vera Nisaka Solferini, Depto. Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, Campinas – SP, 13083-970, Brasil; João Semir, Depto. Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, Campinas – SP, 13083-970, Brasil

Apêndice I. Identidades genéticas (Nei 1978) entre as populações de Minasias

População	cip-a	cip-b	cip-c	cip-d	alp-a	alp-b	alp-c	alp-d	alp-e	sca-a	sca-b	sca-c	sca-d	splet	lewin	perei	cab1-a	cab1-b	cab1-c	cab1-d	cab2-a	cab2-b
<i>cip-a</i>	*****																					
<i>cip-b</i>	0,997	*****																				
<i>cip-c</i>	1,000	0,997	*****																			
<i>cip-d</i>	1,000	0,999	0,998	*****																		
<i>alp-a</i>	0,934	0,964	0,939	0,946	*****																	
<i>alp-b</i>	1,000	0,997	1,000	0,999	0,938	*****																
<i>alp-c</i>	0,993	0,993	0,995	0,992	0,942	0,994	*****															
<i>alp-d</i>	1,000	0,997	0,999	1,000	0,933	1,000	0,993	*****														
<i>alp-e</i>	0,994	1,000	0,995	0,997	0,966	0,995	0,992	0,994	*****													
<i>sca-a</i>	0,965	0,973	0,963	0,971	0,943	0,964	0,959	0,966	0,974	*****												
<i>sca-b</i>	1,000	0,998	1,000	1,000	0,938	1,000	0,994	1,000	0,995	0,967	*****											
<i>sca-c</i>	1,000	0,996	0,998	1,000	0,932	0,999	0,991	1,000	0,993	0,967	1,000	*****										
<i>sca-d</i>	0,993	0,999	0,991	0,999	0,962	0,992	0,986	0,994	0,996	0,977	0,994	0,995	*****									
<i>splet</i>	0,982	0,986	0,982	0,985	0,942	0,982	0,975	0,982	0,985	0,985	0,983	0,982	0,984	*****								
<i>lewin</i>	0,995	0,992	0,991	0,998	0,925	0,993	0,983	0,997	0,987	0,967	0,996	0,999	0,996	0,979	*****							
<i>perei</i>	1,000	0,997	1,000	1,000	0,934	1,000	0,993	1,000	0,994	0,965	1,000	1,000	0,993	0,982	0,996	*****						
<i>cab1-a</i>	0,873	0,871	0,861	0,882	0,796	0,866	0,850	0,877	0,860	0,858	0,874	0,884	0,889	0,906	0,903	0,873	*****					
<i>cab1-b</i>	0,798	0,798	0,784	0,810	0,724	0,789	0,771	0,804	0,785	0,792	0,799	0,813	0,823	0,844	0,838	0,799	0,992	*****				
<i>cab1-c</i>	0,943	0,941	0,932	0,952	0,867	0,937	0,922	0,947	0,931	0,927	0,944	0,953	0,957	0,952	0,969	0,944	0,983	0,950	*****			
<i>cab1-d</i>	0,791	0,791	0,776	0,804	0,721	0,782	0,764	0,797	0,779	0,788	0,792	0,806	0,818	0,838	0,833	0,791	0,990	1,000	0,948	*****		
<i>cab2-a</i>	0,664	0,696	0,661	0,682	0,736	0,661	0,714	0,667	0,694	0,700	0,669	0,671	0,714	0,727	0,683	0,661	0,781	0,779	0,752	0,781	*****	
<i>cab2-b</i>	0,749	0,767	0,747	0,759	0,772	0,746	0,798	0,750	0,770	0,779	0,752	0,752	0,779	0,779	0,757	0,746	0,734	0,702	0,761	0,701	0,935	*****

Apêndice II. Distâncias geográficas, aproximadas em km, entre as populações de *Minasia* (calculadas diretamente por diferença de coordenadas de UTM – “Universal Transverse Mercator”)

População	cip-a	cip-b	cip-c	cip-d	alp-a	alp-b	alp-c	alp-d	alp-e	sca-a	sca-b	sca-c	sca-d	splet	lewin	perei	cab1-a	cab1-b	cab1-c	cab1-d	cab2-a	cab2-b
<i>cip-a</i>	*****																					
<i>cip-b</i>	4,7	*****																				
<i>cip-c</i>	4,9	1,2	*****																			
<i>cip-d</i>	3,5	2,0	1,5	*****																		
<i>alp-a</i>	113,5	111,3	110,2	110,7	*****																	
<i>alp-b</i>	125,9	123,2	122,2	122,9	19,9	*****																
<i>alp-c</i>	125,9	123,2	122,2	122,9	19,9	0,2	*****															
<i>alp-d</i>	114,9	112,0	111,1	111,8	20,8	12,6	12,6	*****														
<i>alp-e</i>	114,4	111,5	110,6	111,4	20,7	13,0	13,0	0,5	*****													
<i>sca-a</i>	131,6	128,9	127,9	128,6	23,4	5,8	5,8	18,3	18,7	*****												
<i>sca-b</i>	125,9	123,2	122,2	122,9	19,9	0	0	12,6	13,0	5,8	*****											
<i>sca-c</i>	121,6	118,9	117,9	118,6	17,4	4,4	4,4	9,0	9,2	10,1	4,3	*****										
<i>sca-d</i>	122,0	118,8	117,9	118,8	31,3	16,1	16,1	11,3	11,6	19,7	16,1	15,2	*****									
<i>splet</i>	113,5	111,3	110,2	110,7	0	19,9	19,9	20,8	20,7	23,4	19,9	17,4	31,3	*****								
<i>lewin</i>	125,9	123,2	122,2	122,9	19,9	0	0	12,6	13,0	5,8	0	4,4	16,1	19,9	*****							
<i>perei</i>	114,9	112,0	111,1	111,8	20,8	12,6	12,6	0	0,5	18,3	12,6	9,0	11,3	20,8	12,6	*****						
<i>cab1-a</i>	191,5	189,9	188,8	189,1	81,0	78,5	78,5	90,8	91,2	73,6	78,5	81,9	92,8	81,0	78,5	90,8	*****					
<i>cab1-b</i>	190,8	189,2	188,1	188,4	80,1	77,3	77,3	89,6	89,9	72,3	77,3	80,7	91,5	80,1	77,3	89,6	1,6	*****				
<i>cab1-c</i>	188,5	186,7	185,6	186,0	76,5	72,2	72,2	84,7	85,0	66,9	72,2	75,7	85,9	76,5	72,2	84,7	9,2	7,5	*****			
<i>cab1-d</i>	187,0	185,3	184,2	184,5	75,1	71,0	71,0	83,5	83,8	65,9	71,0	74,6	84,8	75,1	71,0	83,5	9,2	7,6	1,6	*****		
<i>cab2-a</i>	191,0	189,4	188,3	188,6	80,4	77,8	77,8	90,1	90,4	72,8	77,8	81,1	92,0	80,4	77,8	90,1	0,9	0,7	8,3	*****		
<i>cab2-b</i>	191,0	189,4	188,3	188,6	80,4	77,8	77,8	90,1	90,4	72,8	77,8	81,1	92,0	80,4	77,8	90,1	0,9	0,7	8,3	8,3	0	*****

CONSIDERAÇÕES GERAIS

- A variabilidade genética encontrada nas populações de *P.argentea* e das espécies de *Minasia* foi baixa, compatível com o esperado para espécies endêmicas, mas contrastante com os altos valores encontrados em espécies de orquídeas nos mesmos ambientes.
- Em *P.argentea* a estruturação genética foi alta, encontrando-se diferenciação tanto em uma população isolada geograficamente quanto entre populações muito próximas. Em *Minasia* a estruturação genética variou de moderada a alta, mesmo sendo as populações próximas geograficamente.
- *P.argentea*, bem como algumas espécies de *Minasia*, poderiam perder uma parcela importante de sua variabilidade genética com a extinção de apenas uma população. Isso deve ser levado em consideração em programas futuros de conservação.
- As identidades genéticas entre populações de mesma espécie foram altas nos dois gêneros estudados.
- As espécies de *Minasia* ocorrendo em Diamantina e na Serra do Cipó (MG) parecem ter se diversificado recentemente, o que é indicado pelas altas identidades genéticas encontradas entre elas. O fato de essas espécies ocuparem cada uma um habitat específico sugere que fatores ecológicos podem ter sido importantes nos eventos de especiação.
- Entre Serra do Cabral e Diamantina pode ter ocorrido pelo menos um evento de especiação mais antigo, o que é indicado pela diferenciação genética entre as espécies de cada local.
- Apesar de haver apenas uma espécie de *Minasia* descrita na Serra do Cabral, encontrou-se evidência genética da existência de pelo menos duas espécies. Além disso, em uma dessas supostas espécies, populações contíguas mostraram algumas diferenças genéticas. Estas diferenças podem ser atribuídas a fatores locais ou podem estar indicando a presença uma terceira espécie na região.

- Os casos de diferenciação local entre populações coespecíficas, bem como a evidência de divergência recente entre espécies ocorrendo em simpatria sugerem que o padrão de diversidade e endemismo da Cadeia do Espinhaço não pode ser explicado somente pelo isolamento geográfico entre as diversas manchas de campos rupestres.