

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Dulce Maria Sucena da Rocha

Aspectos taxonômicos, genéticos e reprodutivos de *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. e *P. emarginatus* Vog. (Leguminosae, Dipteryxaceae)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) DULCE MARIA SUCENA DA ROCHA e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Vegetal.



Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Paulo Yoshio Kageyama

Campinas, Ano 2006

UNIDADE BC
Nº CHAMADA: 79.582a
T/UNICAMP
V. _____ EX. _____
TOMBO BCCL 75080
PROC 16.143-07
C _____ D X
PREÇO 11,00
DATA 32/11/07
BIB-ID 416877

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

R582a

Rocha, Dulce Maria Sucena da

Aspectos taxonômicos, genéticos e reprodutivos de *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. e *Pterodon emarginatus* Vog. (Leguminosae, Dipteryxae) / Dulce Maria Sucena da Rocha. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Paulo Yoshio Kageyama.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Genética vegetal. 2. Diversidade biológica -
Conservação. 3. Taxonomia vegetal. I. Kageyama,
Paulo Yoshio. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Taxonomic, genetic and reproductive aspects of *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. and *Pterodon emarginatus* Vog. (Leguminosae, Dipteryxae).

Palavras-chave em inglês: Plant genetics; Biological diversity conservation; Plants - Classification.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Paulo Yoshio Kageyama, George John Shepherd, Flávio Antonio Maães dos Santos, Vera Nisaka Solferini, John Du Vall Hay.

Data da defesa: 07/04/2006.

Campinas, 7 de Abril de 2006

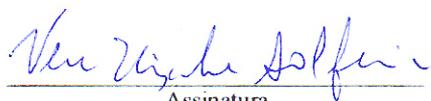
BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a) Paulo Yoshio Kageyama (Orientador(a))



Assinatura

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini



Assinatura

Prof(a). Dr(a) George John Shepherd.



Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Flávio Maes dos Santos



Assinatura

Prof(a). Dr(a) John Du Val Hay



Assinatura

Prof(a). Dr(a) Sandra Maria Carmello-Guerreiro

Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Sérgio Gandolfi

Assinatura

Prof(a). Dr(a) Ana Yamaguishi Ciampi

Assinatura

A meus pais e minha irmã Silvinha

Se eu fosse uma sucupira, seria mais enrolada ainda...

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda e apoio de um grande número de pessoas às quais sou profundamente grata.

Gostaria de agradecer especialmente,

Ao meu orientador Paulo Yoshio Kageyama por ter me aceitado como orientada e me apoiado durante todos esses anos.

À FAP-DF pelo financiamento obtido para realização do projeto.

Ao CNPq pela bolsa RHAE que obtive no início do trabalho.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

À Vera Solferini, George John Shepherd e Flávio Antonio Maes dos Santos, pelas inúmeras discussões durante o decorrer do trabalho e pela leitura cuidadosa, comentários, sugestões e correções durante a pré banca da tese. Espero que o texto final faça jus ao esmero com que vocês leram o manuscrito inicial e aos comentários e sugestões de mudança que cada um me fez.

Ao João Semir e Waldir Mantovani pelas discussões sobre o tratamento taxonômico adequado para esse grupo de plantas, sobretudo, durante o início do projeto.

À Linda Styer Caldas que foi a responsável por eu ter trabalhado com as sucupiras. Foi ela que propôs que fosse escolhida *Pterodon emarginatus sensu Lewis* como espécie modelo a ser investigada sob vários enfoques. Desta forma, quando fui trabalhar no departamento de Botânica da Universidade de Brasília com uma bolsa do RHAE/CNPq o projeto do departamento era com sucupira branca, o *Pterodon emarginatus sensu Lewis*.

Ao meu grande amigo, zen budista, guitarrista e companheiro de bancada Samuel Wallace MacDowell pela enorme paciência quando me ensinou como trabalhar com DNA e pela amizade constante.

À Célia Torres Cordeiro, minha grande amiga, minha irmã, por tudo. Sem ela a tese não teria saído mesmo! À Célia devo toda a análise dos dados da tese. Se dependesse de mim, iríamos precisar de outros tantos anos para desenrolar parte das análises estatísticas. A ela devo uma amizade profunda e apoio em todas as horas. A ela devo a constante insistência para que eu não saísse dispersando em todas as direções, mas me concentrasse no trabalho que vinha realizando. A ela devo ter aprendido a gostar de dias nublados e das chuvas de Brasília. A ela devo o fato de por fim ter aprendido a gostar de Brasília.

Ao Departamento de Botânica da UnB, em especial aos professores, Lacê Medeiros Breyer, Carolyn Proença, Maria das Graças Machado, Lucia Helena Soares e Silva, Mariluzza Barros, George Eiten, funcionários, Maria Josemilia de Carvalho Miranda, José Aires, José do Carmo, Enilton Antonio do Nascimento. Aos alunos de pós graduação, Simone, Luciano, Bia, Vanessa, Eduardo, Denise e Cássia, do Herbário, pela acolhida calorosa e apoio durante todos esses inúmeros anos em que passei e ainda espero passar por lá.

Ao Departamento de Morfologia e Genética da Universidade de Brasília pela acolhida e apoio durante a realização do trabalho, em especial aos professores e amigos Maria de Nazaré Guimarães Grisólia, Silviene Fabiana de Oliveira, César Koppe Grisólia, Zulmira Guerrero Marques Lacava, e ao Senhor Ornil Claro Costa. Foi no laboratório de Genética que todo o trabalho de tese foi desenvolvido e apesar de eu nunca ter sido membro do departamento, fui sempre tratada como tal. Essa consideração e amizade foram as bases

para que eu me sentisse feliz e segura para poder desenvolver minha pesquisa. Não existem palavras possíveis para descrever minha gratidão a todos vocês.

Ao Senhor Elias Luis Batista Cavalcante técnico do Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade de Brasília, que foi a pessoa que me ajudou com a parte de germinação das sementes, preparando o meio de cultura e colocando para germinar as sementes.

À Sra. Yara de Fátima Bressan, bióloga do laboratório de Biossistemática do Departamento de Botânica da Unicamp, que preparou e forneceu o corante de Alexander usado para verificar a viabilidade do pólen.

A todos os professores do Departamento de Botânica da Unicamp pela paciência que tiveram comigo e pelo apoio que sempre tive de todos vocês. Em especial gostaria de agradecer aos coordenadores de pós graduação, Kikyo Yamamoto, Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi e Sandra Maria Carmello Guerreiro, pela paciência de Jó que tiveram para comigo. Como se pode observar não são muitos os estudantes que têm a chance de passar por três coordenadores de pós durante seu único doutorado. Meu muito obrigada pelas inúmeras vezes em que vocês intercederam por mim e revolveram montanhas para me manter no curso. Não teria conseguido sem a compreensão de vocês.

À Ana Odete Santos Vieira e Marta Camargo de Assis pela leitura, sugestões e discussões do primeiro capítulo.

Agradeço enormemente à Andrea Mariúza Líbano e à Fernanda Bucci por terem me ajudado com as correções da tese e a leitura da mesma.

Agradeço aos meus amigos, vocês foram essenciais: Andrea e Luciana, Fernanda e Pedro, Bethinha e Ana Eliza, Alencar, Ana Palmira, Marta, Luísa, Jonas, Leonardo (Lêco), Paulo Eugênio, Anderson, Helga, Xandão, Isabel, Lourdes, Rosana, Leonardo Noletto,

Alexandre (o Ale), Daniel, Marcelo, Graça, Nazá, Célia, Tri, Cláudia, Nami, Raon, Dani, Hay, Jay e Andrea, Sérgius, Mônica, Lacê, Taci, Luciano, Bruno, Márcio, Marcão, Karen, Douglas, Sheila.

À Maricy, Claudinho e Lourenço. Mari, minha companheira de anos de Brasília. Aqueles anos foram seguramente mais alegres, leves e lúcidos devido à sua presença

Agradeço a meus pais pelo apoio e incentivo ao longo de toda minha vida (uma tarefa hercúlea). À minha irmã Silvoça (ela até acha as sucupiras o máximo!). Seu interesse, apoio, incentivo e entusiasmo, foram e são essenciais para mim. Ela consegue ouvir meus delírios e achá-los normais. Sua presença na minha vida é como o amanhecer a cada dia. Ao Hebert por sua amizade sincera. Ao Caio e à Adrina pelo brilho e alegria que acrescentaram à minha vida.

À Carmen Silvia e Maria Raquel, minhas tias mineiras, a elas eu devo, entre inúmeras e infinitas coisas, o fato de amar o meio do mato.

À Minha tia Nisa eu devo o fato de pela primeira vez ter posto os pés em um laboratório de verdade. Aí eu tive certeza de que era isso que eu queria para mim.

Muito Obrigada a todos. Essa tese é o resultado final da amizade, apoio e ajuda de todos vocês.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 - ESTUDO TAXONÔMICO DE *P. EMARGINATUS* VOG. (FABACEAE, DIPTERYXEA) BASEADO EM DADOS MORFOLÓGICOS E DE MARCADORES MOLECULARES DO TIPO RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)

..... **Erro! Indicador não definido.**

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	4
HISTÓRICO TAXONÔMICO	5
MATERIAL E MÉTODOS	9
AMOSTRA DE FOLHAS PARA PCR	9
EXTRAÇÃO DE DNA E ANÁLISE DE RAPD	10
SELEÇÃO DOS PRIMERS	11
ELETROFORESE	12
ANÁLISE DOS DADOS DE RAPD	12
ANÁLISE DOS DADOS MORFOLÓGICOS	14
COMPARAÇÃO COM FOTOTIPOS	15
RESULTADOS	16
DISCUSSÃO	25
BIBLIOGRAFIA	31

CAPÍTULO 2 - COMPARAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA, ESTIMADA POR MARCADORES RAPD, COM PARÂMETROS RELACIONADOS A ASPECTOS REPRODUTIVOS EM <i>PTERODON EMARGINATUS</i> VOG. E <i>PTERODON PUBESCENS</i> (BENTH.) BENTH., DUAS ESPÉCIES DE LEGUMINOSA ENDÊMICAS DO CERRADO.....	37
RESUMO	37
ABSTRACT	39
INTRODUÇÃO	41
SOBRE AS ESPÉCIES	45
MATERIAL E MÉTODOS	46
AMOSTRA DE FOLHAS PARA PCR	46
EXTRAÇÃO DE DNA E ANÁLISE DE RAPD	48
SELEÇÃO DE PRIMERS	49
ELETROFORESE	50
ANÁLISE DOS DADOS DE RAPD	50
AMOSTRAS DE FRUTOS E SEMENTES	52
ANÁLISES DOS DADOS DE FRUTOS E SEMENTES	54
AMOSTRAS DE PÓLEN	55
ANÁLISE DOS DADOS DE PÓLEN	56
ANÁLISE CONJUNTA DOS DADOS DE PÓLEN E DE PRODUÇÃO DE SEMENTES	57
AMOSTRAS DE PLÂNTULAS	57
RESULTADOS	59
VARIABILIDADE GENÉTICA	59

VIABILIDADE DE SEMENTE	66
PÓLEN	70
PÓLEN E SEMENTES	74
PLÂNTULAS	75
DISCUSSÃO	77
DIVERSIDADE GENÉTICA BASEADA EM MARCADORES RAPD	77
SEMENTES	84
PÓLEN	89
PLÂNTULAS	95
DIVERSIDADE GENÉTICA, SEMENTES, PÓLEN, PLÂNTULAS E CONSERVAÇÃO DAS ESPÉCIES.	96
CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
BIBLIOGRAFIA	102

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Estudo Taxonômico de <i>P. emarginatus</i> Vog. (Fabaceae, Dipteryxae) baseado em dados morfológicos e de marcadores moleculares do tipo RAPD (random amplified polymorphic DNA).	1
MATERIAL E MÉTODOS	9
Tabela 1 – Locais de coleta, número de indivíduos em cada amostra das duas formas (rósea e roxa) de <i>Pterodon emarginatus</i> .	9
RESULTADOS	16
Tabela 2 - Componentes de variância associados às diferenças entre formas; entre locais dentro de forma e entre indivíduos dentro de locais de <i>P. emarginatus</i>	19
Tabela 3 - Matriz de distância de Nei para 7 locais de coleta de amostras de <i>P. emarginatus</i> .	20
Tabela 4 – Coeficientes canônicos para cada uma das estruturas morfológicas consideradas nas duas formas de <i>P. emarginatus</i> .	22
Tabela 5 – Estatísticas descritivas das estruturas morfológicas utilizadas na Análise Canônica Discriminante das duas formas de <i>P. emarginatus</i> .	23

CAPÍTULO 2: Comparação da diversidade genética, estimada por marcadores RAPD, com parâmetros relacionados a aspectos reprodutivos em <i>Pterodon emarginatus</i> Vog. e <i>Pterodon pubescens</i> (Benth.) Benth., duas espécies de leguminosas endêmicas do cerrado.	37
MATERIAL E MÉTODOS	46
Tabela I – Locais de coleta, número de indivíduos em cada amostra de <i>Pterodon pubescens</i> .	46
Tabela II – Locais de coleta, número de indivíduos em cada amostra de <i>Pterodon emarginatus</i> .	47
Tabela III - Distâncias aproximadas em quilômetros, em linha reta, entre os diversos locais dos indivíduos estudados de <i>Pterodon pubescens</i> e <i>Pterodon emarginatus</i>	48
RESULTADOS	59
Tabela 1 – Número de bandas polimórficas encontradas para <i>Pterodon pubescens</i> e <i>P.emarginatus</i>	59
Tabela 2 – Percentagem de bandas polimórficas para cada localidade amostrada de <i>Pterodon pubescens</i> e <i>P.emarginatus</i>	60
Tabela 3 - Análise de variância molecular (AMOVA) para estimar e testar os componentes de variância associados à variação entre locais e entre indivíduos dentro de local em <i>Pterodon emarginatus</i>	65
Tabela 4 - Análise de variância molecular (AMOVA) para estimar e testar os componentes de variância associados à variação entre locais; entre indivíduos dentro de local em <i>Pterodon pubescens</i> .	65
Tabela 5 – Percentagem da variância entre dois locais de coleta em relação à variância total em <i>Pterodon pubescens</i>	65

Tabela 6 – Soma dos componentes de variância entre indivíduos dentro de local de coleta para as bandas de RAPD.	66
Tabela 7 – Resumo dos dados de frutos e sementes.	67
Tabela 8 – Percentagens de categorias de fruto e semente	68
Tabela 9 - Componentes de variância associados às diferenças para produção de sementes viáveis de <i>P.pubescens</i>	68
Tabela 10 - Componentes de variância associados às diferenças para produção de sementes viáveis de <i>P.emarginatus</i>	69
Tabela 11 - Componentes de variância associados às diferenças para produção de sementes viáveis, entre <i>Pterodon pubescens</i> e <i>P.emarginatus</i>	69
Tabela 12 – Percentagem de fertilidade de pólen em <i>Pterodon pubescens</i> e <i>P.emarginatus</i>	71
Tabela 13 - Componentes de variância associados às fontes de variação consideradas na análise da fertilidade de pólen em <i>Pterodon pubescens</i> e <i>P.emarginatus</i> .	72
Tabela 14 – Componentes de variância associados às fontes de variação consideradas na análise conjunta da fertilidade de pólen de <i>Pterodon pubescens</i> e <i>P.emarginatus</i> .	72
Tabela 15 – Resultados da ANOVA da fertilidade de pólen em função do tipo de flor em <i>Pterodon pubescens</i> e <i>P.emarginatus</i> .	73
Tabela 16 – Proporção média de pólen viável, para cada forma de flor em <i>Pterodon pubescens</i> e <i>P.emarginatus</i> .	73
Tabela 17 – Dados sobre plântulas para cada indivíduo mãe, para cada local, para as espécies <i>Pterodon pubecens</i> e <i>P.emarginatus</i> .	75

Tabela 18 – Resultados para análise estratificada da percentagem de sobrevivência de plântula por local de coleta para <i>Pterodon pubescens</i>	76
Tabela 19 – Resultados da análise estratificada da percentagem de sobrevivência de plântula por local de <i>Pterodon emarginatus</i>	76
Tabela 20 – Resultados para análise estratificada da percentagem de sobrevivência de plântulas por espécie	77
Tabela 21 – Coeficientes de correlação parcial de Spearman entre percentagem de pólen fértil, percentagem de sementes viáveis e sobrevivência de plântulas para 25 indivíduos de <i>Pterodon pubescens</i> e <i>P.emarginatus</i>	82

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Estudo <i>Taxonômico</i> de <i>P. emarginatus</i> Vog. (Fabaceae, Dipteryxae) baseado em dados morfológicos e de marcadores moleculares do tipo RAPD (random amplified polymorphic DNA).	1
INTRODUÇÃO	3
Figura 1 - Forma Rósea- <i>Pterodon pubescens</i>	4
Figura 2 - Forma Roxa - <i>Pterodon polygalaeiflorus</i>	4
RESULTADOS	16
Figura 3 – PCO (Principal coordinate analysis) baseado em dados RAPD para os 119 indivíduos de <i>P.emarginatus</i>	15
Figura 4 – Dendrograma apresentando as relações entre os 7 locais de coleta de amostras de <i>P.emarginatus</i> utilizando o método de agrupamento Vizinho mais Próximo sobre uma matriz de distâncias de Nei	17
Figura 5 – Gráfico de dispersão dos indivíduos das duas formas de <i>Pterodon emarginatus</i> segundo a primeira variável canônica discriminante.	18
 CAPÍTULO 2: Comparação da diversidade genética, estimada por marcadores RAPD, com parâmetros relacionados a aspectos reprodutivos em <i>Pterodon emarginatus</i> Vog. e <i>Pterodon pubescens</i> (Benth.) Benth., duas espécies de leguminosas endêmicas do cerrado.	35
RESULTADOS	59
Figura 1 – Dendrograma gerado pela análise de agrupamento, método da média das distâncias - UPGMA, a partir de 355 bandas RAPD de <i>Pterodon emarginatus</i>	62
Figura 2 – Dendrograma, método UPGMA, coeficiente de Dice, para dados RAPD (355 bandas) de <i>Pterodon pubescens</i>	63

Figura 3 – PCA (Principal Component Analysis) baseado na frequência de bandas RAPD dentro de cada localidade para as duas espécies, <i>Pterodon pubescens</i> e <i>P.emarginatus</i>	64
Figura 4 – Fotos de lâminas de grãos de pólen de <i>Pterodon</i> apresentando variação de tamanho e forma.....	70
Figura 5 – Média e intervalos de confiança da fertilidade de pólen das três categorias de flor, para <i>Pterodon pubescens</i> e <i>P.emarginatus</i> .	74

CAPÍTULO 1

Estudo Taxonômico de *Pterodon emarginatus* Vog. (Fabaceae, Dipteryxaceae) baseado em dados morfológicos e de marcadores moleculares do tipo RAPD (random amplified polymorphic DNA).

Resumo

Este trabalho utilizou marcadores moleculares do tipo RAPD e caracteres morfológicos para estudar a variação encontrada dentro de *P. emarginatus sensu* Lewis (Fabaceae, Papilionoideae, Dipteryxaceae). O objetivo foi verificar se o dimorfismo observado dentro deste *taxon* pode ser interpretado como variação dentro de uma mesma espécie ou se é indicativo de que *P. emarginatus sensu* Lewis engloba mais de uma entidade taxonômica, e neste caso, qual a relação entre cada uma dessas entidades bem como qual a melhor forma de nomeá-las. Lewis em uma publicação sobre Legumes da Bahia, considerou *P. pubescens* (Benth.) Benth. e *P. polygalaeflorus* (Benth.) Benth. como sinônimos de *P. emarginatus* Vog. e, desde então, vêm sendo consideradas como tais em vários bancos de dados botânicos. Entretanto, *P. emarginatus*, como proposto por Lewis, é uma espécie dimórfica com indivíduos de flores róseas, folhas pubescentes e com folíolos de ápice levemente retuso e indivíduos de flores roxas, folhas glabras e com folíolos de ápice fortemente emarginado. Não foram encontradas populações mistas contendo indivíduos das duas morfos (rósea e roxa) de *P. emarginatus sensu* Lewis. Os resultados obtidos, tanto para dados moleculares como para os morfológicos são concordantes e separam as duas formas (rósea e roxa) de *P. emarginatus sensu* Lewis. A análise molecular mostrou que 74% da variância encontrada é explicada pela diferença entre as formas rósea e roxa. A análise canônica discriminante empregada para analisar as diferenças entre as

formas baseado em dados morfológicos, permite separar as duas formas ($r=0,963$ $p<0,0001$). As análises anteriores, juntamente com os fototipos dos três *taxa*, permitiram concluir que *P. polygalaeflorus* é sinônimo de *P. emarginatus* Vog. e *P. pubescens* deve ser mantida como espécie distinta.

Abstract

RAPD markers and morphological characters were employed in order to study the variation observed in *Pterodon emarginatus sensu* Lewis (Fabaceae, Papilionoideae, Dipteryxaceae). The objective was to verify if the dimorphism observed in this *taxon* could be interpreted as variation within a species or if it indicates that *P. emarginatus sensu* Lewis contains more than one taxonomical entity and in this case, what is the relationship of them and how would be the best way to denominate them. In a publication about the legume species of Bahia (Brazil), Lewis has considered both *P. pubescens* (Benth.) Benth. and *P. polygalaeflorus* (Benth.) Benth. as synonyms of *P. emarginatus* Vog.. Since then, these two species have been treated as synonyms of *P. emarginatus* in many botanical databanks. However, *P. emarginatus* as proposed by Lewis, is a dimorphic species presenting individuals with pink flowers, pubescent leaves, and retuse folioles apex as well as plants with purple (violet) flowers, glabrous leaves and strong emarginate folioles apex. There is no mixed population of the two morphs (pink and violet) of *P. emarginatus sensu* Lewis in the field. The results of the AMOVA for RAPD markers showed that 74% of the observed variance was due to the difference between morphs pink and violet. The canonical discriminant analysis for morphological data agrees with molecular data showing a good separation of the two morphs ($r= 0,963$ $p<0,0001$). Those analyses together with the

phototypes for the three *taxa* under study indicate that *P.polygalaeflorus* is a synonym of *P.emarginatus* and *P.pubescens* should be maintained as a separate species.

Introdução

O gênero *Pterodon* Vog. (Fabaceae, Papilionoideae, Dipteryxae) é um gênero pequeno com seis espécies: *Pterodon apparicioi* Pedersoli, *P. macrophyllus* Klotzsch, *P. abruptus* (Moric.) Benth., *P. pubescens* (Benth.) Benth., *P. polygalaeflorus* (Benth.) Benth. e *P. emarginatus* Vog. (Polhill 1981, International Plant Names Index 2005). Entretanto, segundo a base de dados “W³ Tropicos” (Missouri Botanical Garden, 2005), o gênero tem três espécies: *P. abruptus*, *P. apparicioi* e *P. emarginatus*, sendo que *P. pubescens* e *P. polygalaeflorus* são colocadas como sinônimos de *P. emarginatus* enquanto que *P. macrophyllus* é considerado *nomen nudo*. A base de dados ILDIS - International Legume Database and Information Service (2005) cita apenas duas espécies para este gênero: *P. abruptus* e *P. emarginatus*, sendo que *P. apparicioi* é colocada como sinônimo de *P. emarginatus*, juntamente com *P. pubescens* e *P. polygalaeflorus* e *P. macrophyllus* não é citada nesta base de dados.

Parte dessa discrepância com relação ao número de espécies válidas de *Pterodon* está relacionada à delimitação das espécies *Pterodon emarginatus*, *P. polygalaeflorus* e *P. pubescens*. Lewis (1987), em seu livro “Legumes da Bahia”, apresentou *P. pubescens* e *P. polygalaeflorus* como sinônimos de *P. emarginatus*. Desde esta publicação, e apesar da mesma não se tratar de uma revisão do gênero, essas espécies têm sido tratadas de forma discrepante por autores diversos: ora como três *taxa* distintos, ora como dois, ora como apenas um.

P. emarginatus, como considerada por Lewis (1987), é uma espécie dimórfica com populações de indivíduos de flores que variam do rosa claro (quase branco) ao rosa escuro (figura 1); com folhas pubescentes e ápice dos folíolos levemente retuso e populações com

indivíduos de flores roxas/violetas (figura 2), folhas glabras e ápice dos folíolos fortemente emarginado.



Figura 1 – Morfo rósea de *Pterodon emarginatus sensu* Lewis. A) Detalhe de uma inflorescência. B) Indivíduos em flor.(fotos: DMS Rocha – população L4)



Figura 2 – Morfo roxa de *Pterodon emarginatus sensu* Lewis. – A) Detalhe de uma inflorescência. B) Árvore em flor.(fotos: DMS Rocha – população AE).

A distribuição geográfica de *P. emarginatus sensu* Lewis abrange o Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, São Paulo e Tocantins (Almeida *et al.* 1998).

Histórico taxonômico

P. emarginatus foi descrita por Vogel (1837), baseada em um material de Sellow sem número, coletado em Minas Gerais próximo ao Rio das Velhas. Na descrição, Vogel

sugeriu que a espécie seja arbórea, mas não tinha certeza; descreveu folhas com sete folíolos, glabros, ovato-oblongos, com ápice emarginado, não mencionando a cor da flor.

Bentham, também em 1837, publicou um trabalho descrevendo o gênero *Commilobium* com duas espécies: *C. polygalaeflorum* e *C. pubescens*. Esse mesmo trabalho foi publicado nos Anais do Museu de Viena, em 1840. Em trabalho publicado posteriormente, Bentham (1850), colocou o gênero *Commilobium* como sinonímia de *Pterodon*, fazendo referência a apenas o seu trabalho dos Anais de Viena de 1840. No trabalho de 1850, Bentham, apresentou duas combinações para *Pterodon*: *Pterodon abruptus* (Moric.) Benth. (*Commilobium abruptus* Moric.), *P. polygalaeflorus* (Benth.) Benth. (*Commilobium polygalaeflorum* Benth.) e considerou *Commilobium pubescens* Benth., sinônimo de *P. emarginatus* Vog..

Nas suas duas descrições anteriores de *Commilobium*, Bentham (1837,1840) descreveu *C. polygalaeflorum* como sendo uma espécie com folhas com 15 – 19 folíolos, ovato-lanceolados, glabros e com ápice truncado emarginado e *C. pubescens* tendo folhas com 21 – 25 folíolos, ovais oblongos, ápice emarginado e a base do peciólulo pubescente junto à ráquis.

Em outra publicação, Bentham (1860) retirou *Commilobium pubescens* da sinonímia de *P. emarginatus* criando uma nova combinação: *P. pubescens* (Benth.) Benth.. Neste mesmo trabalho o autor comentou que, embora ele não tivesse visto nenhum espécime de *P. emarginatus*, a menos que houvesse algum erro de impressão, a espécie descrita por Vogel diferiria de todas as outras (*P. polygalaeflorus*, *P. pubescens* e *P. abruptus*) por apresentar somente sete folíolos. Caso contrário, ele (Bentham) a teria considerado a mesma espécie que *P. polygalaeflorus* (Benth.) Benth. que foi descrita por ele como apresentando flores róseas, tal como *P. pubescens* (Benth.) Benth..

Até o momento não há uma revisão do gênero *Pterodon* e neste caso, todas as seis espécies descritas até o momento - *P. abruptus*, *P. pubescens*, *P. polygalaeflorus*, *P. emarginatus*, *P. apparicioi* e *P. macrophyllus* - deveriam ser consideradas espécies distintas. Entretanto, a maioria dos atuais bancos de dados tratam *P. pubescens* e *P. polygalaeflorus* como sinônimos de *P. emarginatus*, ocasionando confusão em relação a como autores diversos vem se referindo a esses nomes em suas publicações.

P. emarginatus, *P. pubescens* e *P. polygalaeflorus* vem sendo amplamente investigadas com relação aos compostos secundários produzidos por elas. A literatura é vasta e abrange áreas como fitoquímica, bioquímica, farmacologia e imunologia (Katz *et al.* 1993, Duarte *et al.* 1996, Carvalho & Caputo 1999, Paula *et al.* 2005).

Caso *P. emarginatus*, *P. pubescens* e *P. polygalaeflorus* sejam três *taxa* distintos, não há como saber, para os trabalhos publicados após o livro de Lewis (1987), qual interpretação os autores desses artigos deram para a espécie *P. emarginatus*: se *sensu* Vogel ou *sensu* Lewis. Se *P. pubescens* e *P. polygalaeflorus* forem sinônimos de *P. emarginatus* muitos desses trabalhos que se referem a espécies diferentes, estão se reportando a uma só espécie.

A falta de clareza quanto à delimitação de uma espécie é de importância para a sua conservação. *P. emarginatus sensu* Lewis é considerada uma espécie de ampla distribuição não estando, portanto, ameaçada ou em risco de extinção. Entretanto, a situação pode ser diferente se estivermos diante de três espécies cuja distribuição é mais restrita e menos conhecida, podendo ser muito mais raras ou estarem muito mais vulneráveis do que se supõe.

A espécie *P. emarginatus sensu* Lewis é uma espécie dimórfica e não se sabe qual a natureza biológica de tal dimorfismo. Poderia esse dimorfismo ser indicativo de que esta

espécie apresenta uma subestruturação? E neste caso como interpretar essas diferenças genéticas? Seriam elas indicativas de que a espécie *P. emarginatus sensu* Lewis apresenta mais de uma entidade biológica? E neste caso, como nomear essas entidades, uma vez que existem duas morfos e três nomes específicos distintos? Ou seriam, essas diferenças morfológicas, simplesmente variações da expressão fenotípica associada a algum fator do ambiente físico tal como tipo de solo ou o pH do mesmo?

Marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) podem ser de grande ajuda na delimitação de *taxa* problemáticos (Furman *et al.* 1997, Spooner *et al.* 1997, Coleman *et al.* 2000, Ferguson *et al.* 2000), sendo uma técnica relativamente barata, que fornece um número maior de marcadores do que isoenzimas (Ferreira & Grattapaglia 1995, Wolff & Morgan-Richards 1999). Os iniciadores (primers) utilizados são do tipo inespecífico, podendo ser usados em qualquer organismo sem que haja a necessidade de um conhecimento prévio de seqüências de DNA ou regiões ladeadoras de genes já seqüenciados. Desta forma, essa técnica pode ser utilizada em estudos de espécies nativas onde nada, ou quase nada, se conhece sobre suas histórias de vida e genética.

Este trabalho utilizou marcadores moleculares do tipo RAPD e caracteres morfológicos para estudar a variação encontrada dentro de *P. emargiantus sensu* Lewis. O objetivo é verificar se o dimorfismo observado dentro deste *taxon* pode ser interpretado como variação dentro de uma mesma espécie ou se é indicativo de que *P. emarginatus sensu* Lewis engloba mais de uma entidade taxonômica, e neste caso, qual a relação entre cada uma dessas entidades bem como qual a melhor forma de nomeá-las.

Material e métodos

Amostra de folhas para PCR

Amostras de folhas de 119 indivíduos de sete localidades distintas de *P. emarginatus* (*sensu* Lewis), foram coletadas para análise de DNA, procurando-se abranger as duas morfos observadas neste *taxon*: flores róseas e flores roxas (tabela 1).

Tabela 1 – Locais de coleta, número de indivíduos em cada amostra das duas formas (rósea e roxa) de *Pterodon emarginatus sensu* Lewis..

Amostra	Descrição do local de coleta	morfo	Nº indiv
Cenargen (CEN)	Plano Piloto de Brasília (DF), Setor de áreas isoladas norte (SAIN); por trás da Fundação Zoobotânica, ao lado da Delegacia de Polícia. Tipo de vegetação: cerrado (<i>sensu stricto</i>) muito degradado. 15° 44'S, 47° 57'O.	Rósea	10
Avenida L4 (L4)	Plano Piloto de Brasília (DF), ao longo da avenida L4 na altura do clube da Associação dos Funcionários da Universidade de Brasília (UnB) e por trás dos prédios da colina (moradia dos professores da UnB). Tipo de vegetação remanescente de cerrado (<i>sensu stricto</i>). 15° 47'S, 47° 55'O.	Rósea	20
Avenida das Nações (AV)	Plano Piloto de Brasília (DF), ao longo da Avenida das Nações Sul; entre entroncamento da Esplanada dos ministérios e STJ. Tipo de vegetação: remanescente de cerrado (<i>sensu stricto</i>). 15° 49'S, 47° 49'O.	Rósea	20
Jardim Botânico (JB)	Jardim Botânico de Brasília (DF). Tipo de vegetação: cerrado (<i>sensu stricto</i>). Área de preservação. 15° 52'S, 47° 50'O.	Rósea	20
Uberlândia (UBL)	Ao longo da Br 050, próximo à Uberlândia (MG)	Rósea	9
CPAC	Em áreas de cerrado (<i>sensu stricto</i>) e cerradão no CPAC (Centro Nacional de Pesquisas agropecuárias do Cerrado/Embrapa) (Planaltina, DF.). 15° 36'S, 47° 44'O.	Roxa	20
Águas Emendadas (AE)	Reserva Ecológica de Águas Emendas, Planaltina, DF. Tipo de vegetação; cerrado (<i>sensu stricto</i>). 15° 44'S, 47° 56'O.	Roxa	20
TOTAL	.		119

Os indivíduos que compuseram tanto a amostra JB (Jardim Botânico – morfo rósea) como a AE (Águas Emendadas – morfo roxa), localizavam-se em áreas de cerrado dentro de unidades de conservação – a primeira dentro do Jardim Botânico de Brasília e a segunda na Reserva Ecológica de Águas Emendadas. No CPAC os indivíduos de *P. emarginatus* (morfo roxa) distribuía-se em fitofisionomias diferentes, porém contíguas: cerrado sentido restrito e cerradão.

A amostra de indivíduos UBL (Uberlândia) – morfo rósea- foi formada por indivíduos distribuídos ao longo da rodovia BR-050 nas proximidades de Uberlândia.

As demais áreas onde foram coletadas as outras amostras da morfo rósea encontram-se em área urbana de Brasília, com diferentes tipos de perturbação.

Foram coletados ramos, com flores e quando possível, frutos, para exsiccatas de herbário de indivíduos das duas morfos. Esse material está depositado no Herbário da Universidade de Brasília (UB).

As amostras de folhas coletadas foram individualizadas em sacos plásticos, marcadas com o número da planta correspondente e mantidas dentro de um recipiente de isopor com gelo até chegar ao laboratório onde foram armazenadas a -20°C , até o momento da extração do DNA.

Extração de DNA e análise de RAPD

O DNA foi extraído em N_2 líquido pelo método de CTAB (Doyle & Doyle 1987) e o precipitado de DNA (“pellet”) obtido ressuspenso em 100 μl de TE (10mM Tris-HCl + 1mM EDTA + RNase pH 7,5).

Após extração, a concentração de cada amostra foi estimada a partir de comparações com uma série de 10 padrões de concentrações crescentes conhecidas. Em seguida, foram diluídas em tampão TE para obter uma concentração de 1,7ng/μl de DNA por amostra.

O volume final das reações foi de 10μl, contendo 3μl da solução diluída contendo o DNA, 1,5 U de Taq polimerase da Gibco, 20mM Tris pH 8,5, 2mM MgCl₂, 1,0 μl primer (Operon Technologies) e 2,6 μl dNTP .

Para as reações de amplificação dos fragmentos de DNA, foi empregado um termociclador (MJ Research Inc. minicycler PTC-100). As amostras foram submetidas a um programa de 40 ciclos:

- 39 ciclos de três minutos cada sendo: 1min. a 92⁰C, 1min. a 35⁰C, 1min. a 72⁰C.
- O 40° ciclo de 8 minutos sendo: 1min. a 92⁰C, 1min. a 35⁰C, e 6 minutos a 72⁰C.

Seleção dos primers

Uma amostra de 10 indivíduos de *P. emarginatus*, quatro da morfo roxa e seis da rósea, representando todas as localidades de coleta, foram usadas para testar 100 primers (Operon Technologies, Alameda, CA). Para a escolha dos primers, todas as reações foram repetidas por duas pessoas e duas vezes por pessoa. Somente os primers que reproduziram os mesmos padrões de bandas, nas quatro reações, e cujas bandas apresentaram boa definição e um padrão intenso, foram selecionados. A seguir, verificaram-se quais desses primers produziam o maior número de bandas polimórficas. Ao final, foram selecionados 32 primers (OPA: 8, 9; 11, 12; 17, 18; OPB:1, 10, 12; 16; 19, 20; OPC: 7, 9; 13, 14, 16, 17; OPX: 3, 4, 11, 16, 17, 20; OPY: 5, 7, 10, 14, 15, 18) que foram empregados como molde para as reações de PCR nos 119 indivíduos estudados.

Eletroforese

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, 0,5µl de brometo de etídio, tampão TBE (10mM TRIS, pH 8,3, 10mM ácido bórico, 1mM EDTA) (Maniatis *et al.* 1982). As bandas foram visualizadas em luz ultra-violeta (UV) e fotografadas (filme TriX-Pan asa 100).

Todas as bandas de maior intensidade foram levadas em consideração para as análises. Somente foram rejeitadas bandas de grande intensidade que ocorreram em uma frequência menor do que 5% nos 119 indivíduos amostrados.

Análise dos dados de RAPD

Cada indivíduo foi representado por um vetor cujos elementos assumem o valor 1 se uma dada banda está presente, ou 0 em sua ausência. A partir desses dados de presença/ausência de bandas foi obtida uma matriz de similaridade entre os 119 indivíduos, usando o coeficiente de Jaccard. Uma análise de PCO (Principal Coordinate Analysis), empregando o programa NTSYS-pc versão 2.0 (Rohlf 1997), gerou uma representação gráfica desta matriz.

As relações entre os 119 indivíduos amostrados, segundo os perfis de bandas de RAPD, obtidos com os 32 primers, foram avaliadas de acordo com uma estrutura hierárquica que considera os níveis: indivíduos dentro de local, local dentro de morfo e entre morfos. O objetivo desta análise foi quantificar como a variabilidade total se distribui segundo esta estrutura, obtendo-se estimativas dos componentes de variância associados às três fontes de variação: variância entre morfos, variância entre locais dentro de morfos e variância entre indivíduos dentro de local.

As estimativas dos componentes de variância associados aos diferentes níveis hierárquicos foram obtidos com a AMOVA (Analysis of Molecular Variance), mediante o uso do Arlequin (versão 2000) (Schneider *et al.* 2000). As estimativas dos componentes de variância, Va, Vb e Vc, obtidos com este procedimento equivalem à soma das estimativas destes componentes associados a cada banda. Os níveis de significância para estes componentes de variância são computados por procedimentos permutacionais.

O polimorfismo de DNA de um indivíduo avaliado através de RAPD é tratado como se fosse um haplótipo, pois não se pode considerar a variação dentro de indivíduo, por ser este marcador não-codominante. Ainda mais, estas bandas são consideradas, para fins de gerar as distribuições permutacionais utilizadas para se fazer os testes estatísticos, como um bloco de características que não se separam. Considera-se o perfil de RAPD como uma caracterização do indivíduo sem nenhuma referência a sua base genética. Cada banda é associada a um loco simplesmente como um recurso para quantificar a diferença entre indivíduos. Assim, é usual a literatura tratar os componentes de variância estimados com este tipo de polimorfismo como “estimate variance components for RAPD phenotypes” (Huff *et al.* 1993, Buso *et al.* 1998, Mockford *et al.* 1999).

Uma matriz de distâncias genéticas entre locais foi construída utilizando o número médio de diferenças de Nei (Nei & Li 1979) entre bandas RAPD. Assim, a distância entre os locais 1 e 2 foi estimada por:

$$D_{12} = \widehat{\pi}_{12} - (\widehat{\pi}_1 + \widehat{\pi}_2) / 2$$

onde
$$\widehat{\pi}_{12} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{k'} \delta_{ij} / k \cdot k'$$

e
$$\widehat{\pi}_1 = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{k'} \delta_{ij} / k \cdot (k' - 1)$$

sendo k e k' , o número de indivíduos nos locais 1 e 2; δ_{ij} , o número de bandas diferentes nos indivíduos i, j .

O teste de hipótese que estas distâncias (entre locais de coleta) sejam nulas foi conduzido usando procedimentos não paramétricos permutacionais, para cada conjunto de indivíduos dos dois locais envolvidos. Esta matriz de distâncias foi também utilizada em uma análise de agrupamento - método de Vizinho mais Próximo; NTSYS-pc versão 2.0 (Rolf 1997) - para mostrar, em um dendrograma, a estrutura de relação entre as localidades.

Análise dos dados morfológicos

Para analisar as características morfológicas das duas morfos, foram avaliados 10 atributos morfológicos de 30 exsicatas do herbário da Universidade de Brasília (UB) para cada morfo. Uma parte das exsicatas foi de indivíduos utilizados nas análises moleculares; outra parte foi de indivíduos coletados em outras regiões, representando uma distribuição mais ampla das duas morfos de *P. emarginatus sensu* Lewis. Para esta análise foram medidas as seguintes estruturas: número de folíolos, comprimento da folha, comprimento do pecíolo, comprimento do peciólulo, comprimento do folíolo, maior largura do folíolo, largura do ápice do folíolo, comprimento do ápice do folíolo, comprimento do botão e maior largura do botão. As medidas de comprimento da folha foram feitas com régua milimetrada, enquanto as demais medidas de comprimento, com paquímetro. Para as medidas de folha foram utilizadas cinco folhas por exsicata, ou o número máximo de folhas existentes na exsicata, quando abaixo de cinco. As medidas do folíolo foram tomadas fixando-se o folíolo do meio, independentemente do número de folíolos, uma vez que este

era o maior de cada folha. Esses dados foram submetidos a uma Análise Canônica Discriminante - Proc Candisc (SAS 1999).

Além dessas medidas foram também observadas a presença de pelos na ráquis e nas superfícies abaxial e adaxial dos folíolos.

Comparação com fototipos

Foram examinadas fotos dos holótipos dos três *taxa*:

Pterodon emarginatus Vog. – fototipo enviado pelo Field Museum of Natural History (Chicago, EUA). Esta foto em preto e branco é parte da coleção de fotos dos tipos do Herbário de Berlim tiradas entre 1929 e 1939, antes da II Guerra Mundial. Muitos holótipos do Herbário de Berlim foram destruídos durante a II Guerra, inclusive o de *P. emarginatus*.

P. pubescens (Benth.) Benth. (*Commilobium pubescens* Benth.) – fototipo recebido do Royal Botanic Gardens Kew (K) – Londres, Inglaterra. Este material foi identificado por H.C. de Lima em 1985 como sendo um holótipo e transferido pelo mesmo para *P. emarginatus* Vog..

P. pubescens (Benth.) Benth. (*Commilobium pubescens* Benth.) – fototipo adquirido por meio eletrônico do New York Botanical Garden, Nova Iorque, EUA. Este material foi identificado como possível isótipo.

P. polygalaeflorus (Benth.) Benth. (*Commilobium polygalaeflorus* Benth.) – fototipo enviado pelo Naturhistorisches Museum Wien (W) – Viena, Áustria.

P. polygalaeflorus (Benth.) Benth. (*Commilobium polygalaeflorus* Benth.) – fototipo enviado pelo Royal Botanic Gardens Kew (K) – Londres, Inglaterra. Este material

foi identificado por H.C. de Lima em 1985 como sendo um holótipo e transferido pelo mesmo para *P. emarginatus* Vog..

Resultados

As populações de *P. emarginatus sensu* Lewis com indivíduos de flores róseas e folhas pubescentes distribuem-se: no Plano Piloto de Brasília (DF) em direção ao sul, Triângulo Mineiro (MG), Estado de São Paulo e sul do Estado de Goiás (municípios de Goiânia, Caldas Novas, Mineiros, Santa Rita do Araguaia).

As populações com indivíduos de flores roxas e folhas glabras ocorrem em áreas mais ao norte do que a distribuição observada para as populações de flores róseas: no município de Planaltina (DF), norte de Goiás (municípios de Uruaçu, Minaçu, Alto Paraíso e São Domingos); Bahia (municípios de Correntina e Barreiras) e parecem estar associadas a solos mais ricos em carbonato de cálcio (E.M. Guimarães com.pess.).

Não foram encontradas populações mistas, ou seja, com indivíduos de ambas as morfos – flores róseas, folhas pilosas e flores roxas, folhas glabras. Entretanto, na população do Jardim Botânico de Brasília foram observados três indivíduos que apresentaram características morfológicas intermediárias entre as duas morfos. Os indivíduos intermediários possuíam ou a cor do cálice roxa e a corola rósea, ou flores com cálice róseo e a corola roxa. Com relação à morfologia e indumento dos folíolos, esses indivíduos tinham folhas com folíolos morfológicamente iguais aos observados para os indivíduos com flores róseas, mas os folíolos eram glabros em ambas as faces, como os folíolos observados para os indivíduos com flores roxas, ou glabros na face adaxial.

Os 32 primers utilizados para a análise de PCR utilizando o DNA genômico dos 119 indivíduos das duas morfos (79 indivíduos da morfo rósea e 40 da morfo roxa) produziram

325 bandas, das quais 287 foram polimórficas. A morfo rósea apresentou 182 bandas polimórficas, 63,4% de polimorfismo quando considerado somente as bandas polimórficas para o total de indivíduos analisados (descartando-se as bandas monomórficas para toda a amostra). A morfo roxa apresentou 133 bandas polimórficas (46,3% das bandas polimórficas).

Ao todo 47 bandas (16,4% das bandas polimórficas) discriminaram as duas morfos de *P. emarginatus sensu* Lewis, ou seja, foram bandas que foram monomórficas em uma das morfos mas não ocorreram na outra. A morfo roxa apresentou 30 bandas exclusivas (10,4% das bandas polimórficas) e a morfo rósea 17 (0,06%). Outras 102 bandas foram do tipo, polimórficas em uma das morfos mas não ocorreram em nenhum dos indivíduos da outra morfo.

A análise de PCO (Principal Coordinate Analysis) obtida a partir da matriz de dados de coeficiente de similaridade entre indivíduos (coeficiente de Jaccard) separou as duas morfos (figura 3). A primeira dimensão explicou 46,5% da variância e separou perfeitamente as duas morfos. A segunda dimensão explicou 2,2% e a terceira 1,7%. Ao todo as três primeiras dimensões explicaram 50,4% da variância total. As dimensões 2 e 3 separam os indivíduos da morfo rósea. Os indivíduos da morfo roxa permanecem muito próximos mesmo quando visualizados na dimensão 3. Isso provavelmente é decorrente do fato dos indivíduos da morfo rósea apresentarem somente 17 bandas monomórficas enquanto os indivíduos da morfo roxa 30.

Vale ressaltar, que o indivíduo JB02, que se destacou na figura 2 dos demais indivíduos da morfo rósea, foi o único indivíduo classificado como pertencente à morfo rósea que apresentou, além das bandas monomórficas que ocorreram na morfo rósea, sendo inexistentes na roxa, várias das bandas monomórficas da morfo roxa, inexistentes na rósea.

Além disso, este indivíduo apresentou características morfológicas intermediárias às duas morfos: cálice roxo, corola rósea; folíolos morfológicamente iguais aos da morfo rósea e glabros na face adaxial.

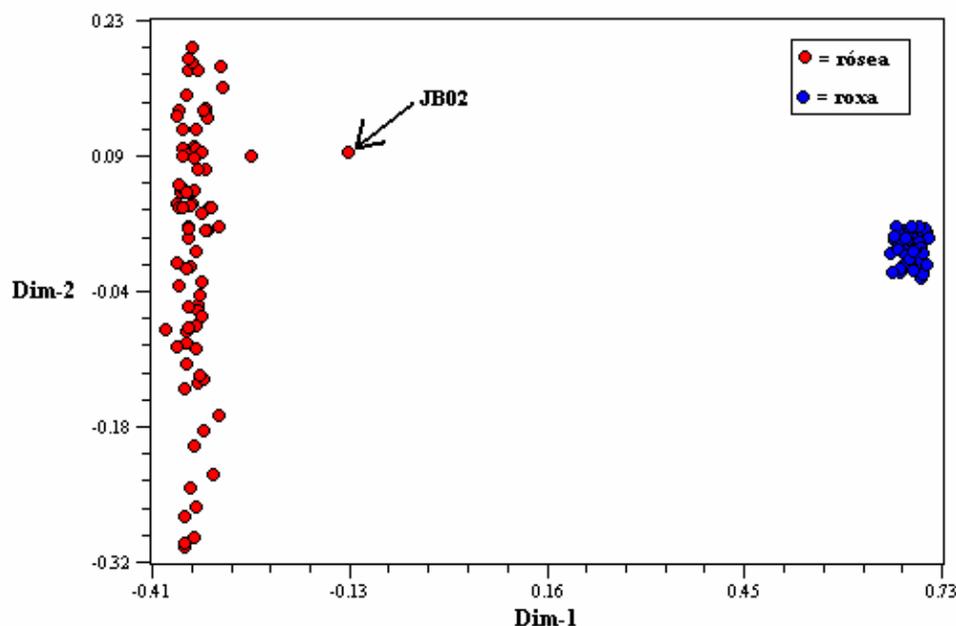


Figura 3 – PCO (Principal Coordinate Analysis) baseado em dados RAPD para os 119 indivíduos de *P. emarginatus sensu* Lewis. Primeira dimensão: 46,5% ; segunda dimensão: 2,2%. Morfo rósea = círculos em vermelho; morfo roxa = círculos em azul. Indivíduo JB02 – seta – apresentou bandas que são monomórficas na morfo roxa e que não ocorreram nos demais indivíduos da rósea.

O resultado da AMOVA (tabela 2) mostrou que 74,4% da variância total está associada à diferença entre morfo – rósea e roxa – ($p=0,047$) e que apenas 2,8% da variância explica a diferença encontrada entre as localidades de uma mesma morfo ($p<0,001$). Portanto, a um nível de significância de 5% rejeita-se a hipótese de que as variações observadas entre as morfos de *P. emarginatus sensu* Lewis possam ser atribuídas a uma variação amostral.

Tabela 2 - Componentes de variância associados às diferenças entre morfos; entre locais dentro de morfo e entre indivíduos dentro de locais de *Pterodon emarginatus sensu* Lewis, baseados 317 bandas RAPD, usando AMOVA (Molecular Analysis of Variance). g.l.=graus de liberdade.

Fonte de Variação	g.l.	Soma dos quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação	Prob ¹
Entre morfos	1	3397,554	62,775	74,43	0,047
Entre locais dentro de morfos	5	285,080	2,317	2,75	< 0,001
Entre indivíduos dentro de local	112	2155,433	19,245	22,82	< 0,001
Total	118	5838,067	84,337		

¹ Prob: probabilidade de obter um maior componente de variância, por acaso, sob a hipótese nula que o componente de variância seja zero; o valor de prob. é estimado a partir de 30.000 permutações.

As distâncias de Nei, calculadas a partir da frequência de bandas RAPD para as 7 localidades (tabela 3 e figura 4), mostraram que a menor distância entre locais foi de 2,12, verificada entre as localidades da morfo roxa: Estação Ecológica de Águas Emendadas (AE) e Embrapa Cerrados (CPAC). Com relação às localidades correspondentes aos indivíduos da morfo rósea, a menor distância observada foi de 3,74 entre L4 e Avenida das Nações (AV), enquanto que a maior distância observada entre localidades da morfo rósea foi de 9,09 e ocorreu entre Uberlândia (UBL) e Jardim Botânico de Brasília (JB), duas localidades separadas por cerca de 350 km. Por outro lado, a menor distância entre localidades de morfos distintas foi observada entre CPAC (morfo roxa) e L4 (morfo rósea), sendo de 126,06, muito maior do que qualquer uma das distâncias entre localidades de uma mesma morfo (figura 4). Os dendrogramas obtidos com a utilização de outros métodos de agrupamento foram muito semelhantes e, não estão apresentados aqui.

Tabela 3 - Matriz de distância de Nei para 7 locais de coleta de amostras de *Pterodon emarginatus sensu* Lewis. Morfo roxa: Ae e CPAC Morfo rósea: Cen, Ubl, Av, L4 e JB.

	AE	CPAC	CEN	UBL	AV	L4	JB
AE	0						
CPAC	2,12	0					
CEN	134,36	128,47	0				
UBL	134,11	128,60	5,01	0			
Av	132,80	127,74	5,66	5,60	0		
L4	131,51	126,06	6,41	8,30	3,74	0	
JB	132,08	126,45	6,38	9,09	4,61	3,95	0

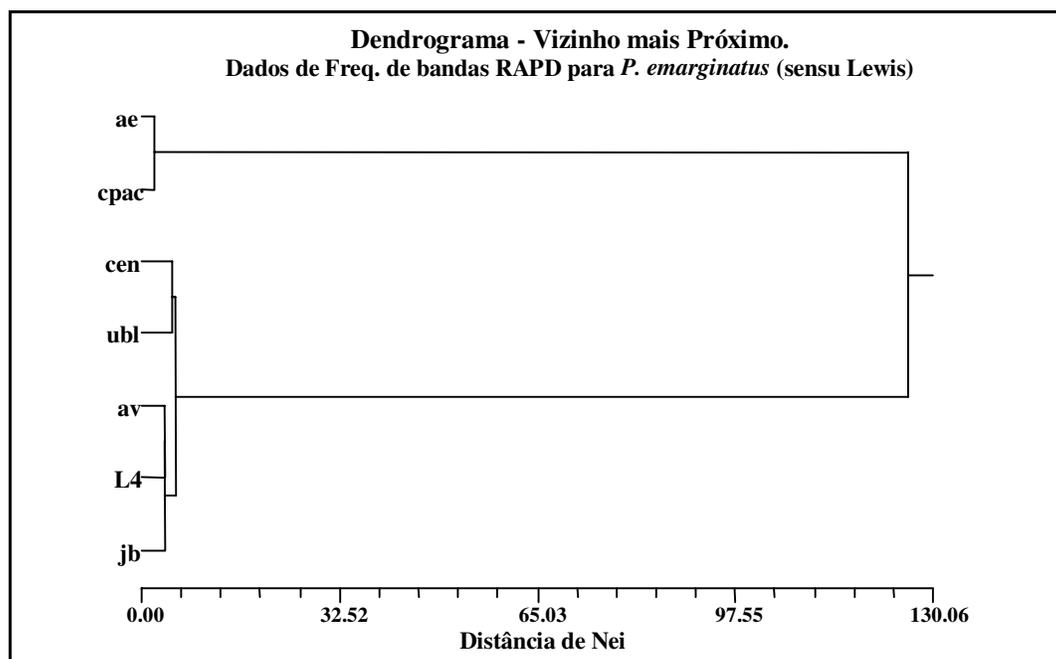


Figura 4 – Dendrograma apresentando as relações entre os 7 locais de coleta de amostras de *Pterodon emarginatus* utilizando o método de agrupamento Vizinheiro mais Próximo sobre uma matriz de distâncias de Nei.

Morfo Roxa: Ae e CPAC Morfo Rósea: Cen, Ubl, L4, Av e JB.

A Análise Canônica Discriminante, baseada nas medidas das características morfológicas de exsicatas separou perfeitamente as duas morfos, rósea e roxa de *P. emarginatus sensu* Lewis (figura 5). O coeficiente de correlação canônica foi $r=0,963$ ($p <$

0,001), ou seja, cerca de 93% da variação total da variável canônica é explicada pela variação encontrada entre as morfos rósea e roxa. As variáveis que mais contribuíram para a discriminação das duas morfos foram: comprimento do folíolo, número de folíolos e largura do botão, com coeficientes canônicos de 1,090, 0,984 e -0,891, respectivamente (tabela 4).

Dos 10 atributos morfológicos usados para avaliar a variação morfológica das duas morfos de *P. emarginatus sensu* Lewis, apenas 4 (comprimento do ápice, comprimento do botão, comprimento do peciólulo e largura do ápice) não apresentaram distribuição normal. Os indivíduos da morfo roxa apresentaram, em geral, folíolos maiores e mais largos que os da morfo rósea (tabela 5). Em relação à morfologia e largura do botão, os indivíduos da morfo rósea tiveram botões alongados, com a base de mesma largura que o ápice. Os botões da morfo roxa apresentaram a base mais estreita do que o ápice, que é arredondado. A maior largura dos botões da morfo roxa é maior do que a dos botões da morfo rósea.

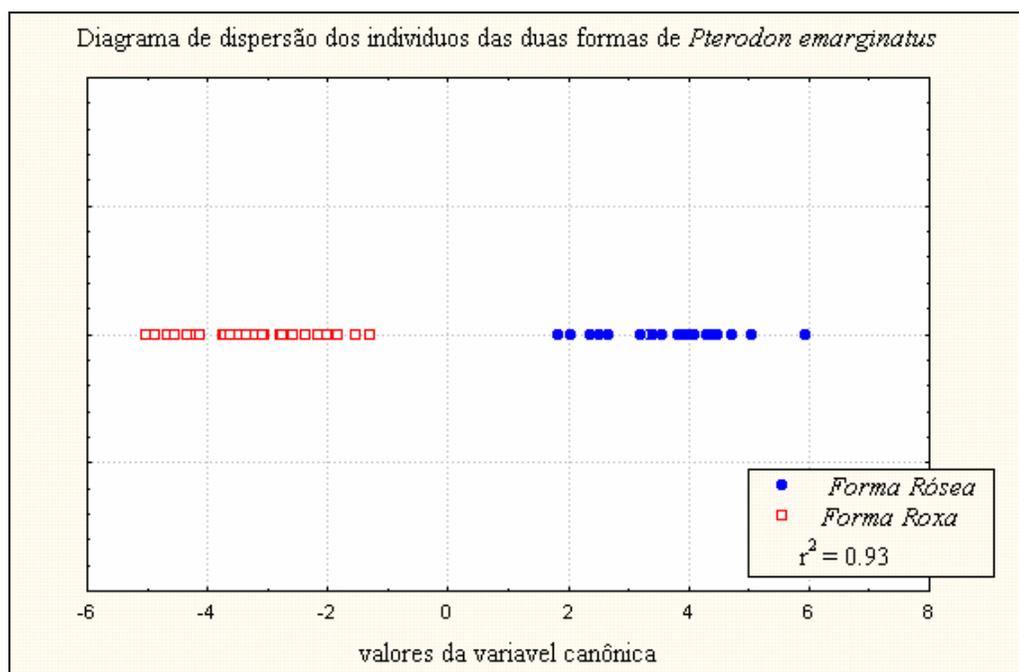


Figura 5 – Gráfico de dispersão dos indivíduos das duas morfos de *Pterodon emarginatus sensu* Lewis segundo a primeira variável canônica discriminante. $r = 0,963$ ($p < 0,0001$).

Tabela 4 – Coeficientes canônicos para cada uma das estruturas morfológicas consideradas nas duas morfos de *Pterodon emarginatus sensu* Lewis.

Atributos	Coef. canônicos
Comprimento folíolo	1,090
Número de folíolos	0,984
Largura botão	- 0,891
Comprimento folha	- 0,572
Comprimento peciólulo	- 0,427
Comprimento botão	0,352
Largura folíolo	- 0,377
Largura ápice	- 0,348
Comprimento pecíolo	- 0,123
Comprimento ápice	0,031

Tabela 5 – Média e limites de confiança (inferior e superior) das estruturas morfológicas utilizadas na Análise Canônica Discriminante das duas morfos de *Pterodon emarginatus*. Nrósea = 30; Nroxa = 30

Estrutura Morfológica	Morfo					
	Rósea			Roxa		
	Média	inferior	superior	Média	inferior	superior
Número de Folíolos	12,26	11,69	12,88	7,09	6,79	7,41
Comprimento da Folha (cm)	17,67	16,60	18,70	14,42	13,49	15,38
Comprimento do Pecíolo (cm)	2,04	1,87	2,19	2,67	2,44	2,88
Comprimento do Folíolo (cm)	3,15	3,02	3,28	3,41	3,17	3,65
Largura do Folíolo (cm)	1,13	1,08	1,18	1,70	1,55	1,84
Comprimento do Ápice (cm)	0,04	0,03	0,05	0,14	0,11	1,17
Largura do Ápice (cm)	0,41	0,37	0,46	0,91	0,81	1,01
Comprimento do Botão (cm)	0,99	0,96	1,03	1,12	1,06	1,17
Largura do Botão (cm)	0,40	0,38	0,41	0,61	0,57	0,64
Comprimento peciólulo (cm)	0,26	0,17	0,36	0,27	0,25	0,29

As exsicatas analisadas para as medidas morfológicas deste trabalho, bem como as observações de campo, mostraram variação no número de folíolos por folha (contados apenas em um lado da folha) de 4 a 9 (média de 7,11) nos indivíduos da morfo roxa. Um único indivíduo desta morfo apresentou uma das folhas com 11 folíolos. Para a morfo rósea o número de folíolos variou de 10 a 19 por folha (média de 12,31). Para esta morfo 6 indivíduos apresentaram alguma das folhas com menos do que 10 folíolos. Em quatro indivíduos uma das folhas contadas tinha apenas 9 folíolos e os outros dois indivíduos,

provenientes da população do Jardim Botânico de Brasília, apresentaram alguma das folhas com menos do que 9 folíolos. Um desses indivíduos apresentou folhas variando de 6 a 10 folíolos e o outro, de 8 a 12. Esses dois indivíduos também apresentaram características quanto à cor da flor e pilosidade dos folíolos intermediários entre as duas morfos. O número de folíolos foi a segunda variável que mais contribuiu para a discriminação entre as morfos (variável canônica=0,98).

O número de folíolos pôde também ser contado a partir dos fototipos. *P. emarginatus* Vog. (fototipo do Field Museum of Natural History) apresentou 7 folíolos por folha, conforme a descrição de Vogel (1837) e morfologicamente semelhantes aos observados na morfo roxa. Entretanto, este material continha apenas frutos jovens e flores velhas, não tendo sido possível observar a morfologia dos botões florais.

P. polygalaeflorus (Benth.) Benth. (*Commilobium polygaliflorum* Benth.), fototipo do Naturhistorisches Museum Wien, apresentou folhas com de 4 a 6 folíolos. *P. polygalaeflorus* (Benth.) Benth. (*Commilobium polygaliflorum* Benth.), fototipo do Royal Botanic Gardens – Kew, identificado como holótipo por H.C. de Lima, apresentou folhas com 7 a 8 folíolos. A morfologia dos folíolos e dos botões florais, em ambos os fototipos examinados, foram similares à observada para a morfo roxa.

P. pubescens (Benth.) Benth. (*Commilobium pubescens* Benth.), fototipo recebido do Royal Botanic Gardens – Kew, apresentou folhas com de 11 a 13 folíolos morfologicamente semelhantes aos da morfo rósea. Este material estava com frutos, não tendo sido possível observar a morfologia dos botões. Entretanto o possível isótipo obtido do New York Botanical Garden apresenta flores semelhantes morfologicamente às observadas para a morfo rósea.

Com relação aos caracteres qualitativos analisados, verificou-se que todas as exsicatas analisadas para a morfo roxa apresentaram folhas com folíolos glabros em ambas as faces e a ráquis glabra ou glabrescente, jamais pubescente. Com relação à morfo rósea, 92% dos indivíduos analisados apresentaram pubescência em ambas as faces dos folíolos. Os indivíduos que apresentaram qualquer uma das faces dos folíolos totalmente glabra também apresentaram características de cor de flor intermediárias às das duas morfos. Dois deles foram os mesmos que também apresentaram alguma das folhas com menos do que 9 folíolos. A ráquis dos indivíduos da morfo rósea variou de densamente pubescente a pubescente.

Discussão

Todas as análises realizadas a partir dos dados moleculares separaram perfeitamente os 119 indivíduos em dois grupos distintos. Um dos grupos reuniu os 79 indivíduos com flores róseas e o outro, os 40 indivíduos com flores roxas.

O número de fragmentos que discriminou as duas morfos de *P. emarginatus sensu* Lewis foi 47. A morfo rósea apresentou 17 bandas monomórficas e exclusivas desta morfo e a morfo roxa apresentou 30 bandas.

O número de bandas que discriminou as duas morfos foi muito maior do que o encontrado em um estudo para duas espécies de vinhático, *Plathymenia foliosa* (espécie da Mata Atlântica) e *P. reticulata* (espécie do Cerrado), no qual somente 4 bandas, em um total de 84 marcadores, foram do tipo espécie específica (Lacerda *et al.* 2002). Em um outro estudo, envolvendo duas espécies de carvalho, *Quercus grisea* e *Q. gambelii*, somente 14 bandas específicas foram reconhecidas para um total de 700 primers utilizados (Howard 1997 *apud* Wolff & Morgan-Richards 1999).

Tanto a análise de agrupamento quanto a de ordenação (PCO) separam as duas morfos de *P. emarginatus sensu* Lewis. A primeira dimensão da análise de PCO separa as duas morfos de *P. emarginatus sensu* Lewis explicando 46,5% da variância total. Esta percentagem é mais alta do que a obtida em outros trabalhos usando RAPD como uma ferramenta na elucidação dos limites entre espécies próximas. Na separação de três espécies de *Taxus*, Collins *et al* (2003) obtiveram 36,9% para as duas primeiras dimensões. Coleman *et al* (2000) aplicando a mesma análise na taxonomia de *Ulmus* encontraram valores de 18,41% e 27,52% para a primeira dimensão do PCO em duas das combinações entre espécies. Em um outro trabalho, sobre taxonomia de *Juniperus*, a primeira dimensão do PCO explicou 22% da variância (Adams *et al* 2002).

As inferências obtidas através da AMOVA confirmaram os resultados obtidos nas análises descritivas. Estes testes indicaram que os resultados encontrados não suportam a hipótese de que a variação genética captada pelos marcadores RAPD distribuiu-se ao acaso entre os indivíduos amostrados. A variância associada à diferença entre morfos (74,43% da variância total) foi maior do que a encontrada para as espécies *Plathymenia foliosa* e *P. reticulata* – 60,5% (Lacerda *et al* 2002) e é muito maior do que a observada para a diferença entre locais de uma mesma morfo (2,75%).

A análise canônica discriminante permitiu separar perfeitamente as duas morfos – rósea e roxa de *P. emarginatus sensu* Lewis, corroborando com os dados moleculares.

A concordância entre os resultados obtidos com os dois tipos de marcadores – molecular e morfológico – indicou que o dimorfismo observado em *P. emarginatus sensu* Lewis não pode ser explicado como simples variação fenotípica devido a diferenças de fatores externos, e sim que existe um componente genético associado a essas diferenças morfológicas e que, portanto, essa espécie apresenta uma subestruturação interna.

A floração das duas morfos bem como os principais polinizadores são distintos. A morfo roxa floresce um pouco mais cedo, com pico em meados de agosto e a morfo rósea apresenta um pico de floração no início de setembro (Afonso 1997). A morfo roxa é polinizada por *Bombus morio* enquanto que a morfo rósea por *Bombus attratus* (Afonso 1997). Esses dados corroboram com os dados moleculares e morfológicos obtidos, reforçando as evidências de que as duas morfos são geneticamente diferentes.

Bentham (1860) distinguiu *P. emarginatus* Vog. de *P. polygalaeflorus* (Benth.) Benth. devido à diferença quanto ao número de folíolos. *P. emarginatus* apresentando 7 folíolos e *P. polygalaeflorus* de 15 a 19 folíolos. Entretanto, no material examinado, somente um indivíduo da morfo roxa apresentou uma folha com 11 folíolos e os fototipos examinados desta espécie apresentaram de 4 a 8 folíolos quando contados de um único lado da ráquis. Por outro lado, Bentham (1860) descreveu *P. pubescens* como possuindo de 21 a 25 folíolos, mas nenhum dos indivíduos da morfo rósea apresentou mais do que 19 folíolos (contados de um único lado da ráquis). O número de folíolos observado no fototipo *P. pubescens* do material depositado em Kew apresentou de 11 a 13 folíolos. Parece provável que este autor, quando descreveu pela primeira vez as duas espécies *Commilobium pubescens* e *C. polygalaeflorum*, hoje transferidas para *Pterodon* (Bentham 1850), tenha contado todos os folíolos da folha, de ambos os lados da ráquis. Desta forma, *P. polygalaeflorus* de Bentham teria, de fato, de 7 a 10 folíolos em um dos lados da ráquis e *P. pubescens* de 10 a 18, o que concorda tanto com a descrição de Vogel, para *P. emarginatus*, como com as observações realizadas neste trabalho para as duas morfos e com as contagens de folíolos realizadas a partir das fotos dos tipos. Entretanto, seu comentário sobre os dois taxa, *P. emarginatus* e *P. polygalaeflorus* (Bentham 1860) parece indicar que esse autor

não tenha atentado para a possibilidade de que o modo de contar os folíolos, entre ele e Vogel pudesse ter sido distinto.

As flores de *P. pubescens* foram descritas por Bentham (1850) como sendo um pouco menores que as de *P. polygalaeflorus*. No presente trabalho, as medidas de botão floral para as duas morfos também mostraram que, tanto o comprimento e especialmente a largura dos botões da morfo rósea, foram significativamente menores que os da morfo roxa.

Com relação aos fototipos analisados observou-se que os tipos de *P. polygalaeflorus* apresentaram o mesmo número de folíolos e a mesma morfologia daqueles observados no holótipo de *P. emarginatus*. A morfologia dos folíolos desses materiais assemelhou-se a observada nos indivíduos da morfo roxa.

O holótipo de *P. pubescens* apresentou o mesmo número e a mesma morfologia dos folíolos dos indivíduos da morfo rósea.

Não há uma medida absoluta de diferença genética que permita definir quando duas populações de indivíduos devem ser consideradas espécies diferentes. Entretanto o exame dos dados genéticos e morfológicos, juntamente com outras informações tais como, distribuição geográfica, época de floração e polinizadores, permite sugerir que as duas morfos observadas na espécie *P. emarginatus sensu* Lewis sejam distintas o suficiente para serem tratadas como duas espécies.

Durante este trabalho foi possível identificar três indivíduos com características morfológicas intermediárias entre as duas morfos de *P. emarginatus sensu* Lewis. Um deles, JB02, que fez parte da análise molecular, apresentou vários dos marcadores RAPD que foram monomórficos na morfo roxa, mas que não ocorreram nos indivíduos analisados da morfo rósea. Esses dados sugerem que essas espécies sejam capazes de formar híbridos naturais nas áreas de contato de distribuição entre as duas. O número de cromossomos dos

dois *taxa* é o mesmo (n=8) (Goldblat 1981) o que, talvez, possa facilitar a formação de híbridos naturais.

Hibridação entre espécies de plantas próximas está bem documentada literatura (Martin & Cruzan 1999, Wolff & Morgan-Richards 1999, Epperson *et al.* 2001) e não é considerada um impedimento para reconhecer, como espécies distintas, aquelas capazes de formar híbridos naturais nas áreas de contato de suas distribuições. Os indivíduos considerados como híbridos encontrados no presente estudo foram poucos e todos pertenciam à população do Jardim Botânico de Brasília (JB). Esse dado sugere que, pelo menos em Brasília, hibridação é um evento raro e não justificaria considerar as duas morfos como pertencentes a uma mesma entidade taxonômica.

Todos os dados analisados neste trabalho levam-nos a concluir que as duas morfos de *P. emarginatus sensu* Lewis sejam duas espécies distintas. As comparações entre o material de herbário e de campo, com os fototipos, mostraram que a morfo rósea corresponde à espécie *P. pubescens* (Benth.) Benth. e que *P. polygalaeiflorus* (Benth.) Benth. e *P. emarginatus* Vog. são a mesma espécie, correspondendo à morfo roxa. Neste caso, considerando-se a prioridade de publicação, o nome válido para a espécie é *P. emarginatus* Vog. sendo *P. polygalaeiflorus* (Benth.) Benth. um sinônimo desta.

Essas duas espécies podem ser distinguidas pelas seguintes características morfológicas:

P. emarginatus, possui folhas com 4 – 10 folíolos (geralmente 6-8), glabros, ovados, folíolos com ápice de truncado a fortemente emarginado; ráquis glabra ou glabrescente, flores roxas e os botões apresentam forma obovada, ápice bem arredondado e mais largo que a base.

P. pubescens, possui folhas com 6 – 19 folíolos (geralmente 11-13), pubescentes em ambas as faces, elípticos a levemente ovados, folíolos com ápice de levemente retuso a arredondado; ráquis denso pubescente, flores variando de róseo claro, quase branco, a róseo escuro, botões com forma alongada, o ápice e base apresentando a mesma largura.

Bibliografia

ADAMS, R.P., HSIEH, C.F, MURATA, J. & PANDEY, R.N. 2002. Systematics of *Juniperus* from eastern Ásia base don random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochemical Systematics and Ecology*. 30:231-241.

AFONSO, A.P. 1997. Biologia reprodutiva de *Pterodon pubescens* Benth. e *Pterodon polygalaeflorus*. Benth. (Fabaceae – Papilionoideae) em áreas de cerrado do Distrito Federal. Tese de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília.

ALMEIDA, S.P., PROENÇA, C.E.B., SANO, S.M. & RIBEIRO, J.F. 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. Embrapa-CPAC, Planaltina, DF.

BENTHAM, G. 1837. Commentationes de Leguminosarum Generibus p.46-47.

BENTHAM, G. 1840. De Leguminosarum Generibus. *Annalen des Wiener Museums der Naturgeschichte*, p.110-111.

BENTHAM, G. 1850. Report on the plants collected by Mr. Spruce at Para. *In* Hooker's *Journal of Botany and Kew Garden Miscellany* Hooker's J. Bot. Kew Gard. Misc (J.D. Hooker, ed). v.2, p.235-236.

BENTHAM, G. 1860. A tribe of Leguminosae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 4 (suppl):127-128.

BUSO, G.S.C., RANGEL, P.H. & FERREIRA, M.E. 1998. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. *Molecular Ecology* 7: 107-117.

CARVALHO, J.C.T., CAPUTO, L.R.G. 1999. Anti-inflammatory activity of the crude extract from fruits of *Pterodon emarginatus* Vog.. *Journal of Ethnopharmacology* 64:127-133.

COLEMAN, M., HOLLINGSWORTH, M.L. & HOLLINGSWORTH, P.M. 2000. Application of RAPDs to the critical taxonomy of the english endemic elm *Ulmus plotii* Druce. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133: 241-262.

COLLINS, D., MILL, R.R. & MÖLLER, M. 2003. Species separation of *Taxus baccata*, *T. canadensis*, and *T. cuspidata* (Taxaceae) and origins of their reputed hybrids inferred from RAPD and cpDNA data. *American Journal of Botany* 90: 175-182.

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

DUARTE, I.D.G., FERREIRA-ALVES, D.L., PILÓ-VELOSO, D. & NAKAMURA, M. 1996. Evidence of involvement of biological amines in the anticonceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeiflorus* Benth. *Journal of Ethnopharmacology* 55: 13-18.

EPPERSON, B.K., TELEWSKI, F.W., PLOVANICH-JONES, A.E. & GRIMES, J.E. 2001. Clinal differentiation and putative hybridization in a contact zone of *Pinus ponderosa* and *P. arizonica* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 88: 1052-1057.

FERGUSON, M.E., MAXTED, N., VAN SLAGEREN, M. & ROBERTSON, L.D. 2000. A re-assessment of the taxonomy of *Lens* Mill. (Leguminosae, Papilionoideae, Vicieae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 133: 41-59.

FERREIRA, M. & GRATTAPAGLIA, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária – MAARA, Embrapa, Cenargen, Brasília.

FURMAN, B.J., GRATTAPAGLIA, D., DVORAK, W.S. & O'MALLEY, D.M. 1997. Analysis of genetic relationships of Central American and Mexican pines using RAPD markers that distinguish species. *Molecular Ecology* 6: 321-331.

GOLDBLATT, P. 1981. Cytology and the phylogeny of Leguminosae. *In* *Advances in legume systematics* (R.M. Polhill & P.M. Raven, ed.). Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, England, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, part 2, p.427-463.

HUFF, D.R., PEAKALL, R. & SMOUSE, P.E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 927-934.

INTERNATIONAL LEGUME DATABASE & INFORMATION SERVICE. *Pterodon*.
09/07/2005. <http://www.ildis.org/LegumeWeb/>

INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX. *Pterodon*. 09/07/2005.
<http://www.ipni.org/index.html>

KATZ, N., MENDES, N.M. & ARAÚJO, N. 1993. Atividade quimioprofilática na esquistossomose mansoni de sabonetes contendo óleo essencial de frutos de *Pterodon pubescens*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 35: 183-191.

LACERDA, D.R., LEMOS FILHO J.P., ACEDO, M.D.P. & LOVATO, M;B. 2002. Molecular differentiation of two vicariant neotropical tree species, *Plathymenia foliosa* and *P.reticulata* (Mimosoideae), inferred using RAPD markers. Plant Systematics and Evolution 235: 67-77.

LEWIS, G.P. 1987. Legumes of Bahia. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, England.

MANIATIS, T., FRISCHT, E.F. & SAMBROOK, J. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, Cold Spring Harbor, New York.

MARTIN, L.J. & CRUZAN, M.B. 1999. Patterns of hybridization in *Piriqueta caroliniana* complex in central Florida: evidence for an expanding hybrid zone. Evolution 53: 1037-1049.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. "W³TROPICOS". *Pterodon*. 09/07/2005.
<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>.

MOCKFORD, S.W., SNYDER, M. & HERMAN, T.B. 1999. A preliminary examination of genetic variation in a peripheral population of Blanding's turtle, *Emydoidea blandingii*. *Molecular Ecology* 8:323-327.

NEI, M. & LI, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceeding of the National Academy of Science of USA*. 76: 5269-5273.

PAULA, F.B.A., GOUVÊA, C.M.C.P., ALFREDO, P.P. & SALGADO, I. 2005. Protective action of a hexane crude extract of *Pterodon emarginatus* fruits against oxidative and nitrosative stress induced by acute exercise in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 5. Encontrado em: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/5/17>.

POLHILL, R.M. 1981. Dipteryxae. *In* *Advances in Legume Systematics* (R.M. Polhill & P.H. Raven, ed.). Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, England, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, part 1, p. 231-232.

ROHLF, F.J. 1997. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Exeter Software, New York.

SAS 1999. SAS/STAT User's Guide , Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC.

SCHNEIDER, D., ROESSLI, D. & EXCOFFIER, L. 2000. Arlequin ver 2: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

SPOONER, D.M., UGARTE, M.L. & SKROCH, P.W. 1997. Species boundaries and interrelationship of two closely related sympatric diploid wild potato species, *Solanum astleyi* and *S. boliviense*, based on RAPDs. Theoretical and Applied Genetics 95: 764-771.

VOGEL, T.H. 1837. Linnaea. 11: 384-385.

WOLFF, K. & MORGAN-RICHARDS, 1999. The use of RAPD in the analysis of population genetic structure: case studies of *Alkanna* (Boraginaceae) and *Plantago* (Plantaginaceae). In Molecular Systematics and Plant Evolution (P.M.Hollingsworth, R.M. Bateman & R.J. Gornall, eds). Taylor and Francis Ltd. London, p.51-73.

CAPÍTULO 2

Comparação da diversidade genética, estimada por marcadores RAPD, com parâmetros relacionados a aspectos reprodutivos em *Pterodon emarginatus* Vog. e *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth., duas espécies de leguminosa endêmicas do cerrado.

Resumo

Neste trabalho empregaram-se marcadores RAPD para estimar a diversidade genética dentro e entre locais de duas espécies endêmicas do cerrado: *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. e *Pterodon emarginatus* Vog. (Leguminosae, Papilionoideae, Dipteryxaceae). Os resultados de diversidade genética foram confrontados com os provenientes de características relacionadas a aspectos reprodutivos: produção de sementes viáveis, fertilidade de pólen e sobrevivência de plântulas. Os resultados das AMOVA para os dados moleculares indicaram que em ambas as espécies a maior percentagem da variância é explicada pela diferença entre indivíduos dentro de populações e apenas uma pequena parcela pela diferença entre locais; *P.pubescens* - 88,4% dentro e 11,6% entre; *P.emarginatus* - 94% dentro e 5,9% ($p < 0,00001$) entre. Esses resultados sugerem que essas duas espécies, apesar de autocompatíveis, sejam alógamas. Tanto os dados de produção de sementes viáveis, como os de pólen viável e sobrevivência de plântulas, revelou uma variação muito grande entre indivíduos e populações estudadas. A percentagem de pólen fértil entre indivíduos variou de 0% a 89% em *P.pubescens* e de 13% a 80% em *P.emarginatus*. A percentagem de sementes viáveis variou entre indivíduos de 0 a 84% em *P.pubescens* e de 6 a 61% em *P.emarginatus*. A percentagem de sobrevivência de plântulas entre populações de *P.pubescens* variou de 18,9% a 36% e em *P.emarginatus* de 33,9% a

59%. A correlação de Pearson entre percentagem de sementes viáveis e percentagem de pólen fértil ($r = -0,538$ $p=0,025$), e entre percentagem de pólen fértil e sobrevivência de plântulas ($r = -0,518$ $p=0,033$) foram negativas e significativas, indicando que a contribuição masculina de um indivíduo é inversamente correlacionada à contribuição feminina, sugerindo que estas espécies não sejam funcionalmente hermafroditas. A diversidade genética alta ou baixa não está relacionada com os aspectos reprodutivos avaliados. A população de *P.pubescens* que apresentou maior diversidade genética é a que apresentou pior desempenho quanto à produção de sementes e o segundo pior desempenho com relação à sobrevivência de plântulas. A espécie *P.emarginatus* apresentou menor diversidade genética do que *P.pubescens*, no entanto foi a que apresentou maior percentagem de sobrevivência de plântulas. Embora, diversidade genética seja um parâmetro importante quando o objetivo de um dado estudo é a conservação de uma espécie, os resultados indicam que a diversidade genética não fornece informações sobre a aptidão dos fenótipos de uma população. Dados sobre o sistema reprodutivo, produção de sementes e sobrevivência de plântulas são igualmente importantes e podem esclarecer aspectos da história de vida de uma espécie, essenciais ao seu manejo e conservação.

Abstract

Pterodon pubescens (Benth.) Benth. and *P.emarginatus* Vog. (Leguminosae, Papilionoideae, Dipteryxae) are two endemic species of the Brazilian cerrado. The genetic diversity of this species was estimated with RAPD markers. Then the genetic diversity of each species and population was compared to phenotypic characteristics related to reproductive aspects of these species. Individuals were sampled for viable seed production, pollen fertility and seedling survival. The genetic diversity estimates based on AMOVA, indicated that in *P. pubescens*, 88% of the total variance is due to difference among individuals within a population and 11,6% ($p < 0,00001$) to the difference among populations. In *P. emarginatus*, 94% of the variance is due to difference among plants within a population and only 5,9% among populations ($p < 00001$). These results suggest that both species are outbreeding, although they are self compatible. The percentage of fertile pollen changes greatly among individuals within populations (0 to 89% in *P.pubescens*; 13% to 80% in *P.emarginatus*). Similarly, the variation of viable seed percentage ranged from 0 to 84% in *P.pubescens* and from 6% to 61% in *P.emarginatus*. Seedling survival percentage among populations ranged from 18,9% to 36% in *P.pubescens* and from 33,9% to 59% in *P.emarginatus*. Pearson correlation analysis between percentage of fertile pollen and viable seed percentage was negative and significant ($r = -0,538$ $p = 0,025$) as well as the correlation between fertile pollen and percentage and seedling survival ($r = -0,518$ $p = 0,033$). Those results indicate that the female contribution of an individual is inversely correlated to its male contribution suggesting that these species are not functionally hermaphrodites. The high or low genetic diversity of a population or species is not related to the reproductive aspects measured. The *P. pubescens* population which presented the highest genetic diversity was the one with the poorest performance in relation

to viable seed production and the second worse in seedling survival. On the other hand *P. emarginatus* has a low genetic diversity when compared to *P. pubescens* but showed a far better seedling survival performance. This study suggests that although genetic diversity is an important parameter for the long term species survival it is not a sufficient parameter for it does not give any information about the fitness of phenotypes within a population. Data based on the reproductive system, seed production and seedling survival are equally important and might clarify aspects of the life history of a species essential to its conservation and management.

Introdução

A crescente devastação de áreas naturais devido à atividade humana tem colocado em risco diversas espécies nativas (animais e vegetais) uma vez que ao reduzir as áreas de vida pode eliminar populações ou mesmo a própria espécie. Dessa forma, na definição de políticas de conservação, existe uma preocupação de como avaliar qual o tamanho adequado de áreas que devem ser preservadas, bem como o tamanho mínimo viável das populações a serem mantidas (Schaffer 1993).

Por trás dessas questões encontra-se o reconhecimento de que uma dada população ou espécie, para poder sobreviver no tempo, isto é, evoluir, deve apresentar variabilidade genética que permita sua sobrevivência diante mudanças ambientais (Hamrick & Godt 1990, Hamrick & Nason 1996, Weir 1990). São vários os casos de espécies ameaçadas devido ao estreitamento de sua base genética (Hamrick & Godt 1996).

A variação genética em populações naturais de plantas não é um evento ao acaso; ela se encontra estruturada no tempo e no espaço. Esta estrutura pode se manifestar entre populações geograficamente distintas, dentro de um mesmo agrupamento ou mesmo entre progênies de um mesmo indivíduo (Crawford 1984, Loveless & Hamrick 1984) e é determinada tanto pelo modo de polinização, reprodução e dispersão de propágulos da espécie como pela distribuição espacial dos indivíduos que compõem a população. O sistema de reprodução acha-se diretamente relacionado à capacidade de reorganização dos genótipos de uma população no tempo e os mecanismos de dispersão resultam em uma organização espacial desses genótipos (Crawford 1984).

Não existe um consenso quanto à importância relativa da variabilidade genética dentro de populações e espécies e a dinâmica das populações naturais com relação à conservação das mesmas (Schemske *et al.* 1994). Vários autores questionam se a

variabilidade genética seria tão mais importante na sobrevivência de uma espécie ou população do que fatores ecológicos como a destruição de habitat ou as mudanças do ambiente que podem levar a extinção de populações ou espécies inteiras (Lande 1988, Schemske *et al.* 1994). Enquanto alguns acreditam que a variação genética é um critério chave para estratégias de conservação, outros apontam que populações grandes o suficiente para mitigar as ameaças ecológicas à viabilidade da população também serão capazes de mitigar as genéticas (Schemske 1994). Variações em fecundidade, crescimento e sobrevivência em plantas podem estar sendo mais influenciadas por fatores ambientais do que genéticos (Antonovics & Levin 1980).

Em um modelo de metapopulações, para a espécie como um todo, a probabilidade de extinção de uma das populações ao longo do tempo está associada a fatores aleatórios, bem como à taxa de natalidade e mortalidade que seriam controladas principalmente por fatores ambientais locais (Hanski 1996). Além disso, tanto a entrada de novos indivíduos em uma população como a colonização de novas áreas depende da capacidade de dispersão de propágulos de uma espécie e a capacidade da população se comportar como fonte ou sumidouro depende das taxas de natalidade e mortalidade que são influenciadas pelo habitat no qual a mesma se encontra (Pullian 1996).

A evolução da história de vida de plantas engloba tanto os aspectos demográficos como os genéticos. Aspectos de dispersão via pólen e sementes, apresentam papéis importantes na estruturação da variabilidade genética. A capacidade de dispersão de propágulos está relacionada à probabilidade de colonização de novas áreas e, portanto, de influenciar a variabilidade genética de outra população. Aspectos fisiológicos que determinam a capacidade e sobrevivência em diferentes tipos de habitats são produto tanto

do genótipo dos indivíduos como das interações com o meio biótico e abiótico onde eles se encontram (Lewontin 2000).

O número de indivíduos também é um parâmetro crucial para determinar a quantidade de variabilidade genética que pode ser mantida na população (Lande & Borrowclough 1993). Acredita-se que a probabilidade de extinção de uma população aumente drasticamente com a diminuição do tamanho populacional (Shaffer 1993).

Sob o ponto de vista genético, o número de indivíduos necessário para tornar uma população viável deve levar em consideração não o número total de indivíduos na população mas o número efetivo, N_e (Wright 1931), ou seja, os indivíduos que estão contribuindo com gametas para a próxima geração. Em geral o N_e , é menor que o número de indivíduos que compõem a população devido, tanto à razão sexual diferir de 1:1, quanto a flutuações do tamanho populacional ao longo do tempo, ou a variações no número de descendentes dos indivíduos da população (Avice 1994).

Devido ao pouco conhecimento sobre a história de vida das espécies de plantas nativas e à dificuldade para realizar estudos de dinâmica de populações com espécies perenes costuma ser mais viável utilizar informações sobre a variabilidade genética, a fim de propor estratégias de conservação para as mesmas.

No Brasil, só recentemente, estudos sobre a genética de populações de espécies arbóreas nativas vem se intensificando (Cardoso *et al.* 1998, Cardoso *et al.* 2000, Collevatti *et al.* 2001, Lemes *et al.* 2003). Mesmo para a flora temperada, relativamente poucas espécies foram estudadas. Hamrick e colaboradores (Hamrick & Godt, 1990, Hamrick & Nason 1996) reuniram dados de estudos sobre a estrutura genética de plantas, baseados na análise de isoenzimas e tentou correlacioná-la com a distribuição geográfica, sistema de reprodução, agente polinizador, forma de vida, entre outras variáveis. Desta forma alguns

desses parâmetros poderiam ser usados para inferir a provável diversidade genética de uma dada espécie e ajudar na tomada de decisões com relação a programas de conservação. Parecem existir alguns padrões gerais, como espécies autógamas conterem menor variabilidade dentro de populações do que as alógamas, ou ainda plantas endêmicas apresentarem menor diversidade genética do que as de ampla distribuição, embora, existam inúmeras exceções (Hamrick & Godt 1996).

No caso de espécies brasileiras, até mesmo as características levadas em consideração por Hamrick e colaboradores (Hamrick & Godt 1990, Hamrick & Nason 1996) são desconhecidas, dificultando qualquer tipo de inferência indireta. Pouco se conhece sobre o sistema de reprodução, tipo de polinizador, agente dispersor e por vezes até sobre a amplitude de distribuição de boa parte das espécies.

O objetivo deste trabalho foi verificar se a variabilidade contida dentro de populações e dentro de espécies poderia ser indicativa de um melhor desempenho dessas populações ou espécie quanto a aspectos diretamente relacionados à capacidade reprodutiva dos indivíduos.

Neste trabalho empregaram-se marcadores de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) para estimar a diversidade genética dentro e entre locais de duas espécies endêmicas do cerrado: *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. e *Pterodon emarginatus* Vog. (Leguminosae, Papilionoideae, Dipteryxaceae). Os dados de diversidade genética foram confrontados com os dados provenientes de características das espécies que foram consideradas importantes por estarem relacionadas a aspectos reprodutivos das mesmas: produção de sementes viáveis, fertilidade de pólen e sobrevivência de plântulas.

Sobre as espécies

P. pubescens e *P. emarginatus* são duas espécies arbóreas com cerca de até 20 m de altura, comuns nas fitofisionomias do cerrado: cerrado *sensu stricto*, e cerrado e vulgarmente chamadas de sucupira branca. Sua distribuição é algo disjunta. *P. pubescens* apresenta uma distribuição mais ao sul, nos Estados de São Paulo, Triângulo Mineiro (MG), Distrito Federal, sul do Estado de Goiás (Municípios de Cristalina, Caldas Novas, Ipameri, Santa Rita do Araguaia e Mineiros) e Mato Grosso do Sul (Município de Alto Araguaia) e Mato Grosso (Município de Barra do Garças). *P. emarginatus* tem uma distribuição mais ao norte, Distrito Federal, centro-norte de Goiás (Municípios de Uruaçu, Minaçu, Niqueândia, Alto Paraíso e Mun. São Domingos), Bahia (Municípios de Barreira e Correntina) e Maranhão (Municípios de Loreto e Carolina). No Distrito Federal, *P. pubescens* distribui-se mais ao sul, (cidade de Brasília, Guará, Taguatinga, Ceilândia e Gama) e *P. emarginatus* mais a norte (Planaltina). Não são encontradas populações mistas dessas duas espécies.

Os frutos de sucupira branca possuem um óleo utilizado na medicina popular nas infecções tanto de garganta como reumáticas (Barros 1982). Isolamento dos compostos secundários dos frutos e sementes de sucupira tem sido usado na profilaxia da esquistossomose (Mors *et al.* 1966) e como antiinflamatório (Duarte *et al.* 1992).

Material e métodos

Amostra de folhas para PCR

Amostras de folhas de 79 indivíduos de *Pterodon pubescens* (tabela I) e de 40 indivíduos de *P. emarginatus* (tabela II), de localidades diferentes, foram coletadas para análise de DNA. Todas as amostras foram coletadas entre agosto e setembro de 1996 época em que as plantas estão rebrotando e florescendo. Desta forma todas as folhas coletadas eram novas.

Tabela I – Locais de coleta, número de indivíduos em cada amostra de *Pterodon pubescens*.

Local	Descrição do local	Nº indivíduos
CEN	Plano Piloto de Brasília (DF), Setor de áreas isoladas norte (SAIN); por trás da Fundação Zoobotânica, ao lado da Delegacia de Polícia. Tipo de vegetação: cerrado (<i>sensu stricto</i>) muito degradado. 15° 44'S, 47° 57'O.	10
L4	Plano Piloto de Brasília (DF), ao longo da avenida L4 na altura do clube da Associação dos Funcionários da Universidade de Brasília (UnB) e por trás dos prédios da colina (UnB). Tipo de vegetação remanescente de cerrado (<i>sensu stricto</i>). 15° 47'S, 47° 55'O.	20
AN	Plano Piloto de Brasília (DF), ao longo da avenida das Nações Sul; entre entroncamento da Esplanada dos ministérios e STJ. Tipo de vegetação: remanescente de cerrado (<i>sensu stricto</i>). 15° 49'S, 47° 49'O.	20
JB	Jardim Botânico de Brasília (DF). Tipo de vegetação: cerrado (<i>sensu stricto</i>). Área de preservação. 15° 52'S, 47° 50'O.	20
UBL	Ao longo da Br 050, próximo à Uberlândia (MG)	9
TOTAL		79

Os indivíduos que compuseram tanto a amostra JB (Jardim Botânico – *P. pubescens*), como a amostra AE (Águas Emendadas – *P. emarginatus*), localizam-se em áreas de cerrado preservado dentro de áreas de conservação – a primeira dentro do Jardim

Botânico de Brasília e a segunda na Reserva Ecológica de Águas Emendadas. No CPAC os indivíduos de *P. emarginatus* distribuem-se em fisionomias de vegetação diferentes porém contíguas; cerrado *sensu stricto* e cerradão.

A amostra de indivíduos UBL (Uberlândia) – *P. pubescens* - foi formada por indivíduos distribuídos ao longo da rodovia BR050 nas proximidades de Uberlândia. A distância aproximada, em linha reta, desta amostra para as de Brasília é de 350 km.

Os demais locais onde foram coletadas as outras amostras de *P. pubescens*, encontram-se em área urbana de Brasília, com diferentes tipos de distúrbios, entretanto os indivíduos são remanescentes da vegetação natural que existia nesses locais antes da construção da cidade de Brasília.

Tabela II – Locais de coleta, número de indivíduos em cada amostra de *Pterodon emarginatus*.

Local	Descrição do local	Nº indivíduos
CPAC	Em áreas de cerrado (<i>sensu stricto</i>) e cerradão no CPAC (Centro Nacional de Pesquisas agropecuárias do Cerrado/Embrapa) (Planaltina, DF.). 15° 36'S, 47° 44'O.	20
AE	Reserva Ecológica de Águas Emendas, Planaltina, DF. Tipo de vegetação; cerrado (<i>sensu stricto</i>). 15° 44'S, 47° 56'O.	20
TOTAL	.	40

As distâncias em linha reta, entre as localidades, foram calculadas utilizando o programa Google-earth (tabela III) (Google earth . 2006).

Tabela III – Distâncias aproximadas em quilômetros, em linha reta, entre os diversos locais dos indivíduos estudados para *Pterodon pubescens* e *Pterodon emarginatus*.

	Localidades						
		UBL	CEN	L4	AV	JB	AE
<i>Pterodon pubescens</i>	CEN	350					
	L4	350	4				
	AV	350	9,5	6,5			
	JB	350	16	13	6,5		
<i>Pterodon emarginatus</i>	AE	390	35	33	36	38	
	CPAC	380	21,5	23,5	28	31	11

Para a maioria dos indivíduos coletaram-se ramos, com flores e quando possível, frutos, para exsiccatas de herbário. Esse material está depositado no Herbário da Universidade de Brasília (UB).

As amostras de folhas coletadas foram individualizadas em sacos plásticos, marcadas com o número da planta correspondente e mantidas dentro de um recipiente de isopor com gelo até chegar ao laboratório onde foram armazenadas a -20°C , até o momento da extração do DNA.

Extração de DNA e análise de RAPD

O DNA foi extraído em N_2 líquido pelo método de CTAB (Doyle e Doyle, 1987) e o precipitado de DNA (pellet) obtido, ressuscitado em 100 μl de TE (10mM Tris-HCl + 1mM EDTA + RNase pH 7,5).

Após extração, a concentração de cada amostra foi estimada a partir de comparações com uma série de 10 padrões de concentrações crescentes conhecidas e a seguir diluídas em tampão TE para obter uma concentração de 1,7ng/ μl de DNA por amostra.

O volume final das reações foi de 10µl, contendo 3µl da solução diluída contendo o DNA, 1,5 U de Taq polimerase da Gibco, 20mM Tris pH 8,5, 2mM MgCl₂, 1,0 µl primer (Operon Technologies) e 2,6 µl dNTP .

Para as reações de amplificação dos fragmentos de DNA, foi empregado um termociclador (MJ Research Inc. minicycler PTC-100). As amostras foram submetidas a um programa de 40 ciclos de: 1min. a 92⁰C, 1min. a 35⁰C, 1min. a 72⁰C, com um último passo, ao final dos 40 ciclos de 72⁰C por 6 minutos.

Seleção de primers

Para selecionar os primers que seriam utilizados neste trabalho, uma amostra de 6 indivíduos de *P.pubescens* e 4 de *P. emarginatus*, representando todas as localidades de coleta, foram usadas para testar 100 primers (Operon Thechnologies, Alameda, CA). Para a escolha dos primers, todas as reações foram repetidas por duas pessoas e duas vezes por pessoa. Somente os primers que reproduziram os mesmos padrões de bandas, nas duas reações realizadas por cada pessoa e entre as mesmas, e cujas bandas apresentaram boa definição e um padrão de bandas intenso, foram selecionados. A seguir, verificou-se quais desses primers produziam o maior número de bandas polimórficas. Ao final, foram selecionados 32 primers que foram empregados como molde para as reações de PCR: OPA (8, 9, 11, 12; 17 e 18), OPB(1; 10, 11, 12, 16,19 e 20) OPC(7, 8, 9, 13, 14, 16 e 17), OPX (3, 4, 11, 16, 17 e 20), OPY (5, 7, 10, 14, 15 e 18).

Eletroforese

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, 0,5µl de brometo de etídio, tampão TBE (10mM TRIS, pH 8,3, 10mM ácido bórico, 1mM EDTA) (Maniatis *et al.*. 1982). As bandas foram visualizadas em luz ultra violeta (UV) e fotografadas (filme TriX-Pan asa 100).

Todas as bandas de maior intensidade foram levadas em consideração para as análises. Somente foram rejeitadas bandas de grande intensidade que ocorreram em uma frequência menor do que 0,05 nos indivíduos amostrados.

Análise dos dados de RAPD

Para avaliar a variabilidade genética baseado na percentagem de bandas polimórficas foram empregados dois métodos. O primeiro levou em consideração todas as bandas polimórficas detectadas na amostra como um todo, independentemente da espécie de modo a permitir comparar a variabilidade genética das duas espécies além das amostras (localidades). O segundo levou em consideração apenas as bandas polimórficas observadas em cada uma das espécies permitindo avaliar a variabilidade genética dentro de cada amostra (localidade) quando se consideram apenas o polimorfismo de cada uma das espécies.

Para avaliar a distância genética entre os indivíduos de para cada espécie, cada indivíduo foi representado por um vetor cujos elementos assumem o valor 1 se uma dada banda está presente, ou 0 em sua ausência. Duas matrizes de distância, uma para cada espécie, foram obtidas a partir desses vetores utilizando-se como medida de distância o complemento do coeficiente de Dice em relação à unidade aplicado a cada par de

indivíduos dentro de espécie. O coeficiente de Dice é equivalente ao coeficiente F proposto por Nei e Li (1979) para medir o grau de divergência de DNA entre populações ou linhagens. As matrizes de distância foram submetidas à análise de agrupamento usando o método das médias das distâncias não ponderadas (UPGMA), empregando o programa NTSYSpc-2.0 (Rohlf 1997).

As relações entre os locais de coleta foram visualizadas por uma análise de PCA (Principal Component Analysis) conduzida sobre a matriz (7x7) de correlação entre frequências de bandas de RAPD dos locais de coleta usando o programa NTSYSpc-2.0 (Rohlf 1997).

Os perfis de bandas RAPD, obtidos com os 32 primers, dos indivíduos amostrados para cada uma das espécies (79 *P.pubescens* e 40 *P.emarginatus*), foram avaliados de acordo com uma estrutura hierárquica que considerou os níveis: indivíduo dentro de local e local dentro de espécie. O objetivo destas análises foi fazer inferência sobre como a variabilidade total é distribuída segundo esta estrutura, através das estimativas dos componentes de variância associados às duas fontes: V_a (variância entre locais) e V_b (variância entre indivíduos dentro de local). Testes da hipótese: $V_a=0$ assim como das diferenças em variabilidade entre locais, dois a dois, dentro de cada espécie foram conduzidos.

As estimativas dos componentes de variância associados aos diferentes níveis hierárquicos foram obtidos com a AMOVA (Analysis of Molecular Variance), mediante o uso do Arlequin versão 2000 (Schneider *et al.* 2000). As estimativas dos componentes de variância, V_a , V_b , obtidos com este procedimento equivalem à soma das estimativas destes componentes associados a cada banda. Os níveis de significância para estes componentes de variância são computados por procedimentos permutacionais.

A variabilidade genética dentro de cada local foi também estimada utilizando a decomposição da variação entre indivíduos dentro de local obtida na AMOVA, descrita acima. Esta forma de calcular a variabilidade genética em um local leva em consideração, não apenas o número de bandas RAPD polimórficas em cada local, mas, também, a frequência das mesmas. A contribuição de cada locus RAPD para variância associada a cada local será máxima quando os valores de $p_i = (1 - p_i) = 0,5$, onde p_i é a frequência populacional da banda considerada no locus i . As populações que apresentam bandas com frequências muito altas ou muito baixas, isto é quase fixadas ou perdidas, apresentam menor variância apesar de poderem apresentar maior número de bandas polimórficas do que uma outra população onde as bandas apresentem valores intermediários de frequência.

O polimorfismo de DNA de um indivíduo avaliado através de RAPD é tratado como se fosse um haplótipo pois não se pode considerar a variação dentro de indivíduo, por ser este marcador não-codominante. Ainda mais, estas bandas são consideradas, para fins de gerar as distribuições permutacionais utilizadas para fazer os testes estatísticos, como um bloco de características que não se separam. Na realidade considera-se o perfil de RAPD como uma caracterização do indivíduo sem nenhuma referência a sua base genética. Cada banda é associada a um loco simplesmente como um recurso para quantificar a diferença entre indivíduos. Assim, é usual tratar-se na literatura os componentes de variância estimados com este tipo de polimorfismo como “estimate variance components for RAPD phenotypes” (Huff *et al.* 1993, Buso *et al.* 1998, Mockford *et al.* 1999).

Amostras de frutos e sementes

Para a análise de produção de sementes foram coletados frutos, entre agosto e setembro de 1996, das duas espécies de indivíduos que foram usados na análise genética.

Em *P. pubescens* foram coletados 2393 frutos de 37 indivíduos sendo 8 indivíduos da localidade CEN, 10 da L4, 11 da AV e 8 da JB. Não foram coletados frutos da localidade UBL por não se conhecer a exata localização dos indivíduos onde foram coletadas amostras de folhas para extração de DNA.

Em *P. emarginatus* foram coletados 3444 frutos de 33 indivíduos sendo 6 indivíduos da localidade AE, 18 da CPAC e 9 indivíduos localizados na APA do Parque Estadual de Terra Roca, Município de São Domingos, (GO) que não haviam sido incluídos na análise genética.

Tanto *P. emarginatus* como *P. pubescens*, têm ovário uniovulado, portanto cada fruto produz somente uma semente. Os frutos de *Pterodon* são secos, alados, indeiscentes, o endocarpo extremamente duro e apresenta resina abundante.

Os frutos foram abertos com auxílio de um alicate. Foram estabelecidas, inicialmente, cinco categorias de estados possíveis para os frutos e sementes: 1) frutos com sementes (e neste caso sementes aparentemente saudáveis e provavelmente viáveis) 2) frutos sem sementes (onde não foi possível se observar o menor traço de semente produzida) 3) frutos com sementes abortadas (e neste caso o tamanho das sementes podia variar de desde 1mm até sementes de tamanho normal mas totalmente vazias, somente a testa da semente parecia ter se desenvolvido) 4) frutos com sementes predadas 5) frutos com sementes infestadas por fungos.

Para fins de análise os frutos classificados nas categorias 1, 4, e 5 foram considerados como sendo frutos com sementes viáveis e as categorias 2 e 3 como frutos com sementes abortadas.

Análises dos dados de frutos e sementes

A frequência de fruto com semente viável foi quantificada com 1 e de fruto com semente abortada foi quantificada com 0. Essa variável foi avaliada para cada espécie em separado segundo uma estrutura hierárquica que considera: local de coleta, indivíduo dentro de local de coleta e fruto dentro de indivíduo. O modelo empregado para descrever a estrutura de variação de formação de sementes foi então:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + c_k(ab_{ij})$$

onde:

$Y_{ijk} = 1$ se a semente é viável, e

$Y_{ijk} = 0$ se a semente é abortada

μ = valor médio populacional de Y_{ijk} (efeito geral)

a_i = efeito aleatório de local de coleta com variância V_a

b_j = efeito aleatório de indivíduo dentro de local de coleta com variância V_b

c_k = efeito aleatório de fruto dentro de indivíduo com variância V_c

De acordo com este modelo $V(Y_{ijk}) = V_a + V_b + V_c$

Uma análise conjunta da frequência de frutos com sementes viáveis nas 2 espécies foi feita adotando a seguinte estrutura hierárquica; efeito de espécie, indivíduo dentro de espécie e frutos dentro de indivíduo.

Todas as análises de variância foram feitas empregando-se o programa Arlequin versão 2000 (Schneider *et al.*2000). Embora o Arlequin, tenha sido desenvolvido para análise de dados de marcadores moleculares, ele foi aqui empregado, não para fornecer uma interpretação genética, mas apenas para se obter os testes permutacionais para as

hipóteses de interesse sobre os componentes de variância de uma variável que assume valores 0 e 1 (semente não viável - semente viável). Os métodos clássicos de teste para estes componentes presumem que a variável resposta tenha distribuição normal, o que obviamente não é o caso presente.

Amostras de pólen

Para as análises de viabilidade de grão de pólen foram usados no mínimo 5 botões por indivíduo, de pelo menos cinco indivíduos de cada localidade de ambas as espécies. Procurou-se coletar inflorescências dos mesmos indivíduos para os quais havia amostras de frutos e, portanto utilizados nas análises genéticas, mas outros indivíduos foram também aqui incluídos.

Inflorescências de indivíduos de ambas as espécies foram coletadas e conservadas em álcool 70%, para posterior análise da viabilidade dos grãos de pólen. As inflorescências foram coletadas no ano de 1997. Os grãos de pólen foram tratados com o corante de Alexander (Alexander 1980) e examinados ao microscópio óptico. A viabilidade foi avaliada como a percentagem de pólen viável em cada botão. As inflorescências dessas espécies são do tipo panícula indeterminada, de forma que os botões utilizados para as contagens de pólen foram os basais dos ramos da panícula. Utilizaram-se sempre botões prestes a abrir, ou seja, não foram utilizadas nem as panículas muito jovens com botões pouco desenvolvidos, nem panículas muito velhas cujos botões basais já haviam aberto.

Ao serem retiradas as anteras de um botão, para análise da viabilidade de pólen, também foram anotadas certas características da flor: presença ou ausência de óvulo bem formado e posição do estigma em relação à altura das anteras. Quando a morfologia do óvulo parecia normal, foi considerado que o óvulo seria bem formado. Com relação às

características da posição do estigma em relação à altura das anteras, consideraram-se três tipos básicos de flor: a) tipo 1: flores com tubo de estames reto e curto e estigma muito acima ou muito abaixo das anteras, b) tipo 2: flores com o tubo dos estames longo e curvo e estigma na altura (no meio) ou um pouco abaixo das anteras e c) tipo 3: flores com tubo dos estames longo e curvo e estigma acima das anteras.

Análise dos dados de pólen

A percentagem de pólen viável foi analisada inicialmente para cada espécie em separado segundo um modelo hierárquico, semelhante ao usado para a análise de viabilidade de semente, neste caso incluindo uma fonte de variação adicional referente ao efeito aleatório de grão de pólen dentro de botão. Esta análise, usando o VARCOMP do SAS, ofereceu estimativas dos componentes de variância que permitiram adotar algumas simplificações para a análise conjunta das duas espécies. Assim, na análise conjunta o modelo adotado considera o efeito de espécie, de indivíduo dentro de espécie e grão de pólen dentro de indivíduo. Os efeitos: indivíduos dentro de local e de botões dentro de indivíduo, não foram considerados. Para esta análise foi usado o Arlequin versão 2000 (Schneider *et al.* 2000) para se obter os testes das hipóteses de interesse.

A percentagem de fertilidade de pólen em 39 indivíduos (188 botões) foi analisada segundo um modelo que considerou os fatores tipo de flor e indivíduo sendo este último fator considerado aleatório. Esta análise foi feita com o Proc GLM do SAS (SAS 1999) usando uma ponderação pelo número de grãos de pólen de cada botão. Esta análise verifica se a viabilidade do pólen está associada ao tipo de flor (tipo 1, tipo 2, e tipo 3).

Um gráfico das estatísticas descritivas da percentagem de pólen fértil foi elaborado baseado nos dados da percentagem observada de pólen fértil sem considerar o efeito de indivíduo.

Análise conjunta dos dados de pólen e de produção de sementes

Para investigar a associação existente entre frutos com sementes e viabilidade de pólen os dados de pólen e sementes de 25 indivíduos foram submetidos a uma análise de correlação parcial (ajustada para diferenças de espécie e população).

Amostras de plântulas

As plântulas utilizadas neste trabalho foram obtidas das sementes dos frutos coletados de indivíduos das diferentes localidades amostradas. Essas sementes são as mesmas que foram consideradas viáveis na parte do trabalho que avaliou a produção de sementes.

As sementes foram germinadas em meio de agar colocada em tubos de ensaio. Uma semente apenas foi colocada por tubo de ensaio. Os tubos com as sementes foram depois mantidos em câmara de germinação por cerca de 4 semanas.

De cada plântula anotaram-se certas características que foram consideradas essenciais para a possível sobrevivência da mesma: Presença de parte aérea e presença de raiz bem formada. A seguir, as plântulas foram classificadas em dois grupos:

1) Sem possibilidade de sobrevivência: Neste grupo foram incluídas as plântulas sem raiz, com raiz atrofiada e as sem parte aérea.

2) Com possibilidade de sobrevivência: Neste grupo foram incluídas as plântulas com raiz e parte aérea, de pequena a grande.

Todas as plântulas foram classificadas de acordo com esses critérios de sobrevivência e foram feitos testes de Qui-quadrado nas tabelas de contingência a fim de averiguar se diferentes locais de coleta apresentavam igual percentagem de sobrevivência de plântulas. Esse procedimento foi feito, considerando todos os locais de coleta para as duas espécies separadamente e por espécie sem levar em consideração local de coleta. Para tanto usou-se o procedimento FREQ do SAS (SAS 1999).

Para verificar a relação entre percentagem de sobrevivência de plântulas, percentagem de pólen fértil e de sementes viáveis foi realizada uma análise de correlação parcial de Spearman com dados de 22 indivíduos (5 de *P. emarginatus* e 17 de *P. pubescens*).

Resultados

Variabilidade genética

Os 32 primers utilizados para a análise de PCR utilizando o DNA genômico dos 119 indivíduos das duas espécies (79 indivíduos de *P. pubescens* e 40 de *P. emarginatus*) produziram 355 bandas, das quais 321 mostraram-se polimórficas. *P. pubescens* apresentou 209 bandas polimórficas (65% de bandas polimórficas). *P. emarginatus* apresentou 149 bandas polimórficas (46% de bandas polimórficas). O número de bandas polimórficas diferiu entre locais. As amostras CEN e UBL de *P. pubescens* apresentaram polimorfismo semelhante e menor do que o obtido para as demais populações desta espécie, provavelmente devido ao número de indivíduos amostrados nestes dois locais (10), quando comparado com o das outras localidades (20). Entretanto, a amostra AE de *P. emarginatus* apresentou praticamente o mesmo nível de polimorfismo observado em CEN e UBL, apesar de ter se baseado em um tamanho amostral de 20 indivíduos (tabela 1). A amostra CPAC apresentou menor nível de polimorfismo quando comparada com as outras amostras de mesmo número de indivíduos de *P. pubescens*. O maior nível de polimorfismo para todas as localidades, independente de espécie, foi observado para a amostra JB (tabela 1).

Tabela 1 – Número e porcentagem de bandas polimórficas encontradas em cada localidade amostrada para *Pterodon pubescens* e *P. emarginatus*, considerando-se o total de bandas polimórficas para os 119 indivíduos analisados. (321 bandas polimórficas).

Espécie	<i>Pterodon pubescens</i>					<i>Pterodon emarginatus</i>		
	Local	CEN	UBL	L4	AV	JB	AE	CPAC
Nº banda polimórficas		112	108	148	145	175	116	134
% bandas polimórficas		35	34	47	45	55	36	42

Considerando-se o número de bandas que foram polimórficas dentro de uma mesma espécie, o nível de polimorfismo observado nas amostras de *P. emarginatus* foi maior do que o das amostras de *P. pubescens* (tabela 2). Para *P. pubescens* o maior nível de polimorfismo foi encontrado na localidade JB. Entretanto, quando tomadas apenas as bandas polimórficas dentro de uma mesma espécie, o maior nível de polimorfismo foi observado para a localidade CPAC de *P. emarginatus*.

Tabela 2 – Percentagem de bandas polimórficas para cada localidade amostrada de *Pterodon pubescens* e *P. emarginatus*, considerando apenas as bandas que foram polimórficas dentro de cada uma das espécies.

Espécie	<i>Pterodon pubescens</i>					<i>Pterodon emarginatus</i>		
	Local	CEN	UBL	L4	AV	JB	AE	CPAC
N ^o banda polimórficas		112	108	148	145	175	116	134
% de polimorfismo		54,55	51,67	70,81	69,39	83,73	77,85	89,93
Total de bandas				209			149	

A análise de agrupamento pelo método de média aritmética das distâncias (UPGMA), expressa pela distância de Dice (figuras 1 e 2), não apresentou subgrupos definidos dentro de cada uma das espécies. Aparentemente não há um padrão claro de agrupamento dos indivíduos provenientes de uma mesma localidade. Entretanto, os indivíduos das amostras UBL e CEN de *P. pubescens* constituíram um grupo (figura 2). Em *P. emarginatus* quase todos os indivíduos da localidade AE formam um grupo em contraponto a vários grupos de indivíduos da amostra CPAC.

Outros métodos de agrupamento (Visinho mais próximo, Ligação completa, Ward) apresentaram padrões similares e, portanto, não estão aqui expressados.

Na análise de PCA a primeira dimensão explicou 66,52% da variância total, a segunda 27,72% e a terceira 2,44%. Juntas as três dimensões explicaram 96,68% da variância o que constitui uma representação precisa das relações entre os locais de coleta representados pelas frequências das bandas de RAPD (figura 3). Em adição, deve-se observar que a relação entre UBL e CEN é compatível com aquela observada no dendrograma (figura 2), mesmo existindo uma distância geográfica de 350km entre esses locais de coleta. A primeira esteve associada à separação das duas espécies. A segunda dimensão separou UBL e CEN dos demais locais dentro de *P.pubescens* (figura 3).

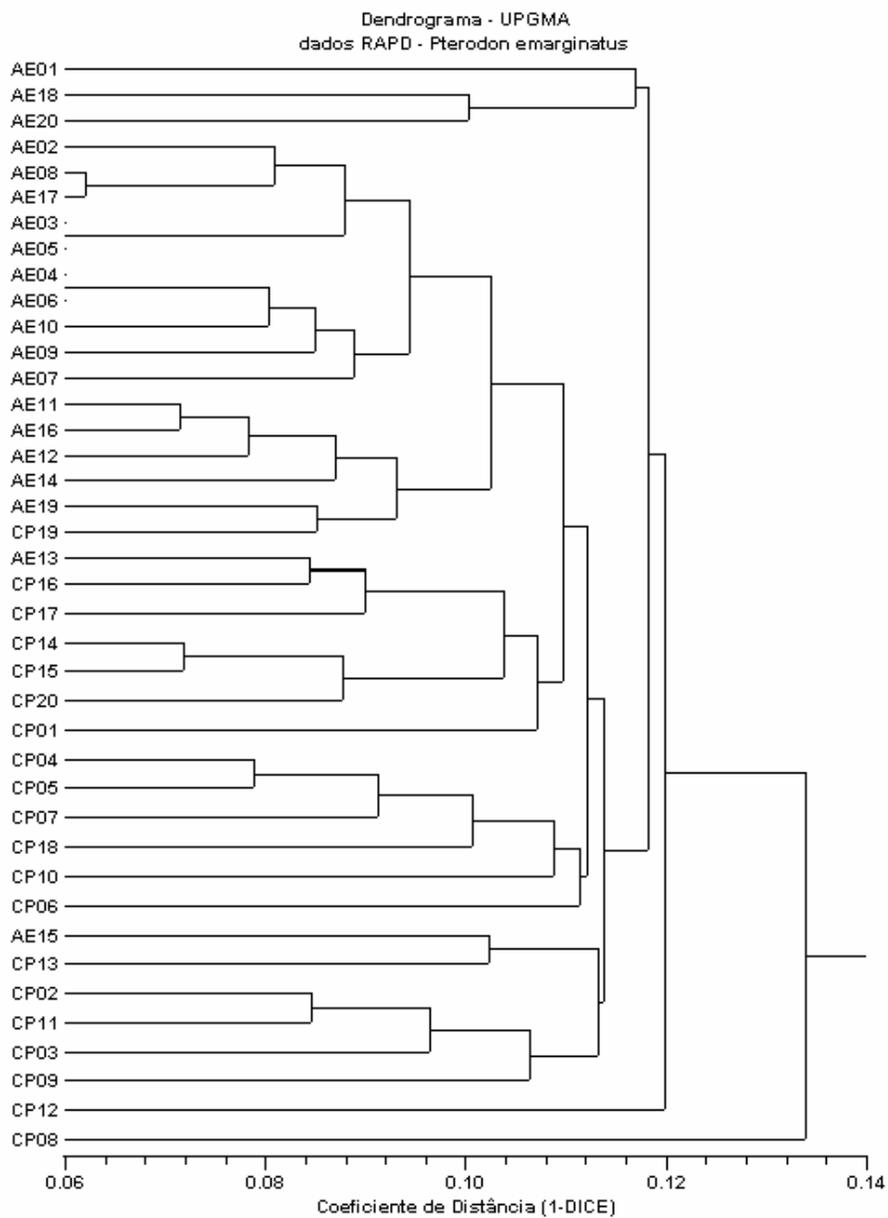


Figura 1 – Dendrograma, método UPGMA, coeficiente de Dice, para dados RAPD (355 bandas) de *Pterodon emarginatus*.

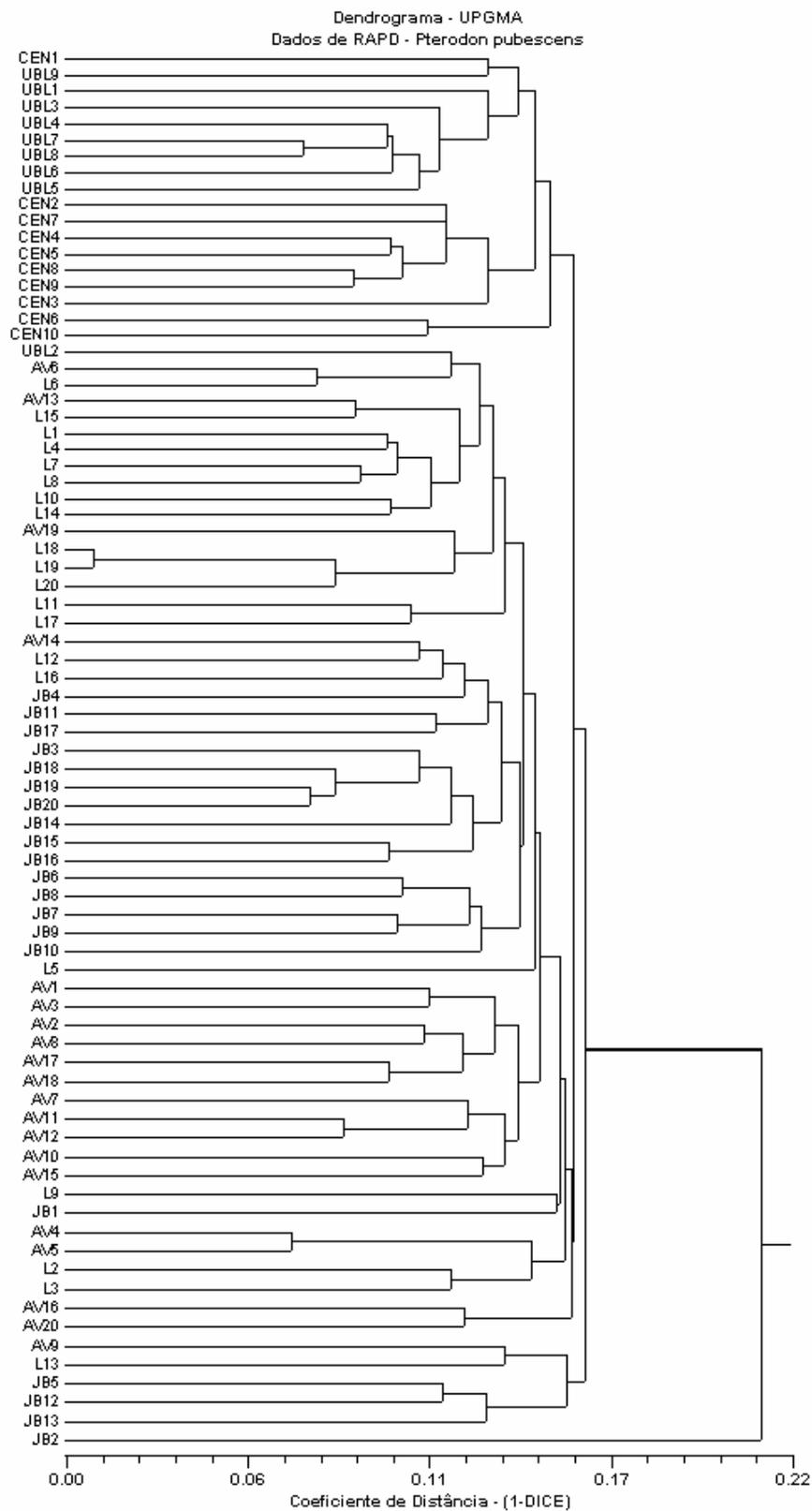


Figura 2 – Dendrograma, método UPGMA, coeficiente de Dice, para dados RAPD (355 bandas) de *Pterodon pubescens*.

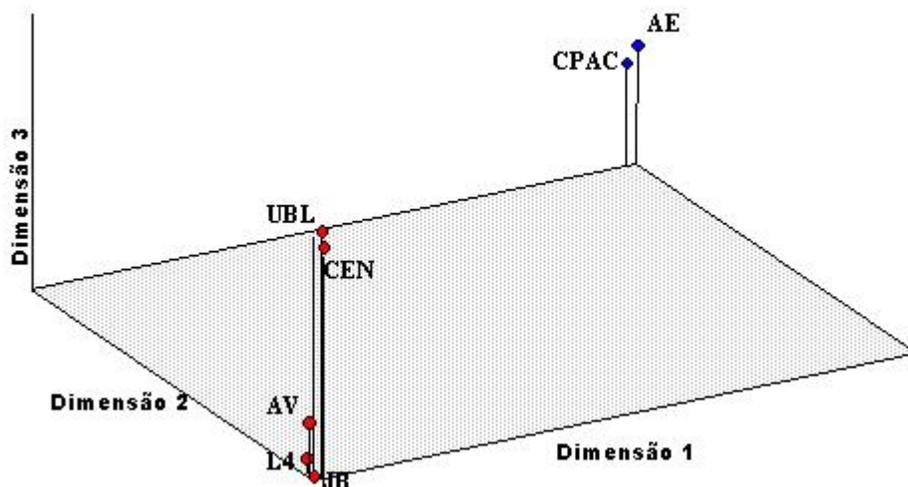


Figura 3 – PCA (Principal Component Analysis) baseado na frequência de bandas RAPD dentro de cada localidade para as duas espécies, *Pterodon pubescens* e *P. emarginatus*. Primeira Dimensão: 66,56%; segunda dimensão: 27,72%; terceira dimensão: 2,44%.

O resultado da AMOVA (tabela 3) para *P.emarginatus* mostrou que 5,86% ($p < 0,00001$) da variância total está associada à diferença entre os dois locais e 94,14% à variância encontrada dentro de local.

Para *P.pubescens*, 11,6% ($p < 0,00001$) está associada à diferença entre locais e 88,4% à variância dentro de local (tabela 4). Os resultados das AMOVA para todas as combinações de locais de coleta dois a dois, foram significativos, indicando, que cada local pode ser considerado uma amostra de uma população diferente (tabela 6).

Tabela 3 - Análise de variância molecular (AMOVA) para estimar e testar os componentes de variância associados à variação entre locais e entre indivíduos dentro de local em *Pterodon emarginatus*, a partir de 317 bandas RAPD.

Fonte de Variação	g.l.	Soma dos quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação	Prob ¹
Entre locais	1	38,250	1,061	5,86	< 0,00001
Dentro de local	38	647,200	17,031	94,14	
Total	39	685,450	18,092		

¹ Prob: probabilidade de obter um igual ou maior componente de variância, por acaso, sob a hipótese nula que o componente de variância seja zero; o valor de prob. foi estimado a partir de 30.000 permutações.

Tabela 4 - Análise de variância molecular (AMOVA) para estimar e testar os componentes de variância associados à variação entre locais e entre indivíduos dentro de local em *Pterodon pubescens*, a partir de 317 bandas RAPD.

Fonte de Variação	g.l.	Soma dos quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação	Prob ¹
Entre locais	4	246,83	2,68	11,6	< 0,00001
Dentro de local	74	1508,23	20,38	88,4	
Total	78	1755,06	23,06		

¹ Prob: probabilidade de obter um igual ou maior componente de variância, por acaso, sob a hipótese nula que o componente de variância seja zero; o valor de prob. foi estimado a partir de 30.000 permutações.

Tabela 5 – Percentagem da variância entre dois locais de coleta (linha, coluna) em relação à variância total em *Pterodon pubescens* (resultados da AMOVA obtidos a partir de 317 bandas RAPD). Acima da diagonal está expressa a probabilidade de obter um igual ou maior componente de variância, por acaso, sob a hipótese: $V_a=0$; o valor da probabilidade foi estimado a partir de 5.000 permutações.

Locais	UBL	CEN	L4	AV	JB
UBL		0,003	<0,0001	0,002	<0,0001
CEN	8,67		<0,0001	0,015	<0,0001
L4	13,9	8,16		0,0004	<0,0001
AV	6,35	3,80	5,17		<0,0001
JB	14,41	9,41	9,83	6,66	

A variabilidade genética dentro de cada local, quando estimada através da decomposição da variância entre indivíduos dentro de local, apresentou valores muito próximos para os diferentes locais. Apesar disso à exceção da amostra UBL, todas as amostras de *P. pubescens* apresentaram valores maiores que os das localidades de *P.*

emarginatus, sendo que JB apresentou o maior valor (tabela 6). Com relação a cada uma das espécies, a variabilidade genética estimada para *P. pubescens* foi de 23,06, maior que a obtida em *P. emarginatus*, 18,09 (variância total, última linha das tabelas 3 e 4).

Tabela 6 –Componentes de variância entre indivíduos dentro de local de coleta avaliada a partir das bandas de RAPD.

Espécie	<i>Pterodon pubescens</i>					<i>Pterodon emarginatus</i>	
	Local	UBL	CEN	L4	AV	JB	CPAC
SQ(local)¹	140,33	180,20	375,35	401,75	415,90	342,85	304,35
Variância	17,54	20,02	19,76	21,14	21,89	18,04	16,02

¹Decomposição das Somas de Quadrados associada à fonte de variação dentro de local das tabelas 3 e 4.

Viabilidade de semente

Foram coletados 3.445 frutos de 33 indivíduos de *P. emarginatus*, que forneceram 498 sementes viáveis (14,46%) (tabela 7). Para *P. pubescens* foram coletados 2.393 frutos de 37 indivíduos, que forneceram 651 sementes viáveis (27,2%) (tabela 7). A proporção de frutos com sementes viáveis variou entre indivíduos de um mesmo local e dentro da espécie de 0,00 a 0,84 em *P. pubescens* e 0,06 a 0,61 em *P. emarginatus*. A percentagem de sementes viáveis em todas as populações de ambas as espécies variou, estando abaixo de 46% para todas elas (tabela 8).

A percentagem de frutos com sementes abortadas, incluindo frutos sem semente e frutos com sementes muito pequenas ou de tamanho normal, mas, vazias, foi de 50,2% em *P. pubescens*, variando de 43,6% a 62,4% entre as populações (tabela 8). Em *P. emarginatus* 69% dos frutos apresentaram sementes abortadas e a percentagem variou, entre as populações de 61,1% a 83,2% (tabela 8). Aborto foi a principal causa do baixo número de sementes viáveis formado para ambas as espécies.

Em muitos frutos a falta de semente viável se deveu à predação ou ao fato das mesmas estarem infectadas por fungo. A predação de sementes foi maior em *P. pubescens* (19,1%) do que em *P. emarginatus* (13,3%), tendo alcançado 27,3% na população AV de *P. pubecens* o que é bem mais do que a percentagem de sementes viáveis produzidas nessa população (19,2%). Predação também é um componente importante na redução de sementes viáveis nas populações CPAC (12% de sementes viáveis e 16,8% de sementes predadas) e AE (4,3% de sementes viáveis e 12,5% de sementes predadas) (tabela 8).

A percentagem de sementes infectadas foi baixa para todas as populações de ambas as espécies variando de 1,3% a 5,7% em *P. pubescens* e de 0% a 4,8% em *P. emarginatus*.

Tabela 7 – Resumo dos dados de frutos e sementes analisados para *P. pubescens* e *P. emarginatus* em cada local e total por espécie.

CEN – Cenargen; L4 – Avenida L4; AV – Avenida das Nações; JB – Jardim Botânico; TR – Parque Estadual de Terra Ronca; AE – Reserva Ecológica de Águas Emendadas; CPAC – Embrapa Cerrados.

Espécies	<i>Pterodon pubescens</i>					<i>Pterodon emarginatus</i>				
	Locais	CEN	L4	AV	JB	Total	TR	AE	CPAC	Total
N ⁰ frutos		541	615	847	390	2.393	833	677	1934	3.444
N ⁰ indiv		8	10	11	8	37	9	6	18	33
N ⁰ sementes viáveis		218	195	163	75	651	236	29	233	498
% semente viável		40,2	31,7	19,2	19,2	27,2	28,3	4,3	12,0	14,46

Tabela 8 – Percentagens de categorias de fruto e semente para cada localidade amostrada das duas espécies.

CEN – Cenargen; L4 – Avenida L4; AV – Avenida das Nações; JB – Jardim Botânico; TR – Parque Estadual de Terra Ronca; AE – Reserva Ecológica de Águas Emendadas; CPAC – Embrapa Cerrados.

Espécie	<i>P. pubescens</i>					<i>P. emarginatus</i>				
	Locais	CEN	L4	AV	JB	Total	TR	AE	CPAC	Total
Sementes viáveis		40,2	31,7	19,2	19,2	27,2	28,3	4,3	12,0	14,5
Predadas		13,5	15,1	27,3	15,5	19,1	5,8	12,5	16,8	13,3
Infectadas		2,7	1,3	5,7	2,9	3,4	4,8	0	3,7	3,2
Aborto		43,6	51,9	47,8	62,4	50,2	61,1	83,2	67,5	69,0

A produção de sementes viáveis variou significativamente entre populações para as duas espécies muito embora os componentes de variância associados às diferenças entre locais tenha sido baixo em ambos os casos – 1,96% para *P. pubescens* (tabela 9) e 3,15% para *P. emarginatus* (tabela 10).

A produção de sementes viáveis também foi significativamente diferente entre as duas espécies (tabela 11).

Tabela 9 - Componentes de variância associados às diferenças para produção de sementes viáveis de *Pterodon pubescens* entre locais, entre indivíduos dentro de locais e dentro de indivíduo.

Fonte de variação	gl	Soma de Quadrados	Componentes de Variância	% Variância	Prob ¹
Entre locais	3	13,356	0,005	1,96	p=0,0445
Entre indivíduos dentro de local	32	43,154	0,017	6,89	p<0,0000
Dentro de indivíduos	2346	537,673	0,222	91,14	p<0,0000
Total	2381	594,183	0,25146		

¹ Prob: probabilidade de obter um igual ou maior componente de variância, por acaso, sob a hipótese nula que o componente de variância seja zero; o valor de prob. foi estimado a partir de 16128 permutações.

Tabela 10 - Componentes de variância associados às diferenças para produção de sementes viáveis de *Pterodon emarginatus* entre locais, entre indivíduos dentro de locais e dentro de indivíduo.

Fonte de variação	gl	Soma de Quadrados	Componentes de Variância	% Variância	Prob ¹
Entre locais	2	19,084	0,007	3,15	0,0286
Entre indivíduos dentro de local	31	56,103	0,017	7,65	<0,0001
Dentro de indivíduos	3.421	661,911	0,193	89,20	<0,0001
Total	3.454	737,098	0,21691		

¹ Prob: probabilidade de obter um maior componente de variância, por acaso, sob a hipótese nula que o componente de variância seja zero; o valor de prob. foi estimado a partir de 16128 permutações.

Tabela 11 - Componentes de variância associados às diferenças para produção de sementes viáveis, entre *Pterodon pubescens* e *P. emarginatus*, entre indivíduos dentro de espécie e dentro de indivíduo.

Fonte de variação	gl	Soma de Quadrados	Componentes de Variância	% Variância	Prob ¹
Entre espécies	1	39,771	0,013	5,47	0,001
Entre indivíduos dentro de espécie	68	131,697	0,021	8,65	<0,0001
Dentro de indivíduos	5767	1199,584	0,208	85,89	<0,0001
Total	5836				

¹ Prob: probabilidade de obter um igual ou maior componente de variância, por acaso, sob a hipótese nula que o componente de variância seja zero; o valor de prob. foi estimado a partir de 16128 permutações.

Pólen

O tamanho e forma dos grãos de pólen, tanto para *P. pubescens* como para *P. emarginatus* apresentaram ampla variação (figura 4), mesmo em amostras provenientes do mesmo botão. Para as análises de viabilidade de pólen, foram considerados como viáveis, os grãos com citoplasma intensamente corado, e contornos regulares ou levemente irregulares, independente da variação de tamanho. Sendo assim, os dados de viabilidade de pólen estão provavelmente superestimados, uma vez que mesmo grãos de pólen muito pequenos, provavelmente inviáveis, mas com as características acima descritas, foram considerados viáveis. Os grãos de pólen foram considerados inviáveis quando não apresentaram citoplasma ou muito pouco citoplasma, contornos muito irregulares e paredes muito espessadas.

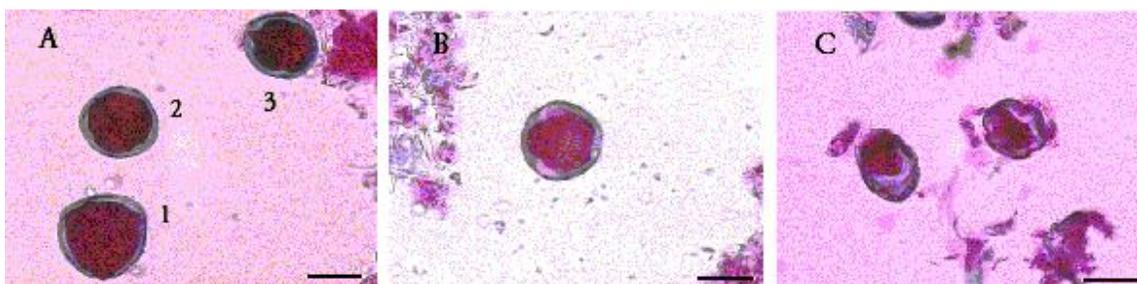


Figura 4 – Fotos de lâminas de grãos de pólen de *Pterodon* apresentando variação de tamanho e forma.

4A) A1 – grão de pólen viável, tamanho e forma considerados normais; A2 e A3, grãos de pólen, considerados viáveis, menores e com paredes mais espessadas.

4B) Grão de pólen considerado viável, apresentando tamanho menor e forma com contornos levemente irregulares e com paredes espessadas.

4C) Grãos de pólen considerados inviáveis, apesar de ainda apresentarem citoplasma.

Para as análises de fertilidade de pólen foram analisados 259 botões de 44 indivíduos de *P. pubescens* sendo contados um total de 69.202 grãos. Para *P. emarginatus*,

foram analisados 93 botões de um total de 20 indivíduos, tendo sido contados um total de 43.910 grãos. A porcentagem de grãos de pólen férteis variou de 26,18% a 58,72% entre as localidades de *P. pubescens* e de 49,21% a 69,64% em *P. emarginatus* (tabela 12). A proporção de pólen fértil, entre indivíduos, variou de 0,00 a 0,89 em *P. pubescens* e de 0,13 a 0,80 em *P. emarginatus*.

Tabela 12 – Percentagem de fertilidade de pólen em *Pterodon pubescens* e *P. emarginatus* e número de indivíduos para cada um dos locais estudados.

Espécie	<i>Pterodon pubescens</i>					<i>Pterodon emarginatus</i>			
	Local	CEN	L4	AV	JB	TOTAL	CPAC	AE	TR
Nº indiv.	8	16	9	11	44	8	5	7	20
% viabilidade	26,18	50,75	54,28	58,72	51,09	57,41	49,21	69,64	60,09

O padrão de variação encontrado em ambas as espécies foi similar sendo que a maior fonte de variação que afeta a fertilidade do pólen está dentro de botão (tabela 13). Os resultados também mostraram que as fontes de variação associadas a locais e a botões dentro de indivíduo são menos relevantes na análise desses dados. Assim estas fontes de variação foram ignoradas na análise conjunta das duas espécies.

Tabela 13 - Componentes de variância associados às fontes de variação consideradas na análise da fertilidade de pólen em *Pterodon pubescens* e *P.emarginatus*.

Componentes de variância¹	<i>Pterodon pubescens</i>	<i>Pterodon emarginatus</i>
Entre locais	0,0051 (1,99%)	0
Entre indivíduos dentro de local	0,0641 (25,04%)	0,0435 (17,70%)
Entre botões dentro de indivíduo	0,0387 (15,12%)	0,0269 (10,94%)
Entre grãos de pólen dentro de botão	0,1481 (57,85%)	0,1754 (71,36%)
Total	0,2560	0,2458

¹ Estimativas obtidas pelo método de máxima verossimilhança.

A análise conjunta das duas espécies (tabela 14) não detectou diferença significativa entre as espécies quanto a fertilidade de pólen. A variação entre indivíduos foi significativa assim como o foi nas análises para cada uma das espécies. A maior fonte de variação encontra-se entre grãos de pólen dentro de indivíduo, resultado idêntico ao obtido quando cada uma das espécies foi analisada individualmente.

Tabela 14 – Componentes de variância associados às fontes de variação consideradas na análise conjunta da fertilidade de pólen de *Pterodon pubescens* e *P.emarginatus*.

Fonte de variação	gl.	Soma dos Quadrados	Componentes de variância	Percentagem de variação	Prob¹
Entre Espécies	1	234,925	0,0018	0,71	0,2047
Entre indivíduos dentro de espécie	62	7103,113	0,0652	26,11	<0,0001
Entre grãos de pólen dentro de indivíduo	112779	20621,758	0,1828	73,18	
Total	112842	27959,796	0,2499		

¹ Prob: probabilidade de obter um igual ou maior componente de variância, por acaso, sob a hipótese nula que o componente de variância seja zero; o valor de prob. foi estimado a partir de 16128 permutações.

A análise de variância para fertilidade de pólen em função de indivíduo e categoria de flor mostrou uma forte associação entre tipo de flor e a fertilidade de pólen ($r^2 = 0,8385$) (tabela 15). A viabilidade de pólen produzido pelo tipo de flor 1 foi significativamente menor do que os demais tipos. Entretanto, a média de pólen fértil entre os tipos de flor 2 e 3 não foi significativamente diferente ($p=0,1739$) para o teste de Tukey-Kramer (tabela 16 e figura 5).

Tabela 15 – Resultados da ANOVA da fertilidade de pólen em função do tipo de flor em *Pterodon pubescens* e *P. emarginatus*.

Fonte variação	gl.	Quadrado médio	Valor de F	Prob > F
Entre indivíduos	38	49,21	8,05	< 0,0001
Entre tipo de flor	2	253,35	41,43	< 0,0001
Resíduo	147	6,11		

Tabela 16 – Médias ajustadas da proporção de pólen viável, para cada tipo de flor em *Pterodon pubescens* e *P. emarginatus*. Tipo 1: Tubo de estames reto e curto e estigma muito acima ou muito abaixo das anteras. Tipo 2: Tubo de estames longo e curvo, estigma na altura ou um pouco abaixo das anteras. Tipo 3: Tubo de estames longo e curvo e estigma um pouco acima das anteras.

Tipo de flor	Médias ajustadas da proporção de pólen viável ¹	Erro Padrão
1	0,34 a	± 0,027
2	0,68 b	± 0,021
3	0,61 b	± 0,023

¹ Médias ajustadas ao efeito de indivíduo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey-Kramer

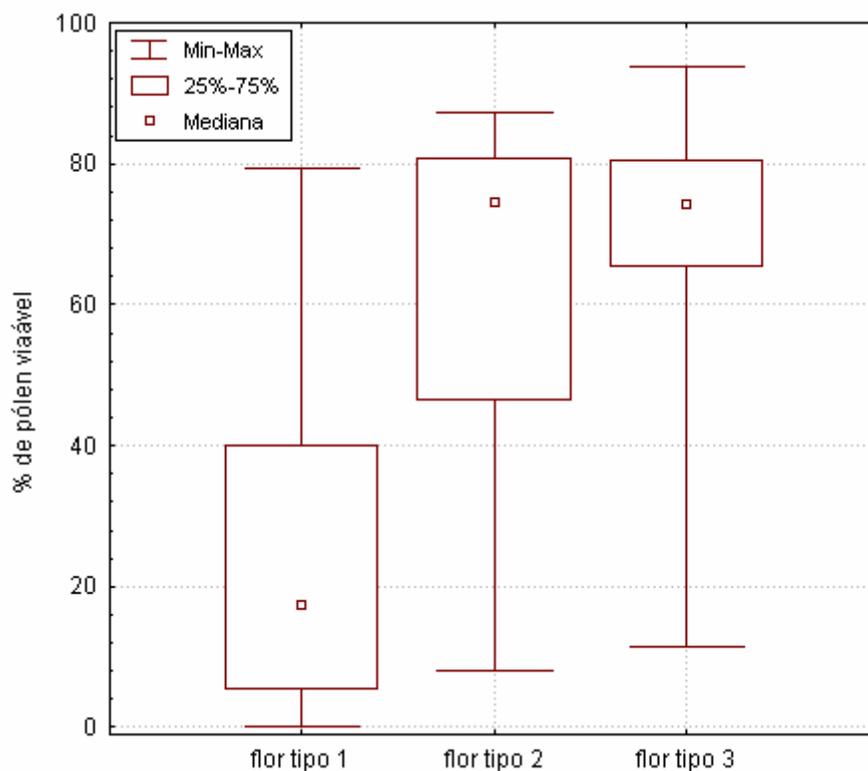


Figura 5 – Estatísticas descritivas para a percentagem observada de pólen fértil das três categorias de flor de *Pterodon pubescens* e *P.emarginatus*. Tipo 1: Tubo de estames reto e curto; estigma muito acima ou muito abaixo das anteras. Tipo 2: Tubo de estames longo e curvo; estigma na altura ou um pouco abaixo das anteras. Tipo 3: Tubo de estames longo e curvo; estigma um pouco acima das anteras.

Pólen e Sementes

A correlação entre percentagem de pólen fértil e sementes viáveis para 25 indivíduos das duas espécies, ajustada para o efeito de espécie e população resultou em um valor negativo $r = -0,5216$ ($p=0,0011$), indicando que indivíduos que produzem muitas sementes viáveis, produzem uma menor proporção de pólen fértil.

Plântulas

Para as análises de plântulas e sobrevivência das mesmas foram obtidas 381 progênies de 31 indivíduos de *P. pubescens* e 296 de 22 adultos de *P. emarginatus*. Para *P. pubescens* o número de plântulas por população variou de 55 a 117, sendo o tamanho médio de progênie por indivíduo de 12,29. Em *P. emarginatus* o número de plântulas variou de 22 a 151 nas populações, sendo o tamanho médio de progênies por adulto de 13,45 (tabela 17).

Tabela 17 – Dados sobre plântulas para cada indivíduo mãe, para cada local, para as espécies *Pterodon pubescens* e *P. emarginatus*.

Espécie	<i>Pterodon pubescens</i>					<i>Pterodon emarginatus</i>				
	Local	CEN	L4	AV	JB	Total	CPAC	AE	TR	Total
Número de plântulas/ indivíduo		21	8	9	4		15	14	12	
		12	7	27	12		12	4	4	
		4	14	27	7		22	3	18	
		24	9	15	18		13	1	26	
		14	5	10	8		9		16	
		26	10	7	4		23		7	
		8	16		2		16		38	
		8	27				14			
			17				9			
			1				7			
						13				
Total de plântulas		117	114	95	55	381	151	22	121	296
Nº adultos		8	10	6	7	31	11	4	7	22
Média de plântulas/ indivíduo		14,6	11,4	15,8	7,86	12,29	13,73	5,5	17,29	13,45

Os resultados para análise estratificada por local de coleta foram significativos para as duas espécies, indicando que a sobrevivência de plântulas está associada a local de coleta.

Para *P. pubescens* o local que apresentou menor sobrevivência foi AV (18,95%), seguido por JB (21,82%), CEN (33,33%) e L4 (36,28%) (tabela 18).

Para *P. emarginatus* a menor sobrevivência foi observada em TR (33,88%), seguida por AE (40,91%) e CPAC (59,48%) (tabela 19).

O resultado conjunto para sobrevivência de plântulas dentro de cada espécie também foi significativo indicando que a sobrevivência está associada à espécie, sendo que *P. pubescens* apresentou menor sobrevivência de plântulas do que *P. emarginatus* (tabela 20).

Tabela 18 – Resultados para análise estratificada da percentagem de sobrevivência de plântula por local de coleta para *Pterodon pubescens*.

Local/Sobrevivência	0	1	Total
CEN	78 66,67%	39 33,33%	117 30,79%
L4	72 63,72%	41 36,28%	113 29,74%
AV	77 81,05%	18 18,95%	95 25,00%
JB	43 78,18%	12 21,82%	55 14,47%
$\chi^2 = 10,03$ gl. = 3 p<0,0183			

Tabela 19 – Resultados da análise estratificada da percentagem de sobrevivência de plântula por local de coleta para *Pterodon emarginatus*.

Local/Sobrevivência	0	1	Total
CPAC	62 40,52%	91 59,48%	153 51,69%
AE	13 59,09%	9 40,91%	22 7,43%
TR	80 66,12%	41 33,88%	121 40,88%
$\chi^2 = 18,17$ gl. = 2 p<0,0001			

Tabela 20 – Resultados para análise estratificada da percentagem de sobrevivência de plântulas por espécie.

Espécie/Sobrevivência	0	1	Total
<i>Pterodon emarginatus</i>	155 52,36	141 47,64	296 43,79
<i>Pterodon pubescens</i>	270 71,05	110 28,95	380 56,21
$\chi^2 = 24,89$ gl. = 1 p<0,0001			

As correlações entre percentagem de pólen fértil/sementes viáveis e pólen fértil/sobrevivência de plântulas foram negativas e significativas (tabela 21), enquanto que a correlação entre percentagem de sementes viáveis e sobrevivência de plântulas, embora positiva não foi significativa (tabela 21).

Tabela 21 – Coeficientes de correlação parcial de Spearman entre percentagem de pólen fértil, percentagem de sementes viáveis e sobrevivência de plântulas para 25 indivíduos de *Pterodon pubescens* e *P. emarginatus*. Acima da diagonal estão expressas as probabilidades associadas a cada coeficiente.

	% de pólen fértil	% semente viável	% plântula
% de pólen fértil	1	p = 0,025	p = 0,033
% semente viável	- 0,538	1	p = 0,165
% plântula	- 0,518	0,353	1

Discussão

Diversidade genética baseada em marcadores RAPD

Marcadores moleculares e bioquímicos vêm sendo muito utilizados em estudos sobre a variabilidade genética e estrutura genética de populações naturais com o intuito de criar critérios ou estratégias de conservação. No caso de marcadores RAPD, a partição da variância genética dentro e entre amostras pode permitir inferências sobre a subestruturação de uma dada espécie, em nível local e regional, bem como inferir sobre o possível sistema

de reprodução (Gillies *et al.* 1997, Palacios & Gonzales-Candelas 1997, Schierenbeck *et al.* 1997, Cardoso *et al.* 1998, Gillies *et al.* 1999, Lacerda *et al.* 2001).

Nas análises de agrupamento levando em consideração a as diferenças genéticas entre indivíduos não foi possível observar uma clara estruturação dentro de cada uma das espécies, exceto para os indivíduos dos locais UBL e CEN de *P. pubescens* que formam um grupo à parte dos demais. Esse mesmo comportamento foi igualmente verificado na análise de PCA considerando os locais de coleta de ambas as espécies.

Entretanto, as Análises Moleculares de Variância constataram que a variação genética captada pelas bandas de RAPD não se distribui ao acaso e embora as percentagens de variação entre amostras de locais diferentes tenham sido pequenas, foram fontes significativas na organização desta variação. Assim sendo, em ambas as espécies, cada amostra pode ser considerada como tendo sido tirada de uma população diferente.

A proximidade genética entre os indivíduos das populações UBL e CEN, não pode ser facilmente explicada. Essas duas populações estão distantes cerca de 350km, enquanto que a distância entre CEN e L4 é de apenas 4km; CEN dista de AV 9,5km e de JB 16km. Portanto, a similaridade dos indivíduos das populações UBL e CEN não pode ser explicada pela distância geográfica. O tamanho das amostras, que poderia estar interferindo no resultado apresentado pelo PCA, que leva em consideração a frequência das bandas RAPD dentro de cada amostra, também não explica porque os indivíduos dessas duas amostras agrupam-se separadamente dos demais no dendrograma. Resultados similares de dados com RAPD, onde distância geográfica não está correlacionada com a distância genética entre populações são conhecidos na literatura. Em *Cedrella odorata* (Gillies *et al.* 1997) uma das populações localizadas no extremo sul da costa do Pacífico da Costa Rica é geneticamente mais similar das populações localizadas próximas à costa do Atlântico do

que as demais populações localizadas na costa do Pacífico. Esta proximidade genética foi considerada como uma provável adaptação a condições ambientais contrastantes entre as regiões; a costa norte do Pacífico sendo uma região muito mais seca do que a costa sul e as regiões de influência Atlântica. Em *Swietenia macrophylla* (Gillies *et al.* 1999) dados não concordantes entre distância geográfica e genética também foram reportados para algumas populações amostradas e uma série de explicações possíveis fornecidas, entre elas adaptação a ambientes similares e isolamento devido à distância. Em um estudo genético de *Euterpe edulis* (Cardoso *et al.* 2000) empregando marcadores AFLP, a maior similaridade genética entre as populações de Garaqueçaba e Ilha Grande, distantes uma da outra 512 km, foi atribuída à possibilidade de pássaros migratórios estarem envolvidos no fluxo de sementes. No caso de CEN e UBL, entretanto, não é fácil encontrar uma explicação convincente. Esses dois locais acham-se muito perturbados devido à ação humana, entretanto esta explicação não parece ser suficiente para explicar a proximidade genética dos indivíduos desses locais, uma vez que L4 e AV, também se encontram em áreas com razoável grau de perturbação. Já a pequena divergência genética das demais populações de *P. pubescens* e a semelhança genética encontrada nas de *P. emarginatus* podem ser explicadas pela proximidade geográfica das mesmas.

A variação genética, captada pela Análise Molecular de Variância, entre populações, tanto para *P. emarginatus* (5,86%) como *P. pubescens* (12,13%), em relação àquela existente dentro de população, 94,14% em *P. emarginatus* e 87,87% em *P. pubescens*, é coerente com o que se pode esperar de espécies de fertilização cruzada e são compatíveis com dados obtidos para RAPD para outras espécies arbóreas consideradas alógamas. Para *Cedrella odorata* (Lacerda *et al.* 2001) foi encontrado que 12,3% da variância encontram-se entre as populações amostradas e 87,7% dentro de população. Em

Swietenia macrophilla 12% da variância se deve à diferença entre populações e 87,43% à existente dentro de população. Em um estudo realizado na Costa Rica para quatro espécies arbóreas tropicais (Schierenbeck *et al.* 1997) foram encontrados valores de percentagem de variação entre e dentro de populações que variaram de 0 e 100% em *Protium glabrum* a 3,20% a 96,80% em *Dendropanax arboreus*.

A variabilidade genética contida dentro de uma dada população pode ser estimada tanto pela decomposição da variância entre indivíduos da população como através da percentagem de bandas RAPD polimórficas encontradas na mesma. A variabilidade genética dentro de espécies pode ser estimada pela variância total encontrada entre os indivíduos da espécie ou pela percentagem de bandas polimórficas total encontrada na amostra independentemente da espécie.

P. pubescens apresentou maior variabilidade genética que *P. emarginatus* tanto quando foi considerado como estimador da mesma a variância total entre indivíduos dentro de cada espécie, como quando considerada a percentagem de bandas polimórficas para os 119 indivíduos, independente da espécie.

Por outro lado, nas comparações entre populações de cada espécie, os dados de percentagem de bandas polimórficas fornecem resultados distintos quando consideradas todas as bandas polimórficas independente de espécie ou somente as polimórficas dentro de espécie.

Para *P. pubescens*, considerando todas as bandas polimórficas independente de espécie, somente as populações CEN e UBL apresentam menor variabilidade genética do que a detectada para as populações de *P. emarginatus*. Essas duas populações apresentam tamanho amostral menor que as demais (UBL 9 e CEN 10 indivíduos), o que explica o menor polimorfismo detectado. Entretanto o menor polimorfismo observado em AE, não

pode ser explicado pelo tamanho da amostra. A população JB de *P. pubescens* é a que apresentou maior percentagem de bandas polimórficas dentre todas as populações, enquanto que AE e CPAC apresentaram a menor dentre as que tiveram o mesmo tamanho de amostra (20 indivíduos).

Os valores encontrados para as populações de *Pterodon* (35% a 55%) não diferem muito do que foi encontrado para *Plathymenia reticulata*, outra espécie do cerrado, cuja percentagem de loci polimórfico variou nas populações estudadas entre 41,7% e 55,6% (Lacerda *et al.* 2001), muito embora os valores para as populações UBL, CEN e AE tenham sido menores. A percentagem de loci polimórfico encontrada nas duas espécies de *Pterodon* foi menor que a encontrada para *Plathymenia reticulata* (70,8%) embora, essa deva estar correlacionada ao tamanho das amostras de 117 indivíduos em *Plathymenia reticulata*, 79 em *Pterodon pubescens* e 40 em *P. emarginatus*, indicando que esse é um dado de difícil comparação.

Considerando as bandas polimórficas dentro de cada espécie a população as populações de *P. emarginatus* apresentaram alto polimorfismo. A população CPAC apresentou a maior variabilidade genética, enquanto que a de AE só foi superada pela de JB de *P. pubescens*.

Esses resultados mostram a dificuldade que existe em comparar níveis de polimorfismo entre trabalhos distintos usando marcadores RAPD. A percentagem de bandas polimórficas varia dependendo de como se considera o que é ser polimórfico. Se todas as bandas de todas as espécies são consideradas ou se somente as encontradas em cada uma delas. Isso se deve ao fato de que bandas RAPD em espécies distintas, especialmente quando as mesmas pertencem a gêneros ou famílias diferentes, muitas vezes não são homólogas e, portanto representam marcadores diferentes e a comparação entre as

espécies não pode ser feita simplesmente assumindo a percentagem de bandas polimórficas. Essas medidas não são comparáveis. Dessa forma, a variância detectada dentro das populações ou de espécies pode ser uma melhor medida de comparação.

As estimativas de percentagem de loci polimórfico são mais sensíveis ao tamanho das amostras do que o cálculo da variância dentro das populações, porque levam em consideração somente o número de bandas que são polimórficas, enquanto que a variância também considera a frequência da banda na população ou na espécie. Quando o tamanho das amostras utilizadas para representar os indivíduos de uma certa população é muito pequeno, e muito variável entre as populações, talvez utilizar a variância dentro de população, mais do que a percentagem de polimorfismo, possa ser uma estratégia mais parcimoniosa. Além disso, variância é mais informativa do que percentagem de loci polimórficos porque, “alelos” cujas frequências estejam muito próximas a 1 ou 0 (ou seja, muito próximos de serem fixados ou eliminados da população), estarão mais sujeitos a efeitos de deriva e portanto estarão contribuindo menos para a variabilidade genética ao longo do tempo.

Apesar da discordância com relação aos dois critérios utilizados para estimativas da variabilidade genética dentro de populações (variância e percentagem de loci polimórficos), com relação a algumas populações de *P. pubescens*, ambos os critérios identificam a população JB de *P. pubescens* e CPAC de *P. emarginatus* como as que contêm maior variabilidade genética. Desta forma, considerando-se variabilidade genética como um indicador da probabilidade de sobrevivência no tempo (evolução) de uma dada população, essas duas populações deveriam ser as escolhidas dentro de um programa de conservação como as mais promissoras para preservação.

A integridade do ambiente, onde essas populações foram coletadas, pode também ser usada como um critério para escolher qual população deveria ser preservada. Nesse caso, a população JB de *P. pubescens* encontra-se em área de cerrado nativo bem conservado e esse critério juntamente com o de variabilidade genética sugerem que essa deveria apresentar maior capacidade de permanência no tempo. Entretanto, esse não é o caso da população do CPAC, cujos indivíduos foram coletados em áreas distintas de remanescentes de cerrado, duas delas ainda vegetação original e uma delas uma área contígua à área de cerradão, mas onde boa parte das espécies arbóreas do cerradão original foi cortada. Talvez essa maior variabilidade genética encontrada na população CPAC seja um reflexo tanto de uma história passada da população, uma vez que os indivíduos amostrados são adultos e portando já existiam antes da perturbação da área e da maior heterogeneidade ambiental. A população AE, que se encontra dentro de uma área de preservação (Estação Ecológica de Águas Emendadas) aparentemente tem uma baixa variabilidade genética, quando comparada com CPAC apesar de se encontrar em uma área de cerrado nativo maior e mais bem preservado.

Parâmetros sobre da biologia de uma dada espécie que possam estar correlacionados com a probabilidade de sobrevivência dos indivíduos são importantes no que diz respeito à capacidade de sobrevivência da população ou espécie no espaço e no tempo.

A produção de sementes viáveis e fertilidade de pólen de indivíduos de uma dada espécie podem ajudar a entender aspectos de sua biologia que venham a ajudar na conservação e manejo da mesma. A produção de sementes é o resultado de vários outros eventos, tais como: distribuição espacial dos indivíduos, fenologia da espécie, número de flores produzidas, produção e fertilidade do pólen, sistema de reprodução, tipo de agente

polinizador, aspectos fisiológicos que determinam a fecundação de forma eficiente e o desenvolvimento de sementes saudáveis, predação, entre outros (Lee 1988).

Sementes

A percentagem de frutos com sementes viáveis variou entre indivíduos nas duas espécies, tendo sido um pouco menor em *P. emarginatus*. A percentagem de sementes viáveis em todas as populações de ambas as espécies variou bastante, sendo abaixo de 46% para todas elas. A baixa produção de sementes viáveis se deveu tanto a aborto como à predação.

A predação de sementes variou entre as populações das duas espécies tendo sido maior em *P. pubescens* do que em *P. emarginatus*. Neste caso, somente foi avaliada a predação pré dispersão, uma vez que os frutos coletados foram coletados nas plantas mães. É possível que a predação de sementes pós dispersão seja responsável por uma taxa significativa na perda de sementes na natureza para essas espécies, mas isso não foi avaliado neste trabalho (Janzen 1971, Louda 1989, Crawley 1992).

Entretanto, os valores obtidos de predação não são nem tão altos, nem discordantes com o observado para outras plantas em outros estudos. De fato, mesmo o maior valor observado (27,3% para a população AV, de *P. pubescens*) pode ser considerado pequeno para predação pré dispersão em plantas perenes (Crawley 1992).

Em um estudo envolvendo espécies de *Hymenaea* e de *Copaifera langsdorfii*, Lewinsohn (1980) observou que 71% das sementes de *Copaifera langsdorfii* foram predadas. Para as espécies estudadas de *Hymenaea*, a predação de sementes variou de 9% em *Hymenaea stigonocarpa*, uma espécie de cerrado, a 24% em *Hymenaea intermédia*, uma espécie da mata Amazônica. Já em outro estudo, com a palmeira macaúba, *Acrocomia*

aculeata, espécie que ocorre no cerrado, a predação respondeu por 40% da perda de sementes viáveis (Ramos *et al.* 2001).

Embora predação tenha sido um evento que, pelo menos na população AV de *P. pubescens* supera a percentagem de sementes viáveis formada, não é este evento que explica a baixa produção de sementes viáveis. A maioria dos frutos colhidos, ou não apresentava sementes ou as mesmas estavam abortadas. Portanto, aborto, e não predação, explica a baixa produção de sementes viáveis para todas as populações de ambas as espécies. É possível que uma parte das sementes abortadas não tenha se desenvolvido adequadamente, como Janzen (1971) chamou a atenção, devido à predação, e neste caso, o efeito de predação é que estaria subestimado.

P. emarginatus apresentou maior percentagem de sementes abortadas do que *P. pubescens*.

Várias podem ser as causas possíveis para a ocorrência de aborto: auto incompatibilidade, intensidade de polinização, distância da fonte de pólen, fertilidade do pólen, limitação de recursos (Lee 1988).

Com relação ao sistema de reprodução, as duas espécies são auto compatíveis (Afonso 1997) e, portanto auto incompatibilidade não seria uma das causas para as altas percentagens de sementes abortadas. Distância da fonte de pólen também não parece explicar a baixa produção de frutos com sementes, uma vez que todos os indivíduos coletados estavam próximos (entre 2m a 20m) de vários outros indivíduos de sua espécie. A intensidade de polinização e presença do polinizador no local, também não parece justificar a baixa produção de frutos com sementes, uma vez que as populações que menos produziram frutos com sementes em ambas as espécies (JB de *P. pubescens* e AE de *P. emarginatus*) situam-se em locais com vegetação nativa em bom estado de preservação.

Estas populações encontram-se nos mesmos locais onde foram realizados os trabalhos de biologia reprodutiva das duas espécies (Afonso 1997) e, portanto onde foram observados e coletados os polinizadores dessas espécies.

Na maioria das angiospermas, somente uma pequena fração das flores e óvulos formados se desenvolve em frutos e sementes (Lloyd 1980a, Stephenson 1981, Lee 1988). O aborto de flores e frutos ocorre em vários estágios do desenvolvimento e mesmo em frutos que chegam à maturidade, nem todos os óvulos dão origem a sementes (Arathi *et al.* 1999). Os fatores que afetam o desenvolvimento de sementes podem atuar antes ou após a fertilização (Lee 1988). Um importante fator atuando na fase pré fertilização é a limitação de grãos de pólen (Niesenbaum 1999). Entretanto, para um grande número de plantas, nem todos os óvulos de um ovário são fertilizados mesmo quando uma quantidade razoável de pólen foi depositada sobre o estigma da flor (Cruzan 1989). Alguns estudos teóricos também sugerem que o sucesso reprodutivo feminino não seja limitado pela disponibilidade de pólen, mas pela quantidade de recursos necessária para a formação de frutos e sementes (Lloyd 1980, Charnov 1982, Bawa & Webb 1984, Arathi *et al.* 1999). Plantas que são limitadas por recurso, normalmente iniciam um número maior de frutos do que chega a amadurecer. O aborto de frutos iniciados, em teoria, deveria ser seletivo de tal forma que os recursos, que são limitados, seriam alocados para frutos contendo embriões de melhor qualidade (Charnov 1982, Lee 1988, Niesenbaum 1999, Melser & Klinkhamer 2001). De fato, em manipulações experimentais, verificou-se, em plantas cultivadas, que reduzir o número de frutos que está iniciando o desenvolvimento, muitas vezes reduz o aborto de sementes, bem como o suplemento de nutrientes e água diminui o aborto de sementes em *Chyptantha flava* (Lee 1988). Por outro lado Wiens (1984) observou que o aborto de sementes está relacionado com a história de vida da planta e provavelmente com o sistema

de reprodução. Em um levantamento de 191 espécies, esse autor encontrou que a razão de sementes maduras por fruto em relação aos óvulos por fruto era significativamente maior em espécies anuais (85%) que para as perenes herbáceas (57%) e, que as perenes lenhosas apresentavam a menor razão semente/óvulo (33%). Este autor (Wiens 1984) argumenta que espécies anuais são na maioria autógamas e apresentam baixa heterozigosidade e, portanto baixa oportunidade de seleção entre embriões. Já as espécies perenes, especialmente as lenhosas, tendem a ser alógamas e a apresentar alta heterozigosidade. Desta forma o aborto de óvulos nessas espécies poderia ser uma consequência de seleção contra homozigotos ou contra combinações de alelos letais ou semi letais. As percentagens de frutos com sementes nas populações de *P. pubescens* foi maior do que a estimada, por Wiens, para espécies lenhosas perenes, variando de 37,6% - 56,4%, sendo de 49,7% para a espécie. As populações de *P. emarginatus*, à exceção de AE (16,8%), apresentam percentagens similares às estimadas por Wiens. É possível que seleção contra combinações de alelos letais ou semi letais devido à endogamia, possa explicar parte do aborto de sementes verificado nestas espécies.

As inferências obtidas pela AMOVA indicaram que a percentagem de sementes viáveis variou entre indivíduos de uma mesma população, entre as populações e as duas espécies e *P. pubescens* apresentou maior percentagem de sementes viáveis do que *P. emarginatus*.

Variação na produção de sementes viáveis, entre indivíduos de uma mesma população, entre populações de uma espécie e entre espécies é relatada para um grande número de plantas e podem estar relacionados com aspectos fisiológicos da planta mãe devido à limitação de recursos como nutrientes ou água (Harper 1977, Lee 1988);

intensidade de herbivoria de partes vegetativas e reprodutivas, predação de sementes e idade da planta adulta (Sarukhán 1980, Sarukhán *et al.* 1984, Crawley 1992).

Com relação a *P. pubescens* a população que obteve a menor percentagem de sementes viáveis foi JB e CEN foi a que apresentou a maior. JB foi a população que apresentou maior variabilidade genética e CEN, dentre as que tiveram a produção de sementes analisadas, foi a que apresentou menor. Segundo, portanto, o critério produção de sementes, a população que apresentaria melhores condições de sobrevivência no tempo, seria a população CEN e não JB.

Na espécie *P. emarginatus* a população com pior desempenho com relação tanto à produção de frutos com semente, como de sementes viáveis foi AE, seguida de CPAC e TR. CPAC foi também a população de *P. emarginatus* que apresentou maior variabilidade genética. A população TR não estava incluída nas análises genéticas.

Existem poucos trabalhos que fazem referência ao efeito da contaminação de sementes, pré dispersão, por fungos. Em *Anadenanthera macrocarpa* a percentagem de sementes infectada variou entre locais de 46% a 58% (Dhingra *et al* 2002), enquanto em *Piptadenia paniculata* a maior percentagem de infestação foi de 9% (Strapasson *et al.* 2002). Já em um estudo para *Pinus elliottii* a percentagem de fungos em sementes variou de 88% a 3% entre plantios (Anderson *et al.* 1984), sendo que destes, 11% deles foram considerados patogênicos e ocorreram em sementes não danificadas. A perda de sementes viáveis devido à contaminação por fungos em *Pterodon* foi baixa, quando comparada com os estudos acima mencionados, para todas as populações de ambas as espécies, sendo inexistente em AE de *P. emarginatus*, e praticamente a mesma nas duas espécies.

Pólen

O tamanho e forma do pólen nas duas espécies de *Pterodon* variaram bastante, mesmo dentro de um mesmo botão de um indivíduo. O tamanho de um grão de pólen e a natureza de seu conteúdo pode influenciar a desempenho masculino através de efeitos na germinação do pólen e crescimento do tubo polínico (Bertin 1988). Um grande número de plantas não heterostílicas nem cleitógams apresentam variação em tamanho de pólen entre indivíduos e entre botões na natureza e mesmo em experimentos controlados (Bertin 1988). Em alguns casos, o tamanho do pólen pôde ser correlacionado com a velocidade de crescimento do tubo polínico ou o tamanho do tubo produzido; grãos de pólen maiores apresentaram tubos polínicos que cresciam mais rápido ou maiores (Bertin 1988). Porém essa diferença em crescimento do tubo polínico nem sempre pôde ser correlacionada com diferenças em aptidão. Se tamanho de pólen em *Pterodon* estiver correlacionado com seu desempenho, na germinação, então os cálculos de percentagem de pólen fértil estão muito subestimados e é possível que um outro padrão, mais realista, emergisse se tivesse sido considerado também a diferença entre tamanho de pólen entre indivíduos, populações e espécies.

A fertilidade do pólen variou entre os indivíduos das duas espécies de 0 a 89% em *P. pubescens* e de 13% a 80% em *P. emarginatus*. Embora a fertilidade de pólen de *P. pubescens* tenha sido menor que a encontrada em *P. emarginatus*, não foi estatisticamente significativa, indicando que o comportamento geral com relação à produção de pólen fértil, é similar, nas duas espécies. O mesmo resultado foi observado para variação de pólen fértil entre populações de ambas as espécies.

As flores de *P. pubescens* e *P. emarginatus* são consideradas morfologicamente hermafroditas e todas as flores examinadas das duas espécies apresentaram um ovário com

um óvulo bem formado. Entretanto, a análise de variância para fertilidade de pólen entre os tipos de flor e a correlação entre tipo de flor e produção de pólen fértil sugere que a contribuição de pólen efetuada por esses tipos de flor seja diferente. Assim, as flores do tipo 1, com tubo de estames curtos e estigma muito acima ou abaixo das anteras quase não produzem pólen fértil e seriam mais femininas do que masculinas. As flores que apresentam tubo de estames longos e curvos (tipo 2 e 3) seriam as responsáveis pela formação de pólen fértil e seriam portanto, ou hermafroditas ou masculinas. As diferenças morfológicas das flores do tipo 2 e 3 não estão associadas à produção de pólen fértil, mas talvez possam estar associadas à diferenças fisiológicas quanto à germinação do mesmo.

A correlação entre percentagem de pólen fértil e sementes viáveis, para as duas espécies, foi negativa e significativa, sugerindo que indivíduos que produzem mais sementes, estariam produzindo menos pólen fértil e vice versa. Esse resultado juntamente com o apresentado acima, de associação entre tipo de flor e fertilidade de pólen, sugere que os indivíduos de uma população, tanto para *P. pubescens* como *P. emarginatus*, invistam diferentemente na produção de pólen fértil e sementes viáveis. É possível que estas espécies, funcionalmente, não sejam hermafroditas.

Situação similar foi observada em *Thalictrum pubescens* (Ranunculaceae) uma espécie dióica críptica, cujas plantas femininas produzem flores morfolologicamente hermafroditas, com anteras e pistilos (Davis 2001) e em *Cupania guatemalensis* (Sapindaceae), uma espécie monóica cujas flores femininas produzem estames e grãos de pólen, mas as anteras não se abrem (Bawa 1977). Em *Citharexylum fruticosum* (Verbenaceae) as flores da planta feminina produzem estames morfolologicamente normais, mas que não produzem pólen nem se abrem (Tolomson & Fawcett 1972). Um caso ainda críptico de dioicia ocorre em *Solanum appendiculatum* (Solanaceae) onde tanto as flores

das plantas masculinas, como das femininas produzem pistilo, estames e anteras que produzem grãos de pólen bem formados, mas que não germinam (Meagher 1988). Várias espécies de *Solanum* são androdióicas morfológicas, entretanto funcionalmente são dióicas. As flores masculinas apresentam gineceu pouco desenvolvido e anteras com pólen copioso, enquanto as flores hermafroditas, embora tenham anteras bem desenvolvidas que produzem pólen, o mesmo não germina (Anderson & Symon 1989).

Trabalho avaliando a variação de fertilidade de pólen entre botões dentro de um indivíduo em *P. pubescens* também sugere que esta espécie não seja funcionalmente hermafrodita (Avelino *et al.* 2002 a,b,c). A percentagem de pólen de botões de uma mesma inflorescência, seguindo uma seqüência da base da inflorescência em direção ao ápice decai. Botões basais apresentam maior percentagem de pólen fértil do que os mais apicais. Assim sendo, indivíduos cujos botões basais apresentam baixa percentagem de pólen fértil seriam funcionalmente femininos. Indivíduos cuja percentagem de pólen fértil nos botões basais é alta seriam doadores de pólen no início da floração uma vez que esses são os primeiros botões a se abrir durante a floração. Esses indivíduos seriam funcionalmente masculinos. Tanto indivíduos com baixa fertilidade de pólen como os com alta produzem frutos e sementes, portanto essa espécie não parece ser totalmente dióica. As flores basais de indivíduos que apresentam alta percentagem de pólen seriam ou flores hermafroditas, ou apenas masculinas, mas as apicais não produzem pólen, sendo, portanto femininas apenas. Há indivíduos com percentagens intermediárias de grão de pólen fértil nos botões basais, que apresentam o mesmo comportamento e, portanto têm o seu máximo de contribuição masculina para a próxima geração também no início da floração. A mesma relação ocorre em relação ao tamanho dos grãos de pólen (Avelino *et al.* 2002b). Botões basais apresentam grãos de pólen significativamente maiores e de contornos mais regulares do que

os botões mais apicais da mesma inflorescência. Além disso, existe uma variação significativa na percentagem de pólen fértil de um mesmo indivíduo em anos distintos, sugerindo que a fertilidade do pólen de um mesmo indivíduo pode mudar de um ano para outro (Avelino *et al.* 2002b), embora não mude o padrão descrito para fertilidade entre botões de uma mesma inflorescência (botões basais apresentam maior percentagem de pólen fértil que os apicais). Em um estudo para seis espécies de *Atriplex* (Freeman & McArthur 1984) foi observado que a razão sexual em populações dessas espécies muda de ano para ano, devido à mudança de sexo dos indivíduos dessas espécies.

Existe um número muito alto de exemplos de plantas que apresentam uma expressão do sexo intermediária à dioícia completa e hermafroditismo. Quando indivíduos de uma mesma população não são regularmente hermafroditas a espécie é considerada díclina (Richards 1986). Os dados apresentados acima, sugerem que este possa ser o caso para as espécies estudadas de *Pterodon*. Essas espécies podem ser ginodióicas, apresentando indivíduos com flores funcionalmente femininas e indivíduos com flores funcionalmente masculinas apenas e hermafroditas, ou então polígama com indivíduos femininos, indivíduos hermafroditas e indivíduos com flores hermafroditas e femininas (Richards 1986). Em *Cirsium arvense* (Asteraceae) (Richards 1986) flores morfológicamente hermafroditas agem como unissexuais, uma vez que as anteras de flores femininas não produzem pólen.

Uma outra possibilidade que é sugerida pela variação na contribuição de pólen de um mesmo indivíduo em anos consecutivos (Avelino *et al.* 2002b) é que essas espécies apresentem sexo lábil, ou seja, difasia de gênero ou escolha de gênero (Lloyd 1980a,b, Lloyd *et al.* 1980, Schlessman 1988). O conceito de gênero, neste caso é importante porque indivíduos que produzem óvulos e sementes, também podem estar produzindo pólen. Em

uma série de trabalhos, Lloyd (1979, 1980a,b) e Lloyd *et al.* (1980) propuseram o conceito de gênero funcional, uma vez que não é raro, em espécies de plantas, que um indivíduo não seja funcionalmente exclusivamente masculino ou feminino. Por exemplo, *Discaria toumatou* (Rhamnaceae) apresenta flores morfológicamente hermafroditas que variam na função feminina e masculina. Entre 0 a 44% das flores se desenvolvem em frutos enquanto outros indivíduos da população produzem pólen mas não sementes (Primack & Lloyd 1980, Cox 1988).

A escolha de gênero ou ainda a reversão do gênero tem sido entendida como um mecanismo importante em plantas para aumentar o sucesso reprodutivo de indivíduos de uma dada espécie e uma medida importante para o entendimento de como um indivíduo contribui com seus genes para as próximas gerações, se via pólen ou via óvulo (Lloyd 1979, 1980b). Em plantas, a determinação sexual pode ser cromossômica, gênica, pode ser influenciada por fatores ambientais, temporais (Bierzychudek 1982, 1984, Freeman & Vitale 1985, Lee 1988, Meagher 1988, Schlessman 1988, Zimmerman 1991, Dellaporta & Calderon-Urrea 1993, Korpelainen 1998) ou ainda pelo tamanho do indivíduo (Bierzychudek 1984, Schlessman 1988, Clay 1993). Acredita-se o investimento na produção de sementes ou de pólen esteja correlacionado com a alocação de recursos energéticos da planta para produção de pólen fértil e formação, desenvolvimento e manutenção de frutos e sementes viáveis (Charnov 1982, Lee 1988, Eckhart & Chapin 1997, McDowell *et al* 2000). Em plantas, o investimento em produção de pólen, e especialmente em produção de sementes parece ser limitada pela quantidade de recurso necessária para o desenvolvimento dos mesmos (Lloyd 1980 a,b). No geral acredita-se que o gasto energético com para produção e desenvolvimento de sementes viáveis seja maior do que os gastos para produção de pólen fértil (Schlessman, 1988). Em *Caesalpinia calycina*

(Leguminosae), a produção de frutos e sementes influencia a produção de flores funcionalmente masculinas na mesma inflorescência (Gibbs *et al.* 1999). Esta espécie é andromonóica, cujas flores hermafroditas encontram-se na base da inflorescência, mas cuja expressão das flores masculinas só se manifesta após estas flores basais terem sido fecundadas com sucesso e os frutos começarem a se desenvolver. Na ausência de fertilização, as flores mais apicais permanecem hermafroditas. Este, entretanto, não parece ser o caso de *P. pubescens* e *P. emarginatus*. Observações de campo indicam que os frutos normalmente se formam no ápice das inflorescências (dados não apresentados aqui). Por outro lado os botões basais são os produtores de pólen nos indivíduos que são funcionalmente mais masculinos. Portanto, nessas espécies outros fatores devem estar controlando a expressão sexual.

Seja qual for o mecanismo de controle da expressão de gênero em *Pterodon*, os indivíduos de uma população nestas espécies não parecem estar investindo igualmente na produção de gametas masculinos e femininos, como se poderia supor pela observação apenas das características morfológicas das flores. A variação nas contribuições masculinas e femininas para a próxima geração, em uma população ou espécie, influencia no tamanho efetivo da população e tem conseqüências importantes para a sobrevivência das mesmas no tempo (Lande & Barrowclough 1993, Frankel *et al.* 1995). Além disso, apesar das espécies de *Pterodon* serem autocompatíveis (Afonso 1997) os dados de pólen e sementes sugerem que os indivíduos dentro de uma população sejam funcionalmente mais femininos ou masculinos. Essa estratégia estaria favorecendo reprodução cruzada o que explica a alta variabilidade genética, detectada através de marcadores RAPD, dentro de populações.

Plântulas

Os resultados das análises estratificadas para percentagem de sobrevivência de plântulas foi altamente significativo, indicando que a sobrevivência de plântulas está associada à população estudada, bem como à espécie.

Pterodon emarginatus apresentou quase o dobro de sobrevivência de plântulas do que *P. pubescens*.

Em *Pterodon pubescens* a população que apresentou menor percentagem de sobrevivência de plântulas foi AV, seguida de JB, CEN e L4. A baixa percentagem de sobrevivência de plântulas não é explicada pela integridade do ambiente onde as plantas mães se distribuem. A população JB encontra-se dentro da reserva do Jardim Botânico e apresentou baixa percentagem de sobrevivência quando comparada com as de CEN e L4 que se encontram em áreas mais perturbadas pela ação humana. Esses resultados também não estão correlacionados com a maior variabilidade genética encontrada nos indivíduos da população, uma vez que a população JB apresentou maior variabilidade genética e a que apresentou menor, estimada pela decomposição da variância entre indivíduos dentro de local, foi L4. O tamanho médio de progênie, também não parece estar relacionado com esse resultado. Embora, JB tenha apresentado o menor tamanho médio de progênie, AV apresentou o maior.

Com relação à percentagem de sobrevivência de plântulas, para *P. emarginatus*, a população com menor percentagem foi TR, apesar de apresentar o maior tamanho médio de progênie.

A integridade do ambiente parece também não estar correlacionada à sobrevivência das plântulas. Os indivíduos da população TR estão distribuídos em áreas de cerrado bem preservados, enquanto que a população CPAC ocupa uma área mais perturbada. Entretanto,

não se pode rejeitar a hipótese de que a maior sobrevivência de plântulas da população CPAC se deva à maior variabilidade genética contida nesta população, quando comparada com a observada em AE.

Por outro lado, a variabilidade genética não parece estar correlacionada à sobrevivência de plântulas nas duas espécies. A espécie *P. emarginatus* que apresenta menor variabilidade genética do que *P. pubescens*, apresentou maior percentagem de sobrevivência de plântulas.

Os resultados da análise de correlação entre percentagem de pólen fértil, produção de sementes viáveis e sobrevivência de plântulas, indicam que há uma correlação negativa e significativa, entre percentagem de pólen fértil e produção de sementes viáveis e entre percentagem de pólen fértil e sobrevivência de plântula. Esses resultados sugerem que as sementes formadas pelos indivíduos doadores de pólen, aqueles funcionalmente mais masculinos, estariam formando plântulas de pior qualidade, reforçando a idéia de que essas duas espécies não sejam funcionalmente hermafroditas e que a alocação de recursos para formação de sementes viáveis seja diferente entre os indivíduos que se comportaram como masculinos e aqueles que se comportaram como femininos. Entretanto, não houve correlação entre produção de semente e sobrevivência de plântula o que sugere que outros fatores, além do gênero dos indivíduos interferem na sobrevivência de plântulas.

Diversidade Genética, sementes, pólen, plântulas e conservação das espécies.

Flutuações na proporção de indivíduos masculinos e femininos, bem como no tamanho das progênes entre adultos, altera o tamanho efetivo de uma população (N_e) (Wright 1969, Crow & Kimura 1970, Avise 1994, Lande & Barrowclough 1993, Frankel *et al* 1995). O N_e é um parâmetro importante quando a conservação de uma determinada

espécie é o objetivo central de um estudo. As variações observadas nas duas espécies de *Pterodon* (na produção de pólen e sementes viáveis e número de plântulas por adulto) sugerem que o tamanho efetivo de suas populações seja muito afetado por essas flutuações e que o simples censo não seja suficiente para inferir sobre o N_e das mesmas.

A variabilidade genética observada em uma população de adultos retrata um evento passado, pois avalia a variabilidade de genótipos que foram selecionados em um passado distante, em condições ambientais que podem não ser mais as atuais. Por outro lado, a variabilidade genética de um dado indivíduo não permite que se infira sobre sua aptidão. Os resultados sobre produção de pólen fértil, de sementes viáveis e sobrevivência de plântulas nas duas espécies, mostram que apesar da variabilidade genética, expressa pela decomposição da variância entre indivíduos das populações de ambas as espécies, ser equivalente, elas apresentam variação significativa quanto aos demais aspectos de suas histórias de vida. A população de *P. pubescens* que apresentou maior variabilidade genética foi a que apresentou menor produção de sementes viáveis, média baixa de progênie por planta mãe e baixa percentagem de sobrevivência de plântulas. Por outro lado, a espécie *P. emarginatus*, apresentou menor variabilidade genética que *P. pubescens* e maior percentagem de sobrevivência de plântulas.

Os dados encontrados para as duas espécies de *Pterodon*, não são de todo únicos. Embora existam vários trabalhos que mostram que variabilidade genética e aptidão estão correlacionadas, outros trabalhos indicam que esses dois eventos nem sempre se correlacionam (Reed & Frankham 2003). Reed e Frankham (2003) encontraram correlações positivas e significativas entre heterozigosidade e aptidão quando analisando em conjunto os dados de inúmeros trabalhos para diversos organismos. Entretanto, em suas tabelas,

pode-se observar que pelo menos para cinco espécies de plantas essa correlação foi negativa (ver apêndices 1 e 2).

Em *Lychnis viscaria* (Caryophyllaceae), embora a diversidade genética encontrada dentro das populações estivesse diretamente correlacionada com o tamanho das mesmas, nem o tamanho das populações tampouco a diversidade genética nelas encontrada apresentou correlação com aptidão, estimada através da percentagem de germinação de sementes, produção de sementes e plântulas (Lammi *et al.* 1999).

Variabilidade genética e dados sobre a estrutura genética de populações são dados considerados extremamente importantes na escolha de populações de uma dada espécie que devam ser preservadas, ou como manejar, coletar e manter uma dada espécie. Essas são informações importantes e por vezes as mais fáceis e rápidas de serem obtidas. Entretanto, não são suficientes. Dados sobre o sistema reprodutivo, produção de sementes e de plântulas são igualmente importantes e podem esclarecer aspectos da história de vida de uma espécie, essenciais para o manejo da mesma e que não se acham expressos necessariamente na diversidade genética amostrada.

As análises genéticas mostraram que ambas espécies são alógamas e que a maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro de cada população. Apesar disso, cada local de coleta correspondeu a populações geneticamente distintas. Desta forma, em projetos de conservação *ex-situ* as amostras ser tomadas de mais de uma localidade. Por outro lado, os resultados referentes à produção de sementes viáveis e sobrevivência de plântulas, para as duas espécies de *Pterodon*, indicam que a simples escolha de matrizes no campo, que aparentemente, em um dado ano tenham produzido muitos frutos, e cujas características morfológicas da planta mãe, tais como altura e formação de copa, sugeriram uma qualidade superior de progênies, não é uma estratégia adequada para essas espécies.

Uma forma de contornar esse problema seria tomar amostras de botões florais no início da floração, verificar a viabilidade do pólen e coletar, na estação seguinte, frutos dos indivíduos que apresentaram baixa viabilidade. Uma vez que tal procedimento é por vezes inviável, devido ao tempo necessário para assim proceder, uma estratégia mais plausível deveria se concentrar em coletar frutos e manter poucas sementes de um grande número de indivíduos de uma dada população, como é sugerido por Vencovsky & Crossa (1999) para espécies que apresentam um sistema de reprodução misto, com autofecundação e acasalamentos ao acaso, como parece ser o caso das duas espécies estudadas. Essa estratégia asseguraria um aumento do número efetivo da população, mesmo que não se tenha informação sobre o comportamento dos indivíduos mães amostrados.

Com relação à conservação *in-situ* das duas espécies, embora os dados genéticos indiquem que cada local representa uma população distinta, a variabilidade genética contida nessas populações, não parece estar correlacionada com a aptidão total das mesmas, pelo menos no que diz respeito a *P. pubescens*. Desta forma, a conservação dessas espécies deveria incluir muitas populações de cada uma e, uma vez que as flutuações com relação à contribuição de gametas masculinos e femininos, bem como sobrevivência de progênie, são altas, cada população deveria conter um grande número de indivíduos adultos, desta forma tentando assegurar a sobrevivência da espécie no tempo. Um outro fator que deve ser levado em consideração quanto ao número de indivíduos dessas espécies a ser mantido em uma população diz respeito à possibilidade de reprodução assexuada, como foi mostrado por Rocha & MacDowell (1997). Esses dois autores mostram que, em *P. pubescens*, o que seriam considerados vinte e quatro indivíduos adultos relativamente próximos, em uma dada população, representavam de fato apenas sete genótipos distintos. Uma vez que *P. emarginatus* parece ser uma espécie muito próxima de *P. pubescens*, e devido ao fato de

que várias espécies de cerrado apresentam alguma forma de reprodução assexuada (Rawitscher *et al.* 1943, Ferri 1962, Rizzini & Heringer 1962, Raw & Hay 1985, Goldenberg & Shepherd 1998, Hoffmann 1998), é provável que esta espécie também seja capaz deste tipo de estratégia de reprodução o que significa que o número de indivíduos em uma dada área pode não corresponder ao número de genótipos distintos aí contidos. Por outro lado, ao se selecionar uma dada área para conservação dessas espécies, deveriam ser escolhidos locais que apresentem fitofisionomias distintas onde ocorram indivíduos dessas espécies (cerrado *sensu stricto* e cerradão, por exemplo), uma vez que a maior variabilidade genética encontrada na população CPAC com relação à detectada para a população AE, de *P. emarginatus*, talvez possa ser explicada pela maior diversidade de habitats aí encontrada.

Considerações finais

A existência de variação genética dentro de uma população ou espécie normalmente é tomada como indicativo do potencial dessa população sobreviver às pressões de seleção ao longo do tempo. Entretanto, isoladamente, dados sobre variabilidade genética nem sempre estão correlacionados com a aptidão dos indivíduos de uma população. No caso das populações de *Pterodon pubescens* estudadas, variabilidade genética não está correlacionada com a aptidão das mesmas. A população do Jardim Botânico que apresentou maior variabilidade genética é a que apresenta menor produção de sementes viáveis e a segunda menor sobrevivência de plântulas. Já em *Pterodon emarginatus* a população que apresentou maior variabilidade genética foi também a que apresentou maior aptidão. Quando é considerada a relação entre variabilidade genética e aptidão em nível de espécie observa-se que *P. pubescens* apresenta maior variabilidade genética do que *P. emarginatus*, entretanto, a aptidão (medida em termos de sobrevivência de plântulas) é maior nesta

última espécie. Entretanto, se essas populações conseguiram trazer até o momento a diversidade constatada nesse estudo, é de se supor que essas populações fizeram uso de estratégias de reprodução mais complexas do que aquelas sugeridas pelos resultados obtidos nesse trabalho de modo a estabilizar a contribuição gamética dos indivíduos para sua descendência e assim criarem condições reprodutivas capazes de permitirem a manutenção dessa diversidade.

Desta forma, percebe-se que na prática é difícil estabelecer *a priori* um conjunto de critérios que possa ser válido para toda e qualquer espécie ou população. Portanto, juntamente com os dados genéticos há que se considerar os parâmetros demográficos e reprodutivos, pois estes dizem respeito à capacidade da população transmitir essa variabilidade a populações futuras.

Apesar da variabilidade genética observada dentro das populações de ambas as espécies de *Pterodon* ser semelhante, a contribuição de pólen e sementes entre indivíduos varia substancialmente e encontra-se refletida na variação de sobrevivência de plântulas (variação do número de descendentes) e são indicativas de que o tamanho efetivo (N_e) dessas populações difere e deve ser muito menor que o tamanho censitário. Esses resultados afetam as possíveis estratégias de conservação *ex-situ* e *in situ* a serem empregadas. No caso de conservação *ex-situ*, não há como, *a priori*, escolher matrizes no campo e, portanto a estratégia deverá se concentrar em coletar poucas sementes de um grande número de adultos por população. Para a conservação *in situ* aconselha-se escolher muitas áreas diferentes que apresentem diversidade de habitats e um grande número de indivíduos adultos dessas espécies.

Bibliografia

AFONSO, A.P. 1997. Biologia reprodutiva de *Pterodon pubescens* Benth. e *Pterodon polygaliflorus*. Benth. (Fabaceae – Papilionoideae) em áreas de cerrado do Distrito Federal. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília.

ALEXANDER, M.P. 1980. A versatile staining for pollen tubes, yeast and bacteria. *Stain Technology* 55:13-18.

ANDERSON, G.J. & SYMON, D.E. 1989. Functional dioecy and andromonoecy in *Solanum*. *Evolution* 43: 204-219.

ANDERSON, R.L., BELCHER, E. & MILLER, T. 1984. Occurrence of seed fungi inside slash pine seeds produced in seed orchards in the United States. *Seed Science and Technology* 12:795-799.

ANTONOVICS, J.A. & LEVIN, D.A. 1980. The ecological and genetic consequences of density-dependent regulation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:411-452.

ARATHI, H.S., GANESHIAIAH, K.N., SHAANKER, R.U. & HEDGE, S.G. 1999. Seed abortion in *Pongamia pinnata* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 86:659-662.

AVELINO, A.S., ROCHA, D.M.S., CORDEIRO, C.M.T. 2002 a. Pollen viability in *Pterodon pubescens*, a possible case of gynodioecy or polygamy?. In Abstracts of the XLV Simposium of the International Association for Vegetation Science, Porto Alegre, p.34.

AVELINO, A.S., ROCHA, D.M.S., CORDEIRO, C.M.T. 2002 b. Possível sexo lábil em *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae). In Resumos do Simpósio de Ecologia e Biodiversidade – Perspectivas e desafios para o século XXI, Brasília, p.17-18.

AVELINO, A.S., ROCHA, D.M.S., CORDEIRO, C.M.T. 2002 c. Sexo funcional em *Pterodon pubescens* Benth.: análise de fertilidade de pólen dentro e entre indivíduos. In Resumos do LIII Congresso Nacional de Botânica – XXV Reunião Nordestina de Botânica, Recife, p.220.

AVISE, J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York.

BARROS, M.A.G. 1982. Flora Medicinal do Distrito Federal. Revista Brasil Florestal 12:35-45.

BAWA, K.S. 1977. The reproductive biology of *Cupania guatemalensis* (Sapindaceae). Evolution 31:52-63.

BAWA, K.S. & WEBB, C.J. 1984. Flower fruit and seed abortion in tropical trees: implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. *American Journal of Botany* 71: 736-751.

BERTIN, R.I. 1988. Paternity in plants. *In Plant reproductive ecology* (J.Lovett Doust & L.Lovett Doust, eds.). Oxford University Press, New York, p.30-59.

BIERZYCHUDEK, P. The demography of jack-in-the-pulpit, a forest perennial that changes sex. *Ecological Monographs* 52: 335-351.

BRADSHAW, A.D. 1972. Some evolutionary consequences of being a plant. *In Evolutionary Biology* (T. Dobzhansky, M.K. Hecht & W.C. Steere, eds). v.5, p.25-47.

BUSO, G.S.C., RANGEL, P.H. & FERREIRA, M.E. 1998. Analysis of genetic variability of South American wild rice (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. *Molecular Ecology* 7: 107-117.

CARDOSO, M.A., PROVAN, J., POWELL, P.C., FERREIRA, C.G. & OLIVEIRA, D.E.de. 1998. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae). *Molecular Ecology* 7:601-608.

CARDOSO, S.R.S., ELOY, N.B., PROVAN, J., CARDOSO, M.A. & FERREIRA, P.C.G. 2000. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. Populations estimated by AFLP analysis. *Molecular Ecology* 9:1753-1760.

CRUZAN, M.B. 1989. Pollen tube attrition in *Erythronium grandiflorum*. American Journal of Botany 76: 562-570.

DAVIS, S.L. 2001. Phenotypic and genetic correlations among floral traits in two species of *Thalictrum*. The Journal of Heredity 92:361-366.

DELLAPORTA, S.L. & CALDERON-URREA, A. 1993. Sex determination in flowering plants. The Plant Cell 5:1241-1251.

DHINGRA, O.D., MAIA, C.B., LUSTOSA, D.C. & MESQUITA, J.B. 2002. Seedborne pathogenic fungi that affect seed quality in red angico (*Anadenanthera macrocarpa*) trees in Brazil. Journal of Phytopathology 150:451-455.

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

DUARTE, I.D.G., FERREIRA-ALVES, D.L. & NAKAMURA-CRAIG, M. 1992. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia induced by vouacapan. Life Sciences 50: 891-897.

ECKHART, V.M. & CHAPIN, F.S. 1997. Nutrient sensitivity of the cost of male function in gynodioecious *Phacelia linearis* (Hydrophyllaceae). American Journal of Botany 84:1092-1098.

ENDLER, J.A. 1979. Gene flow and life history patterns. Genetics 93:263-284.

FERRI, M.G. 1962. Histórico dos trabalhos botânicos sobre o cerrado. *In* Simpósio sobre o Cerrado (M.G. Ferri, ed). p.7-35

FRANKEL, O.H., BROWN, A.H.D. & BURDON, J. 1995. The conservation of plant biodiversity. Cambridge University Press, Cambridge.

FREEMAN, D.C. & MCARTHUR, E.D. 1984. The relative influences of mortality, nonflowering, and sex change on the sex ratio of six *Atriplex* species. *Botanical Gazette* 145:385-394.

FREEMAN, D.C. & VITALE, J. 1985. The influence of environment on the sex ratio and fitness of spinach. *Botanical Gazette* 146:137-142.

GIBBS, P.E., LEWIS, G.P. & LUGHADHA, E.N. 1999. Fruit-set induced changes in sex of flowers in *Caesalpinia calycina* (Leguminosae). *Plant Biology* 1:665-669.

GILLIES, A.C.M., CORNELIUS, J.P., NEWTON, A.C., NAVARRO, C. & HERNÁNDEZ, M. 1997. Genetic variation in Costa Rica populations of the tropical timber species *Cedrella odorata* L., assessed using RAPD. *Molecular Ecology* 6:1133-1145.

GILLIES, A.C.M., NAVARRO, C., LOWE, A.J., NEWTON, A.C., HERNÁNDEZ, M., WILSON, J. & CORNELIUS, J.P. 1999. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPD. *Heredity* 83:722-732.

CHARNOV, E.L. 1982. The theory of Sex allocation. Princeton University Press, Princeton.

CLAY, K. 1993. Size-dependent gender change in green dragon (*Arisaema dracontium*; Araceae). *American Journal of Botany* 80:769-777.

COLLEVATTI, R.G. & GRATTAPAGLIA, D., HAY, J. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10:349-356.

COX, P.A. 1988. Morphological and dimorphic sexual strategies: a modular approach. *In* Plant reproductive ecology (J.Lovett Doust & L.Lovett Doust, eds.). Oxford University Press, p.80-97

CRAWFORD, T.J. 1984. What is a population? *In* Evolutionary Ecology: 23rd Symposium of the British Ecological Society (Shorrocks, ed.). p.135-172

CRAWLEY, M. 1992. Seed predators and plant population dynamics. *In* Seeds: the ecology of regeneration in plant communities (Fenner, ed.). p.157-191.

CROW, J.F. & KIMURA, M. 1970. An introduction to Population Genetics Theory. Harper & Row Publishers Inc, New York.

GOLDENBERG, R. & SHEPHERD, G.J. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in “cerrado” vegetation. *Plant Systematics and Evolution* 211:13-29.

GOOGLE EARTH FREE VERSION. 10/01/2006. <http://earth.google.com/index.html>

HAMRICK, J.L. 1989. Isozymes and the analysis of genetic structure. *In* Isozymes in plant biology (D. Soltis & P.S. Soltis, eds.). Dioscorides Press, Portland, Oregon, p.87-105.

HAMRICK, J.L. & GODT, M.J. 1990. Allozyme diversity in plant species. *In* Plant population genetics, breeding and genetic resources (A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L.Kahler & B.S. Weir, ed.). Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, p.43-63.

HAMRICK, J.L. & GODT, M.J. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. *In* Conservation genetics: case history from nature (J.C. Avise & J.L. Hamrick, ed.). Chapman & Hall, New York, p.281-304.

HAMRICK, J.L. & LOVELESS, M.D. 1989. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. *In* The evolutionary ecology of plants (J.H. Bock & Y.B. Linhart, eds.). Westview Press, London, p.129-146.

HAMRICK, J.L. & NASON, D. 1996. Consequences of dispersal in plants. *In* Population dynamics in ecological space and time (O.E.Rhodes Jr., R.K. Chesser & M.H.Smith, eds.). The University of Chicago Press, Chicago, p.203-236

HANSKI, I. 1996. Metapopulation ecology. *In* Population dynamics in ecological space and time (O.E.Rhodes Jr., R.K. Chesser & M.H.Smith, eds.). The University of Chicago Press, Chicago, p.13-43.

HARPER, J.L. 1977. Population biology of plants. Academic Press, London.

HOFFMANN, W.A. 1998. Post-burn reproduction of woody plants in a neotropical savanna: the relative importance of sexual and vegetative reproduction. *Journal of Applied Ecology* 35:422-433.

HUFF, D.R., PEAKALL, R. & SMOUSE, P.E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.. *Theoretical and Applied Genetics* 86:927-934.

JANZEN, D.H. 1971. Seed predation by animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 2: 465-492.

KOPERLAINEN, H. 1998. Labile Sex expression in plants. *Biological Review* 73:157-180.

LACERDA, D.R., ACEDO, M.D.P., LEMOS FILHO, J.P. & LOVATO, M.B. 2001. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymania reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian cerrado. *Molecular Ecology* 10:1143-1152.

LAMMI, A., SIIKAMAKI, P. & MUSTAJARVI, K. 1999. Genetic diversity, population size and fitness in central and peripheral populations of a rare plant *Lychnis viscaria*. *Conservation Biology* 13:1069-1078.

LANDE, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241:1455-1460.

LANDE, R. & BARROWCLOUGH, G.F. 1993. Effective population size, genetic variation and their use in population management. *In* *Viable populations for conservation*. (M.E. Soulé, ed.). Cambridge University Press, Cambridge, p.87-123

LEE, T.D. 1988. Patterns of fruit and seed production. *In* *Plant reproductive ecology* (J.Lovett Doust & L.Lovett Doust, eds.). Oxford University Press, New York, p.179-202.

LEMES, M.R., GRIBEL, R., PROCTOR, J. & GRATTAPAGLIA, D. 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swetenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology* 12:2875–2883.

LEWINSOHN, T.M. 1980. Predação de sementes em *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae): aspectos ecológicos e evolutivos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MCDOWELL, S.C.L., MCDOWELL, N.G., MARSHALL, J.D. & HULTINE, K. 2000. Carbon and nitrogen allocation in Rocky Mountain douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var *glauca*, Pinnaceae). *American Journal of Botany* 87: 539-546.

MEAGHER, T.R. 1988. Sex determination in plants. *In* Plant reproductive ecology. Patterns and strategies (J.Lovett Doust & L.Lovett Doust, eds.). Oxford University Press, New York, p.125-138.

MELSER, C. & KLINKHAMER, P.G. 2001. Selective seed abortion increases offspring survival in *Cynoglossum officinale* (Boraginaceae). *American Journal of Botany* 88:1033-1040.

MOCKFORD, S.W., SNYDER, M. & HERMAN, T.B. 1999. A preliminary examination of genetic variation in a peripheral population of Blanding's turtle, *Emydoidea blandingii*. *Molecular Ecology* 8:323-327.

MORS, W.B., PELLEGRINO, J. & FASCIO DOS SANTOS FILHO, M. 1966. Ação profilática do óleo dos frutos de sucupira branca, *Pterodon pubescens* Benth., contra a infecção pelo *Schistosoma mansoni*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências (Suplemento)* 38: 325-330.

NEI, M. & LI, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceeding of the National Academy of Science of USA* 76:5269-5273.

NIESENBAUM, R.A. 1999. The effects of pollen load size and donor diversity on pollen performance, selective abortion, and progeny vigor in *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany* 86: 261-268.

PALACIOS, C. & GONZÁLES-CANDELAS, F. 1997. Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). *Molecular Ecology* 6:1107-1121.

PRIMACK, R.B. & LLOYD, D.G. 1980. Sexual strategies in plants IV. The distribution of gender in two monomorphic shrub populations. *The New Zealand Journal of Botany* 18:109-111.

PULLIAM, H.R. 1996. Sources and sink: empirical evidence and population consequences. *In* Population dynamics in ecological space and time (O.E.Rhodes Jr., R.K. Chesser & M.H.Smith, eds.). The University of Chicago Press, Chicago, London, p.45-69.

RAMOS, F.A, MARTINS, I., FARIAS, J.M., SILVA, I.C.S. & MIRANDA, A.P. 2001. Oviposition and predation by *Speciomerus revoili* (Coleóptera, Bruchidae) on seeds of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) in Brasília, DF., Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 61: 449-454.

RAW, A. & HAY, J. 1985. Fire and other factors affecting a population of *Simarouba amara* in cerradão near Brasília, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 8: 101-107.

LEWONTIN, R. 2000. The problems of population genetics. *In* Evolutionary genetics. From molecules to morphology (R.S.Singh & C.B.Kribas, eds). Cambridge University Press, Cambridge, p.5-23.

LLOYD, D.G. 1979. Parental strategies in angiosperms. *The New Zealand Journal of Botany* 17:595-606.

LLOYD, D.G. 1980 a. Sexual strategies in plants I. A hypothesis of serial adjustment of maternal investment during one reproductive session. *New Phytologist* 86:69-79.

LLOYD, D.G. 1980 b. Sexual strategies in plants III. A quantitative method for describing the gender in plants. *The New Zealand Journal of Botany* 18:103-108.

LLOYD, D.G., WEBB, C.J. & PRIMACK, R.B. 1980. Sexual strategies in plants II. Data on temporal regulation of maternal investment. *New Phytologist* 86: 81-92.

LOUDA, S.M. 1989. Predation in the dynamics of seed regeneration. *In* Ecology of soil seed banks. (Leck, Parker & Simpson, eds.). Academic Press Inc., New York, p.25-51.

LOVELESS, M.D. & HAMRICK, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15:65-95.

MANIATIS, T., FRISCHT, E.F. & SAMBROOK, J. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Publications, Cold Spring Harbor, New York.

RAWITSCHER, F., FERRI, M.G. & RACHID, M. 1943. Profundidade dos solos e vegetação em campos cerrados do Brasil Meridional. Anais da academia Brasileira de Ciências 15:267-294.

REED, D.H. & FRANKHAM, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. Conservation Biology 17: 230-237.

RICHARDS, A.J. 1986. The Plant breeding system. George and Allen & Unwin (Publishers) Ltd., London.

RIZZINI, C.T. & HERINGER, E.P. 1962. Studies on the underground organs of trees and shrubs from some southern Brazilian savannas. Anais da Academia Brasileira de Ciências 34:235-247.

ROCHA, D.M.S. & MACDOWELL, S.W. 1997. Identificação de clones de *Pterodon pubescens* Benth. (Leguminosae, Papilionoideae) através da utilização da técnica de RAPD. In Contribuição ao Conhecimento Ecológico do Cerrado – Trabalhos selecionados do 3^o Congresso de Ecologia do Brasil (Brasília, 6-11/10/96) (L.L. Leite, C.H. Saito, eds). Brasília, Depto Ecologia, Universidade de Brasília, p.309-315.

ROHLF, F.J. 1997. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Exeter Software, New York

SARUKHÁN, J. 1980. Demographic problems in tropical systems. *In* Demography and evolution in plant populations (O. Solbrig ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, p.161-188.

SARUKHÁN, J, MARTÍNEZ-RAMOS, M. & PIÑERO, D. 1984. The analysis of demographic variability at the individual level and its consequences. *In* Perspectives in plant population ecology (R. Dirzo & J. Sarukhán eds.). Sinauer Associates Inc., Massachusetts, p.83-106.

SAS 1999. SAS/STAT User's Guide , Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC.

SCHNEIDER, D., ROESSLI, D. & EXCOFFIER, L. 2000. Arlequin ver 2: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

SCHEMSKE D.W., HUSBAND, B.C., RUCKELSHAUS, M.H., GOODWILLIE, C., PARKER, I.M. & BISHOP, J.G. 1994. Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. *Ecology* 75:584-606.

SCHIERENBECK, K.A., SKUPSKI, M., LIEBERMAN, D. & LIEBERMAN, M. 1997. Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. *Molecular Ecology* 6:137-144.

SCHLESSMAN, M.A. 1988. Gender diphasy ("Sex Choice"). *In* Plant reproductive ecology. Patterns and strategies (J.L.Doust & L.L.Doust, eds.). Oxford University Press, New York, Oxford, p.139-153.

SHAFFER, M. 1993. Minimum viable populations: coping with uncertainty. *In* Viable populations for conservation (M.E. Soulé, ed.). Cambridge University Press, Cambridge, p.69-86.

STEPHENSON, P.J. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 12:253-279.

STRAPASSON, M., SANTOS, A.F. & MEDEIROS, A.C.S. 2002. Fungos associados às sementes de angico (*Piptadenia paniculata*). *Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo* 45:137-141.

TOMLINSON, P.B. & FAWCETT, P. 1972. Dioicisism in *Citharexylum* (Verbenaceae). *Journal of the Arnold Arboretum Harvard University* 53:386-389.

VENCOVSKY, R. & CROSSA, J. 1999. Variance effective population size under mixed self and random mating with applications to genetic conservation of species. *Crop Science* 39:1282-1294.

WEIR, B.S. 1990. Sampling properties of gene diversity. *In* Plant population genetics, breeding and genetic resources (A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler & B.S. Weir, eds.). Sinauer Associates Inc. p.23-47.

WIENS, D. 1984. Ovule survivorship, brood size, life history, breeding system and reproductive success in plants. *Oecologia* 64: 47-53.

WRIGHT, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16:97-159.

WRIGHT, S. 1969. Evolution and genetics of Populations. The Theory of Gene Frequencies. University of Chicago Press, Chicago, v.2.

ZIMMERMAN, J.K. 1991. Ecological correlations of libele sex expression in the orchid *Catassetum viridiflavum*. *Ecology* 72: 597-608.