

Dulce Maria Sucena da Rocha

POS-GRADUAÇÃO

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pela candidata Dulce Maria Sucena da Rocha e aprovada pela comissão julgadora



7/10/88

Estudo Filogenético de Hymenaea L. Baseado em Proteínas de Semente

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Vegetal.

Orientador: Dr. George John Shepherd

Campinas - SP

1988

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

R582e

10041/BC

Aos meus pais e à Silvinha.
Pelo apoio e carinho em todas as horas.

Se eu fosse um Jatobá, eu teria demorado mais ainda.

Índice

Introdução -----	1
O gênero <u>Hymenaea</u> -----	1
Proteínas -----	11
 Material e Métodos -----	 20
Estocagem de sementes -----	20
Preparação dos extratos -----	25
Determinação da concentração protéica -----	28
Preparação das amostras -----	29
Preparação do gel -----	30
Fixação e coloração das proteínas -----	31
Determinação do peso molecular -----	32
Determinação da homologia das bandas -----	33
Identificação das proteínas nos gels -----	33
Determinação da similaridade entre padrões -----	35
Construção de dendrogramas -----	36
Dendrogramas com distâncias euclidianas -----	37
Análise de componentes principais (PCA) -----	38
 Resultados -----	 39
Aferimento do método -----	39
Análise de proteínas -----	43
<u>H. courbaril</u> var <u>courbaril</u> -----	43
<u>H. courbaril</u> var <u>stilbocarpa</u> -----	60
<u>H. courbaril</u> var <u>subsessilis</u> -----	79
<u>H. stigonocarpa</u> -----	83
<u>H. intermedia</u> -----	95
<u>H. martiana</u> -----	104
<u>H. courbaril</u> var <u>altissima</u> , <u>H. aurea</u> , <u>H. parvifolia</u> , <u>H. oblongifolia</u> -----	108
Comparação das espécies -----	111
 Discussão -----	 141
Sobre o método -----	141
Sobre as espécies -----	145
Sobre cada espécie -----	147
<u>H. courbaril</u> var <u>courbaril</u> -----	147
<u>H. courbaril</u> var <u>stilbocarpa</u> -----	152
<u>H. courbaril</u> var <u>subsessilis</u> -----	156
<u>H. courbaril</u> var <u>altissima</u> -----	157
Complexo <u>H. courbaril</u> -----	157
<u>H. stigonocarpa</u> -----	162
<u>H. martiana</u> -----	167
<u>H. intermedia</u> -----	168
<u>H. oblongifolia</u> , <u>H. aurea</u> , <u>H. parvifolia</u> -----	170
Comparação entre as espécies -----	171
Significado evolutivo possível -----	189
Significado a nível taxonômico -----	191

Resumo	-----	196
Summary	-----	198
Bibliografia	-----	200

Índice de Figuras

Figura 1 (a,b,c,d) - Padrões parciais que ocorreram no gênero <u>Hymenaea</u>	-----44-47
Figura 2 - Diagrama de todas as proteínas encontradas no gênero <u>Hymenaea</u>	-----48
Figura 3 - Diagrama de todas as proteínas encontradas em <u>H. courbaril</u> var <u>courbaril</u>	-----49
Figura 4 - Dendrograma de média não ponderada para <u>H. courbaril</u> var <u>courbaril</u>	-----52
Figura 5 - Diagrama de todas as proteínas encontradas em <u>H. courbaril</u> var <u>stilbocarpa</u>	-----61
Figura 6 - Dendrograma de média não ponderada para <u>H. courbaril</u> var <u>stilbocarpa</u>	-----65
Figura 7 - Diagrama de todas as proteínas encontradas em <u>H. courbaril</u> var <u>subsessilis</u>	-----80
Figura 8 - Dendrograma de média não ponderada para <u>H. courbaril</u> var <u>subsessilis</u>	-----82
Figura 9 - Diagrama de todas as proteínas encontradas em <u>H. stigonocarpa</u>	-----84
Figura 10- Dendrograma de média não ponderada para <u>H. stigonocarpa</u>	-----86
Figura 11- Diagrama de todas as proteínas encontradas em <u>H. intermedia</u>	-----96
Figura 12- Dendrograma de média não ponderada para <u>H. intermedia</u>	-----98
Figura 13- Diagrama de todas as proteínas encontradas em <u>H. martiana</u>	-----105
Figura 14- Dendrograma de média não ponderada para <u>H. martiana</u>	-----107
Figura 15- Dendrograma de média não ponderada para sementes individuais de <u>H. courbaril</u> var <u>altissima</u> , <u>H. aurea</u> , <u>H. parvifolia</u> e <u>H. oblongifolia</u>	-----110
Figura 16- Dendrograma de média não ponderada de todos os padrões individuais encontrados nos taxa de <u>Hymenaea</u>	-----116

- Figura 17- Fotografia de um gel de H. courbaril var courbaril mostrando variação entre padrões protéicos -----118
- Figura 18- Fotografia de um gel com extratos de várias espécies de Hymenaea -----119
- Figura 19- Dendrograma de média não ponderada com distâncias euclidianas para as espécies que mais contribuíram para este estudo (frequências normalizadas) -----120
- Figura 20- Dendrograma de média não ponderada com distâncias euclidianas para as espécies que mais contribuíram para este estudo (frequências não normalizadas) -----121
- Figura 21 a,b- PCA de covariância das espécies, usando frequências. Estão representados os dois primeiros autovetores -----123-124

INDICE DE TABELAS

TABELA I - Principais dados de coleta para as sementes analisadas de <u>H. courbaril</u> var. <u>courbaril</u> .-----	21
TABELA II - Principais dados sobre as sementes de <u>H. courbaril</u> var. <u>stilbocarpa</u> utilizadas no presente estudo.-----	22
TABELA III - Principais dados sobre as sementes analisadas de <u>H. stigonocarpa</u> .-----	23
TABELA IV - Principais dados para as sementes analisadas de <u>H. intermedia</u> .-----	24
TABELA V - Principais dados de sementes analisados para as demais espécies.-----	24
TABELA 1 (a) - Média da concentração proteica de <u>P. vulgaris</u> para cada tratamento através do método de Lowry. Também são fornecidos: o desvio padrão (S) e o número de repetições (N) em cada tratamento. (Concentração em ug/ml). (Solução extratora básica NaCl 1%).---	39
TABELA 1 (b) - Fonte de variação obtida na análise de variância à qual foram submetidos os resultados dos 8 tratamentos para extração de proteínas de <u>P. vulgaris</u> .-	40
TABELA 2 - Frequência de bandas para cada população de <u>H. courbaril</u> .-----	50
TABELA 3 - Padrões totais encontrados nas sementes analisadas de <u>H. courbaril</u> .-----	55
TABELA 4 - Frequência de ocorrência dos padrões parciais em <u>H. courbaril</u> var. <u>courbaril</u> .-----	56
TABELA 5 - Padrões encontrados em cada uma das populações consideradas no estudo.-----	57
TABELA 6 - Ocorrência dos padrões parciais nas populações de estudo de <u>H. courbaril</u> var. <u>courbaril</u> .-----	58
TABELA 7a - Frequência de ocorrência de proteínas de <u>H. courbaril</u> var. <u>stilbocarpa</u> em diversas localidades dos estados de Minas Gerais e São Paulo.-----	62
TABELA 7b - Frequência de ocorrência de proteínas de <u>H. courbaril</u> var. <u>stilbocarpa</u> nos dois estados amostrados.-----	63
TABELA 8 - Padrões que ocorreram em <u>H. courbaril</u> var. <u>stilbocarpa</u> .-	66

TABELA 9	- Padrões totais encontrados em cada população considerada de <u>H. courbaril</u> var. <u>stilbocarpa</u> . No caso de ter sido possível, é indicado o indivíduo mãe e o fruto de proveniência das sementes.-----	68
TABELA 10	- Ocorrência dos padrões parciais de <u>H. courbaril</u> var. <u>stilbocarpa</u> nos indivíduos da população de Esmeraldas (MG).-----	69-70
TABELA 11	- Frequência de ocorrência dos padrões parciais na população 1 de <u>H. courbaril</u> var. <u>stilbocarpa</u> . (Esmeraldas, MG - n= 43).-----	72
TABELA 12	- Frequência de ocorrência dos padrões parciais em <u>H. courbaril</u> var. <u>stilbocarpa</u> (n= 64).-----	73
TABELA 13	- Frequência de ocorrência dos padrões parciais de <u>H. courbaril</u> var. <u>stilbocarpa</u> nas populações: Andiroba, Sabará, Sete Lagoas, Paraopeba, Butantan, Conchal, Campinas e Jaboticabal (n= 21).-----	74
TABELA 14	- Ocorrência dos padrões parciais nas populações de <u>H. courbaril</u> var. <u>stilbocarpa</u> .-----	76-77
TABELA 15	- Padrões totais encontrados em <u>H. courbaril</u> var. <u>subsessilis</u> .-----	81
TABELA 16	- Padrões totais que ocorreram nas sementes analisadas de <u>H. stigonocarpa</u> .-----	85
TABELA 17	- Frequência de bandas protéicas na espécie <u>H. stigonocarpa</u> em cada região de coleta.-----	87
TABELA 18	- Padrões de <u>H. stigonocarpa</u> encontrados em cada uma das populações consideradas no estudo.-----	89
TABELA 19	- Frequência de ocorrência dos padrões parciais de <u>H. stigonocarpa</u> .-----	90
TABELA 20	- Frequência dos padrões parciais nas populações mais expressivas de <u>H. stigonocarpa</u> .-----	91
TABELA 21	- Ocorrência dos padrões parciais nas populações de estudo.-----	92-93
TABELA 22	- Padrões totais de <u>H. intermedia</u> por população considerada -----	97
TABELA 23	- Frequência de ocorrência das proteínas de <u>H. intermedia</u> nas duas populações amostradas.-----	99
TABELA 24	- Ocorrência dos padrões parciais de <u>H. intermedia</u> nas duas populações estudadas.-----	102

TABELA 25	- Padrões totais encontrados nas sementes analisadas de <u>H. martiniana</u> .-----	106
TABELA 26	- Padrões totais das espécies <u>H. courbaril</u> var. <u>altissima</u> , <u>H. aurea</u> , <u>H. parvifolia</u> , <u>H. oblongifolia</u> .-----	109
TABELA 27	- Frequência de ocorrência de bandas protéicas dentro dos taxa de <u>Hymenaea</u> estudados.-----	112
TABELA 28	- Ocorrência de padrões parciais para cada faixa, no gênero <u>Hymenaea</u> .-----	129-132
TABELA 29	- Frequência de ocorrência de cada padrão parcial dentro do gênero <u>Hymenaea</u> (n= 185).-----	133

Agradecimentos

Muitas foram as pessoas que me ajudaram durante a realização deste trabalho e muito embora palavras nunca expressem exatamente o que se sente, gostaria de agradecer em especial:

Ao Professor Dr. George John Shepherd, um grande amigo e orientador, por todo apoio, estímulo, discussões, paciência e carinho durante estes anos todos.

Ao Dr. William Henry Stubblebine; meu primeiro orientador e o "pai" da idéia deste trabalho, pelo estímulo e por acreditar em mim.

Ao Dr. Eric Derbyshire, pelas sugestões e discussões e incentivo durante a execução do trabalho, bem como por sua participação na pré banca.

Ao Professor Dr. Ladslav Sodek pela sua ajuda durante a fase experimental deste trabalho, permitindo e facilitando a utilização de equipamentos e drogas do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp. E por sua participação e sugestões durante a pré banca.

A Professora Dra. Catalina Romero Lopes pelas sugestões e discussão durante a pré banca.

Ao Dr. Paulo Cavalcanti do Museu Emílio Goeldi pela
presteza com que atendeu ao meu pedido de envio de sementes.

A Dra. Jean Langenheim da Universidade de Berkeley, pe-
las discussões esclarecedoras a respeito do gênero e pelo envio
de sementes.

A Sra. Izabel Tozzi, pela amizade, colaboração e dedi-
cação durante todo o trabalho.

A Maria Odeti Fontana Pedrossanti pelo auxílio e pa-
ciência durante minha longa fase de aprendizado de técnicas quí-
micas.

A Sra. Esmeralda Zanchetta Borghi, pelo auxílio na con-
fecção das ilustrações.

Ao Sr. José Luis Moreira, pela constante colaboração e
amizade.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal:
Sr. João Humberto Guimarães, Sra. Sebastiana Rodrigues dos Santos
e Sr. Aribis Januário Fonseca, pelo auxílio nas mais diversas
ocasiões.

A todos os funcionários do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais, pelo auxílio e amizade.

A todos os professores do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais e em especial aos meus mestres:

Jorge Yoshio Tamashiro - que muito me ensinou durante estes longos anos.

Dr. Antonio Carlos Gabrielli - grande amigo e grande mestre.

Aos meus amigos; aqueles que estiveram comigo nas horas mais difíceis me estimulando, me ajudando. Gostaria de agradecer em especial a:

Mônica Nehr, Guacira Grecco, Adrian e Willie, pela força nos momentos difíceis;

Benê, Michael, Helena e Thomas pela amizade e por terem sempre se lembrado de mim a cada vez que vocês viram um pé de Jatropha com frutos.

Ariana, Klink, Maristerra, Adauto, Fred, Nara e Rafa - uma grande família.

Sérgius, Marcinha, Ana Odete, Nivaldo, Gilda, Paulo Eugênio, Agostinho, Fu, Su, Túlio, Evandro, Ciça, Zé e Tri, pela força.

Maria Alice e José Eugênio pela amizade e pela ajuda na confecção das figuras da tese.

Marquinhos e Carmen - grandes amigos - pela enorme ajuda na datilografia da tese, pelo estímulo e amizade.

Cláudia, pela datilografia das tabelas.

Maricy e Claudinho, pela amizade sincera, pelo apoio e pelas noites em claro junto ao computador.

Kenny e Ivan pela paciência e por aguentarem o meu mau humor durante estes últimos vários meses.

E à Mariângela por me ouvir...

Gostaria ainda de agradecer a todos os colegas de Pós Graduação do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais pela amizade, apoio e compreensão.

Não poderia deixar também de agradecer à minha família, meus pais e minha irmã que sempre me estimularam e apoiaram e por muitas vezes participaram ativamente deste trabalho.

Ao meu pessoal de Minas, pelo carinho e apoio durante todo o tempo. Por aguentarem a casa completamente transformada em laboratório a cada vez que eu ia visitá-los. Muito do que está aqui eu devo a vocês.

INTRODUÇÃO:

O gênero Hymenaea

O gênero Hymenaea L., pertence à família Leguminosae, sub família Caesalpinioideae, tribo Detarieae. Na última revisão do gênero, são descritas 14 espécies, a maior parte delas com distribuição Neotropical, estendendo-se desde o centro do México, Antilhas, até ao norte da Argentina (Lee & Langenheim, 1975). H. verrucosa Gaertn. é a única espécie do gênero que não se encontra nos Neotrópicos. Essa espécie acha-se restrita à costa leste do continente Africano e à ilha de Madagascar (Lee & Langenheim, 1975). Acredita-se que o centro de origem do grupo tenha sido na África, e o de diversidade na região Amazônica (Langenheim & Lee, 1974; Lee & Langenheim, 1975).

Além dos intensos estudos taxonômicos, o gênero vem sendo centro de investigações à cerca da composição química de suas resinas, bem como do possível significado ecológico e evolutivo das mesmas (Martin et al 1974,1976; Langenheim et al 1977; Stubblebine & Langenheim 1977; Langenheim et al 1980; Stubblebine et al 1980; Arrhenius & Langenheim 1983; Langenheim & Hall 1983; Langenheim & Stubblebine 1983; Langenheim et al 1986).

Esse interesse pelo grupo começou com a constatação de que resinas fósseis, datadas do Terciário, encontradas no México, Colômbia e Brasil, eram derivadas de Hymenaea. Por outro lado, a sub família Caesalpinioideae abriga um número significativo de plantas produtoras de resinas e é um dos mais importantes grupos

de plantas nos ecossistemas equatoriais tanto Africanos como Sul Americanos. Desta forma os estudos com Hymenaea também foram realizados na tentativa de uma melhor compreensão do sistema de resinas em plantas de regiões tropicais (Langenheim, 1981; Langenheim & Stubblebine 1983).

Apesar dos inúmeros estudos tanto ao nível puramente químico, como taxonômico, a delimitação dos taxa nem sempre é simples. Algumas espécies apresentam uma grande variação morfológica sobretudo em certas áreas de suas distribuições. Algumas destas variações foram consideradas suficientemente estáveis ao ponto de se criarem variedades dentro de uma espécie. Em outros casos certos taxa, anteriormente considerados espécies boas, passaram à categoria de variedades de uma espécie mais ampla. Esse é o caso de H. stilbocarpa Hayne, H. altissima Ducke e H. longifolia Benth, que foram incluídas como variedades de H. cournarii L. (Lee & Langenheim, 1975). Essa mudança de critério deve-se, principalmente, ao fato da variação morfológica de forma e tamanho de folíolos e frutos, bem como as características florais se sobreporem pelo menos em certas áreas; ou à ocorrência de indivíduos com caracteres morfológicos intermediários aos descritos para dois ou mais taxa (Lee & Langenheim 1975). Essas situações frequentes para vários dos taxa do gênero, dificultam ou mesmo impossibilitam uma delimitação clara dos taxa. Desta forma, muitas vezes a localização geográfica ou a descrição do habitat, fornece mais informações sobre a identidade de uma planta do que as características morfológicas observadas em um material de herbário.

Embora não existam trabalhos questionando a validade de se incluir estes 3 taxa como variedades de H. courbaril, nem todos os pesquisadores parecem aceitar esta mudança. Rizzini (1979) embora não faça referência a qualquer tipo de discordância, continua citando H. stilbocarpa, H. altissima e H. longifolia como espécies válidas.

Considerando-se H. courbaril sensu Lee e Langenheim (1975) a distribuição desta espécie praticamente concorda com a distribuição Neotropical do gênero. A grande variabilidade morfológica observada nesta espécie é verificada tanto dentro de cada população, como de cada variedade, à exceção das populações de H. courbaril var courbaril da Venezuela, América Central e México que não apresentam variação morfológica. As populações da Amazônia e ao sul desta formação vegetal, são muito variáveis (Lee & Langenheim, 1975; Martin et al 1974, 1976; Langenheim et al 1977; Stubblebine et al 1980).

Outras espécies também apresentam muita variação morfológica. H. parvifolia Huber, por exemplo, apresenta alta plasticidade fenotípica, podendo variar desde árvores altas em regiões de mata arenosa de terra firme na Amazônia, até plantas de porte arbustivo em regiões de campo (Lee & Langenheim 1975).

Com relação às resinas, foram feitos estudos sobre a composição química do tronco, do fruto e folhas. Esses estudos visavam tanto a busca de uma melhor compreensão dos limites entre as espécies bem como as relações filogenéticas e ecológicas das mesmas (Martin et al 1974, 1976; Lee & Langenheim 1975; Langenheim et al 1977, 1978, 1982, 1983; Stubblebine & Langenheim 1980). Estudos

da variação geográfica de resinas foliares mostraram que a proporção relativa de alguns dos principais compostos componentes das resinas, variam dentro de uma mesma população em algumas das espécies de florestas tropicais (Martin et al 1974,1976; Langenheim et al 1977, 1983; Stubblebine et al 1980). Essas variações se repetiram, guardando, aproximadamente, as mesmas proporções em populações distintas e permitiu que se caracterizasse 6 tipos de resinas com composições diferentes (Langenheim et al 1977,1983; Stubblebine et al 1980). Nem todas as espécies de Hymenaea apresentam variações na composição qualitativa das resinas foliares. Essas variações foram verificadas sobretudo em espécies que se distribuem na Amazônia (à exceção de H. courbaril var subsessilis Ducke) e ao sul da Amazônia normalmente em ambientes méxicos (Martin et al 1974,1976; Lee & Langenheim 1975; Langenheim et al 1977; Stubblebine & Langenheim 1980). Diversas espécies não apresentaram variações na composição da resina foliar. Em outros casos, dentro de um mesmo taxon, em determinadas áreas de distribuição, verifica-se variações qualitativas na composição de resinas foliares, enquanto que em populações da mesma espécie, porém de outras áreas geográficas, isso não ocorre. H. courbaril var courbaril é um exemplo disso. As populações deste taxon da Venezuela, América Central e México não apresentam variação na composição de resinas foliares. Entretanto as populações Amazônicas possuem diversos tipos de resinas. As outras variedades de H. courbaril cujas resinas foram analisadas também apresentam variações qualitativas de resinas foliares; a única exceção, parece ser H. courbaril var subsessilis (Langenheim et al 1977; Stub-

blebine & Langenheim 1980; Langenheim & Stubblebine 1983).

A resina foliar de todas as espécies que não apresentam variações qualitativas se enquadram no que foi descrito como o tipo II de resina (Martin et al 1977,1976; Langenheim et al 1977, 1983; Stubblebine et al 1980). Esse tipo de resina é o mais frequente dentro do gênero e dentro de cada taxon, mesmo naqueles onde ocorre mais de um tipo (Martin et al 1974,1976).

Nos taxa onde é possível encontrar diversos tipos de resina foliar entre indivíduos de uma mesma população, nem sempre todos os tipos de resinas ocorrem (Langenheim et al 1977, 1983; Stubblebine et al 1980). Um mesmo indivíduo adulto pode produzir, em uma mesma coorte, plântulas com tipos de resinas foliares diferentes entre si e diferentes do tipo de resina encontrado na planta mãe (Langenheim et al 1977, 1983; Stubblebine et al 1980). A composição da resina foliar de um indivíduo não varia com a mudança de fatores ambientais ou com o desenvolvimento da planta, sendo portanto uma característica geneticamente determinada (Stubblebine et al 1975, 1978; Langenheim et al 1981).

Essas diferenças qualitativas na composição da resina foliar foram correlacionadas com estratégias da planta contra o ataque de herbívoros (Langenheim et al 1977, 1980, 1983, 1986; Stubblebine et al 1977, 1980; Arrhenius & Langenheim 1983; Langenheim & Hall 1983; Coley 1986). A ação intensa de herbívoros estaria favorecendo a evolução de tipos diferentes de resina. Qualquer mutação que permitisse o aparecimento de uma plântula com composição de resina foliar diferente da composição da árvore mãe e que fosse tóxica aos herbívoros, seria rapidamente selecionada

e fixada na população (Whittaker & Feeny 1971; Levin 1976; Langenheim et al 1977; Stubblebine et al 1980). Desta forma a ação de herbívoros, nas áreas tropicais, desempenharia uma pressão de seleção suficientemente alta de forma a estar determinando a evolução deste sistema de defesa bem como o padrão de distribuição dos indivíduos de espécies vegetais (Janzen 1970). Observa-se que as espécies que apresentam progênie de uma mesma coorte, com tipos de resina foliar diferentes entre si e diferentes da composição da árvore mãe, distribuem-se em áreas onde o ataque de herbívoros é mais intenso (Langenheim et al 1977, 1983; Stubblebine et al 1980). Verifica-se também que herbívoros que atacam as folhas da árvore mãe, atacam preferencialmente as plântulas com o mesmo tipo de composição de resina que o adulto. Desta forma, embora encontre-se sob um adulto, plântulas, que apresentem a mesma composição de resina foliar que o adulto, (além de outras plântulas cuja composição é diferente), após alguns anos transcorridos, os jovens e juvenis aí encontrados apresentam composição de resina diferentes da composição da árvore mãe. Praticamente todos os indivíduos que apresentavam a mesma composição de resina foliar que a árvore mãe, desapareceram; possivelmente devido ao ataque de herbívoros (Langenheim et al 1977, 1983; Stubblebine et al 1980). Acredita-se que esta imprevisibilidade quanto ao tipo de composição de resina foliar de árvores adultas, plântulas e jovens, evite a evolução de herbívoros especialistas (Pimentel & Bellotti 1976; Langenheim et al 1977; Stubblebine et al 1980; Pimentel 1984). Por outro lado, os mesmos tipos de composição de resina foliar aparecem em várias espécies, sugerindo

que o efeito de herbivoría esteja levando a uma convergência em termos de estratégia de defesa. O mesmo parece ocorrer quando se comparam as diferenças quantitativas das resinas foliares. (Martin et al 1974,1976). Além das variações entre os tipos composicionais de resinas, foi detectado um segundo tipo de variação de resinas. Dentro de cada tipo composicional de resina ocorre uma variação na quantidade dos compostos que constituem as resinas. Essas variações quantitativas mantêm a proporção relativa dos principais componentes, mantendo portanto as características dos tipos composicionais. Essas variações quantitativas foram observadas em todas as espécies e todas as populações (Martin et al 1974, 1976). Quando se analisam estas variações quantitativas para todas as espécies do gênero, dentro de um mesmo tipo composicional, observa-se que plantas que ocupam habitats semelhantes ou mesma região geográfica, mesmo não pertencendo à mesma espécie, apresentam resinas mais semelhantes entre si do que plantas da mesma espécie porém de regiões distintas (Martin et al 1974,1976). Isso faz com que resinas foliares forneçam informações, muito importantes sob o ponto de vista ecológico. Contudo com relação à delimitação de espécies e à filogenia do grupo, as informações obtidas através das resinas foliares são muito incongruentes.

Embora Hymenaea seja um grupo bastante estudado, muito pouco foi feito até o momento com respeito ao sistema de reprodução e biologia floral das espécies.

Bawa (1974) cita que H. courbaril var courbaril, na Costa Rica, é auto incompatível. É possível que as demais espécies do

gênero também apresentem este mesmo sistema de reprodução (Lee & Langenheim 1975). Características da flor com relação à posição das anteras e estigma durante a antese sugerem que a reprodução seja principalmente cruzada (Lee & Langenheim 1975). Quanto aos possíveis agentes polinizadores, as características das plantas com relação à posição das inflorescências na copa, tamanho das flores, produção de néctar, horário de antese, entre outras, sugerem dois tipos bem distintos de agentes - um grupo de plantas sendo visitado por insetos e outro grupo por morcegos (Lee & Langenheim 1975).

As espécies da seção *Trachilobium* apresentam características que concordam com as estabelecidas por Faegri & van der Pijl (1979) para síndrome de polinização por abelhas, apresentando flores mais delicadas que as da outra seção (Lee & Langenheim 1975). De fato, várias observações e coletas de abelhas e vespas visitando uma árvore de *H. oblongifolia* na região de Manaus, foram feitas. Entretanto não constam informações sobre a presença de grãos de pólen de *H. oblongifolia* nos insetos coletados (Lee & Langenheim 1975).

As espécies da seção *Trachilobium*, devido às características morfológicas, são consideradas as mais primitivas do gênero. Pertence a esta seção a espécie *H. verrucosa* que é a única espécie Africana de *Hymenaea*. Acredita-se que a origem do grupo tenha sido na África e que do grupo Africano primitivo tenham se originado *H. verrucosa* e *H. oblongifolia*. A espécie Africana apresenta características de flores e inflorescência similares às outras espécies Sul Americanas desta seção, o que sugere que todas te-

nam o mesmo tipo de agente polinizador. Segundo Lee e Langenheim (1975) os morcegos existentes na África da sub ordem Megachiroptera, seriam grandes demais e muito inativos; dificilmente poderiam estar envolvidos com a polinização desta espécie. Acredita-se, portanto, que a polinização por insetos seja o tipo de polinização mais primitivo, sendo a quiropterofilia uma característica secundária e mais recente (Lee & Langenheim 1975). Entretanto, existem alguns morcegos da sub ordem Megachiroptera que são nectarívoros, além de vários outros morcegos Africanos que apresentam este mesmo hábito alimentar, o que permitiria que a espécie africana de Hymenaea pudesse ser por eles polinizada (Sazima, comunicação pessoal).

O grupo de plantas reunidas na seção Hymenaea são consideradas plantas mais recentes e apresentam as características florais de plantas que são polinizadas por morcegos (Faegri & van der Pijl 1979). Observações de morcegos visitando plantas destas espécies, só existem para H. courbaril (Vogel 1968, 1969 apud Langenheim 1975; Heithaus et al 1975). Entretanto, por semelhança de características florais, acredita-se que morcegos possam ser os polinizadores efetivos das outras espécies da seção.

As relações evolutivas sugeridas para as espécies do gênero foram baseadas sobretudo em caracteres morfológicos e da anatomia das folhas (Lee & Langenheim 1975; Langenheim et al 1982). Outros caracteres, mesmo os químicos, sobre resinas, foram pouco ou nada utilizados no estabelecimento das relações de parentesco entre as espécies. Não se elimina a possibilidade de uma origem híbrida de H. intermedia a partir de H. oblongifolia e H. courba-

ril, embora as evidências para isso sejam apenas as morfológicas. Essas mesmas evidências também permitem que se proponha que H. courbaril tenha se originado de H. oblongifolia através de populações intermediárias de H. intermedia (Lee & Langenheim 1975). Também a análise química da resina foliar sugere ser possível que a população de uma espécie ainda não descrita e restrita à província de Osa (Costa Rica) tenha mantido fluxo gênico e até certa hibridação introgressiva com H. courbaril da Costa Rica (Martin et al 1974). Esse grupo de Osa é mantido dentro de H. courbaril por Lee e Langenheim (1975).

O número cromossômico em todo o gênero é o mesmo ($2n=24$) e aparentemente os cariótipos são semelhantes, embora nenhum trabalho mais detalhado tenha sido feito. Não há evidências de poliploidia (Lee & Langenheim 1975). No entanto a similaridade cariográfica talvez pudesse favorecer a hibridação de espécies próximas evolutivamente e/ou sintópicas, caso o isolamento reprodutivo entre espécies não seja completo.

Todas as informações sobre o gênero Hymenaea fornecem um arcabouço muito importante para outros tipos de estudos, para novas perguntas e hipóteses a serem testadas. Apesar de tudo o que já foi feito até o momento, nenhum trabalho utilizou proteínas como fonte de informação. Desta forma este trabalho visou analisar as proteínas de reserva de algumas espécies de Hymenaea com a finalidade de se obter padrões protéicos que pudessem esclarecer e ajudar na taxonomia do grupo.

PROTEÍNAS: Sua importância em estudos quimiotaxonômicos.

Na tentativa de se entender e estudar a evolução de grupos de organismos, durante as últimas duas décadas, o estudo de proteínas e mais recentemente do próprio DNA ganharam uma grande importância (Avise 1974; Fairbrothers et al 1975; Miège 1975; Cronquist 1976; Gray 1980; Boulter 1983).

O interesse por proteínas advém do fato de proteínas serem consideradas cópias terciárias do DNA - "terciary sementides" - (Zuckerlandl & Pauling 1965) e por isso poderem fornecer informações, ainda que indiretas, sobre o código genético. Nos últimos tempos principalmente, o sequenciamento de aminoácidos de certas proteínas que apresentam ampla distribuição entre os seres vivos, como o citocromo C (Miège 1975; Dickerson 1980), hemoglobinas (Kimura 1979; Ferguson 1980) e albuminas (Wilson et al 1977) têm permitindo estudos filogenéticos de grandes grupos, confirmando em vários casos, as classificações anteriormente realizadas baseadas sobretudo na morfologia externa, em outros sugerindo relações de parentesco até então desconhecidas. Foi também através da análise de proteínas (sequenciamento de aminoácidos) que se começou a constatar que a evolução de proteínas distintas deve ter ocorrido em tempos e com velocidades diferentes, sugerindo ,portanto, que as pressões seletivas sobre as diversas estruturas e compostos de um organismo possam ser diferentes. Algumas proteínas, portanto, devido à sua taxa de mudança ao longo do tempo, evento que recebe o nome de Passo Evolutivo, demonstraram ser bons

marcadores do tempo evolutivo e são chamadas de "relógios moleculares" (Wilson et al 1977; Ferguson 1980; Thorpe 1982). Entretanto, devido à redundância do código genético e à inexistência de uma direção e sentido nas mudanças de bases do DNA ao longo do tempo, nem sempre as evidências obtidas através do sequenciamento de aminoácidos, revelam relações de parentesco reais. Várias incongruências foram relatadas e a interpretação das mesmas nem sempre é fácil (Boulter 1980; Gutfreund 1981). De qualquer forma é o sequenciamento de aminoácidos, excetuando-se os recentes estudos com DNA, que fornece informações mais acuradas sobre a evolução de organismos sobretudo nos níveis taxonômicos mais elevados (Ferguson 1980; Jensen & Grumpe 1983). O sequenciamento de aminoácidos por outro lado, é uma técnica cara que para ser realizada requer uma quantidade grande de material (proteína), além da necessidade de purificação, fatores limitantes para este tipo de estudo em muitos casos. Além disso somente uma proteína por vez pode ser analisada o que, se por um lado fornece informações muito detalhadas sobre esta proteína, revela apenas uma pequeníssima parcela do que pode estar ocorrendo no organismo como um todo. Assim, os diversos métodos de estudos de relações filogenéticas e/ou taxonômicas empregando proteínas, sempre oscilam entre estes dois extremos:

- 1) informações detalhadas sobre uma única proteína,
- 2) informações pouco precisas quanto à sequência de aminoácidos das proteínas, mas informações sobre um número maior de proteínas de um dado grupo de organismos.

Ou seja, no primeiro caso ganha-se na qualidade da informação (detalhamento) mas perde-se na quantidade de informação. Nossa visão sobre o que pode estar acontecendo ou ocorreu em termos evolutivos, com o grupo que se está estudando é muito restrita. No segundo caso, perde-se um pouco na qualidade da informação mas ganha-se na quantidade; tem-se uma visão mais ampla do que pode ter acontecido em termos evolutivos e ecológicos com os grupos de organismos que se está estudando.

Os níveis de informação obtidos através destes dois tipos de análise são também bastante distintos. Enquanto o sequenciamento de aminoácidos de proteínas permite que se infira a respeito das relações filogenéticas de níveis taxonômicos mais altos, a análise de diversas proteínas, através de cromatografia, eletroforese ou sorologia, permite o estudo das relações de organismos ao nível de populações, espécies de um mesmo gênero e de gêneros próximos. Os estudos de proteínas através de cromatografia, eletroforese e/ou sorologia são mais baratos, requerem equipamentos menos sofisticados (geralmente), são exequíveis mesmo com amostras pequenas (de material animal ou vegetal) e em curto espaço de tempo, permitindo que se analise material de diversas procedências (Boulter 1971; Jensen & Grumpe 1983).

Cada um destes métodos apresenta vantagens e limitações. Depende do tipo de estudo que se deseje fazer a escolha deste ou daquele método.

A cromatografia engloba um número bastante variado de técnicas e métodos, que têm em comum um princípio básico: duas substâncias não miscíveis, sendo uma delas uma fase estacionária e a

outra uma fase móvel que passa através da fase estacionária. A separação dos compostos é feita através da diferença de coeficientes de distribuição, ou seja, através da forma como determinado composto se distribui entre as duas fases não miscíveis. Cada substância tem propriedades de difusão, em cada uma das fases, diferentes, desta forma podem migrar mais rápida ou lentamente. De maneira geral, para proteínas é usada cromatografia de coluna. Existem vários tipos de cromatografia de coluna e em geral são utilizadas na purificação de proteínas e enzimas (Williams & Wilson 1979; Scopes 1982).

A sorologia parte do princípio que a reação de precipitação antígeno-anticorpo é bastante específica. Desta forma, uma determinada substância (antígeno) injetada no organismo de um vertebrado, irá provocar a formação de anticorpos específicos contra ela. Substâncias que forem semelhantes à que provocou a formação de anticorpos, também serão parcialmente reconhecidas formando um precipitado, ainda que em menor intensidade. A técnica de sorologia aplicada à taxonomia, parte deste princípio e como logo cedo verificou-se que a maior parte dos antígenos e todos os anticorpos são proteínas, o emprego de sorologia tem sido bastante voltado para estudos filogenéticos. Quanto mais próximos evolutivamente forem os organismos, maior a probabilidade de que suas proteínas sejam similares. Quanto mais semelhantes forem as proteínas, maior será a reação de precipitação entre elas e um dado antígeno. Desta forma a sorologia é uma técnica muito mais empregada em estudos filogenéticos do que com finalidades fenéticas, para separação ou estabelecimento de limites entre taxa (Vaughan

1975; Smith 1976). Hoje em dia esta técnica é mais empregada em estudos com animais. Trata-se de um método simples desde que se consiga manter animais de laboratório para produção de soro.

A técnica mais amplamente empregada em estudos quimio taxonômicos e genéticos nas últimas décadas é a eletroforese. Sob este "título" figuram diversas técnicas, mas todas elas permitem a separação de partículas eletricamente carregadas, submetidas a uma diferença de potencial elétrico (Andrews 1981).

Na eletroforese as proteínas são separadas umas das outras através da carga, forma e peso molecular das mesmas (Gáal et al 1980; Andrews 1981). Entretanto como não se sabe qual é a sequência de aminoácidos que constitui cada peptídeo que é revelado através deste método, a comparação entre bandas protéicas é feita exclusivamente através da comparação da mobilidade. A similaridade entre amostras é feita, então, através da constatação da ausência ou presença de bandas protéicas na mesma posição no meio de separação. Devido a isso a presença de bandas nas mesmas posições em amostras distintas, não significa que de fato se tratem de proteínas iguais. Proteínas diferentes podem se separar de forma idêntica devido a um certo balanço entre um dos tres fatores: peso molecular, forma e carga. Desta forma para que se tenha certa confiabilidade nas comparações feitas através da separação de proteínas por eletroforese, é necessário que as proteínas comparadas sejam homólogas. Devido a isso esta técnica é melhor usada em estudos infra genéricos pois espera-se um maior grau de homologia entre proteínas de uma mesma espécie ou entre espécies de um mesmo gênero. Muito acima do nível genérico, já se torna difí-

ou inferir homologias (Boulter et al 1967; Jensen & Grunpe 1983).

Para que se possa comparar proteínas entre taxa diferentes é necessário também que as proteínas tenham as mesmas funções no organismo, que o estágio fisiológico dos organismos que estão sendo comparados seja o mesmo. Por estas razões, em plantas superiores é comum, em trabalhos taxonômicos, a análise de proteínas de sementes, já que sementes podem ser consideradas unidades fisiológicas bem determinadas (Vaughan 1983). Essas proteínas, também conhecidas como proteínas de reserva, têm uma função biológica não muito bem esclarecida. Sabe-se que ao serem degradadas durante a germinação, forneçam uma fonte de nitrogênio a ser usada na síntese de novos compostos nitrogenados necessários para os primeiros estágios de desenvolvimento da plântula (Altschul et al 1966; Derbyshire et al 1976; Millerd 1975; Higgins 1984) ou ainda como macromoléculas que estariam protegendo outros compostos da ação enzimática, desta forma adquirindo uma importância fundamental na regulação metabólica (Stegemann 1975).

Proteínas de sementes foram e são muito empregadas com a finalidade de estabelecer grupos taxonômicos, bem como no reconhecimento de variedades de plantas de interesse econômico e variantes populacionais (Landizinsky & Hymowitz 1979). Pela análise de proteínas de sementes, através de eletroforese, pode-se reconhecer a variedade ou procedência de certa semente tomada de um lote de sementes que esteja sendo comercializado; prática bastante empregada atualmente (Stegemann 1975; Vaughan 1975; Vaughan 1983).

Acredita-se que proteínas de sementes sejam bastante estáveis dentro de uma espécie variando muito pouco entre as populações e/ou variedades desta espécie (Higgins 1984; Landizinsky & Hymowitz 1979). A diferença se torna maior quando se tratam de espécies distintas e devido a isso podem ser usadas como um caráter taxonômico muito importante em grupos de plantas cujos limites são difíceis de serem estabelecidos somente através da morfologia externa (Boulter et al 1967; Vaughan 1983).

Um método de eletroforese bastante usado, acrescenta o detergente aniônico, dodecil sulfato de sódio (SDS), à amostra e aos tampões do gel. O acréscimo de detergentes ajuda a solubilizar muitos tipos de proteínas e lipídios (Andrew 1981). Além disso verificou-se, empiricamente, que detergentes iônicos (catiônicos ou aniônicos) eliminam o efeito de carga das proteínas, fazendo com que a separação delas, na eletroforese, ocorra devido, exclusivamente, ao tamanho dos peptídeos (Weber & Osborn 1969; Weber et al 1972). Como o peso molecular de um peptídeo está relacionado ao seu tamanho, o emprego de SDS, ou outro detergente iônico, permite que se estime o peso molecular (PM) dos peptídeos diretamente a partir da mobilidade dos mesmos no gel. Essa estimativa pode ser feita para diversas concentrações de gel e em diferentes pHs, o que facilita a comparação de peptídeos entre geis diferentes. Não é necessário, no caso do uso de SDS, que sejam feitos cálculos para o cancelamento do efeito de carga dos peptídeos na estimativa de PM (Andrews 1981).

Por outro lado, quando se acrescenta o SDS, peptídeos que tenham o mesmo PM porém cargas diferentes, correrão iguais atra-

vés do gel e não se separarão. Esse método é considerado menos sensível para se detectar variações pequenas entre peptídeos. As únicas variações detectáveis são aquelas provenientes de diferenças no PM.

Apesar desta pouca sensibilidade este método é muito empregado em estudos taxonômicos uma vez que se está interessado na obtenção de padrões que permitam separação de grupos de organismos. Portanto, pequenas variações a níveis individuais ou populacionais não são tão importantes ou mesmo desejáveis. Procura-se de fato perceber variações maiores que estariam provavelmente mais relacionadas a eventos de especiação e separação de grupos de organismos investigados (Stegemann et al 1973; Jenzen & Grumpe 1983). O método aqui empregado, portanto difere bastante do utilizado nos estudos com isoenzimas onde o que se procura são exatamente as diferenças a níveis individuais e populacionais (Selander 1978; Soulé 1978; Doll & Brown 1979; Crawford & Giannasi 1982).

Devido a estas razões, neste estudo foi empregada, na separação de proteínas, eletroforese em gel de acrilamida com SDS, na busca de padrões protéicos bem definidos.

Admitindo-se que proteínas de reserva sejam mais estáveis evolutivamente e portanto menos sujeitas às pressões ecológicas do que resinas foliares e outros caracteres morfológicos foi objetivo deste trabalho:

- 1) Estabelecer padrões protéicos para cada espécie, utilizando eletroforese em geis de acrilamida com SDS.

2) Estabelecer com auxílio destes padrões protéicos limites entre as espécies.

3) Verificar possíveis relações de parentesco entre os taxa, através dos padrões protéicos obtidos, visando melhor esclarecimento da taxonomia infra genérica.

4) Comparar padrões de variação de proteínas com aqueles já estabelecidos para resinas tentando evidenciar possíveis diferenças em pressões de seleção.

5) Tentar estabelecer relações filogenéticas entre as espécies estudadas.

Material e Métodos

1) Estocagem das sementes

Foram utilizadas, neste estudo, sementes dos seguintes taxa de *Hymenaea*: *H. courbaril* (variedades: *courbaril*, *stilbocarpa*, *subsessilis* e *altissima*), *H. stigonocarpa*, *H. martiana*, *H. intermedia*, *H. parvifolia*, *H. oblongifolia* e *H. aurea*. As tabelas I, II, III, IV e V, fornecem os principais dados de coleta do material estudado.

As sementes foram mantidas em sacos plásticos ou de papel, em local seco. Cada saco continha sementes de um único fruto ou no caso de não ser possível a separação por frutos, agrupou-se as sementes de uma mesma árvore ou região.

Foram registrados o local de coleta, o número da árvore e do fruto, bem como a espécie em questão.

O tempo de estocagem das sementes foi muito variável conforme pode ser verificado nas tabelas I, II, III, IV, V. No entanto, alguns testes de germinação sugerem que o tempo de estocagem não estava interferindo na viabilidade das sementes e, muito provavelmente, com a integridade das proteínas.

Tabela 1

Principais dados sobre as sementes de H. courbaril var courbaril utilizadas no presente estudo.

População	Localidade	País/Estado	N.o de sementes	Data de Coleta
1	Província del Osa	Costa Rica	4	4/1972 +
1	Província de Guanacaste	Costa Rica	4	11/1971 +
1	Província de Alajuela	Costa Rica	5	4/1972 +
2	Francisco Morazán	Honduras	8	10/1971 +
4	Laguna de Los Patos, Calabolo, Guarico	Venezuela	4	1984 *+
5	Proximidades de Pandu	Bolívia	3	1984 *+
3	Proximidades de Acaponeta, Nayarit	México	2	1984 *+
3	Proximidades de Tepic, Nayarit	México	2	1984 *+
6	Manaus	Brasil (Amazonas)	2	1983 *o
6	Santarém	Brasil (Pará)	2	1984 *+

* Data de recebimento das sementes, não propriamente da coleta.

+ Sementes enviadas por J.H.Langenheim

o Sementes enviadas por P.Cavalcanti (Museu Goeldi).

Tabela 11

Principais dados sobre as sementes de H. courbaril var stilbocarpa utilizadas no presente estudo

População	Localidade	País/Estado	N.o de plantas	N.o de sementes	Data de Coleta
1	Esmeraldas	MG	5	43	9/1982 o
2	Sete Lagoas	MG	1	1	9/1982 o
3	Andiroba	MG	1	3	1982 o
4	Paraopeba	MG	2	2	1982 o
5	Sabará	MG	1	1	7/1983 +
6	Butantan (São Paulo)	SP	(pool)	5	10/1982 *
7	Campinas	SP	2	3	10/1981 §
8	Conchal, Mogi Guaçu	SP	2	3	9/1981 &
9	Jaboticabal	SP	1	3	11/1982 s

Coletores:

- o D.M.S.Rocha
- + H.C.de Moraes
- * N.S.F.A.de Almeida
- § S.Gandolfi; L.Mattes
- & H.C.de Moraes, B.C.Lopes, M.Cytrinovicz
- s L.K.Gouvêa

Tabela III

Principais dados sobre as sementes de H. stigonocarpa utilizadas no presente estudo

População	Localidade	País/Estado	N.o de plantas	N.o de sementes	Data de Coleta
1	Esmeraldas	MG	3	7	8/1983 o
2	Paraopeba	MG	3	6	10/1977 +
3	Alpinópolis, Furnas	MG	3	6	7/1977 +
4	Luiz Antonio	SP	1	3	9/1982 *
5	Ilha Solteira	MS	1	2	9/1981 #
6	Fazenda Cotia (Poconé)	MT	1	3	11/1982 &
7	Rosário do Oeste	MT	2	4	1982 @
8	Faz. Água Limpa, Brasília	DF	1	2	9/1983 =
9	Mirador	MA	1	3	7/1983 \$

Coletores:

o	D.M.S.Rocha
+	T.M.Lewinson
*	W.H.Stubblebine e M.Ross
#	F.R.Martins
&	F.A.Machado e I. Sazima
@	A.Lemes do Prado
=	P.E.Oliveira
\$	H.C.de Moraes

Tabela IV

Principais dados sobre as sementes de H. intermedia utilizadas no presente estudo

População	Localidade	País/Estado	N.o de plantas	N.o de sementes	Data de Coleta
1	Carajás	PA	1	10	7/1983 +
2	INPA (Manaus)	AM	3	7	6/1978 o
2	Rd.ZF1, (Manaus)	AM	1	1	7/1978 o

Coletores:

+ C.A.Joly
o T.M.Lewinson

Tabela V

Principais dados sobre as sementes das demais espécies do gênero utilizadas no presente estudo.

Espécie	Localidade	Estado	Nº de plantas	Nº de sementes	Data de coleta
<u>H. martiana</u>	Faz. da Bandeira, Buritizal	SP	1	10	8/1983 o
<u>H. courbaril</u> var <u>subsess.</u>	Manaus	AM	(pool)	10	-
<u>H. courbaril</u> var <u>altiss.</u>	Mata Atlântica	SP	1	2	1984 *+
<u>H. aurea</u>	Mata Atlântica, Una	BA	-	4	1984 *+
<u>H. parvifolia</u>	próx. Rosário	MA	-	3	1984 *+
<u>H. oblong.</u>	Belém	PA	-	2	1984 *+

Coletores: o D.M.S.Rocha
+ J.H.Langenheim

* Data de recebimento das sementes; não necessariamente de coleta.

2). Preparação dos extratos

a) Estabelecimento do método

Para preparação dos extratos de proteína de semente de Hymenaea, foi retirada, inicialmente, a testa das sementes. A remoção da testa foi feita manualmente. A seguir, cada semente foi quebrada em pedaços, após o que moída em um moinho tipo Wiley com peneira de 0,5mm. Tomou-se o cuidado de limpar o moinho após a moagem de cada semente, sendo que a farinha de cada semente foi guardada em frascos de vidro separados e devidamente etiquetados com os dados de coleta e data de moagem.

Testes iniciais sobre métodos de extração foram efetuados com Phaseolus vulgaris (sem testa) utilizando-se os seguintes tratamentos:

- 1) NaCl 1%
- 2) NaCl 1% + Tris 0,1 M pH 7
- 3) NaCl 1% + Tris 0,1 M pH 7 + 1% SDS
- 4) NaCl 1% + Tris 0,1 M pH 7 + 1% SDS + 1% mercaptoetanol
- 5) NaCl 1% + Tris 0,1 M pH 7 + 1% mercaptoetanol
- 6) NaCl 1% + 1% SDS
- 7) NaCl 1% + 1% mercaptoetanol
- 8) NaCl 1% + 1% SDS + 1% mercaptoetanol

A solução extratora básica adotada foi uma solução salina (NaCl 1%) de cloreto de sódio uma vez que as proteínas mais abundantes em Leguminosae são albuminas e globulinas, solúveis nesse tipo de solução (Osborne 1895 apud Préaux & Lontie 1975). A espécie P. vulgaris foi

utilizada nestes testes como representante mais ou menos típico de composição protéica de sementes de Leguminosae.

A partir dessa solução salina básica, foram então adicionadas as outras substâncias, verificando-se qual a combinação delas resultaria em maior concentração protéica, já que cada uma delas poderia agir diferentemente sobre as proteínas. Após essa etapa foi verificado também, qual dos tratamentos permitia uma melhor separação das proteínas. Para cada tratamento foram feitas 5 repetições.

O emprego de Tris 0,1 M pH7, foi escolhido por se tratar de uma solução tampão. Sabe-se que soluções tampão permitem uma maior extração de proteínas (Scopes 1982).

A adição de SDS (Dodecil sulfato de sódio), um detergente aniônico, ao extrato, inicialmente separa as moléculas que se acham fortemente ligadas entre si, através de uma ligação não covalente. O SDS ao ligar-se às regiões hidrofóbicas das proteínas, separa a maior parte delas nas suas subunidades componentes (Andrews 1981).

O B-mercaptoetanol foi usado para promover a quebra de pontes dissulfídricas no caso de existência de alguma que por vezes ligam subunidades de uma proteína e que não seriam rompidas pela simples adição de SDS e/ou aquecimento (Préaux & Lontie 1975).

Devido aos extratos de H. courbaril var stilbocarpa frequentemente apresentarem-se muito viscosos, dificultando a aplicação das amostras no gel, foram feitas extrações diversas, tentando-se determinar qual o melhor método que resolvesse esse problema sem comprometer a concentração de proteína extraída em sua separação.

Assim, foram comparados os seguintes tratamentos:

1) Lavagem da farinha da semente com éter de petróleo e extração em NaCl 1%

2) Extrato controle: farinha da mesma semente do tratamento 1, sem ser lavada, e extração em NaCl 1%

A seguir foram feitas extrações com:

1) Tris 0,1 M pH 7 + Uréia 1 M + NaCl 1%

2) Tris 0,1 M pH 7 + Uréia 6 M + NaCl 1%

3) Ácido ascórbico + NaCl 1%

4) Tris 0,1 M pH 7 + NaCl 1%

A todos os extratos obtidos pelos diversos tratamentos, foi acrescentado SDS e B-mercaptoetanol no momento da preparação das amostras para aplicação em gel.

A fim de tentar alterar a viscosidade das amostras, foram feitas extrações variando-se o pH da solução extratora. As seguintes soluções extradoras foram preparadas:

1) Tris 0,1 M pH 4,6 + NaCl 1%

2) Tris 0,1 M pH 5,1 + NaCl 1%

3) Tris 0,1 M pH 7 + NaCl 1%

4) Tris 0,1 M pH 8,9 + NaCl 1%

Ainda na fase de investigação preliminar, tentou-se verificar se existiriam outras proteínas, em quantidades significativas, além de albuminas e globulinas, que não estavam sendo extraídas por não serem solúveis em solução salina.

Para tanto, realizaram-se extrações de proteínas, de algumas sementes individuais, em NaOH 1/10 N, havendo para cada amostra analisada, uma amostra controle, com proteínas extraídas das mesmas sementes em NaCl 1%.

b) Método definitivo

Os extratos utilizados nesse estudo foram preparados tomando 0,25 g de farinha de uma semente (cada extrato correspondia a uma única semente) e fazendo-se um homogeneizado em 5ml de solução extratora de NaCl 1% + Tris 0,1 M pH7. A seguir as amostras eram colocadas na geladeira por 30 minutos, após o que, eram centrifugadas por 15 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante coletado era separado em 3 partes:

- 1) uma alíquota para a determinação da concentração protéica
- 2) uma alíquota de 1 ml à qual eram acrescentados 10 μ l de B-mercaptoetanol + 0,12 ml de SDS 10%, sendo a seguir aquecida por 2 minutos em banho maria a 100°C.
- 3) uma alíquota testemunho armazenada em um freezer à -40°C.

3) Determinação da Concentração protéica

A concentração protéica das amostras, foi estimada por 2 métodos diferentes:

- 1) Método de Bradford (Bradford, 1976) que emprega como corante o Coomassie Brilliant-Blue G-250. Esse corante existe sob 2 formas de coloração diferentes, vermelha e azul. A forma vermelha, se converte em azul ao ligar-se à proteína, podendo ser detectada através de espectrofotometria em um comprimento de onda de 595nm.

2) Método de Lowry (Lowry et al 1951). Esse método emprega o reagente de Folin e envolve a formação de um complexo cobre-proteína, seguida de uma reação de redução que produz uma coloração azul intensa. A leitura de concentração proteica foi feita em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540nm.

Para a construção de uma curva padrão em ambos os métodos, foi utilizado soroalbumina bovina(BSA), proteína de peso molecular conhecido (PM = 68000).

4) Preparação das amostras

Após ter sido determinada a concentração proteica dos extratos, retomava-se as alíquotas separadas anteriormente e preparados com SDS e B-mercaptoetanol, para se proceder à diluição das proteínas.

Dilui-se todas as amostras para uma concentração final de 1000ug/ml, a fim de torná-las comparáveis. A seguir eram acrescentadas algumas gotas de azul de Bromofenol, corante de baixo peso molecular (PM) e que se desloca, na eletroforese, mais rápido do que as proteínas, dessa forma servindo de marcador de frente de corrida.

Para se obter amostras suficientemente densas para sua aplicação no gel, eram acrescentados, às amostras, alguns cristais de sacarose.

5) Preparação do Gel

Para se determinar qual a concentração ótima do gel de separação; foram feitas corridas em geis com concentrações de acrilamida de 10%, 12% e 15%. A melhor separação foi obtida nos geis de 15% concentração que foi então adotada para o restante do trabalho.

As corridas de eletroforese foram feitas em gel de acrilamida com SDS, utilizando a técnica de Laemmli(1970), que usa tampão descontínuo.

O acréscimo de SDS ao gel, e à amostra, praticamente elimina o efeito da carga elétrica das proteínas, permitindo que a separação seja devida quase que exclusivamente às diferenças de PM das mesmas (Weber & Osborn 1969; Weber et al 1972).

O tanque utilizado para eletroforese foi do tipo vertical, para eletroforeses de placa. Esse tipo de eletroforese permite que sejam analisadas diversas amostras no mesmo gel, ou seja, todas elas sujeitas às mesmas condições, o que permite uma melhor comparação entre as amostras.

O gel final, polimerizado, possui uma espessura de 1mm, largura de aproximadamente 13cm e um comprimento de 14cm, tendo sido aplicados 10 amostras por gel.

Os geis foram preparados a partir de uma solução estoque de: 30g de acrilamida/0,2g bis acrilamida em 100ml de água.

Tanto ao gel de separação (concentração final de 15%) como ao gel superior "stacking" (concentração final de 5%) foi acrescentado SDS.

A polimerização dos geis foi feita utilizando-se: 4ul de Temed (N,N,N',N'-Tetrametilenodiamina) como catalizador da reação de polimerização e 50ul de persulfato de amônia a 1% (AMPS) que dissolvido em água fornece radicais livres de oxigênio, que servem como um iniciador do mecanismo de catálise (Andrews 1981).

O tampão do tanque, utilizado durante a eletroforese foi Tris-Glicina-SDS pH 8,8 (Laemmli, 1970) nas proporções de 3,025g:14,4g:0,5g em 500ml de água e tendo sido acrescentados 0,5ml de B-mercaptoetanol ao tampão.

As amostras protéicas devidamente preparadas, foram colocadas com uma microseringa, nas reentrâncias formadas no topo do gel. Em cada reentrância foram aplicados 30ul de amostra (1ug de proteína/ul).

A corrente aplicada no início das eletroforeses (até o momento em que as proteínas alcançaram o gel de separação) era de cerca de 15mA com uma voltagem de 40 V. Quando as proteínas penetravam no gel de separação a voltagem era aumentada para 100 V e mantida constante até o final da corrida.

As corridas tinham duração de 5 horas.

6) Fixação e coloração das proteínas

Depois da corrida as proteínas eram simultaneamente precipitadas e coradas em uma solução de "Coomassie Brilliant-Blue R":metanol:ácido acético glacial:água, nas quantidades de 1,25g:227ml:46ml:227ml por 30 minutos.

O excesso de corante era a seguir retirado, banhando-se o gel em solução aquecida (60°) de ácido acético glacial, metanol e água (75:50:875 V/V/V) por repetidas vezes.

Para conservação dos geis, após serem corados, eram prensados entre uma placa de vidro e recoberta por uma superfície plastificada (plástico "magipack") e papel de filtro e colocados para secar. Esse procedimento permite a montagem permanente dos geis, não alterando suas dimensões com o tempo, o que facilita o manuseio dos geis e a análise das proteínas.

7) Determinação do Peso Molecular

Os pesos moleculares (PM) dos peptídeos, foram calculados tomando-se a mobilidade relativa (Rm) da subunidade proteica. Ou seja, a razão entre a distância percorrida pelo peptídeo e a distância total da corrida, marcada pela faixa azul de Bromofenol (Barker et al, 1976).

Como proteínas de PM conhecido, foram tomadas:

Soroalbumina bovina (BSA - PM=68000), ovalbumina (PM=43000) e lisosina (PM=14300). Com essas 3 proteínas foi preparada uma amostra, seguindo o mesmo método empregado para as demais amostras de Hymenaea. A concentração de cada proteína na amostra foi de cerca de 700 ug/ml. Esse extrato foi aplicado em todos os geis feitos, de forma a ser possível, através dele, determinar os PMs das proteínas de Hymenaea.

A partir dessas proteínas de PM conhecido foi possível obter-se curvas-padrão, tomando-se o logaritmo do PM de cada proteína pelo seu Rm. uma vez obtido o gráfico, a estimativa do PM dos peptídeos desconhecidos, era praticamente direta. O PM das proteínas desconhecidas foi determinado a partir da média aritmética do PM estimado para cada banda em todas as eletroforeses em que esta apareceu.

B) Determinação da homologia das bandas proteicas.

A homologia das bandas proteicas foi estabelecida através de comparação visual e do cálculo do Rm. Para bandas muito próximas entre padrões de sementes distintas, e até mesmo para padrões visualmente iguais, para se certificar da homologia das bandas, foram feitas misturas dos 2 padrões em questão, utilizando-se lado a lado à mistura, os padrões puros, para posterior comparação.

Bandas muito fracas e que não podem ser reconhecidas consistentemente, foram descartadas, deixando ao todo 31 bandas proteicas que foram utilizadas nas análises posteriores.

9) Identificação das proteínas nos geis.

Foram consideradas ao todo 31 bandas proteicas para o gênero. Essas foram as bandas mais nítidas e que apresentaram maior repetibilidade entre os geis.

Os padrões totais obtidos através da eletroforese foram divididos em 4 faixas: A, B, C, e D. A cada uma dessas faixas corresponde um grupo de peptídeos de pesos moleculares próximos. Essas faixas não foram estabelecidas arbitrariamente. A observação da separação dos peptídeos durante as eletroforeses, permitiu que se identificasse, dentro de cada faixa, um conjunto de bandas que parecem correlacionadas entre si mas não com as bandas de outras faixas. Esses peptídeos, dentro de cada faixa apresentam um conjunto de possíveis combinações de bandas que se repetem dentro do gênero. Essas combinações de bandas dentro das faixas formam um conjunto de padrões parciais bem definidos. São esses padrões parciais, por faixa, que se combinam entre si, como se fossem peças de dominó, produzindo o que se chamou de padrões totais.

Durante a fase experimental verificou-se uma mudança na separação das proteínas da faixa C.

Onde anteriormente se obtinha apenas 2 peptídeos, conseguiu-se separar vários peptídeos. Atribui-se essa mudança em separação à uma possível mudança em separação do lote de SDS utilizado para as análises.

Sabe-se que diferentes marcas de SDS têm uma influência muito grande na separação das proteínas, sendo especialmente crítico o efeito do SDS do tampão do tanque sobre a separação dos peptídeos (Lacks et al 1979; Weber et al 1972). Devido a muitos dos extratos já estarem mais velhos e apresentarem sinais de perda de proteína, (pouca nitidez de algumas das bandas, bandas muito claras ou ausentes), nem sempre foi possível repetir a separação das proteínas. Entretanto foi possível se estabelecer, as duas bandas obtidas nas primeiras separações, a quais proteínas correspondiam nas novas separações. Devido a

esse problema em alguns casos faltam informações sobre todas as possíveis proteínas existentes na faixa C. Quando faltam informações sobre as proteínas apresentamos o padrão parcial descrito como: C',_n. Onde C corresponde à faixa do referido padrão parcial, n é o número do padrão e a "'" indica que não se conhecem todas as proteínas aí existentes.

Esse cuidado foi tomado porque os padrões aonde não se identificam todas as proteínas, correspondem a padrões que podem ser obtidos mesmo quando ocorre a separação perfeita dos dos peptídeos dessa faixa.

A ausência de informação sobre as proteínas foi levada em consideração em todas as análises feitas.

10) Determinação da similaridade entre padrões

Para se determinar o grau de similaridade entre os padrões, usou-se uma matriz de presença e ausência de bandas proteicas para cada semente (presença representada pelo numero 1 e ausência pelo número 0 (zero)).

Para comparação de cada uma das unidades taxonômicas operacionais (OTUs), no caso as sementes, usou-se o coeficiente de Jaccard. Esse coeficiente tem sido amplamente usado em comparações de dados eletroforéticos e estudos de Lester et al. (1983) sugerem que é mais apropriado que outros coeficientes utilizados em taxonomia numérica.

O coeficiente de Jaccard compara todos os pares de OTUs não levando em consideração, entretanto, os caracteres que não ocorrem em ambos os membros do par. Portanto, no nosso caso, são levadas em con-

sideração, para esse cálculo, as bandas protéicas que ocorrem em ambas as sementes do par que se está comparando, bem como o número total de bandas dos dois padrões que estão sendo comparados. As bandas protéicas que não ocorrem em nenhuma das OTUs do par a ser comparado, não são levadas em consideração nesse cálculo (Dunn & Everitt 1982; Sneath & Sokal 1973; Lester et al 1983; Vaughan 1975).

Esse coeficiente pode ser calculado através da fórmula:

$$S_j = \text{n}^\circ \text{ de bandas em comum} / \text{n}^\circ \text{ total de bandas dos 2 padrões}$$

Os cálculos foram feitos usando o programa "Coef" v.1.2 desenvolvido no Departamento de Botânica da Unicamp.

11) Construção de dendrogramas:

Os dendrogramas foram feitos através de uma análise de agrupamentos (Cluster Analysis), empregando-se 3 métodos distintos.

a) Ligação simples que agrupa os padrões segundo a menor distância de diferença entre os grupos ou ainda segundo o máximo de similaridade.

b) Ligação completa que leva em consideração as diferenças entre os padrões, agrupando-os tomando a menor distância entre os máximos de diferença encontrados entre os grupos.

c) Ligação média que tende a ser um método intermediário entre os dois anteriores, estabelecendo uma distância média entre os grupos analisados (Dunn & Everitt 1982; Sneath & Sokal 1973).

Todos os dados foram analisados através de um programa de "cluster" v.1.2 desenvolvido no Departamento de Botânica da Unicamp.

12) Dendrogramas com distâncias Euclidianas

Outra forma de se analisar os dados consistiu em se estabelecer a frequência com que cada banda protéica ocorreu em cada taxon.

Baseado na frequência das bandas protéicas dentro de cada taxon, foi possível a obtenção de dendrogramas de distâncias euclidianas que fornecem a distância que cada taxon tem dos outros. Foram desconsiderados os taxa cuja amostra foi muito pequena, uma vez que nesses casos as frequências altas ou baixas apresentadas estavam muito mais sujeitas ao tamanho da amostra do que nos outros taxa.

Os métodos usados na obtenção dos dendrogramas foram os de: média não ponderada e ligação completa. Para cada um desses métodos foram feitos dendrogramas com standardização dos dados e sem os dados serem standardizados.

No primeiro caso transformam-se as frequências para que se obtenha média zero e desvio padrão de um (1). Ao se utilizar essa transformação, é dado menor peso às proteínas cuja frequência é alta e varia muito.

Quando os dados não são normalizados, os valores brutos de frequência são usados nos cálculos. Decorre disso que o maior peso é dado às proteínas cujas frequências são mais altas e que variam mais entre os taxa.

13) Análise de componentes principais (PCA).

A PCA é um método de análise multivariada que é empregado para representar conjuntos de dados multidimensionais de uma forma mais simples. Essencialmente onde ocorre correlação entre as variáveis originais, é possível expressar a variação em termos de um número menor de componentes principais que são variáveis compostas derivadas das variáveis originais. Em muitos casos, onde o grau de correlação entre as variáveis originais é alto, é possível representar a maioria da variância da amostra nos primeiros dois ou três componentes, simplificando, portanto, a descrição e a análise dos dados.

RESULTADOS

1) Aferimento do Método

Os experimentos para se estabelecer o melhor método de extração foi efetuado usando-se tratamentos diferentes, como já descrito no material e métodos. Foi empregada farinha de Phaseolus vulgaris nesse experimento por se tratar de espécie cuja composição protéica já é bastante conhecida e pode ser usada como um modelo para proteínas de leguminosas. A estimativa da concentração protéica para extratos de cada um dos 8 tratamentos, foi obtida através do método de Lowry (Lowry et al 1951). Os resultados obtidos para cada tratamento foram comparados através de uma análise de variância de 3 fatores e acham-se resumidos na tabela 1 (a)e(b).

Tabela 1 (a) - Média da concentração protéica de P. vulgaris para cada tratamento através do método de Lowry. Também são fornecidos: o desvio padrão (S) e o número de repetições (N) em cada tratamento. (Concentração em ug/ml). (Solução extratora básica NaCl 1%).

Tris = Tris 0,1M pH7; Merc= 1% B mercaptoetanol; SDS = 1%
 SDS
 presença = + ; ausência = -

Tratamentos			média	(S)	(N)
Tris	Merc	SDS			
-	-	-	9,7320	1,05713	5
-	-	+	10,2800	2,13561	5
-	+	-	10,5320	1,04686	5
-	+	+	11,4520	3,49779	5
+	-	-	15,8400	1,65850	5
+	-	+	10,2680	1,00096	5
+	+	-	12,8280	1,90093	5
+	+	+	10,1360	1,60046	5
amostra toda			11,3835	2,59613	40

Tabela 1 (b) - Fonte de variação obtida na análise de variância à qual foram submetidos os resultados dos 8 tratamentos para extração de proteínas de P. vulgaris.

GL= graus de liberdade

Tris=Tris 0,1M pH7; Merc = 1% Mercaptoetanol; SDS= 1% SDS
[grau de significância- * =0,05 >P> 0,01; ** = 0,01>P>0,001;
*** P<0,001; (Sokal & Rohlf, 1969)].

Efeito	Soma Quadrática	GL	MQ	F _s
Tris	31,294	1	31,294	8,652**
Merc	0,858	1	0,858	0,237
SDS	28,866	1	28,866	7,981**
TrisxMerc	16,358	1	16,358	4,523*
TrisxSDS	59,195	1	59,195	16,366***
MercxSDS	6,610	1	6,610	1,827
TrisxMercxSDS	3,931	1	3,931	1,087
Var dentro grupos	115,744	32	3,617 (S ²)	

valor de F--- F_{0,05}[1,32]= 4,1016

Os resultados obtidos mostram que os tratamentos que estão ocasionando um aumento na concentração de proteínas dos extratos são: Tris 0,1M pH7 + NaCl 1% e Tris 0,1M pH7 + 1% B-Mercaptoetanol + NaCl. Verifique na tabela 1 (a) a média obtida com esses 2 tratamentos bem como o grau de significância do valor de F_s (Tabela 1 b). No entanto pode-se verificar que a maior concentração de proteínas é obtida através do tratamento Tris 0,1M pH7 + NaCl 1%. Os demais resultados que apresentaram valores significativos, estão de fato reduzindo a concentração proteica de seus extratos (Tabela 1 a). A adição de SDS ao Tris esta nitidamente tendo uma ação de interferência, ou seja, diminuindo a concentração proteica.

As eletroforeses com amostras feitas com extratos de cada um dos 8 tratamentos, mostrou que não há alteração na separação proteínas. Todos os tratamentos apresentaram mesmo padrão de separação.

Os experimentos realizados para se solucionar a questão da viscosidade de extratos de Hymenaea, obteve-se as seguintes resultados:

Éter de petróleo: As amostras cuja farinha havia sido lavada com éter de petróleo não eram viscosas. Entretanto esse tratamento interferia com as leituras de concentração proteica. As leituras feitas através do método de Lowry indicavam um aumento na concentração de proteínas nos extratos lavados com éter de petróleo em relação aos que não haviam recebido esse tratamento. As leituras através do método de Bradford indicavam uma diminuição dessa mesma concentração proteica. Quanto à separação de proteínas por eletroforese ambas as amostras se comportaram de maneira idêntica. Ou seja, não há alteração quanto à separação das proteínas nos 2 tratamentos. Os padrões obtidos são idênticos entre si e iguais ao obtido com extração de NaCl 1% .

Uréia: O uso de uréia junto com Tris (0,1M pH7) e NaCl (1%) reduziu a viscosidade dos extratos. Tanto a concentração de uréia 1M como a de 6M foram efetivas neste sentido. A separação das proteínas, por eletroforese, foi idêntica para os 2 tratamentos não ocorrendo alteração do R_m (coeficiente de mobilidade) das proteínas em relação com NaCl 1% .

Ácido Ascórbico: A extração com ácido ascórbico junto com NaCl 1% resultou em um extrato altamente viscoso, tendo sido impossível a sua utilização.

Efeito de pH: Quanto ao efeito do pH da solução extratora sobre a separação das proteínas e viscosidade do extrato, foram obtidos os seguintes resultados:

pH	Viscosidade	Observações
4,6	diminui	extrato límpido
5,1	diminui	precipita parte da proteína
7,0	diminui	extrato límpido
8,8	mantém	extrato límpido

Em todos os tratamentos usou-se como solução extratora, Tris 0,1M + NaCl 1%. A separação das proteínas através de eletroforese realizada com os 4 tratamentos não diferiu da separação obtida para os extratos padrão, com NaCl 1%.

Os resultados parecem indicar que a separação de proteínas de Hymenaea seja independente da ação do pH.

Em função desses dados, decidiu-se tomar como solução extratora a solução de Tris 0,1M pH7 + NaCl 1%.

Corridas de eletroforese com extratos preparados com solução extratora NaOH 1/10 N permitiu que se constatasse que, de fato não existem outras proteínas, que não albuminas e globulinas, a níveis quantificáveis em sementes de Hymenaea. A separação das proteínas extraídas em NaOH 1/10 N também foi idêntica às demais descritas e à separação obtida com extratos padrões (extração em NaCl 1%).

2) Análise de proteínas

Foram consideradas 31 bandas protéicas para o gênero como um todo. A figura 2 apresenta um diagrama com todas as bandas que foram consideradas no estudo, para o gênero. Nesse diagrama também se acha indicada cada faixa de proteínas que foi considerada. A figura 1 (a,b,c,d) apresenta cada padrão parcial que foi observado dentro de cada faixa para este estudo.

2.1) Hymenaea courbaril var courbaril

Para o taxon H. courbaril var courbaril foram analisadas 36 sementes cujos dados de coleta se acham resumidos na Tabela 1 do Material e Métodos. As sementes analisadas foram agrupadas em populações obedecendo às divisões políticas, de procedência das mesmas.

Esta medida foi tomada devido ao pequeno número de sementes disponível por localidade. A finalidade deste agrupamento foi a de permitir algumas análises.

Das 31 proteínas consideradas para o gênero (figura 2) foram observadas 28 bandas protéicas. A figura 3 apresenta um diagrama com todas as bandas que ocorreram neste taxon.

A tabela 2 fornece a frequência de ocorrência de bandas para cada população estudada. Embora seja pequeno o número de sementes por população, a tabela fornece informações sugestivas à respeito de certas bandas cuja frequência é baixa e que se res-

Figura 1 (a), (b), (c), (d): Padrões parciais que ocorreram no gênero Hymenaea. (a)= Padrões parciais da faixa A; (b)= Padrões parciais da faixa B; (c)= Padrões parciais da faixa C; (d)= Padrões parciais da faixa D.

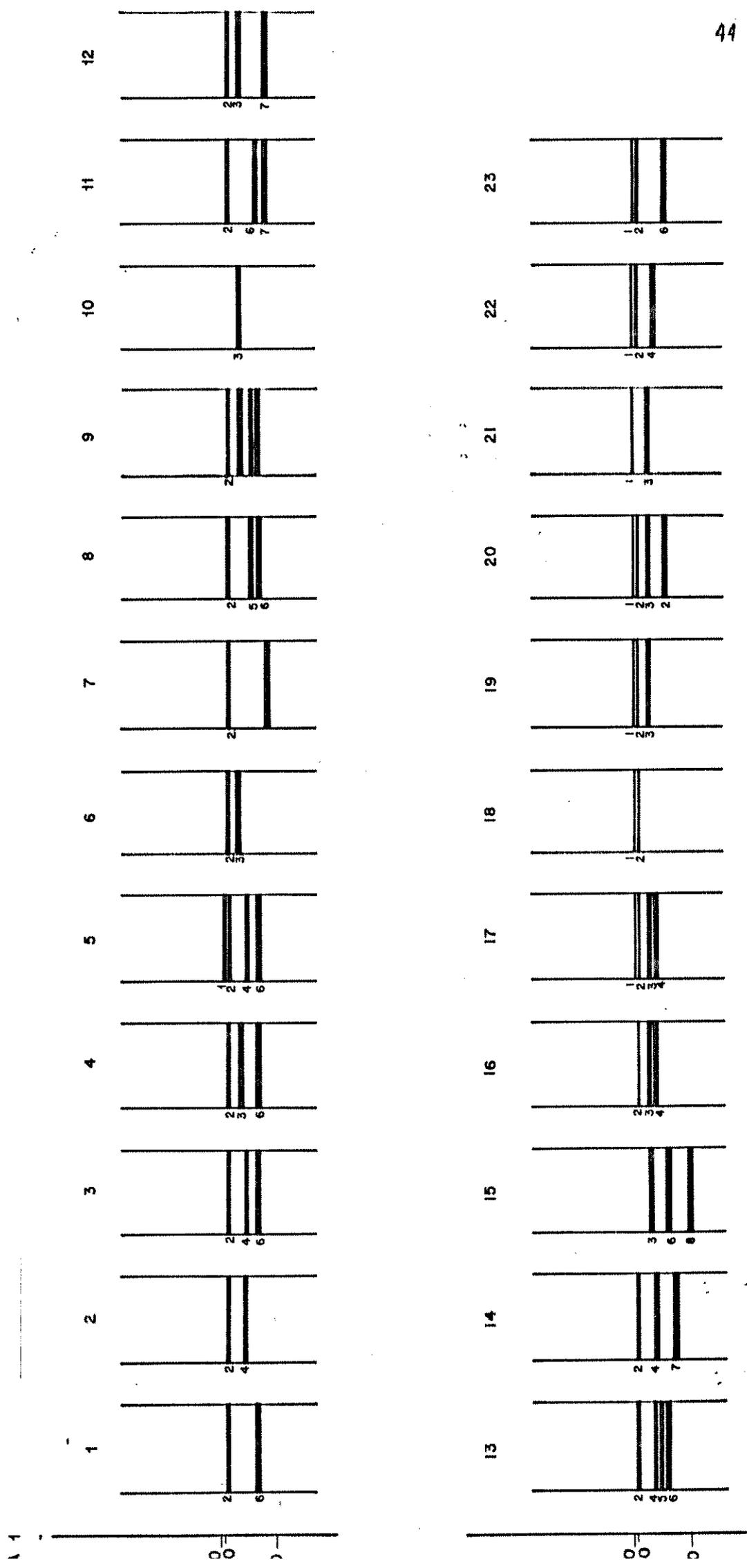
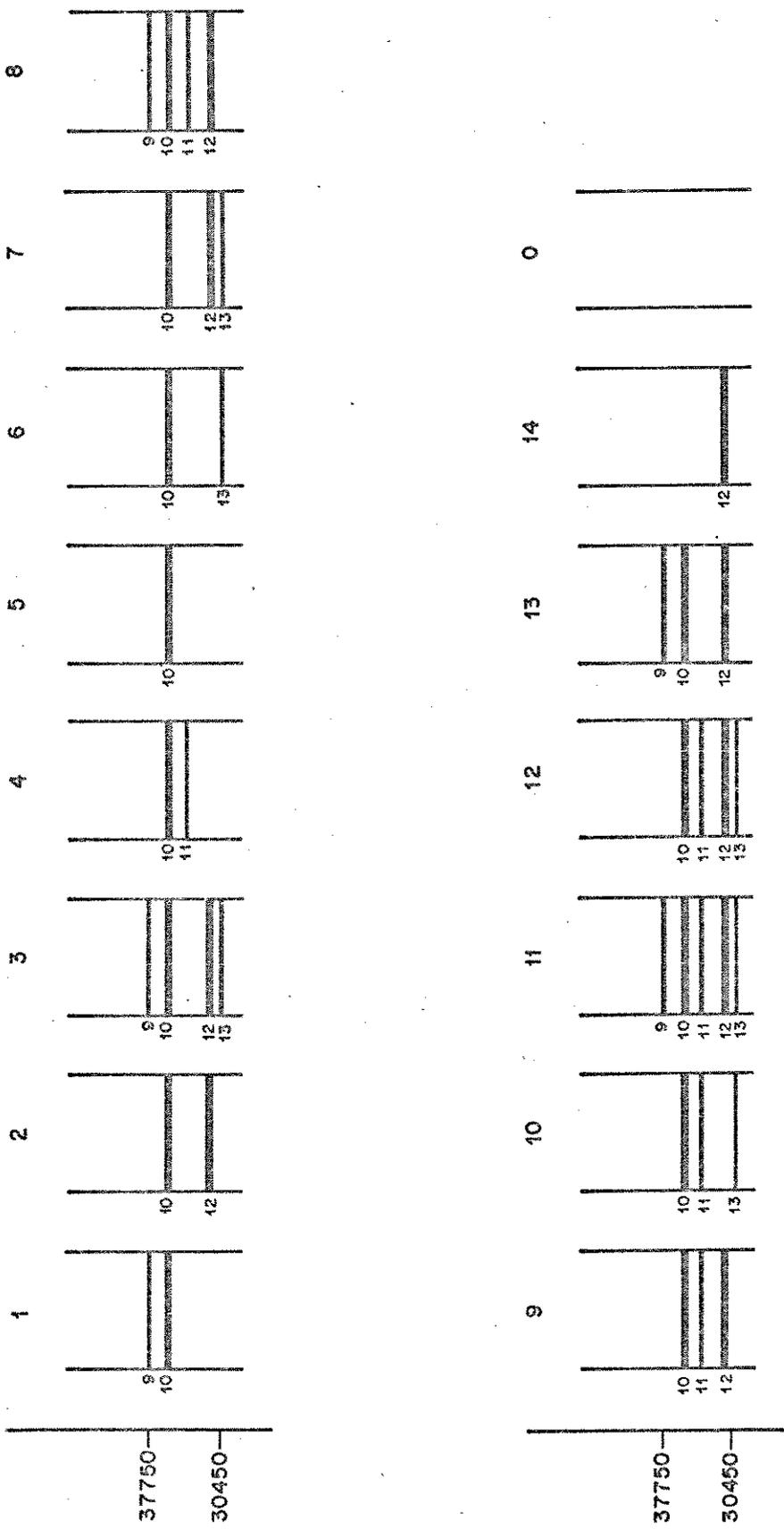


FIGURA 1
(b)



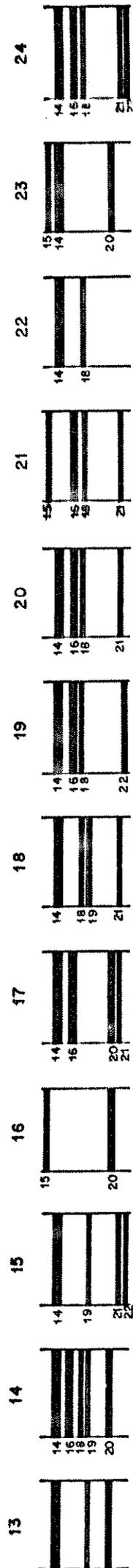
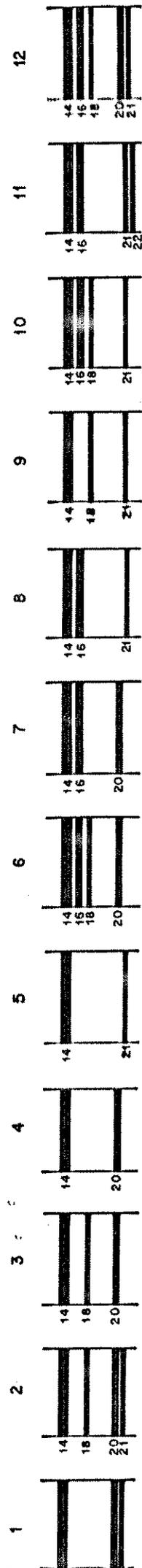
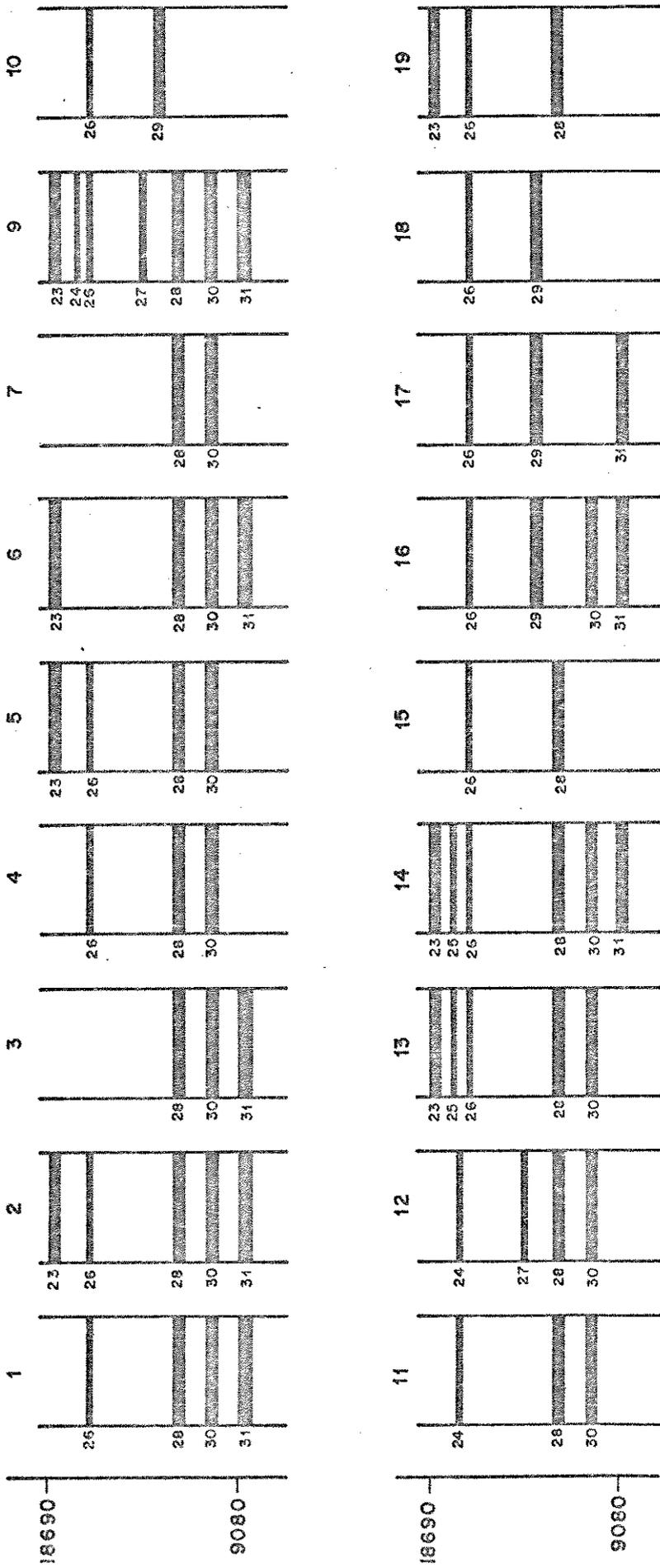


FIGURA 1
(d)



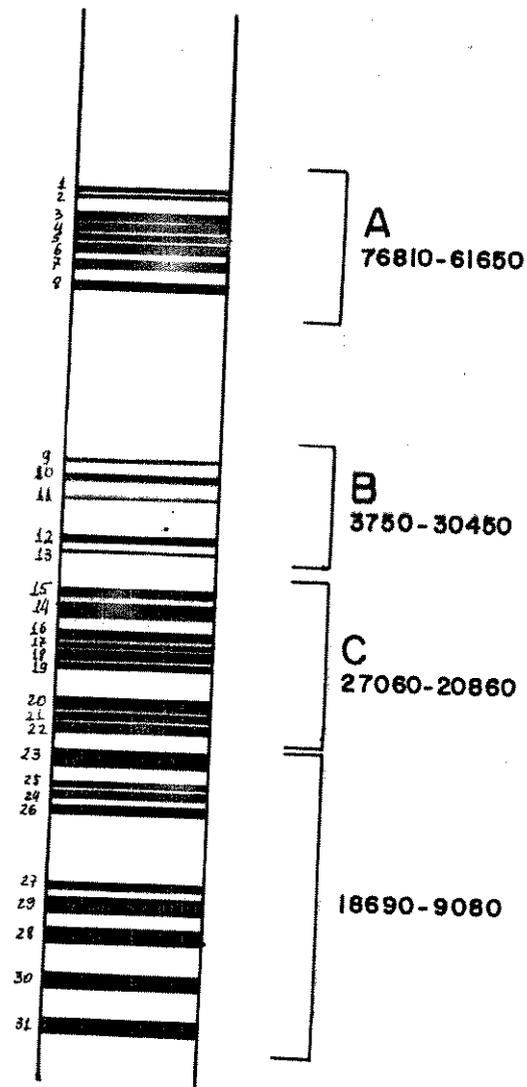


Figura 2: Diagrama de todas as proteínas encontradas no gênero *Eumecurus*.



Figura 3: Diagrama de todas as proteínas encontradas em *L. courbari* var *courbari*.

Tabela 2 - Frequência de bandas para cada população de H.courbaril var courbaril

Banda	Costa Rica	Honduras	México	Venezuela	Bolívia	Brasil
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	69,2	100,0	100,0	75,0	100,0	100,0
3	53,8	25,0	0,0	50,0	66,6	0,0
4	30,7	62,5	100,0	0,0	33,3	50,0
5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0
6	30,7	50,0	0,0	75,0	66,6	100,0
7	30,7	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0
8	15,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9	0,0	37,5	100,0	25,0	0,0	50,0
10	84,6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
11	30,7	37,5	25,0	0,0	0,0	50,0
12	92,3	100,0	100,0	100,0	66,6	100,0
13	23,0	12,5	100,0	25,0	33,3	50,0
14	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16	40,0	28,5	25,0	66,6	33,3	75,0
17	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18	100,0	100,0	25,0	100,0	0,0	100,0
19	0,0	0,0	100,0	0,0	66,6	0,0
20	69,2	100,0	100,0	50,0	0,0	75,0
21	50,0	12,5	0,0	66,6	100,0	75,0
22	0,0	0,0	0,0	0,0	66,6	0,0
23	0,0	0,0	100,0	25,0	0,0	0,0
24	7,6	0,0	0,0	0,0	33,3	0,0
25	0,0	0,0	75,0	0,0	0,0	0,0
26	53,8	87,5	100,0	100,0	66,6	100,0
27	7,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28	100,0	100,0	100,0	100,0	66,6	100,0
29	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	0,0
30	100,0	100,0	100,0	100,0	66,6	100,0
31	46,1	50,0	25,0	75,0	0,0	50,0
Nº de sementes	13	8	4	4	3	4

A identificação das bandas protéicas está apresentada na fig 2.

tringem a apenas uma das populações estudadas. Essas bandas aparentemente esporádicas na espécie, são responsáveis por uma alta variação dentro da espécie.

Verifique:

Prot. n.o 5: só ocorreu na população 6

Prot. n.o 7: ocorreu nas populações 1 e 2

Prot. n.o 8: ocorreu na população 1

Prot. n.o 19: ocorreu nas populações 3 e 5

Prot. n.o 22: ocorreu na população 5

Prot. n.o 23: ocorreu nas populações 3 e 4

Prot. n.o 24: ocorreu nas populações 1 e 5

Prot. n.o 25: ocorreu na população 3

Prot. n.o 27: ocorreu na população 1

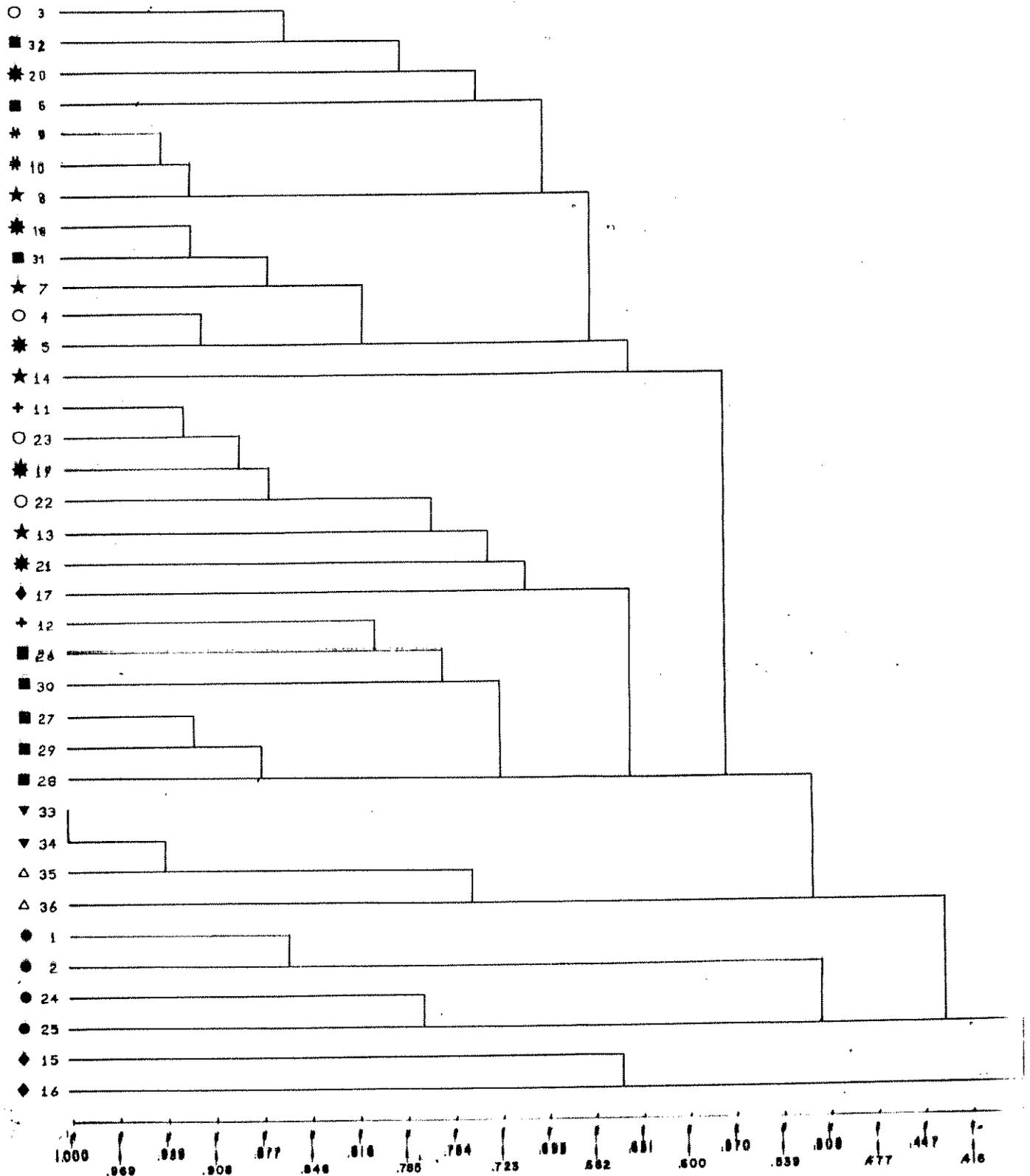
Prot. n.o 29: ocorreu na população 5

Exceto a proteína n.o 14, não houve, para a espécie, nenhuma proteína que apresentou 100% de frequência em todas as populações consideradas.

O dendrograma, figura 4, mostra que não ocorre a formação de grupos nítidos. Mesmo os padrões provenientes de sementes de mesma localidade ou de mesma planta, nem sempre saem próximos e se saem o grau de associação nem sempre é alto. Foram feitas outras análises de aglomerados utilizando-se outros métodos de agrupamento ("ligação única" e "ligação completa") mas nesses casos também não ocorre formação de grupos naturais.

No dendrograma (figura 4) pode-se verificar:

Figura 4: *H. courbaril* var *courbaril*. Dendrograma de média não ponderada.
 (Costa Rica) - Guanacaste ○ ; Alajuela * ; Osa ●.
 (Honduras) - Francisco Morazán ■.
 (México) - Tepic △ ; Acaponeta ▼.
 (Venezuela) - ★.
 (Bolívia) - Pando ◆.
 (Brasil) - Santarém + ; Manaus *.



Costa Rica

Padrões 4 e 5 (Guanacaste e Alajuela respectivamente) saem juntos com alto grau de associação mas separados dos demais padrões da Costa Rica, além de esse agrupamento reunir padrões de 2 regiões distintas. Os padrões 23, 19, 22 também apresentam o mesmo comportamento. Os padrões da província del Osa saem juntos, muito separados dos demais padrões, e com um grau de associação entre eles bem fraco. Os outros padrões da Costa Rica, saem misturados com padrões de outras populações e separados entre si.

Honduras

Padrões 26,30,27,29,28 saem juntos sendo o grau de associação entre os padrões 26 e 30 e entre 30 e 27 bem fraco. Os demais padrões estão espalhados.

México

Padrões 33 e 34 apresentam associação máxima; 35 também apresenta alta similaridade com os outros dois, no entanto a associação com o padrão 36 é fraca.

Venezuela

Todos os padrões se encontram dispersos pelo dendograma.

Brasil

Os padrões 9 e 10 de Manaus são iguais e apresentam altas associação com o padrão 8 da Venezuela. Os padrões de Santarém saem completamente dispersos.

Bolívia

Os padrões 15 e 16 saem juntos mas com um grau de associação muito fraco. Além disso saem distantes do outro padrão (nº17) dessa região.

Variação dos padrões parciais e totais

A figura 1 (a,b,c,d), mostra os diagramas dos padrões parciais dentro de cada uma das faixas de variação para o gênero e é possível com auxílio da tabela 3 se verificar quais padrões parciais ocorreram dentro desse taxon.

As tabelas 3,4,5 e 6 fornecem respectivamente:

- 1) os padrões totais (combinação dos padrões parciais) encontrados nas sementes da espécie.
- 2) a frequência de ocorrência de cada padrão parcial
- 3) padrões totais encontrados em cada população estudada
- 4) ocorrência dos padrões parciais nas populações de estudo.

Pode-se observar que de 36 sementes analisadas obteve-se 35 padrões distintos. Essas diferenças de padrões, são bastante variáveis, podendo significar apenas a presença de uma única proteína a mais em um dos padrões ou várias proteínas a, mais. No primeiro caso o grau de dissemelhança entre os padrões é muito pequeno e no segundo caso essa diferença é muito alta.

Dessa forma, observando-se a tabela 3 e figura 1 (a,b,c,d), pode-se constatar que as diferenças entre os padrões abaixo são de apenas uma proteína a mais ou a alternância de uma proteína.

Padrão 1 e 2 -- presença de proteínas 16 em C₁₂

Padrão 8 e 9 -- presença da proteína 31 em D₁₄

Padrão 16 e 18 -- presença da proteína 9 em B₁₃

Padrão 23 e 24 -- presença da proteína 9 em B₁₃

Padrão 30 e 31 -- presença da proteína 26 em D₁

Tabela 3 - Padrões totais encontrados nas sementes analisadas de
H. courbaril var courbaril

H. courbaril var. courbaril

1) A ₁ B ₃ C ₂ D ₁	6) A ₂ B ₂ C ₆ D ₁	16) A ₃ B ₂ C ₃ D ₄	25) A ₁₀ B ₀ C ₃ D ₃
2) A ₁ B ₃ C ₁₂ D ₁	7) A ₂ B ₂ C ₁₀ D ₄	17) A ₃ B ₉ C ₁₀ D ₄	26) A ₁₀ B ₁₄ C ₄ D ₃
3) A ₁ B ₇ C ₁₀ D ₄	*8) A ₂ B ₃ C ₁₃ D ₁₄	18) A ₃ B ₁₃ C ₃ D ₄	27) A ₁₀ B ₂ C ₃ D ₁
4) A ₁ B ₁₂ C ₃ D ₄	9) A ₂ B ₃ C ₁₃ D ₁₄		
5) A ₁ B ₁₃ C ₄ D ₁	10) A ₂ B ₆ C ₈ D ₄	19) A ₄ B ₂ C ₁₀ D ₂	28) A ₁₁ B ₉ C ₁ D ₃
	11) A ₂ B ₉ C ₁₀ D ₄	20) A ₄ B ₂ C ₁₅ D ₁₀	29) A ₁₁ B ₉ C ₃ D ₁
	12) A ₂ B ₁₁ C ₁₄ D ₂	21) A ₄ B ₂ C ₁₅ D ₁₁	
	13) A ₂ B ₁₂ C ₆ D ₄	22) A ₄ B ₉ C ₃ D ₁	30) A ₁₂ B ₂ C ₄ D ₁
	14) A ₂ B ₁₂ C ₁₀ D ₄		31) A ₁₂ B ₂ C ₄ D ₁
	15) A ₂ B ₁₃ C ₃ D ₄	23) A ₆ B ₂ C ₃ D ₁	
		24) A ₆ B ₁₃ C ₃ 1	32) A ₁₃ B ₉ C ₆ D ₄
			33) A ₁₄ B ₇ C ₁₀ D ₇
			34) A ₁₅ B ₂ C ₂ D ₇
			35) A ₁₅ B ₂ C ₃ D ₁₂

* Padrão que ocorreu em duas sementes distintas, ambas provenientes da região de Acaponeta, México.

Os padrões parciais das faixas A,B,C,D, estão identificados na figura 1 (a,b,c,d).

Tabela 4 - Frequência de ocorrência dos padrões parciais em H.courbaril var courbaril.

Faixa A	Faixa B	Faixa C	Faixa D
A ₁ = 13,9%	B ₂ = 33,33%	C ₁ = 2,78%	D ₁ = 27,8%
A ₂ = 27,8%	B ₃ = 13,9%	C ₂ = 5,56%	D ₂ = 5,56%
A ₃ = 8,33%	B ₆ = 2,78%	C ₃ = 30,56%	D ₃ = 11,11%
A ₄ = 11,11%	B ₇ = 5,56%	C ₄ = 11,11%	D ₄ = 33,33%
A ₆ = 5,56%	B ₉ = 16,67%	C ₆ = 8,33%	D ₇ = 5,56%
A ₁₀ = 8,33%	B ₁₁ = 2,78%	C ₈ = 2,78%	D ₁₀ = 2,78%
A ₁₁ = 5,56%	B ₁₂ = 8,33%	C ₁₀ = 19,44%	D ₁₁ = 2,78%
A ₁₂ = 5,56%	B ₁₃ = 11,11%	C ₁₂ = 2,78%	D ₁₂ = 2,78%
A ₁₃ = 2,78%	B ₁₄ = 2,78%	C ₁₃ = 8,33%	D ₁₃ = 5,56%
A ₁₄ = 2,78%	B ₀ = 2,78%	C ₁₄ = 2,78%	D ₁₄ = 2,78%
A ₁₅ = 5,56%		C ₁₅ = 5,56%	

* O padrão C₄ está embutido em C₄

A identidade dos padrões parciais das faixas A,B,C,D, está apresentada na figura 1 (a,b,c,d).

Tabela 5 - Padrões encontrados em cada uma das populações consideradas no estudo

Costa Rica	Honduras	Bolívia	Venezuela
A ₁ B ₁₂ C ₃ D ₄	A ₁₁ B ₉ C ₁ D ₃	A ₂ B ₆ C ₈ D ₄	A ₁ B ₇ C ₁₀ D ₄
A ₂ B ₂ C ₁₀ D ₄	A ₂ B ₂ C ₆ D ₁	A ₄ B ₂ C ₁₅ D ₁₀	A ₁ B ₁₃ C ₄ D ₁
A ₂ B ₉ C ₁₀ D ₄	A ₂ B ₁₂ C ₆ D ₄	A ₄ B ₅ C ₁₅ D ₁₁	A ₄ B ₂ C ₁₀ D ₂
A ₂ B ₁₂ C ₁₀ D ₄	A ₂ B ₁₃ C ₃ D ₄		A ₁₀ D ₂ C ₃ D ₁
A ₆ B ₂ C ₃ D ₁	A ₃ B ₂ C ₃ D ₄	México	
A ₁₀ B ₀ C ₃ D ₃	A ₃ B ₁₃ C ₃ D ₄		Brasil
A ₁₀ B ₁₄ C ₄ D ₃	A ₄ B ₉ C ₃ D ₁	*A ₂ B ₃ C ₁₃ D ₁₃	A ₁ B ₃ C ₂ D ₁
A ₁₁ B ₉ C ₃ D ₁	A ₆ B ₁₃ C ₃ D ₁	A ₂ B ₁₃ C ₄ D ₁	A ₁ B ₃ C ₁₂ D ₁
A ₁₂ B ₂ C ₄ D ₁		A ₂ B ₁₁ C ₁₄ D ₂	A ₃ B ₉ C ₁₀ D ₄
A ₁₂ B ₂ C ₄ D ₃			A ₁₃ B ₉ C ₆ D ₄
A ₁₄ B ₇ C ₁₀ D ₇			
A ₁₅ B ₂ C ₂ D ₇			
A ₁₅ B ₂ C ₃ D ₁₂			

* Padrão que repete duas vezes

A,B,C,D, correspondem aos padrões parciais identificados na figura 1 (a,b,c,d).

TABELA 6 - Ocorrência dos padrões parciais nas populações de H. courbaril var. courbaril.
 populações: Costa Rica = 1; Honduras = 2; México = 3; Venezuela = 4;
 Bolívia = 5; Brasil = 6.

a) Padrões parciais da faixa A.

POP.	1	2	3	4	5	6
PADRÃO						
A ₁	+			+		+
A ₂	+	+	+		+	
A ₃		+				+
A ₄		+		+	+	
A ₆	+	+				
A ₁₀	+			+		
A ₁₁	+	+				
A ₁₂	+					
A ₁₃						+
A ₁₄	+					
A ₁₅	+					

b) Padrões parciais da faixa B.

POP.	1	2	3	4	5	6
PADRÃO						
B ₂	+	+		+	+	
B ₃			+			+
B ₆					+	
B ₇	+			+		
B ₉	+	+				+
B ₁₁			+			
B ₁₂	+	+				
B ₁₃		+		+		
B ₁₄	+					
B ₀	+					

c) Padrões parciais da faixa C.

POP.	1	2	3	4	5	6
PADRÃO						
C ₁		+				
C ₂	+					+
C ₃	+	+		+		
C ₄	+			+		
C ₆		+				+
C ₈					+	
C ₁₀	+			+		+
C ₁₂						+
C ₁₃			+			
C ₁₄			+			
C ₁₅					+	

d) Padrões parciais da faixa D

POP.	1	2	3	4	5	6
PADRÃO						
D ₁	+	+		+		+
D ₂				+		
D ₃	+	+				
D ₄	+	+		+	+	+
D ₇	+					
D ₁₀					+	
D ₁₁					+	
D ₁₂	+					
D ₁₃			+			
D ₁₄			+			

- Os padrões parciais das faixas A, B, C e D estão identificados na Figura 1.

Padrão 11 e 17 -- presença da proteína 6 em A₃

Padrão 23 e 27 -- presença da proteína 2 em A₆

Padrão 15 e 18 -- presença da proteína 6 em A₃

Padrão 13 e 14 -- presença da proteína 20 em C₆ e proteína 21 em C₁₀.

Padrão 22 e 28 -- presença da proteína 3 em A₄ e ausência em A₁₁ e presença da proteína 7 em A₁₁ e ausência em A₄

Embora o baixo número de sementes por localidade, a tabela 6, de ocorrência de padrões parciais dentro das populações, indica que alguns dos padrões parciais dentro de cada faixa parecem ser relativamente mais frequentes em toda a área de distribuição da espécie.

Assim na faixa A, o padrão A₂ ocorre em quase todas as populações.

Na faixa B o padrão B₂ ocorre em quase todas as populações.

Na faixa C aparentemente não existe nenhum padrão que ocorra em todas as populações. Isso pode-se dever à pequena amostragem de certas populações.

Na faixa D os padrões D₁ e D₄ ocorrem em quase todas as populações.

2.2) H. courbaril var. stilbocarpa

Foram analisada 64 sementes de H. courbaril var. stilbocarpa, cujos principais dados de coleta acham-se resumidos na tabela III do material e métodos.

Das 31 proteínas consideradas para o gênero, foram observadas 23 bandas protéicas nessa espécie. A figura 5 apresenta um esquema com todas as bandas que ocorreram nesse taxon.

As tabelas 7 a e b, fornecem, respectivamente as frequências de ocorrência de bandas protéicas em cada população considerada e considerando-se o agrupamento de padrões por estado de origem das sementes. Essa segunda tabela foi feita no intuito de reduzir um pouco a discrepância no tamanho da amostra.

Comparando-se as 2 tabelas, pode-se perceber que devem estar existindo diferenças quanto à frequência de ocorrência das proteínas entre as populações estudadas.

Verifique na tabela 7 a e b a frequência das proteínas:

prot.1 cuja baixa frequência na população 1 (tabela 7 a), onde o número de sementes analisadas foi grande, em contraste com a alta frequência na população 6 onde o número de sementes é baixo. Isto sugere que essa seja uma proteína mais frequente na população 6 do que na 1. Esse padrão se repete quando se tomam as frequências apresentadas para cada estado (figura 7b).

Casos similares parecem poder estar ocorrendo com as proteínas:

prot 2, prot 11, prot 13, prot 14, prot 15, prot 20, prot 23, prot 30. As diferenças de frequência para as proteínas: prot 15,

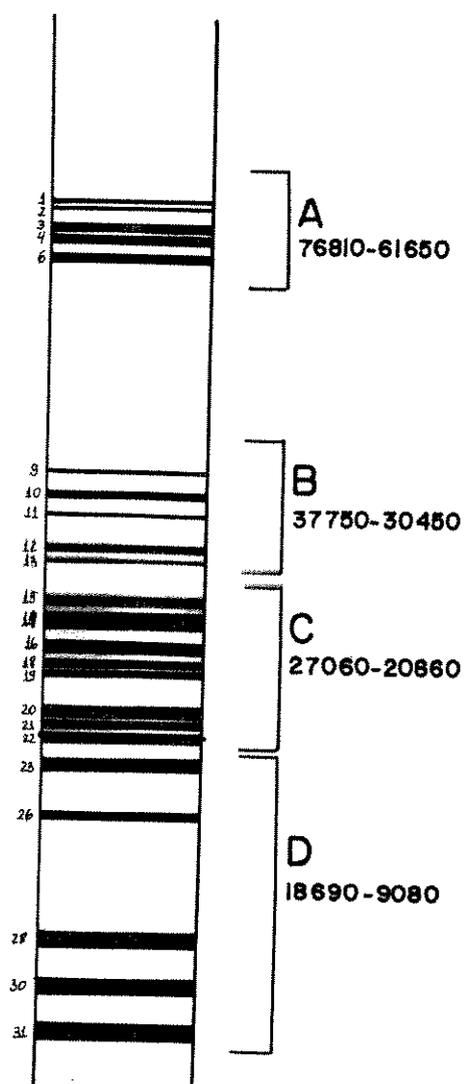


Figura 5: Diagrama de todas as proteínas encontradas em *H. courbaril* var *stilbocarpa*.

Tabela 7a - Frequência de ocorrência de proteínas de H.courbaril var stilbocarpa em diversas localidades
(* valores de proteína faltando)

1 = Esmeraldas; 2 = Andiroba; 3 = Sabará;
4 = Sete Lagoas; 5 = Paraopeba; 6 = Butantan;
7 = Conchal; 8 = Campinas; 9 = Jaboticabal.

Nº Banda	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	20,9	33,1	0,0	100,0	50,0	60,0	0,0	33,3	33,3
2	100,0	66,6	100,0	100,0	100,0	80,0	100,0	100,0	100,0
3	90,6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
4	32,5	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	33,3	0,0	33,3
5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	16,2	0,0	0,0	100,0	50,0	0,0	0,0	33,0	0,0
7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9	4,6	0,0	0,0	0,0	50,0	20,0	0,0	0,0	0,0
10	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
11	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0
12	95,3	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	66,6	100,0
13	9,3	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	33,3	0,0	0,0
14	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	33,3
15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	66,6 *
16	50,0	50,0	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0	50,0	33,3 *
17	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 *
18	100,0	50,0	100,0	100,0	100,0	25,0	100,0	50,0	33,3 *
19	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 *
20	90,0	66,6	0,0	100,0	50,0	60,0	66,6	66,6	66,6
21	83,3	50,0	100,0	0,0	100,0	75,0	100,0	50,0	33,3 *
22	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 *
23	0,0	33,3	100,0	0,0	0,0	40,0	0,0	33,3	0,0
24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
26	97,6	66,6	100,0	100,0	100,0	100,0	66,6	100,0	100,0
27	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	66,6
31	95,3	100,0	100,0	0,0	100,0	60,0	100,0	100,0	33,3
Nº de sementes	43	3	1	1	2	5	3	3	3

As bandas protéicas estão identificadas na Figura 2.

Tabela 7b - Frequência de ocorrência de proteínas de H.courbaril var stilbocarpa nos dois estados amostrados

Nº Banda	MG	SP
1	24,0	35,7
2	98,6	92,8
3	92,0	100,0
4	30,0	14,28
5	0,0	0,0
6	18,0	7,14
7	0,0	0,0
8	0,0	0,0
9	6,0	7,14
10	100,0	100,0
11	2,0	14,28
12	94,0	92,85
13	8,0	21,42
14	100,0	85,71
15	0,0	20,0 *
16	55,55	70,0 *
17	0,0	0,0 *
18	88,88	40,0 *
19	11,11	0,0 *
20	90,0	64,28
21	72,72	60,0 *
22	11,11	0,0 *
23	4,0	21,43
24	0,0	0,0
25	0,0	0,0
26	96,0	92,85
27	0,0	0,0
28	100,0	100,0
29	0,0	0,0
30	100,0	92,85
31	94,0	71,43
Nº de sementes	50	14

As bandas protéicas estão identificadas na Figura 2.

16, 17, 18, 19, 21 e 22 precisam ser olhadas com certa restrição devido a ser essa a faixa onde ocorre falta de informação sobre as proteínas. A proteína 15 foi incluída na listagem acima, por se tratar de proteína muito rara e de só ter ocorrido em uma das populações, sugerindo que deve se tratar de uma proteína mais restrita a algumas localidades. Proteínas raras, como a proteína 15 e 19 são responsáveis pela introdução de muita variação na espécie.

O dendrograma (figura 6) mostra que não está ocorrendo a formação de grupos naturais, já que padrões de sementes de um mesmo fruto acham-se separados, distribuídos ao longo do dendrograma. Por outro lado padrões muito similares são de sementes provenientes de árvores e de populações muitas vezes distintas. Repare por exemplo o que ocorre com o padrão 44 (Butantan, São Paulo) e o padrão 18 (arv 2, Esmeraldas, MG); padrão 42 (Conchal, SP) e padrão 64 (Andiroba, MG).

A similaridade entre padrões de uma mesma localidade é por vezes muito mais baixa do que a observada para padrões de locais diferentes. Além disso padrões de uma mesma população aparecem espalhados no dendrograma, separados entre si, mostrando quase nenhuma similaridade entre eles.

A tabela 8, fornece os padrões totais encontrados em H. courbaril var. stilbocarpa. A figura 1 (a,b,c,d), que apresenta todos os padrões parciais, para cada faixa, encontrados no gênero, permite que se visualise, com auxílio da tabela 8, os padrões totais obtidos para esse taxon.

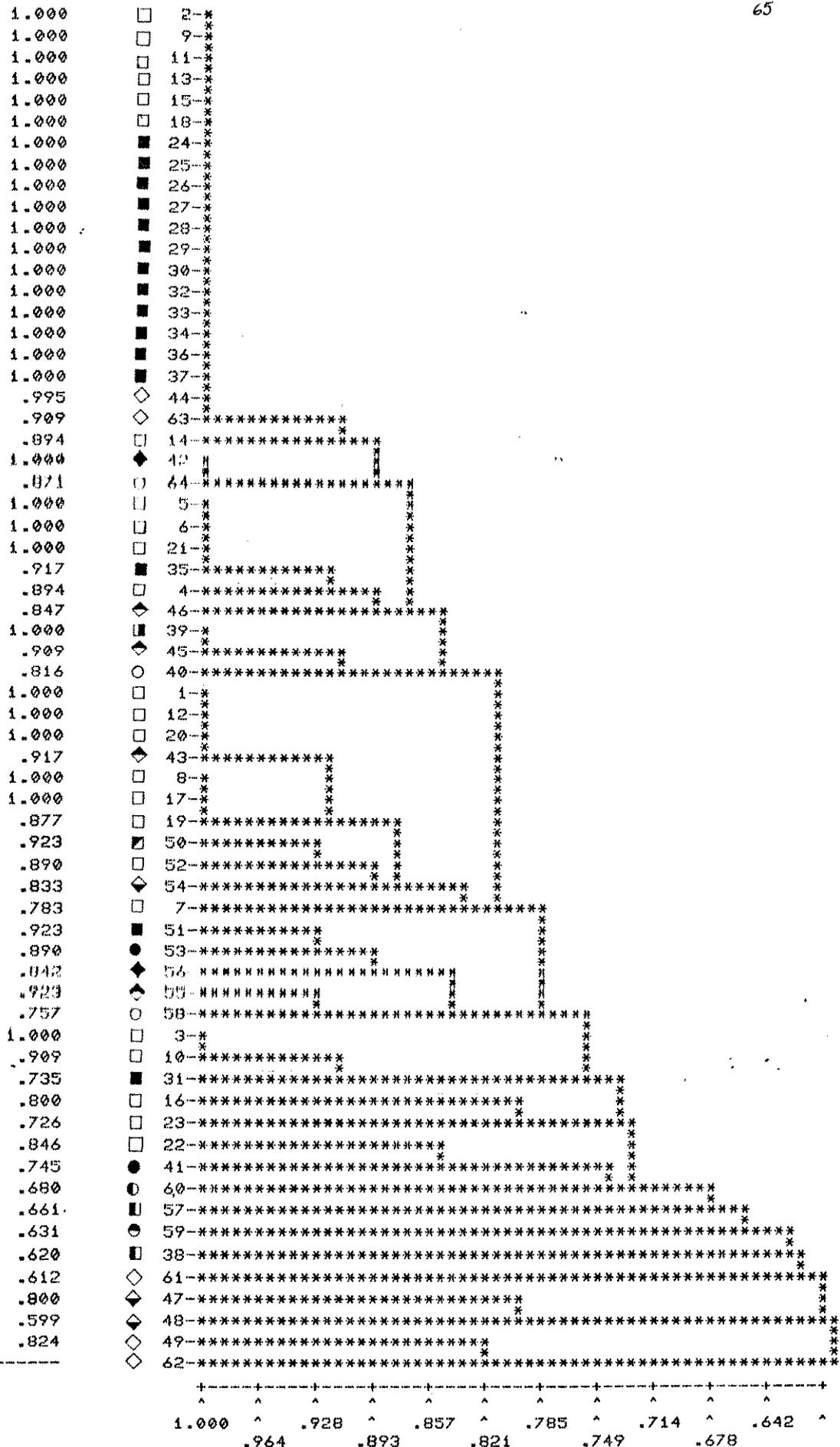


Figura 6 - II. Comparação de 62 amostras. Dendrograma de média não ponderada. (Coeficiente de Jaccard)

MG. Esmeraldas: □ - arv 1, □ - arv 2, ■ - arv 3,
 ▨ - arv 4, ▨ - arv 5; Andiroba: ○ ; Sabará: ● ;
 Paraopeba: ● ; Sete Lagoas: ○ ;
 Estado de São Paulo - Conchal: ◆ , Butantan: ◇ ,
 Campinas: ◆ , Jaboticabal: ◆

TABELA 8 - Padrões totais que ocorreram em H. courbaril var. stilbocarpa

<u>H. courbaril</u> var. <u>stilbocarpa</u>	
1) A ₂ B ₂ C' ₄ D ₁	19) A ₁₆ B ₂ C' ₄ D ₁
2) A ₃ B ₂ C' ₄ D ₁	20) A ₁₆ B ₂ C' ₁₀ D ₁
3) A ₄ B ₂ C' ₄ D ₁	21) A ₁₆ B ₂ C' ₁₈ D ₁
4) A ₄ B ₅ C' ₄ D ₁	22) A ₁₆ B ₃ C' ₄ D ₁
5) A ₄ B ₇ C' ₄ D ₁	23) A ₁₆ B ₅ C' ₁₀ D ₂
6) A ₆ B ₂ C' ₁ D ₁	24) A ₁₇ B ₂ C' ₄ D ₁
7) A ₆ B ₂ C' ₄ D ₁	25) A ₁₇ B ₂ C' ₄ D ₄
8) A ₆ B ₂ C' ₄ D ₃	26) A ₁₇ B ₁₂ C' ₄ D ₁
9) A ₆ B ₂ C ₇ D ₁	27) A ₁₈ B ₁₃ C' ₁ D ₁
10) A ₆ B ₂ C ₇ D ₃	28) A ₁₉ B ₂ C ₄ D ₁
11) A ₆ B ₂ C ₉ D ₁	29) A ₁₉ B ₂ C' ₄ D ₁
12) A ₆ B ₂ C ₉ D ₂	30) A ₁₉ B ₂ C' ₁₀ D ₁
13) A ₆ B ₂ C' ₁₀ D ₁	31) A ₁₉ B ₂ C' ₁₆ D ₄
14) A ₆ B ₂ C' ₁₀ D ₂	32) A ₁₉ B ₅ C' ₁₉ D ₁
15) A ₆ B ₂ C' ₁₆ D ₁₅	33) A ₁₉ B ₁₁ C' ₁₇ D ₂
16) A ₆ B ₅ C' ₄ D ₇	34) A ₁₉ B ₁₂ C ₈ D ₅
17) A ₆ B ₇ C' ₄ D ₁	35) A ₂₀ B ₁₃ C' ₄ D ₁
18) A ₆ B ₇ C' ₁₀ D ₁	36) A ₂₀ B ₂ C ₃ D ₄
	37) A ₂₁ B ₂ C' ₄ D ₁
	38) A ₂₁ B ₂ C' ₁₀ D ₄

- Os padrões das faixas A, B, C e D estão identificados na Figura 1.

Foram encontrados 38 padrões distintos em 64 sementes amostradas. Este valor, no entanto, pode não estar exato devido à falta de informação sobre algumas proteínas, em diversos padrões, na faixa C. Essa falta de informações de bandas proteicas, é representada pelos padrões C-1 e C-4. Assim, pode estar havendo muito padrão C-4 e C-1 que difere de todos os demais padrões (bem como entre si), como C-4 e C-1 que corresponda a algum dos padrões já existentes.

A tabela 9 fornece a distribuição de todos os padrões totais nas populações consideradas. Há indícios de que alguns padrões totais sejam restritos a apenas uma das populações e que outros apresentem distribuição mais ampla.

Devido ao tamanho de amostra e forma como os dados foram coletados, é possível se fazer uma certa comparação com os padrões obtidos na população 1. Dessa forma, tomando-se as tabelas 9 e 10 (de ocorrência de padrões parciais nos indivíduos da população 1), pode-se verificar o que está ocorrendo nessa população entre sementes de um mesmo fruto, frutos de uma mesma árvore e entre árvores de uma mesma área.

Na tabela 9 pode-se perceber que a variabilidade de sementes de um mesmo fruto pode ser bastante alta, mais há frutos cujas sementes podem ser pouco variáveis entre si. A variação proteica entre as sementes dos frutos 4 e 5 é muito maior que a existente entre sementes do fruto 14. O dendrograma fig.6 permite uma melhor visualização do que está ocorrendo. A árvore-mãe, como um todo, pode estar apresentando uma variabilidade muito alta, embora alguns de seus frutos possam ter baixa variabilidade. A

Tabela 9 - Padrões totais encontrados em cada população considerada de H. courbaril var stilbocarpa. No caso de ter sido possível, é indicado o indivíduo mãe e o fruto de proveniência das sementes. arv = árvore f = fruto

População 1 - Esmeraldas (MG)

arv 2

f4	f5	f14	f15
A16B2 C'4D1	A4 B2 C'4D1	A6 B2 C'4D1	A17B12C'4D1
A6 B2 C'4D1	A17B2 C'4D1	A16B2 C'4D1	A17B2 C'4D1
A3 B2 C'4D1	A17B2 C'4D1	A6 B2 C'4D1	A6 B2 C'4D1
A4 B7 C'4D1	A6 B2 C'4D1	A6 B2 C'4D1	A17B2 C'4D1
A4 B2 C'4D1	A3 B2 C'4D1	A6 B2 C'4D1	A16B2 C'4D1
	A4 B2 C'4D1		
A18B13C'4D1 (f7)			
A16B3 C'4D1 (f1)			
A16B2 C'4D1 (f12)			

arv 3

f10	f2	f6	f11
A6 B2 C'4D1	A6 B2 C'1D1	A6 B2 C'4D1	A19B2 C10D1
A6 B2 C'4D1	A6 B2 C'4D1	A6 B2 C'4D1	
A6 B2 C'4D1	A2 B2 C'4D1	A4 B2 C'4D1	
A6 B2 C'4D1	A6 B2 C'4D1	A6 B2 C'4D1	
A6 B2 C'4D1		A6 B2 C'4D1	

arv 1

A6 B6 C'4D7
A19B5 C19D1

arv 7

A19B2 C'4D1

arv 8

A16B2 C18D1

População 2
Andiroba

A21B2 C'4D1
A6 B2 C9 D2
A6 B2 C7 D3

População 3
Sabará

A16B5 C10D2

População 5
Paraopeba

A20B13C'4D1
A6 B2 C10D1

População 4
Sete Lagoas

A20B2 C3 D4

São Paulo

População 7
Conchal

A6 B2 C'4D3
A16B2 C'4D1
A6 B7 C10D1

População 6
Butantan

A6 B2 C'4D1
A19B11C17D2
A21B2 C10D4
A19B12C8 D5
A6 B2 C7 D1

População 8
Monjolinho

A19B2 C4 D1
A6 B2 C10D2

Sta Genebra
A4 B5 C'4D1

População 9
Jaboticabal

A6 B2 C16D15
A19B2 C16D4
A16B2 C10D1

TABELA 10 - Ocorrência dos padrões parciais de *H. courbaril* var. *stilbocarpa* nos indivíduos da população de Esmeraldas (M.G.).

a) Padrões parciais da faixa A

INDIVÍ- DUO	ARV 1	ARV 2	ARV 3	ARV 4	ARV 5	Nº DE OCORRÊN- CIAS
PADRÃO						
A ₂			+			1
A ₃		+				2
A ₄		+	+			5
A ₆	+	+	+			20
A ₁₆		+			+	6
A ₁₇		+				5
A ₁₈		+				1
A ₁₉	+		+	+		3
Nº DE SEMENTES	2	24	15	1	1	

b) Padrões parciais da faixa B

INDIVÍ- DUO	ARV. 1	ARV. 2	ARV. 3	ARV. 4	ARV. 5	Nº DE OCORRÊN- CIAS
PADRÃO						
B ₂		+	+	+	+	37
B ₃		+				1
B ₅	+					1
B ₆	+					1
B ₇		+				1
B ₁₂		+				1
B ₁₃		+				1
Nº DE SEMENTES.	2	24	15	1	1	

- Os padrões das faixas A, B, C e D estão identificados na Figura 1.

TABELA 10 (continuação)- Ocorrência dos padrões parciais de *H. courbaril* var. *stilbocarpa* nos indivíduos da população de Esmeraldas (M.G.)

c) Padrões parciais da faixa C

INDIVÍ- DUO PADRÃO	ARV 1	ARV 2	ARV 3	ARV 4	ARV 5	Nº DE OCOR- RÊNCIAS
C ₁		+	+			2
C ₄	+	+	+	+		23
C ₉		+				1
C ₁₀			+			1
C ₁₈					+	1
C ₁₉	+					1
Nº DE SEMENTES	2	24	15	1	1	

d) Padrões parciais da faixa D

INDIVÍ- DUO PADRÃO	ARV 1	ARV 2	ARV 3	ARV 4	ARV 5	Nº DE OCOR- RÊNCIAS
D ₁	+	+	+	+	+	41
D ₄		+				1
D ₇	+					1
Nº DE SEMENTES	2	24	15	1	1	

- Os padrões das faixas A, B, C e D estão identificados na Figura 1.

variabilidade encontrada entre árvore-mãe, entretanto parece poder diferir bastante. Os dados indicam que a árvore 2 tem uma variabilidade maior que a árvore 3 (Tabela 10).

Sementes tomadas sem critério definido, de outras árvores da mesma população estão introduzindo novas variações, até mesmo com o aparecimento de padrões parciais até então não amostrados. O que indica uma variabilidade populacional muito maior do que a amostrada e a possibilidade de que indivíduos adultos de uma mesma população possam apresentar progênie com níveis de variação muito distintos uns dos outros.

Pode-se perceber também que quanto à ocorrência de padrões parciais, a árvore 2 apresenta (em relação à 3), uma variabilidade maior na faixa A e B sobretudo (Tabela 10).

A árvore 1 parece estar introduzindo variação bastante significativa, já que, apesar da baixa amostragem ela introduz padrões não encontrados nos demais indivíduos adultos (Tabela 10 ; Fig. 6).

Há padrões parciais nessa população que têm ampla distribuição e alta frequência - é o caso dos padrões A_6 , B_2 e D_1 (faixa C não está sendo considerada). E outros padrões que parecem ser esporádicos mas que introduzem grande variação (Tabela 10; Tabela 11).

Tomando-se agora todas as populações amostradas e comparando-se o que está ocorrendo entre elas, pode-se perceber que a frequência de ocorrência dos padrões parciais (Tabelas 11, 12 e 13), é bastante variável com alguns padrões parciais com uma nítida predominância em relação aos demais.

TABELA 11 - Frequência de ocorrência dos padrões parciais na população 1 de H. courbaril var. stilbocarpa. (Esmeraldas, MG. - n=43)

H. courbaril var. stilbocarpa

A ₂ = 2,33%	n= 1	B ₂ = 86,05%	n= 37	C' ₁ = 3,12%	n= 2	D ₁ = 95,35%	n= 41
A ₃ = 4,65%	n= 2	B ₃ = 2,33%	n= 1	C' ₄ = 86,05%	n= 37	D ₄ = 2,33%	n= 1
A ₄ = 11,63%	n= 5	B ₅ = 2,33%	n= 1	C ₉ = 2,33%	n= 1	D ₇ = 2,33%	n= 1
A ₆ = 46,51%	n= 20	B ₆ = 2,33%	n= 1	C ₁₀ = 2,33%	n= 1		
A ₁₆ = 13,95%	n= 6	B ₇ = 2,33%	n= 1	C ₁₈ = 2,33%	n= 1		
A ₁₈ = 2,33%	n= 1	B ₁₃ = 2,33%	n= 1				
A ₁₉ = 6,98%	n= 3						

- Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

TABELA 12 - Frequência de ocorrência dos padrões parciais em H. courbaril
var. stilbocarpa

H. courbaril var. stilbocarpa

A ₂ = 1,56%	n= 1	B ₂ =79,69%	n=51	C ₁ = 3,12%	n= 2	D ₁ =79,69%	n=51
A ₃ = 3,12%	n= 2	B ₃ = 1,56%	n= 1	C ₃ = 1,56%	n= 1	D ₂ = 6,25%	n= 4
A ₄ = 9,37%	n= 6	B ₅ = 6,25%	n= 4	C ₄ =67,19%	n=43	D ₃ = 3,12%	n= 2
A ₆ =45,31%	n=30	B ₇ = 4,69%	n= 3	C ₄ = 1,56%	n= 1	D ₄ = 6,25%	n= 4
A ₁₆ =12,15%	n= 8	B ₁₁ = 1,56%	n= 1	C ₇ = 3,12%	n= 2	D ₅ = 1,56%	n= 1
A ₁₇ = 7,81%	n= 5	B ₁₂ = 3,12%	n= 2	C ₈ = 1,56%	n= 1	D ₇ = 1,56%	n= 1
A ₁₈ = 1,56%	n= 1	B ₁₃ = 3,12%	n= 2	C ₉ = 3,12%	n= 2	D ₁₅ = 1,56%	n= 1
A ₁₉ =10,96%	n= 7			C ₁₀ =10,94%	n= 7		
A ₂₀ = 3,12%	n= 2			C ₁₆ = 3,12%	n= 2		
A ₂₁ = 3,12%	n= 2			C ₁₇ = 1,56%	n= 1		
				C ₁₈ = 1,56%	n= 1		
				C ₁₉ = 1,56%	n= 1		

- Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na
Figura 1.

TABELA 13 - Frequência de ocorrência dos padrões parciais de H. courbaril var. stilbocarpa nas populações: Andiroba, Sabará, Sete Lagoas, Paraopeba, Butantan, Conchal, Campinas e Jaboticabal, (n= 21).

H. courbaril var. stilbocarpa

A ₄ = 4,76%	n=1	B ₂ =71,43%	n=5	C ₃ = 4,76%	n=1	D ₁ =47,62%	n=10
A ₆ =42,86%	n=9	B ₅ = 9,52%	n=2	C ₄ =28,57%	n=6	D ₂ =19,05%	n= 4
A ₁₆ =14,28%	n=3	B ₇ = 4,76%	n=1	C ₄ = 4,76%	n=1	D ₃ = 9,52%	n= 2
A ₁₉ =19,05%	n=4	B ₁₁ = 4,76%	n=1	C ₇ = 9,52%	n=2	D ₄ =14,28%	n= 3
A ₂₀ = 9,52%	n=2	B ₁₂ = 4,76%	n=1	C ₈ = 4,76%	n=1	D ₅ = 4,76%	n= 1
A ₂₁ = 9,52%	n=2	B ₁₃ = 4,76%	n=1	C ₉ = 4,76%	n=1	D ₁₅ = 4,76%	n= 1
				C ₁₀ =28,57%	n=6		
				C ₁₆ = 9,52%	n=2		
				C ₁₇ = 4,76%	n=1		

Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

Dessa forma, na faixa A o padrão mais frequente é o A_6 , faixa B, B_2 ; faixa C (desconsiderando-se o padrão C_4), C_{10} ; faixa D, D_1 . A Tabela 14 fornece a ocorrência desses padrões nas populações estudadas.

As tabelas 11 e 13 permitem a comparação do comportamento dos padrões parciais da população 1 em relação ao restante da amostra.

De maneira geral, verifica-se que a população 1 também apresenta a mesma predominância de um só padrão parcial por faixa, que foi verificado para toda a amostra, exceto em relação à faixa C, onde, devido à incidência do padrão C_4 , não é possível afirmar que haja um padrão mais frequente nesta faixa.

Observa-se também que a população 1 apresenta maior variação de padrões na faixa A e B. As demais populações apresentaram maior variação na faixa D (faixa C é difícil de se saber o que ocorreria com ela se não houvessem os padrões C_4 e C_1).

É importante também notar que alguns padrões são considerados diferentes por apresentarem somente uma proteína a mais em relação a outro padrão (figura 1; tabela 8).

Verifica-se que:

Os padrões totais 7 e 18 (Tabela 8) diferem pela presença da proteína 4 em A_{16} .

Padrões 25 e 26 diferem pela presença da Prot. 31 em D_1

Padrões 29 e 37 diferem pela presença da Prot. 2 em A_{19}

TABELA 14 - Ocorrência dos padrões parciais nas populações de B. courbaril var. stilbocarpa.
 populações: Esmeraldas= 1; Andiroba= 2; Sabará= 3; Sete Lagoas= 4;
 Paraopeba= 5; Butantan= 6; Conchal= 7; Campinas= 8; Jaboticabal= 9.

a) Padrões parciais da faixa A

POP. PADRÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A ₂	+								
A ₃	+								
A ₄	+							+	
A ₆	+	+			+	+	+	+	+
A ₁₆	+		+				+		+
A ₁₇	+								
A ₁₈	+								
A ₁₉	+					+		+	+
A ₂₀				+	+				
A ₂₁		+				+			

b) Padrões parciais da faixa B

POP. PADRÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
B ₂	+	+		+	+	+	+	+	+
B ₃	+								
B ₅	+		+					+	
B ₅	+								
B ₇	+						+		
B ₁₁						+			
B ₁₂	+					+			
B ₁₃	+				+				

- Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

TABELA 14 (continuação) - Ocorrência de padrões parciais nas populações de *H. courbaril* var. *stilbocarpa*.

c) Padrões parciais da faixa C

POP. PADRÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C ₁	+								
C ₃				+					
C ₄	+	+			+	+	+	+	
C ₇		+				+			
C ₈						+			
C ₉	+	+							
C ₁₀	+		+		+	+	+	+	+
C ₁₆									+
C ₁₇						+			
C ₁₈	+								
C ₁₉	+								

d) Padrões parciais da faixa D

POP. PADRÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D ₁	+	+			+	+	+	+	+
D ₂		+	+			+		+	
D ₃		+					+		
D ₄	+			+		+			+
D ₅						+			
D ₇	+								
D ₁₅									+

- Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

Padrões 7 e 29 diferem pela presença da Prot. 1 em
A19

Padrões 1 e 2 diferem pela presença da Prot. 6 em A

Padrões 3 e 4 diferem pela presença da Prot. 12 em B2

Padrões 7 e 16 diferem pela presença da Prot. 13 em
B7

A tabela 14 apresenta a ocorrência dos padrões parciais em cada população amostrada. Apesar do baixo número de sementes, verifica-se que há padrões que aparentemente apresentam uma distribuição ampla, enquanto que outros acham-se mais restritos. Pode-se observar, através da tabela 12, que para essa espécie, os padrões de ampla distribuição são também os que apresentam maior frequência nesse taxon.

2.3) H. courbaril var subsessilis

Foram analisadas 10 sementes de H. courbaril var subsessilis tomadas a partir de um lote de sementes de procedência imprecisa, não se sabendo se as sementes são de frutos de uma única árvore ou se a amostra continha sementes de origens diversas (Tabela V Material e Métodos).

Das 31 proteínas consideradas para o gênero, encontrou-se 19 bandas proteicas (Fig. 7). A Tabela 15 fornece um resumo dos padrões totais encontrados. Para a amostra de 10 sementes encontrou-se 9 padrões distintos. Como o padrão parcial C₄ corresponde ao padrão onde falta informação sobre as proteínas situadas entre as bandas 14 e 22, não se pode afirmar que o padrão 3 seja diferente do 4. Há outros padrões em que as diferenças são muito pequenas. Os padrões 1 e 2 diferem apenas na presença da proteína 20 em C₂. Os padrões 4 e 9 diferem pela presença da prot. 1 em A₂₁ e ausência da prot. 2 e vice-versa (em A₆) (Tabela 15 e Figura 1 a,b,c,d.).

O grau de similaridade, como pode ser visto no dendrograma (Fig. 8), indica também um alta variabilidade nos padrões desse grupo, o que é comparável com o observado para outros taxa.

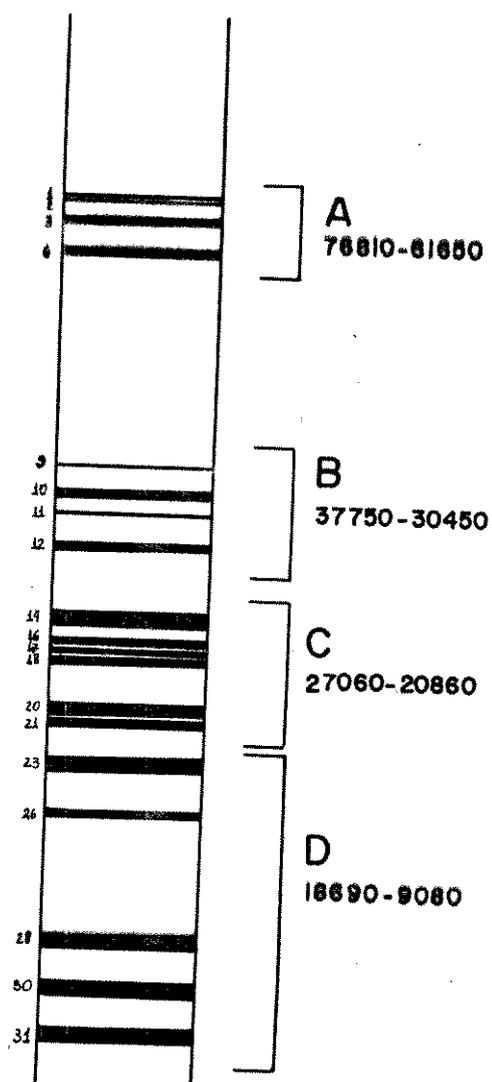


Figura 7: Diagrama de todas as proteínas encontradas em *H. courbaril* var *subsesselis*.

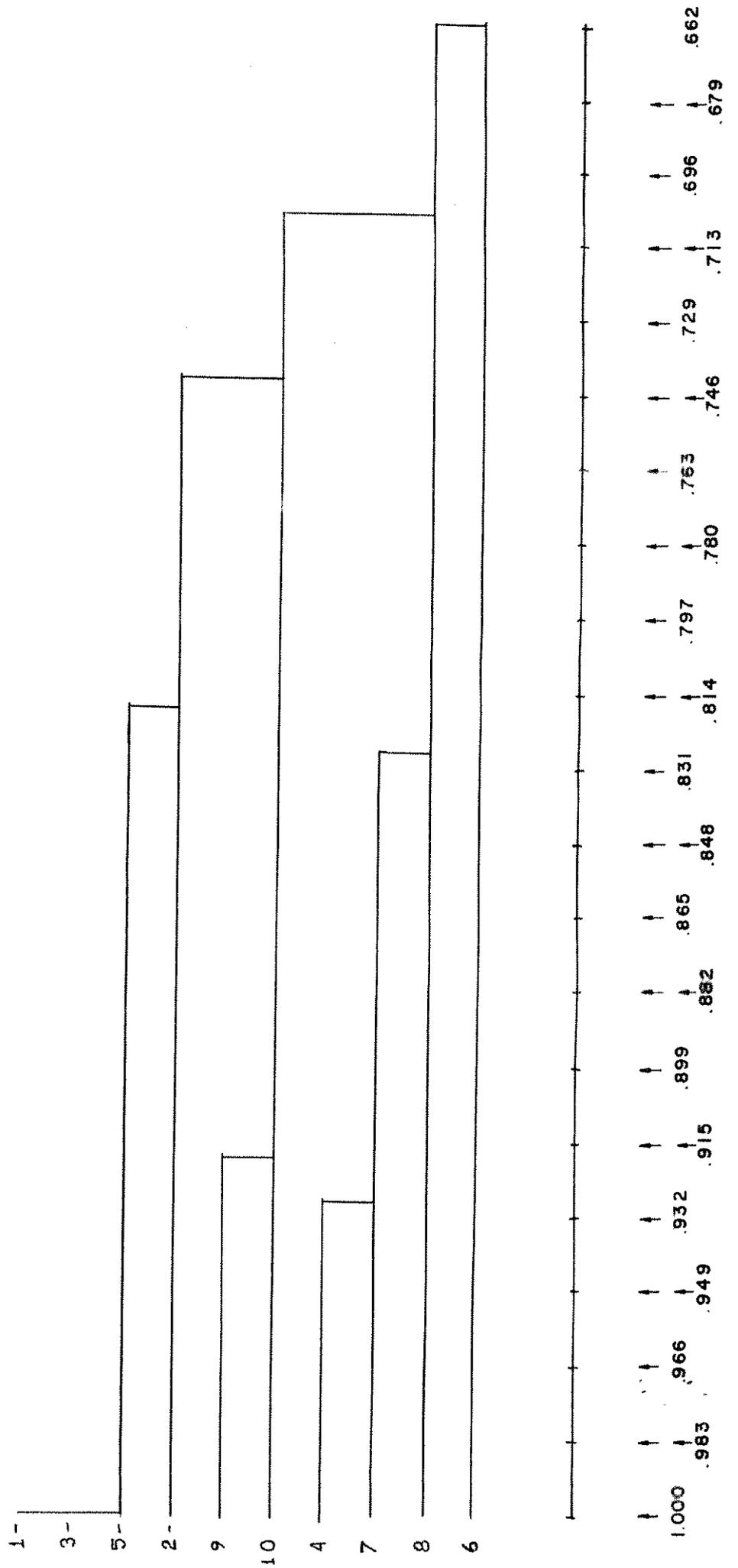
TABELA 15 - Padrões totais encontrados em H. courbaril var. subsessilis

<u>H. courbaril</u>			
var. <u>subsessilis</u>			
1)	A ₄	B ₂	C ₂ D ₄
2)	A ₄	B ₂	C ₉ D ₄
3)	A ₆	B ₂	C ₂ D ₁
4)	A ₆	B ₂	C ₄ D ₁ *
5)	A ₁₉	B ₂	C ₁₂ D ₄
6)	A ₁₉	B ₉	C ₃ D ₅
7)	A ₁₉	B ₁₂	C ₁₀ D ₄
8)	A ₁₉	B ₁₃	C ₂₀ D ₄
9)	A ₂₁	B ₂	C ₄ D ₁

(*) Padrão que ocorreu em duas sementes distintas.

- Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

Figura 8: *H. courbarilla* var *subsessilis*. Dendrograma de média não ponderada. (Coeficiente de Jaccard).



2.3) H. stigonocarpa

Foram analisadas 36 sementes de H. stigonocarpa. A tabela III do material e métodos resume os principais dados de coleta das mesmas. Essas sementes foram agrupadas em populações de acordo com as localidades de coleta.

Das 31 bandas protéicas consideradas para o gênero, foram observadas 25 bandas nessa espécie. A figura 9 mostra um esquema de todas as 25 bandas consideradas em H. stigonocarpa. A figura 1 (a), (b), (c), (d), juntamente com a tabela 16 permite que se visualize os padrões parciais que ocorreram no taxon bem como os padrões totais obtidos.

O dendrograma (figura 10) mostra não estar havendo formação de grupos não havendo nenhuma indicação de uma possível separação de sementes de mesmas populações.

Para as 36 sementes analisadas obteve-se 35 padrões distintos. Os únicos padrões iguais são relativos a sementes de duas populações diferentes: uma semente da população do Mato Grosso (Fazenda Cotia - Pop 7) e a outra semente da população de Mirador (mato Grosso - Pop 9).

Embora o número de sementes analisadas, por população, seja pequeno, a tabela 17, de frequência de ocorrência de bandas protéicas nas populações de H. stigonocarpa sugere a existência de diferenças de frequência de algumas bandas entre as populações estudadas.

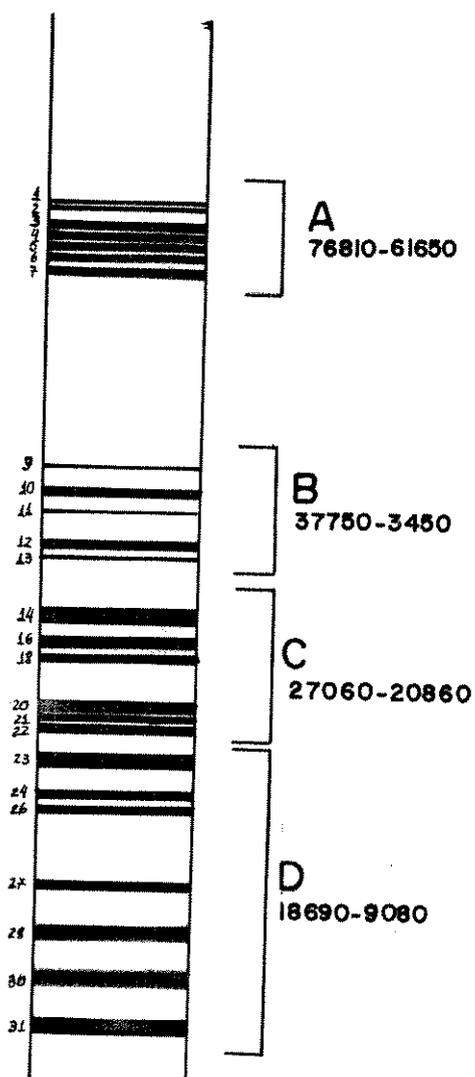


Figura 9: Diagrama de todas as proteínas encontradas em *H. stigonocarpa*.

TABELA 16 - Padrões totais que ocorreram nas sementes analisadas de H. stigonocarpa.

<u>H. stigonocarpa</u>											
A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	A ₂	B ₂	C ₃	D ₄	A ₆	B ₉	C ₃	D ₂
A ₁	B ₁	C ₁	D ₂	A ₂	B ₂	C ₅	D ₆	A ₇	B ₇	C ₇	D ₉
A ₁	B ₂	C ₂	D ₃	A ₂	B ₉	C ₉	D ₆	A ₇	B ₁₂	C ₁₀	D ₂
A ₁	B ₈	C ₁	D ₇	A ₂	B ₁₁	C ₉	D ₈				
A ₁	B ₉	C ₃	D ₁					A ₈	B ₉	C ₃	D ₃
A ₁	B ₅	C ₄	D ₇	A ₃	B ₁	C ₆	D ₁	A ₈	B ₅	C ₄	D ₃
A ₁	B ₁	C ₇	D ₄	A ₃	B ₂	C ₅	D ₅				
A ₁	B ₂	C ₁	D ₁	A ₃	B ₄	C ₄	D ₃				
A ₁	B ₇	C ₁	D ₁ *	A ₃	B ₁₀	C ₈	D ₂				
A ₁	B ₃	C ₃	D ₂	A ₁	B ₂	C ₃	D ₁	A ₄	B ₁	C ₇	D ₃
A ₁	B ₃	C ₄	D ₁	A ₄	B ₅	C ₄	D ₇				
A ₁	B ₅	C ₁₁	D ₁	A ₄	B ₅	C ₆	D ₃				
A ₁	B ₇	C ₆	D ₂	A ₄	B ₆	C ₄	D ₇				
A ₁	B ₅	C ₄	D ₁	A ₁	B ₁₃	C ₁₀	D ₁	A ₅	B ₇	C ₁	D ₁
A ₁	B ₅	C ₄	D ₁								

(*) Padrão que apareceu em duas sementes diferentes: semente 1 proveniente da população da Fazenda Cotia (MT) e semente 2 proveniente de Mirador (MA).

- Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

Figura 10: *H. stigonocarpa*. Dendrograma de média não ponderada.

Esmeraldas ● ; Paracopeba ○ ; Furnas ★
 Brasília ■ ; Ilha Solteira * ; Mato Grosso ★
 Luiz Antonio * ; Mirador ◆

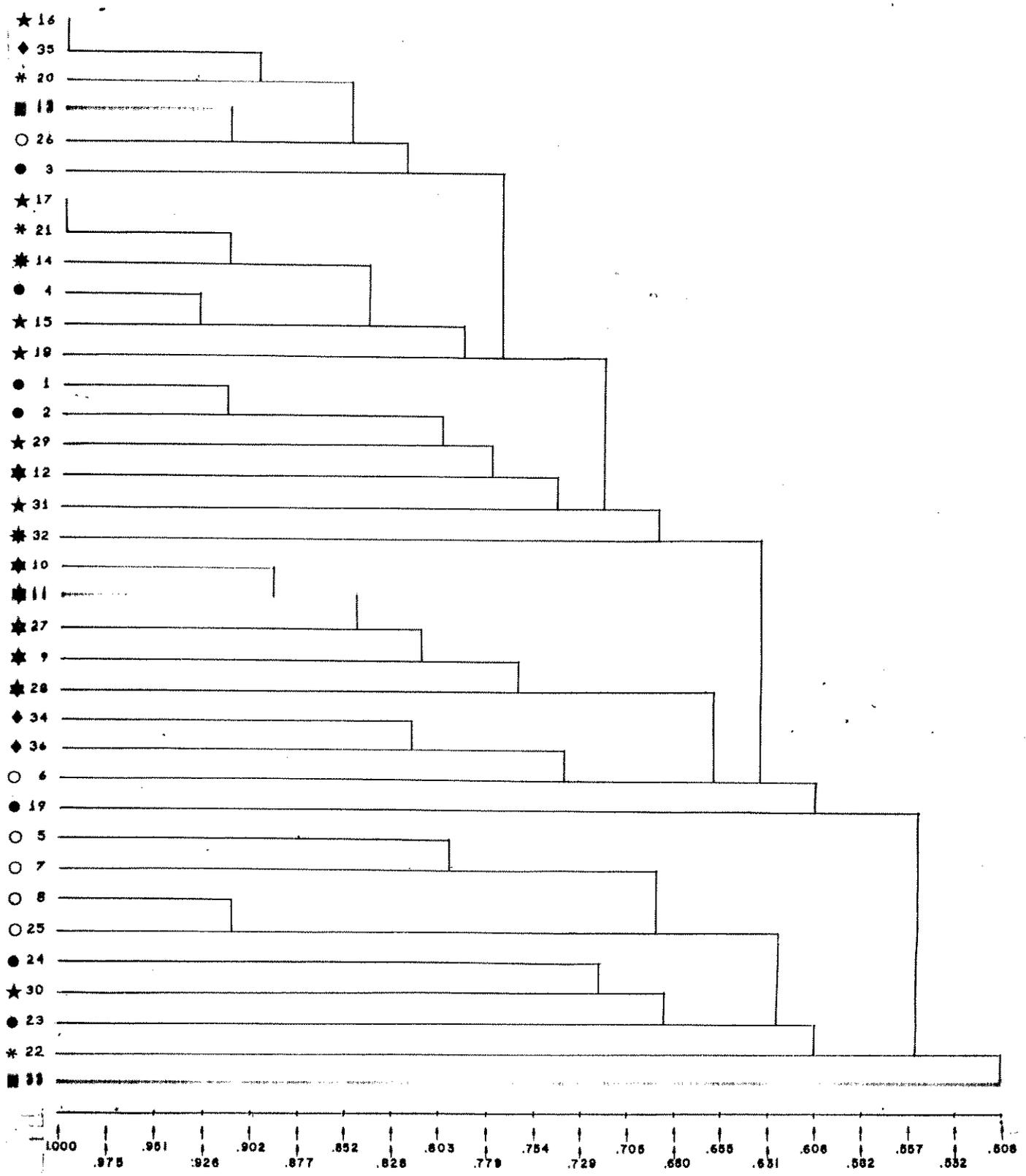


TABELA 17 - Frequência de bandas proteicas na espécie *H. stigonocarpa* em cada região de coleta.

populações: Esmeraldas= 1; Paraopeba= 2; Alpinópolis= 3; Brasília= 4; Ilha Solteira= 5; Fazenda Cotia= 6; Rosário do Oeste= 7; Luiz Antônio= 8; Mirador= 9.

POP. BANDA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BAND1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0
BAND2	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
BAND3	0,0	0,0	66,6	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	0,0
BAND4	28,5	83,3	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0
BAND5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	66,6
BAND6	85,7	50,0	100,0	50,0	100,0	100,0	75,0	66,6	100,0
BAND7	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0
BAND8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
BAND9	71,4	0,0	33,3	0,0	50,0	33,3	25,0	0,0	0,0
BAND10	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
BAND11	42,8	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	33,3	33,3
BAND12	57,1	83,3	0,0	100,0	50,0	66,6	75,0	100,0	33,3
BAND13	42,8	0,0	16,6	50,0	50,0	33,3	75,0	33,3	0,0
BAND14	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
BAND15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
BAND16	33,3	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
BAND17	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
BAND18	60,0	100,0	33,3	50,0	0,0	100,0	100,0	33,3	100,0
BAND19	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
BAND20	71,4	75,0	100,0	100,0	50,0	66,6	75,0	100,0	100,0
BAND21	100,0	75,0	0,0	0,0	100,0	50,0	66,6	66,6	0,0
BAND22	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
BAND23	57,1	50,0	0,0	50,0	0,0	33,3	25,0	33,0	0,0
BAND24	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
BAND25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
BAND26	71,4	50,0	16,6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	33,3
BAND27	14,2	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
BAND28	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
BAND29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
BAND30	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
BAND31	85,7	66,6	33,3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Nº DE SEMENTES	7	6	6	2	2	3	4	3	3

- A identificação das bandas encontra-se na Figura 2.

Se analisarmos as populações 1,2,3, e 7, onde o número de sementes foi um pouco maior podemos notar que a frequência de algumas proteínas parece variar bastante entre essas quatro populações. (Tabela 17, proteínas: 1,3,4,6,9,11,16,21,23,26,27,31).

Proteínas que apresentam baixa frequência de ocorrência na espécie e que são responsáveis pela introdução de muita variação, são: proteínas 1,3,5,22,24,27 (tabela 17).

As proteínas mais estáveis, ou seja as que apresentaram uma alta frequência e pouca variação dessa frequência em todas as populações (proteínas: 2,10,14,28,30), foram em geral, as que também apresentaram altos valores nas demais espécies (tabela 17).

Variação dos Padrões Parciais

A tabela 16 fornece todos os 35 padrões totais encontrados para a espécie.

A tabela 18, mostra os padrões totais encontrados em cada uma das populações.

As tabelas 19 e 20 fornecem, respectivamente, as frequências de ocorrência dos padrões parciais: 1) para toda a espécie;

2) dentro de localidades onde o número de sementes analisadas foi maior.

A tabela 21 mostra a presença e ausência dos padrões parciais em todas as populações estudadas.

TABELA 18 - Padrões de H. stigonocarpa encontrados em cada uma das populações consideradas no estudo.

Pop.1:Esmeraldas (MG)	Pop 2:Paraopeba (MG)	Pop 3:Alpinópolis (MG)
A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	A ₁ B ₉ C ₃ D ₁	A ₁ B ₁ C ₇ D ₄
A ₁ B ₁ C ₁ D ₂	A ₂ B ₂ C ₃ D ₄	A ₁ B ₅ C ₄ D ₇
A ₁ B ₂ C ₂ D ₃	A ₂ B ₂ C ₅ D ₆	A ₄ B ₁ C ₇ D ₃
A ₁ B ₃ C ₃ D ₂	A ₂ B ₉ C ₉ D ₆	A ₄ B ₅ C ₄ D ₇
A ₁ B ₈ C ₁ D ₇	A ₃ B ₂ C ₅ D ₅	A ₄ B ₅ C ₆ D ₃
A ₂ B ₁₁ C ₉ D ₂	A ₃ B ₄ C ₄ D ₃	A ₄ B ₆ C ₄ D ₇
A ₃ B ₁₀ C ₈ D ₂		
Pop.4:Luz Antonio (SP)	Pop.5:Brasília (DF)	Pop.6:Ilha Solteira (MA)
A ₁ B ₂ C ₁ D ₁	A ₁ B ₂ C ₃ D ₁	A ₁ B ₃ C ₄ D ₁
A ₁ B ₇ C ₁ D ₁	A ₇ B ₇ C ₇ D ₉	A ₁ B ₅ C ₁₁ D ₁
A ₆ B ₉ C ₃ D ₂		
Pop.7:Fazenda Cotia(MT)	Pop.8:Rosário do Oeste(MT)	Pop.9:Mirador(MA)
A ₁ B ₅ C ₄ D ₁	A ₁ B ₇ C ₄ D ₁	A ₁ B ₅ C ₄ D ₁
A ₁ B ₇ C ₆ D ₂	A ₃ B ₁ C ₆ D ₁	A ₈ B ₅ C ₄ D ₃
A ₁ B ₁₃ C ₁₀ D ₁	A ₅ B ₇ C ₁ D ₁	A ₈ B ₉ C ₃ D ₃
	A ₇ B ₁₂ C ₁₀ D ₂	

- Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

TABELA 19 - Frequência de ocorrência dos padrões parciais de H. stigonocarpa

Faixa A	Faixa B	Faixa C	Faixa D
A ₁ - 50,00%	B ₁ - 13,80%	C ₁ - 16,66%	D ₁ - 36,11%
A ₂ - 11,10%	B ₂ - 16,66%	C ₂ - 2,77%	D ₂ - 16,66%
A ₃ - 11,10%	B ₃ - 5,50%	C ₃ - 16,66%	D ₃ - 16,66%
A ₄ - 11,10%	B ₄ - 2,77%	C ₄ - 25,00%	D ₄ - 5,50%
A ₅ - 2,77%	B ₅ - 19,44%	C ₅ - 5,50%	D ₅ - 2,77%
A ₆ - 2,77%	B ₆ - 2,77%	C ₆ - 8,33%	D ₆ - 5,50%
A ₇ - 5,50%	B ₇ - 13,80%	C ₇ - 2,77%	D ₇ - 11,10%
A ₈ - 5,50%	B ₈ - 2,77%	C ₈ - 5,50%	D ₈ - 2,77%
	B ₉ - 11,10%	C ₉ - 5,50%	D ₉ - 2,77%
	B ₁₀ - 2,77%	C ₁₀ - 5,55%	
	B ₁₁ - 2,77%	C ₁₁ - 2,77%	
	B ₁₂ - 2,77%		
	B ₁₃ - 2,77%		

- Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

TABELA 20 - Frequência dos padrões parciais nas populações mais expressivas de H. stigonocarpa.

População 1: Esmeraldas (MG) n= 7							
A ₁ =71,4%	n= 5	B ₁ =28,6%	n= 2	C ₁ =42,9%	n= 3	D ₁ =14,6%	n= 1
A ₂ =14,3%	n= 1	B ₂ =14,6%	n= 1	C ₂ =14,6%	n= 1	D ₂ =42,9%	n= 3
A ₃ =14,3%	n= 1	B ₃ =14,6%	n= 1	C ₃ =14,6%	n= 1	D ₃ =14,6%	n= 1
		B ₈ =14,6%	n= 1	C ₈ =14,6%	n= 1	D ₇ =14,6%	n= 1
		B ₁₀ =14,6%	n= 1	C ₉ =14,6%	n= 1	D ₈ =14,6%	n= 1
		B ₁₁ =14,6%	n= 1				
População 2: Paraopeba (MG) n= 6							
A ₁ =16,7%	n= 1	B ₂ =50,0%	n= 3	C ₃ =33,3%	n= 2	D ₁ =16,7%	n= 1
A ₂ =50,0%	n= 3	B ₄ =16,7%	n= 1	C ₄ =16,7%	n= 1	D ₃ =16,7%	n= 1
A ₃ =33,3%	n= 2	B ₉ =33,3%	n= 2	C ₅ =33,3%	n= 2	D ₄ =16,7%	n= 1
				C ₉ =16,7%	n= 1	D ₅ =16,7%	n= 1
						D ₆ =33,3%	n= 2
População 3: Alpinópolis (MG) n= 6							
A ₁ =33,3%	n= 2	B ₁ =33,3%	n= 2	C ₄ =50,0%	n= 3	D ₃ =33,3%	n= 2
A ₄ =66,7%	n= 4	B ₅ =50,0%	n= 3	C ₆ =16,7%	n= 1	D ₄ =16,7%	n= 1
		B ₆ =16,7%	n= 1	C ₇ =33,3%	n= 2	D ₇ =50,0%	n= 3
População 4: Fazenda Cotia (MT) + Rosário do Oeste (MT) n= 7							
A ₁ =57,1%	n= 4	B ₁ =14,3%	n= 1	C ₁ =14,3%	n= 1	D ₁ =71,4%	n= 5
A ₃ =14,3%	n= 1	B ₅ =14,3%	n= 1	C ₄ =28,6%	n= 2	D ₂ =28,6%	n= 2
A ₅ =14,3%	n= 1	B ₇ =42,9%	n= 3	C ₆ =28,6%	n= 2		
A ₇ =14,3%	n= 1	B ₁₂ =14,3%	n= 1	C ₁₀ =28,6%	n= 2		
		B ₁₃ =14,3%	n= 1				

- Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

TABELA 21 - Ocorrência dos padrões parciais nas populações de estudo.
 populações: Esmeralda (MG)= 1; Paraopeba (MG)= 2; Alpinópolis (MG)= 3;
 Luiz Antônio (SP)= 4; Brasília (DF)= 5; Ilha Solteira (MS)= 6; Fazenda
 Cotia (MT)= 7; Rosário do Oeste (MT)= 8; Mirador (MA)= 9.

a) padrões parciais da faixa A

POPULAÇÃO PADRÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A ₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A ₂	+	+							
A ₃	+	+						+	
A ₄			+						
A ₅								+	
A ₆				+					
A ₇					+			+	
A ₈									+

b) padrões parciais da faixa B

POPULAÇÃO PADRÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
B ₁	+		+					+	
B ₂	+	+		+	+				
B ₃	+					+			
B ₄		+							
B ₅			+			+	+		+
B ₆			+						
B ₇				+	+		+	+	
B ₈	+								
B ₉		+		+					
B ₁₀	+								
B ₁₁	+								
B ₁₂								+	
B ₁₃							+		

Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na
 Figura 1.

TABELA 21 (continuação) - Ocorrência dos padrões parciais nas populações de estudo.

populações: Esmeralda (MG)= 1; Paraopeba (MG)= 2; Alpinópolis (MG)= 3; Luiz Antônio (SP)= 4; Brasília (DF)= 5; Ilha Solteira (MS)= 6; Fazenda Cotia (MT)= 7; Rosário do Oeste (MT)= 8; Mirador (MA)= 9.

c) padrões parciais da faixa C

POPULAÇÃO PADRÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C ₁	+			+				+	
C ₂	+								
C ₃	+	+		+	+				+
C ₄		+	+			+	+	+	+
C ₅		+							
C ₆			+				+	+	
C ₇			+		+				
C ₈	+								
C ₉	+	+							
C ₁₀							+	+	
C ₁₁						+			

d) padrões parciais da faixa D

POPULAÇÃO PADRÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D ₁	+	+		+	+	+	+	+	+
D ₂	+			+			+	+	
D ₃	+	+							+
D ₄		+	+						
D ₅		+							
D ₆		+							
D ₇	+		+						
D ₉					+				

- Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

Observa-se que alguns padrões parciais parecem estar mais restritos a uma ou poucas populações enquanto outros ocorrem em quase todas as localidades de estudo (tabelas 19 e 21).

O padrão A_1 (tabela 21) foi constante em todas as populações embora em algumas sua frequência seja baixa (tabelas 18 e 20).

Na faixa B não pareça haver nenhum padrão de ampla ocorrência entre as populações que predomine sobre os demais (tabela 21).

Na faixa C o padrão C_3 aparece em várias das populações amostradas, embora sua frequência dentro de cada uma delas seja baixa. O padrão C_4 não está sendo considerado.

Na faixa D o padrão D_1 tem uma distribuição mais ampla embora a frequência dentro das populações possa ser baixa (tabelas 21, 18 e 20).

Tanto os padrões de distribuição mais ampla entre as populações como os de distribuição restrita, podem apresentar:

- 1) frequência mais alta dentro de uma população ou em algumas.
- 2) frequência baixa na população (ou nas populações onde ocorre) (tabelas 18, 20).

2.4) H. intermedia

As sementes dessa espécie que foram analisadas eram provenientes de 2 regiões distintas: Carajás (PA) e Manaus (AM). A Tabela II do Material e Métodos fornece um resumo sobre os dados de coleta dessas sementes. Pode-se verificar que as sementes de Manaus são provenientes de quatro "árvores-mães" distintas, situadas em localidades diferentes nos arredores de Manaus, enquanto as sementes de Carajás são todas de frutos de um único indivíduo adulto.

Das 31 bandas protéicas consideradas para o gênero Hynenaea, foram verificadas 22 proteínas nesse taxon. A Figura 11 fornece um diagrama de todas as bandas consideradas em H. intermedia, indicando as faixas dentro das quais ocorrem as principais variações. A Figura 1 (a), (b), (c), (d), fornece os diagramas dos padrões parciais encontrados no gênero e com auxílio da tabela 22, é possível se visualizar os padrões totais para esse taxon.

O dendrograma (Fig.12) mostra que, apesar das sementes provenientes da região de Carajás serem todas de um único indivíduo, ocorre uma grande variabilidade de padrões entre as amostras analisadas. Além disso não parece haver diferenças suficientes, entre os padrões das sementes de Carajás e Manaus, que justifique uma distinção nítida entre os padrões das duas regiões. Apesar disso, ao observar-se a Tabela 23 de frequência de ocorrência de proteínas para sementes de cada região, verificaremos que algumas proteínas ausentes em umas das regiões, apresentam frequência alta na outra. Esse é o caso para as proteínas 5, 9 e 13 presentes

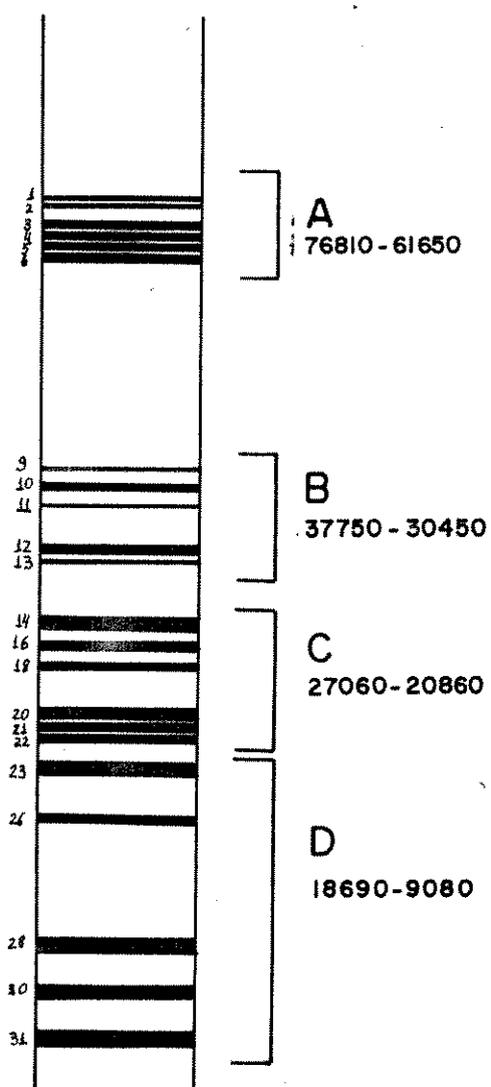


Figura 11: Diagrama de todas as proteínas de *H. inter-*
media.

TABELA 22 - Padrões totais de H. intermedia por população considerada.

Carajás					Manaus				
1)	A ₁	B ₂	C' ₄	D ₂	1)	A ₃	B ₂	C' ₄	D ₁
2)	A ₁	B ₂	C ₆	D ₂	2)	A ₄	B ₂	C' ₄	D ₃
3)	A ₁	B ₂	C ₆	D ₅ *	3)	A ₄	B ₁₃	C ₉	D ₃
4)	A ₁	B ₂	C ₆	D ₁₉	4)	A ₆	B ₇	C' ₄	D ₁
5)	A ₂	B ₂	C' ₄	D ₂	5)	A ₆	B ₈	C ₅	D ₃
6)	A ₂	B ₂	C ₂₄	D ₁	6)	A ₆	B ₁₃	C ₅	D ₃
7)	A ₃	B ₂	C' ₄	D ₂	7)	A ₉	B ₃	C' ₄	D ₃
8)	A ₆	B ₂	C ₆	D ₂	8)	A ₉	B ₁₃	C' ₄	D ₁
9)	A ₂₃	B ₉	C ₆	D ₅					

(*) Padrão que ocorreu em duas sementes distintas.

- Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

Figura 12: H. armada. Dendrograma de Média não Pon-
 derada. (Coeficiente de eccard).

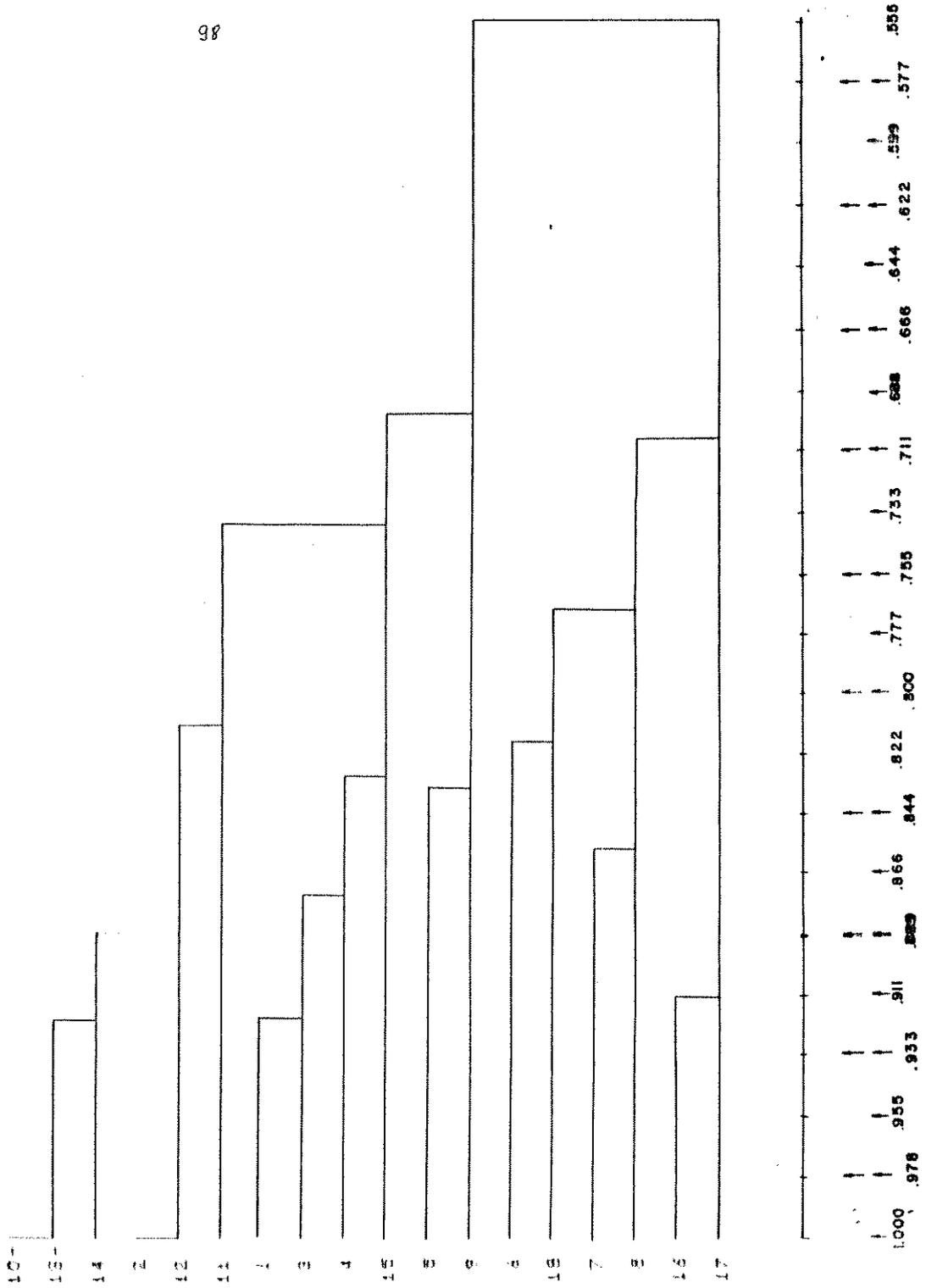


TABELA 23 - Frequência de ocorrência das proteínas de H. intermedia nas duas populações amostradas.
população: Carajás= 1; Manaus= 2.

POPULAÇÃO BANDA	1	2	
1	100,0	0,0	
2	100,0	100,0	
3	10,0	87,5	
4	30,0	12,5	
5	0,0	25,0	
6	70,0	62,5	
7	0,0	0,0	
8	0,0	0,0	
9	0,0	62,5	
10	100,0	100,0	
11	10,0	12,5	
12	100,0	100,0	
13	100,0	100,0	
14	0,0	0,0	
15	0,0	0,0	*
16	100,0	0,0	*
17	0,0	0,0	*
18	100,0	33,3	*
19	0,0	0,0	*
20	90,0	62,5	
21	14,2	100,0	*
22	14,2	0,0	*
23	20,0	0,0	
24	0,0	0,0	
25	0,0	0,0	
26	100,0	42,5	
27	0,0	0,0	
28	100,0	100,0	
29	0,0	0,0	
30	90,0	100,0	
31	60,0	100,0	
Nº DE SEMENTES	10	8	

- A identificação das bandas encontra-se na Figura 2.

(ainda que em baixa frequência) nos padrões de Manaus e ausentes nos de Carajás. Proteínas nos 1, 16, 22, 23 presentes nas sementes provenientes de Carajás e ausentes nas de Manaus.

Há ainda outras proteínas que sugerem diferenças entre as sementes de cada região, apresentando valores de frequência discrepantes para as duas regiões em questão. As proteínas n^{os} 3 e 21 apresentam valores altos de frequência na população de Manaus, e bem mais baixos na de Carajás. O inverso ocorre com as proteínas n^{os} 18 e 26.

Variação dos padrões parciais

A Tabela 22 fornece os padrões totais encontrados em cada uma das populações estudadas. Das 18 sementes analisadas foram observados 17 padrões diferentes. No entanto, devido à falta de informações sobre algumas proteínas da faixa C (entre as prot. n^o 14 e 22) - padrão C'₄, não se pode afirmar com segurança se o número de padrões iguais aumentaria ou se as diferenças entre os padrões aumentariam.

Dessa forma, admitindo-se que C'₄ pudesse ser igual a outros padrões parciais da faixa C, poderíamos ter:

Padrões 1 e 2 (população de Carajás - Tabela 22) poderiam ser iguais no caso de C'₄ ser igual a C₆.

Por outro lado, considerando-se ainda C'₄ como podendo ser algum dos outros padrões da faixa C, e observando-se que por vezes a diferença entre dois padrões totais se deve apenas a presença de uma proteína a mais em um dos padrões parciais em uma

das sementes, teremos:

Padrões 5 e 6 (população de Carajás - Tab. 22) diferem na presença da prot. nº 23 em D₂ (considera-se C'₄ = C₂₄).

O mesmo pode ser observado entre os padrões 7 (Carajás) e 1 (Manaus). A diferença entre os dois é a presença da prot. 23 em D₂ (para C'₄ sendo igual para as duas sementes).

A diferença entre os padrões 5 e 6 (Manaus) é a presença da prot. 11 em B₈.

Os padrões 5 e 7 (Carajás), considerando-se C'₄ igual para os dois, só diferem na presença da prot. 6 em A₃.

Os padrões 2 e 3 (Carajás) diferem na presença da prot. 31 em D₂.

A Tabela 24 de ocorrência de padrões parciais nas duas populações sugere que talvez haja diferenças na ocorrência de padrões parciais entre as duas localidades. Assim os padrões que ocorrem numa das populações parecem que na sua maioria, não estão ocorrendo na outra. A exceção dos padrões A₃, A₆, B₂ e D₁ (padrão C'₄ não está sendo levado em conta) os demais foram exclusivos de apenas uma das populações.

Por outro lado, os dados sugerem que o grau de variação obtida para cada faixa varia de uma população para outra e entre as faixas.

Assim, para a população de Carajás, a faixa B, parece estar admitindo muito menor variação que as demais faixas.

Na população de Manaus a faixa menos variável foi a D.

Comparando-se as duas populações observa-se que a população de Manaus apresenta um número muito maior de padrões para a faixa

TABELA 24 - Ocorrência dos padrões parciais de H. intermedia nas duas populações estudadas.
População: Carajás= 1; Manaus= 2.

a) padrões parciais da faixa A

POPULAÇÃO PADRÃO	1	2
1	+	
2	+	
3	+	+
4		+
6	+	+
9		+
23	+	

b) padrões parciais da faixa B

POPULAÇÃO PADRÃO	1	2
2	+	+
3		+
7		+
8		+
9	+	
13		+

c) padrões parciais da faixa C

POPULAÇÃO PADRÃO	1	2
C'4	+	+
5		+
6	+	
9		+
24	+	

d) padrões parciais da faixa D

POPULAÇÃO PADRÃO	1	2
1	+	+
2	+	
3		+
5	+	
19	+	

Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

B do que a população de Carajás. No entanto, as sementes provenientes de Carajás apresentam um número maior de padrões para a faixa D do que as de Manaus.

2.5) H. martiana

Foram analisadas 10 sementes de H. martiana, todas provenientes de um única árvore-mãe (Tabela V do Material e Métodos).

Das 31 proteínas consideradas dentro do gênero, foram observadas 20 bandas protéicas representadas na Figura 13. A Figura 1 (a,b,c,d), fornece os padrões parciais e juntamente com a tabela 25 pode-se verificar quais ocorreram nesse taxon. A Tabela 25 fornece um resumo dos padrões totais encontrados. Para a amostra de 10 sementes foram observados 10 padrões diferentes, embora, como não haja informação para as proteínas entre prot. 14 e 22 (padrão C'4), não se pode afirmar que os padrões 3 e 4 não pudessem ser mais similares.

O grau de similaridade entre os padrões obtidos pode ser observado no dendrograma (Fig. 14). Como pode-se observar, embora pertencentes a uma só árvore-mãe, a variabilidade detectada nas sementes de H. martiana é muito alta, comparável ao que se observa em outras espécies onde foram comparadas sementes de indivíduos-mãe diferentes.

A Tabela 25 de padrões totais e a Figura 1 a,b,c,d, dos padrões parciais permite notar que diferenças de padrões entre as sementes amostradas, para essa espécie, são sempre maiores do que a simples presença ou não de uma única banda protéica em um dos padrões. Como pode-se observar, as diferenças são ao nível de pelo menos dois padrões parciais distintos.

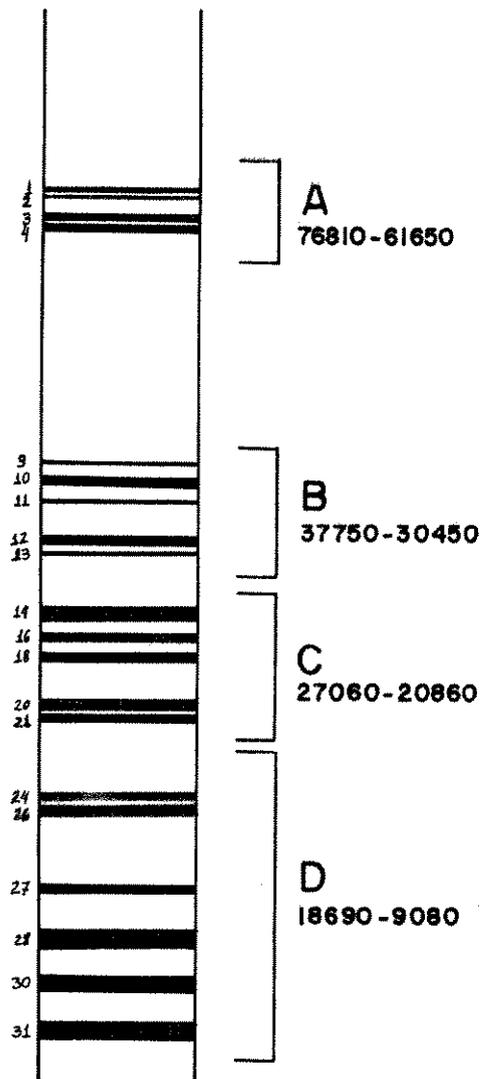


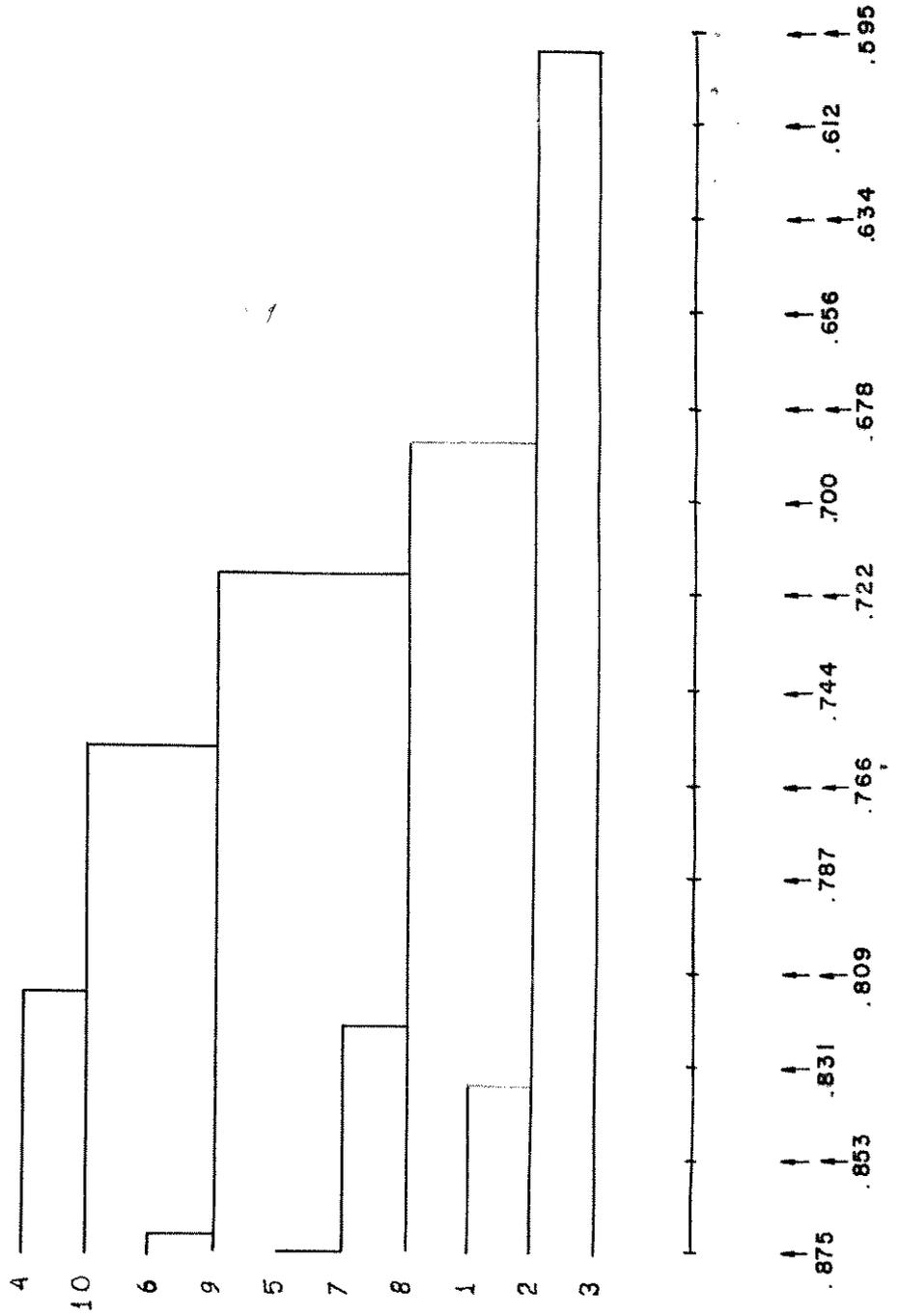
Figura 13: Diagrama de todas as proteínas de *H. mar-*
tiana.

TABELA 25 - Padrões totais encontrados nas sementes analisadas de H. martiniana.

<u>H. martiniana</u>			
A ₂	B ₃	C ₁₂	D ₁
A ₂	B ₁₃	C ₁₀	D ₁
A ₁₆	B ₂	C ₄	D ₁
A ₁₆	B ₉	C ₉	D ₁
A ₁₇	B ₂	C ₁₀	D ₁
A ₂₂	B ₃	C ₃	D ₁₇
A ₂₂	B ₅	C ₄	D ₁₆
A ₂₂	B ₇	C ₁₀	D ₁
A ₂₂	B ₁₃	C ₆	D ₁₇
A ₂₂	B ₁₃	C ₁₂	D ₁

Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

Figura 14: H. martiana. Dendrograma de Média não Ponderada. (Coeficiente de Jaccard).



2.6) H. courbaril var altissima, H. aurea, H. oblongifolia,
H. parvifolia

Os demais taxa serão tratados juntos, devido ao pequeno número de sementes analisados em cada um deles. A Tabela V (Material e Métodos) resume os principais dados de coleta.

Dentro de cada taxon não houve sementes que apresentassem mesmo padrão protéico. Por outro lado, os padrões que mais se aproximam pertencem a sementes de espécies distintas (Fig. 1 a,b, c,d; tabela 26 e figura 15).

Pode-se, portanto, verificar que, o padrão 1 de H. courbaril var altissima difere do padrão 2 de H. aurea devido à presença da proteína no 11 em B₉.

O padrão 3 de H. aurea e 2 de H. oblongifolia diferem entre si devido à presença da proteína n^o 18 em C₉.

O padrão 3 de H. parvifolia difere do padrão 2 de H. oblongifolia devido à presença das proteínas 30 e 31 em D₁.

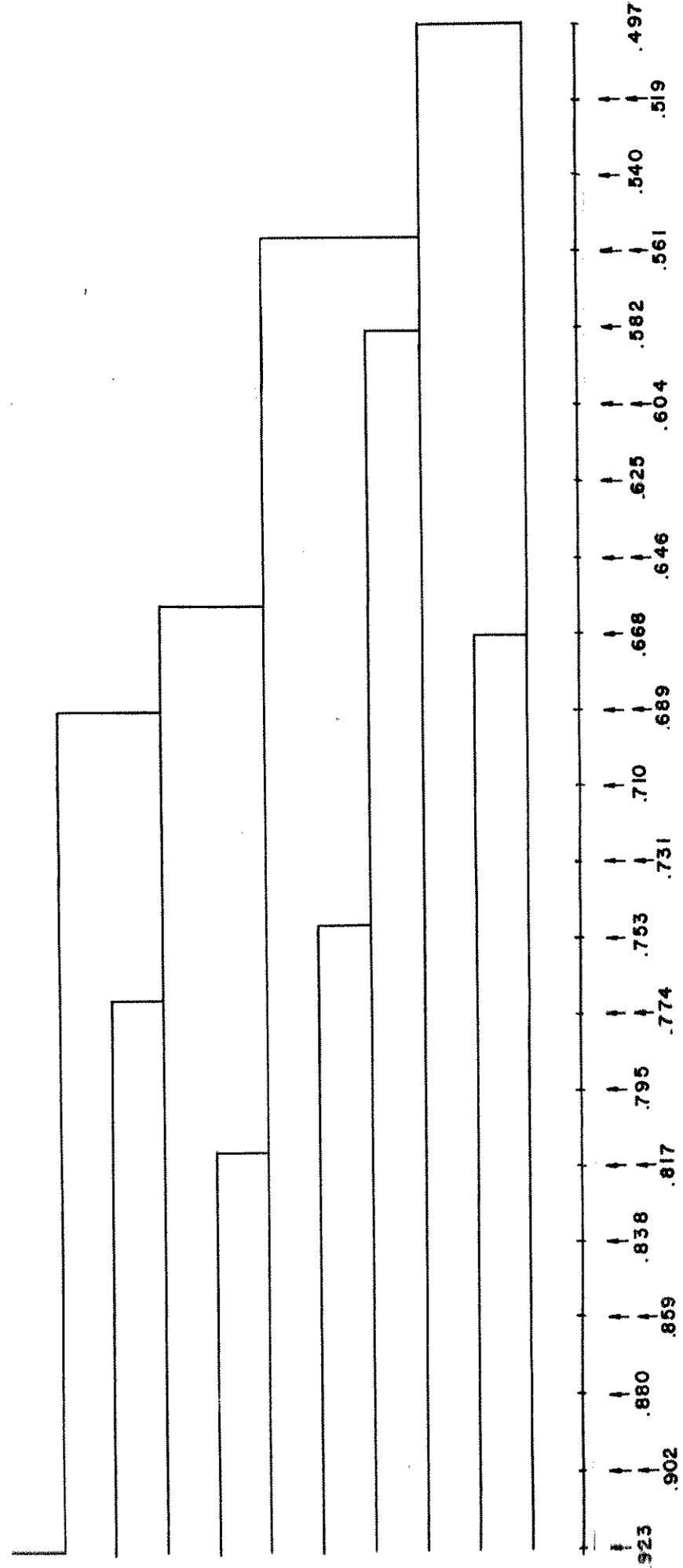
Através do dendrograma (Fig. 15) pode-se mais uma vez verificar que não ocorre nenhuma tendência de agrupamento natural dos padrões.

TABELA 26 - Padrões totais das espécies H. courbaril var. altissima, H. aurea, H. parvifolia, H. oblongifolia.

<u>H. courbaril</u> var. <u>altissima</u>	<u>H. aurea</u>	<u>H. parvifolia</u>	<u>H. oblongifolia</u>
A ₆ B ₃ C ₁₂ D ₁	A ₂ B ₅ C ₁ D ₁	A ₆ B ₂ C ₉ D ₁₈	A ₆ B ₂ C ₉ D ₁
A ₂ B ₂ C ₁₀ D ₁	A ₂ B ₉ C ₁₀ D ₁	A ₆ B ₂ C ₂₁ D ₁₇	A ₆ B ₃ C ₂₁ D ₁
	A ₆ B ₂ C ₄ D ₁	A ₆ B ₂ C ₂₃ D ₁₆	
	A ₆ B ₁₂ C ₂₂ D ₁		

Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

Figura 15: Sementes individuais de *H. courbaril* var *altissima* (○); *H. aurea* (★); *H. parvifolia* (▲) e *H. oblongifolia*. Dendrograma de média não ponderada. (Coeficiente de Jaccard).



3) Comparação das espécies

Foram analisadas ao todo 185 sementes, juntando-se todos os taxa investigados. O tamanho amostral de cada taxon, foi bastante variado.

O número total de bandas estudadas foi 31 (Figura 2). A tabela 27 fornece a frequência de ocorrência de cada proteína para cada taxon, bem como o número de sementes que foi utilizado em cada amostra. É possível verificar que a frequência das bandas pode variar muito de um taxon para outro e esta discrepância dos valores foi muito importante nas análises numéricas efetuadas.

As espécies H. courbaril var altissima, H. parvifolia, H. aurea e H. oblongifolia, não foram levadas em consideração para análises do tipo PCA (Análise de Componentes Principais) e dendrogramas construídos através de distâncias euclidianas, devido ao baixo número de sementes obtido para cada uma destas espécies. No entanto os dados sobre elas ajudam na compreensão do que deve estar ocorrendo para o gênero.

Se verificarmos a frequência de ocorrência de bandas protéicas para o gênero (Tabela 27), poderemos notar que algumas proteínas apresentam alta frequência em quase todos os taxa, ocorrendo até nas amostras menos representativas, parecendo se tratar de proteínas bastante estáveis para o gênero. Observe na tabela 27 as frequências das proteínas: 2, 10, 14, 28 e 30. Algumas das frequências apresentam valores bem mais baixos em uns dos taxa do que em outros, mas estes valores baixos estão ocorrendo em taxa onde o número de sementes analisadas foi muito baixo e por-

TABELA 27 - Frequência de ocorrência de bandas protéicas dentro dos taxa de *Hymenaea* estudados.

P M= peso molecular

"número de sementes" - corresponde ao número de sementes analisadas para cada espécie.

espécie 1= *H. courbaril* var. *courbaril*; espécie 2= *H. courbaril* var. *subsessilis*; espécie 3= *H. courbaril* var. *altissima*; espécie 4= *H. courbaril* var. *stilbocarpa*; espécie 5= *H. stigonocarpa*; espécie 6= *H. martiniana*; espécie 7= *H. intermedia*.

ESP. BANDA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	PM
1	0,0	50,0	0,0	26,5	2,7	60,0	5,5	0,0	0,0	0,0	76810
2	86,1	90,0	100,0	96,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	76628
3	36,1	100,0	50,0	93,7	13,8	30,0	44,4	100,0	50,0	100,0	72384
4	44,4	0,0	50,0	26,5	25,0	100,0	22,2	0,0	50,0	0,0	71338
5	2,7	0,0	0,0	0,0	5,5	0,0	11,1	0,0	0,0	0,0	68400
6	47,2	20,0	0,0	15,6	80,5	0,0	66,6	0,0	0,0	0,0	67527
7	13,8	0,0	0,0	0,0	5,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	66450
8	5,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	61650
9	27,7	20,0	50,0	6,2	27,7	50,0	27,7	0,0	0,0	50,0	37754
10	94,4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	35310
11	27,7	10,0	0,0	4,6	25,0	10,0	11,1	0,0	50,0	0,0	34510
12	94,4	100,0	100,0	93,7	58,3	90,0	100,0	100,0	75,0	100,0	31937
13	33,3	0,0	50,0	10,9	30,5	30,0	11,1	0,0	25,0	50,0	30452
14	100,0	100,0	100,0	96,8	100,0	100,0	100,0	66,6	100,0	50,0	27062
15	0,0	0,0	0,0	10,5	0,0	0,0	0,0	66,6	0,0	50,0	27400
16	41,9	42,8	100,0	63,1	55,5	75,0	70,0	33,3	25,0	50,0	25597
17	0,0	14,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	26100
18	80,6	100,0	100,0	63,1	63,6	100,0	80,0	66,6	50,0	100,0	24272
19	19,3	0,0	0,0	5,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	23666
20	72,2	70,0	50,0	81,2	82,3	60,0	77,7	33,3	50,0	0,0	21573
21	43,7	85,7	100,0	66,6	62,5	62,5	40,0	66,6	50,0	100,0	21394
22	6,4	0,0	0,0	5,2	5,5	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	20860
23	19,8	10,0	0,0	7,8	30,5	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	18691
24	5,5	0,0	0,0	0,0	2,7	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	17200
25	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	17600
26	77,7	100,0	100,0	95,3	66,6	90,0	72,2	100,0	100,0	100,0	16489
27	2,7	0,0	0,0	0,0	5,5	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12375
28	97,2	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0	11783
29	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12442
30	97,2	100,0	100,0	98,4	100,0	100,0	94,4	33,3	100,0	100,0	10510
31	47,2	40,0	100,0	89,0	80,5	100,0	77,7	66,6	100,0	100,0	9080
Nº DE SEMENTES	36	10	2	64	36	10	18	3	4	2	

- A identificação das bandas encontra-se na Figura 2.

tanto a não ocorrência de dada proteína em um dos padrões já fornece uma alteração muito grande.

Por outro lado existem proteínas que, aparentemente, apresentam baixa frequência dentro de cada uma das espécies, mas que se acham representadas em quase todas as taxa considerados. Neste caso, novamente as amostras com poucas sementes não estão sendo levadas muito em consideração e serão melhor discutidas mais adiante. Veja a frequência das proteínas 9,11,13. A proteína 13 não ocorre em H. courbaril var subsessilis e isso pode estar relacionado ao fato das sementes analisadas desta espécie serem todas de uma única localidade. Neste caso estaríamos diante de um caso similar ao que ocorre em H. intermedia com relação à frequência da proteína 23 nas duas populações amostradas.

A proteína 9 apresenta baixa frequência em todas as taxa exceto em H. martiana. Esta alta frequência nesta espécie pode se dever ao fato das sementes analisadas serem provenientes de um único "indivíduo-mãe". Não se está considerando a frequência obtida em H. courbaril var altissima devido à pequena amostragem; da mesma forma com relação à proteína 11 não se está levando em consideração sua não ocorrência nas espécies H. courbaril var altissima e H. parvifolia e H. oblongifolia ou sua frequência alta em H. aurea.

Há proteínas que parecem ser exclusivas de um ou apenas poucos taxa, muito embora a frequência das mesmas seja baixa, indicando se tratarem de proteínas raras, tanto dentro dos taxa onde ocorrem como para o grupo todo. Este é o caso das proteínas 5, 7, 8, 15, 17, 22, 23, 24, 25, 27 e 29.

Outras proteínas apresentam grandes diferenças na frequência de ocorrência em cada taxon, o que parece indicar que estas proteínas são mais raras em alguns dos taxa do que em outros: sua distribuição sendo muito variável dentro do grupo com um todo. Isso é o que ocorre com as proteínas:

Prot. 3 - apresenta alta frequência somente em H. courbaril var stilbocarpa e H. courbaril var subsessilis;

Prot. 4 - apresenta 100% de frequência em H. martiana. O que pode estar relacionado ao fato das sementes de H. martiana serem provenientes de um único indivíduo adulto;

Prot. 6 - ocorre em alta frequência em H. stignocarpa;

Prot. 16 - apresenta maior frequência H. martiana, H. intermedia e H. courbaril var stilbocarpa.

Outras proteínas apresentam comportamento inverso. Mantem-se com alta frequência na maioria dos taxa e em alguns deles ocorre uma queda na frequência de ocorrência da proteína. Isso ocorre para as proteínas:

Prot. 12 - apresenta uma frequência mais baixa em H. stignocarpa

Prot. 21 - apresenta uma frequência relativamente alta em todos os taxa exceto em H. courbaril var courbaril e H. courbaril var subsessilis

Dendrogramas

Para se estudar a relação entre os taxa analisados, foram feitos dendrogramas.

A Fig.16 fornece um dendrograma do tipo média não ponderada, construído a partir de uma matriz de presença ou ausência de bandas protéicas e utilizando o coeficiente de Jaccard.

Cada uma das "unidades taxonômicas operacionais" (OTUS) observadas representa uma semente que tenha sido analisada. Uma análise deste dendrograma permite notar que não está havendo formação de grupos naturais. Pode-se observar que está ocorrendo é o agrupamento de padrões semelhantes, independentemente ao taxa que as sementes, às quais se referem os padrões, pertençam. Estes padrões semelhantes se acham distribuídos nos mais diferentes taxa. Em nenhum momento ocorre a formação de um grupo que possa ser explicado como constituindo uma espécie ou variedade dentro de uma espécie. Não ocorre também nenhum tipo de agrupamento que possa ser explicado através de distribuição geográfica dos indivíduos (sementes) analisados. Em alguns momentos, aparentemente, ocorre um agrupamento de um só taxa, mas, se observarmos melhor veremos que:

- 1) frequentemente estes agrupamentos se acham interrompidos por um ou mais padrões de sementes de um outro taxon.
- 2) A similaridade entre os padrões de um mesmo taxon é muito variável e por vezes menos do que a similaridade apresentada entre um padrão de um dado taxon com o padrão de um outro taxon.

Além disso o dendrograma também não mostra que esteja havendo qualquer tipo de tendência de agrupamento entre as categorias infraespecíficas de H. courbaril (variedades: courbaril, subsessilis, stilbocarpa e altissima).

As figuras 17 e 18 mostram fotografias de geis apresentando o tipo de variação comumente observada dentro de uma espécie e entre as espécies.

Os outros dendrogramas apresentados, Fig 19 e 20 usam distâncias Euclidianas simples, obtidas através de uma matriz de frequência de ocorrência de cada proteína para cada taxa (tabela 27).

As frequências utilizadas para a construção do dendrograma (figura 19), foi normalizada, isto é, os dados apresentam uma média zero e desvio padrão = 1. Nos dados normalizados é dado maior peso às proteínas mais estáveis.

Já o dendrograma expresso na figura 20 foi obtido a partir de dados não normalizados. Neste caso, proteínas que apresentam grande variação têm um peso muito grande.

As diferenças observadas na ordenação oferecida nos dendrogramas com as frequências normalizadas e não normalizadas se deve ao fato de no primeiro caso atribuir-se maior peso às proteínas que apresentam pouca variação de frequência entre os taxa. No segundo caso o peso maior é dado àquelas proteínas altamente variáveis entre os taxa. Assim sendo, dendrograma (figura 20) de dados não normalizados, H. intermedia aparece ligada à H. courbaril var courbaril, enquanto que quando os dados são normalizados (fig.19), H. intermedia liga-se primeiro à H. martiana. Da mesma

Figura 17: Fotografia de um gel de H. courbaril var courbaril mostrando variação em padrões protéicos.

1= extrato com proteínas padrão

2,3= Alajuela (Costa Rica)

4= Pandu (Bolívia)

5= Venezuela

6= Santarém (AM, Br)

7,8= Guanacaste (Costa Rica)

9= Provincia del Osa (Costa Rica)

10= Francisco Morazán (Honduras)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

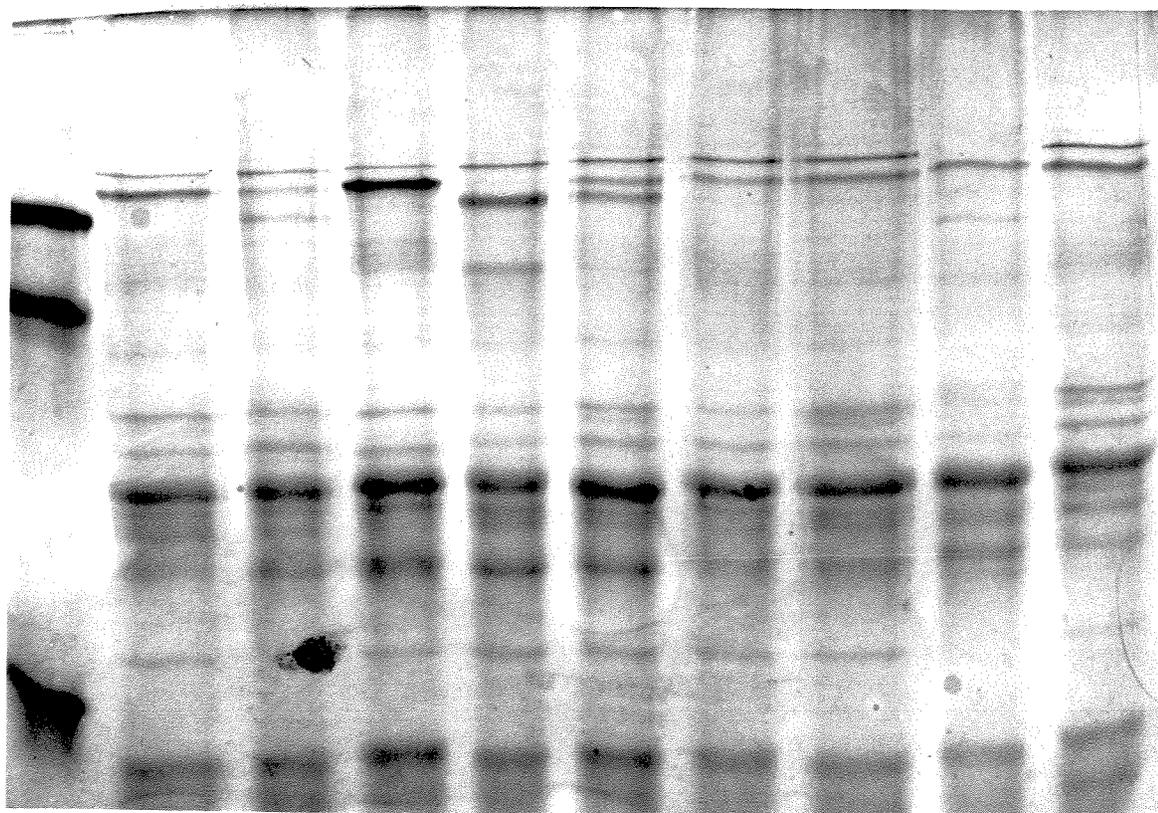


Figura 18: Fotografia com extratos de várias espécies de *Hymenaea*.

- 1,4= *H. courbaril* var *altissima*
2,5,6,9= *H. courbaril* var *courbaril*
3,7= *H. oblongifolia*
8= *H. martiana*

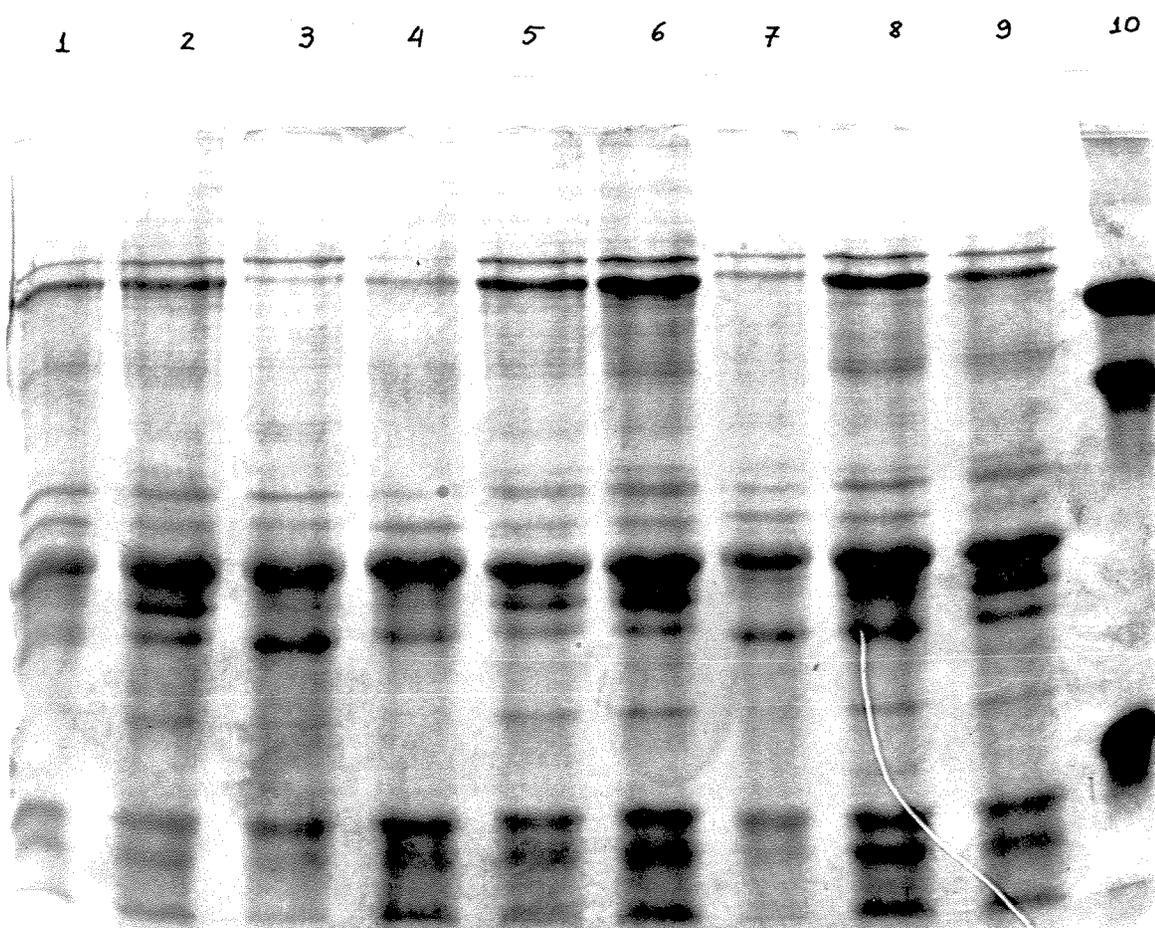


Figura 19: Espécies de Hymenozoa que contribuíram para o estudo. Tipo de coeficiente: Distâncias Euclidianas Simples. (frequências normalizadas). Dendrograma de Média não ponderada.

1= *H. courbaril* var *courbaril* 2= *H. courbaril* var *sub-sessilis* 3= *H. courbaril* var *stibocarpa* 4 = *H. stibocarpa*
 5= *H. martiana* 6= *H. intermedia*

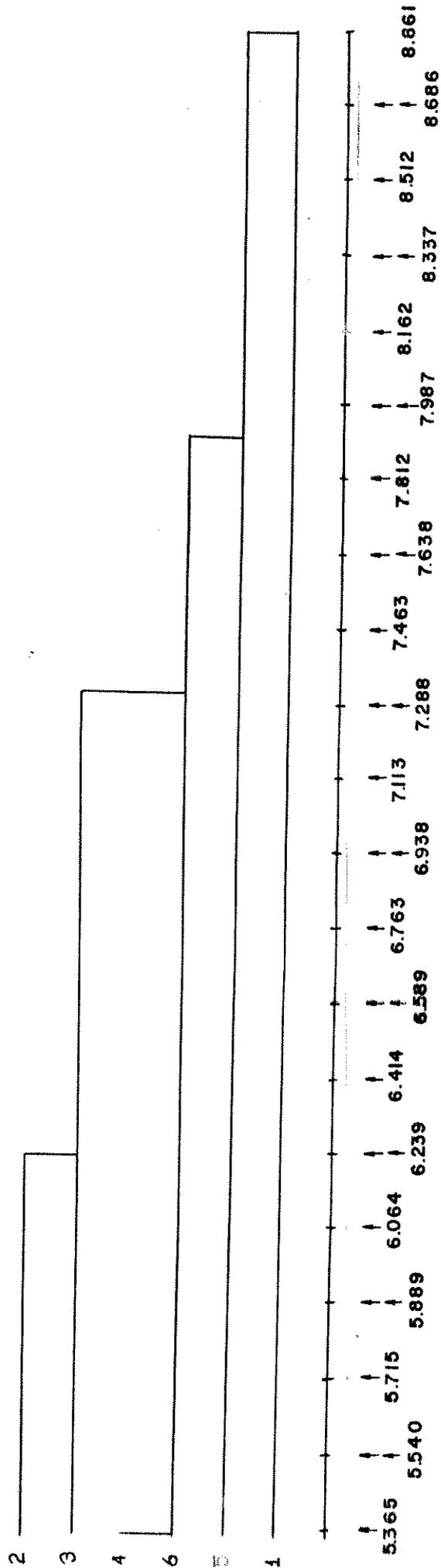
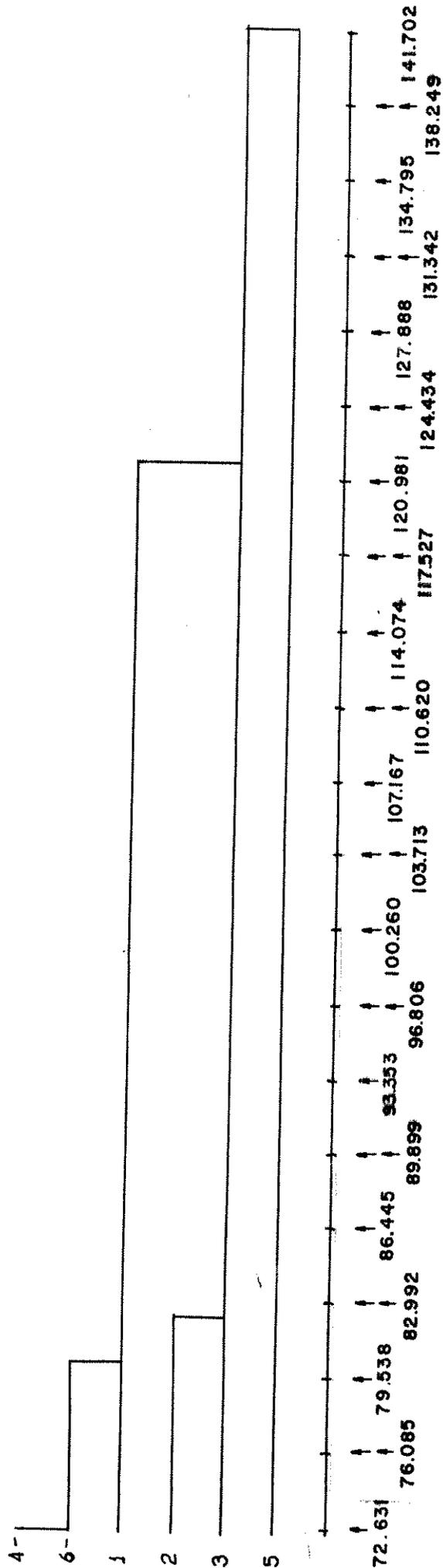


Figura 20: Espécies de *Hynenaea* que mais contribuíram para o estudo. Tipo de coeficiente: distâncias Euclidianas Sim- Ponderada. (Frequências não normalizadas). Dendrograma de Média não

1= *H. courbaril* var *courbaril* 2= *H. courbaril* var *sub- sessilis* 3= *H. courbaril* var *stilhocarpa* 4= *H. stilhocarpa*
 5= *H. martiana* 6= *H. intermedia*



forma para os dados não normalizados, H. martiana liga-se a H. courbaril var stilbocarpa, enquanto que com os dados normalizados H. courbaril var stilbocarpa liga-se à H. intermedia e H. martiana à H. courbaril var courbaril.

Os taxa que aparecem ligados no caso de dados não normalizados também apresentam valores similares para proteínas cuja frequência varia muito entre os taxa. Observe a Tabela 27 o que está ocorrendo com as frequências de proteínas nas espécies H. courbaril var courbaril e H. intermedia, para as proteínas 3, 4, 5, 9, 18, 20, 21, 22 e 26.

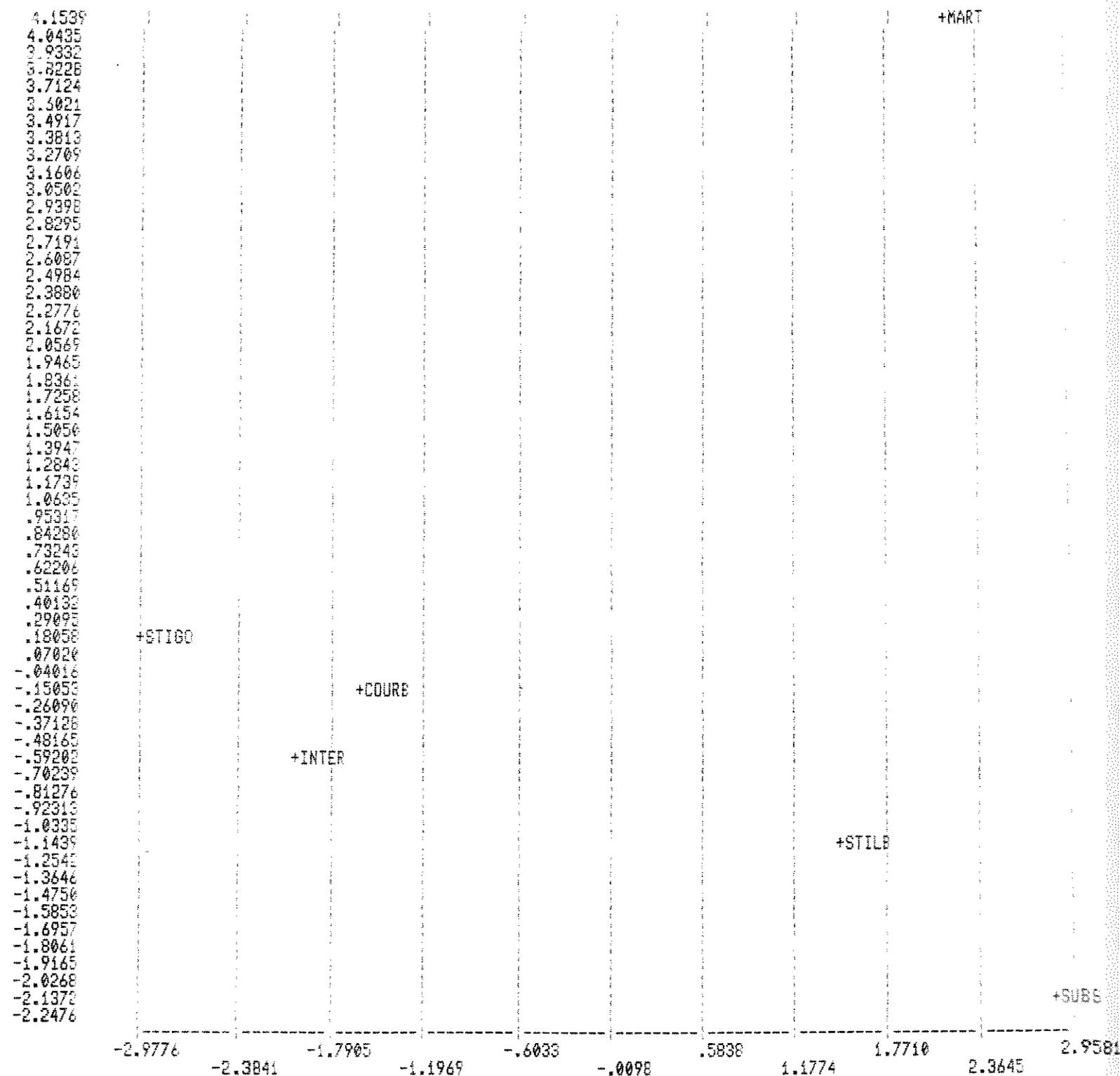
PCA - Análise de Componentes Principais

Foi feita também uma Análise de Componentes Principais (PCA) que fornece a distribuição dos pontos (proteínas) para todos os taxa em um espaço multi-dimensional. Através da distribuição desses pontos, é possível se compreender quais são os conjuntos de dados que melhor explicam os agrupamentos obtidos nos dendrogramas.

Na PCA (figura 21 a,b) de covariância, não é atribuído peso igual a todas as proteínas. A separação dos taxa é explicada através das proteínas que variam mais (que apresentam maior variância).

O gráfico da PCA (fig. 21 b) dos autovetores correspondentes mostra a distribuição no mesmo plano (correspondente ao diagrama acima citado) das proteínas estudadas. Portanto, quando se realiza uma PCA, para cada diagrama de distribuição das espécies

Figura 21 (a,b): PCA de Covariância das espécies, usando frequências. Estão representados os dois primeiros autovetores.

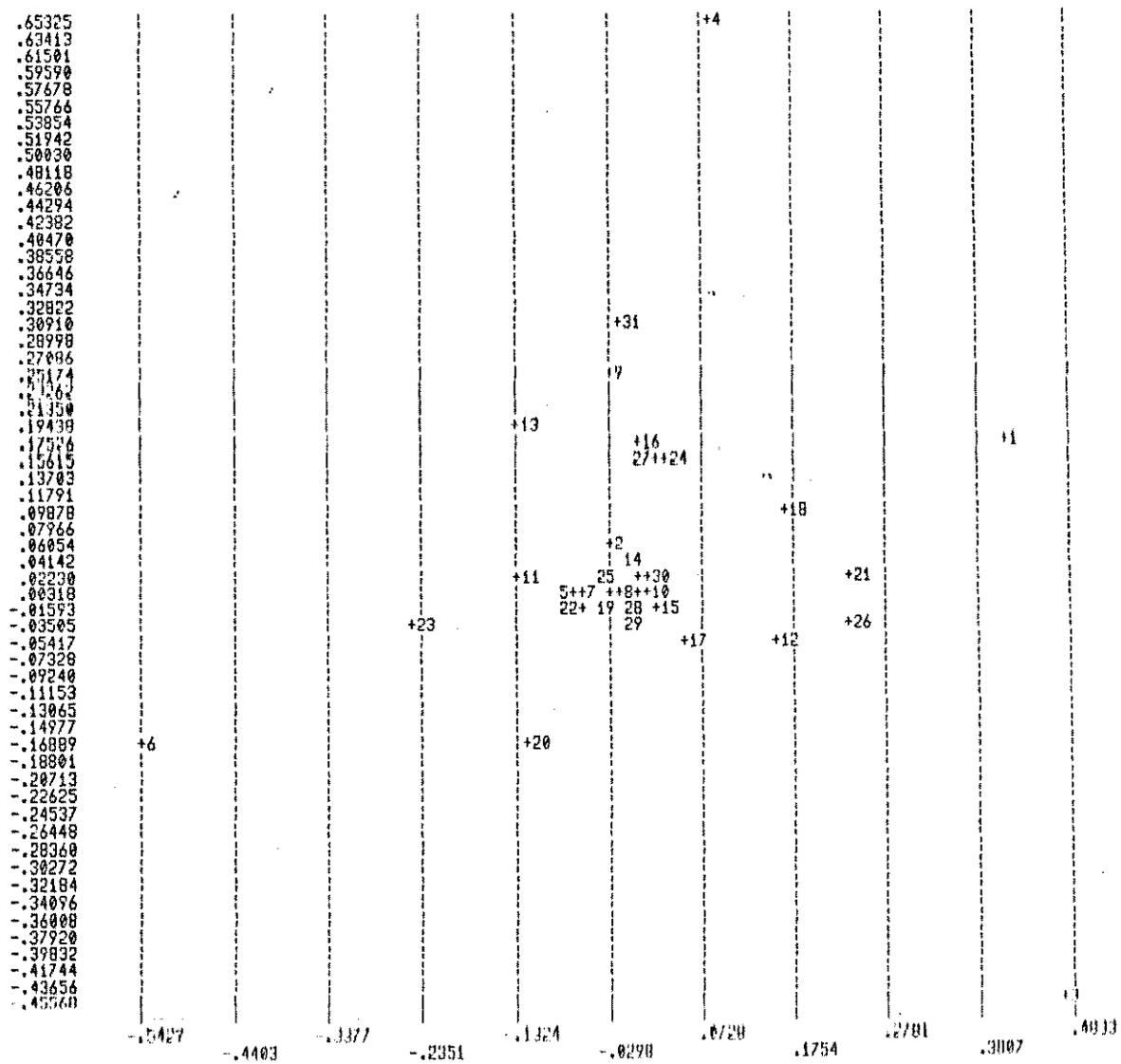


das especies usando frequencias.

diagrama acima,

ovetor Horizontal = 1

ovetor Vertical = 2



PCA das especies usando frequencias.

No diagrama acima,

Autovetor Horizontal = 1

Autovetor Vertical = 2

em um dado plano (delimitado por dois eixos), existe um correspondente diagrama de proteínas que procura explicar, para aquele mesmo plano, quais as proteínas que justificam a separação observada para as espécies. Aqui só está apresentado o primeiro par de eixos, embora seja discutido também o que está, ocorrendo no segundo par de eixos.

Observa-se que para os dois primeiros autovetores (autovetores 1 e 2 ou eixos 1 e 2) (fig. 21 a) obtém-se três grupos distintos:

H. martiana muito separada das demais espécies; H. courbaril var stilbocarpa e H. courbaril var subsessilis próximas; H. stignocarpa, H. intermedia e H. courbaril var courbaril um outro grupo. Comparando-se este diagrama com o seu correspondente que traz a distribuição das proteínas (fig. 21 b) percebe-se que:

H. martiana é separada das demais espécies devido ao alto valor de frequência da proteína 4.

H. courbaril var subsessilis e H. courbaril var stilbocarpa apresentam altos valores de frequência para a proteína 3 e baixos para a proteína 4.

H. intermedia, H. stignocarpa e H. courbaril var courbaril apresentam valores mais altos de frequência para a proteína 6 do que os demais taxa e valores mais baixos para as proteínas 3 e 4.

Os outros dois autovetores, 1 e 3, (que não estão representados aqui), explicam a posição dos taxa quando projetados sobre o plano por eles delimitado.

Verifica-se que: H. intermedia e H. stignocarpa ainda permanecem próximas neste plano, mas distanciam-se de H. courbaril

var courbaril. Isso se deve ao fato de H. courbaril var courbaril apresentar valores mais baixos para a proteína 6 (verifique com a tabela 27) e H. intermedia e H. stignocarpa apresentarem valores altos para esta mesma proteína.

A proteína 31 explica a localização gráfica de H. courbaril var stilbocarpa, H. intermedia, H. stignocarpa e H. martiana situadas na metade superior do diagrama e separadas de H. courbaril var courbaril e H. courbaril var subsessilis em relação ao eixo vertical. Todos estes taxa localizados na região superior do gráfico apresentam altos valores de frequência para a proteína 31 (veja tabela 27).

A proteína 1 explica a separação dos taxa segundo o eixo horizontal, justificando a separação de H. courbaril var stilbocarpa, H. martiana e H. courbaril var subsessilis das demais espécies. Estas três espécies apresentam altos valores para a proteína 1.

Os outros autovetores, 2 e 3; 1 e 4, tentam explicar a distribuição dos pontos nos planos por eles delimitados. Entretanto a maior parte da variação já se acha explicada nos dois primeiros eixos.

A porcentagem de contribuição por autovalor (ou seja, o quanto da variação observada é explicada através de cada autovalor) é de 41,76% para o primeiro autovalor. Já o segundo explica 35,98% da variação. Verifica-se portanto que os outros dois autovalores (contribuições de 10,11% e 6,29% respectivamente) pouco explicam os agrupamentos obtidos. De fato, verifica-se que já no segundo autovetor se obtém 77.73% de porcentagem cumulativa de

toda a variação e no terceiro 87,84% o que quer dizer que no primeiro par de eixos praticamente toda a variação já esta explicada. Portanto, quase todos os agrupamentos entre os taxa se encontram explicados já no primeiro plano.

Padrões parciais dentro do grupo todo.

Quanto aos padrões parciais, a Tabela 28 mostra, para cada faixa, a ocorrência de cada padrão parcial para todos os taxa considerados.

Pode-se perceber que existem padrões que ocorreram em todas ou quase todas as espécies, e padrões que apresentam-se, aparentemente, muito mais restritos.

O fato, no entanto, de alguns padrões terem distribuição mais ampla ou serem mais restritos não significa que eles sejam frequentes (no primeiro caso) ou raros (no segundo caso), dentro de um determinado taxon.

As tabelas de frequência de padrões parciais para cada taxa permitem uma melhor visualização disso. Da mesma forma, a Tabela 29 que fornece a frequência com que cada padrão parcial foi observado na amostra toda para o gênero, permite evidenciar um pouco estas diferenças.

Podemos observar que na faixa A os padrões A_1 , A_4 , A_6 , aparecem em quase todas as espécies. O padrão A_3 também pode ser considerado como tendo distribuição significativa, considerando-se que o mesmo ocorreu em 4 dos 6 taxa mais significativos neste estudo. Se no entanto compararmos os dados de distribuição dos

TABELA 28 - Ocorrência de padrões parciais para cada faixa, no gênero *Hymenaea*.

H. courbaril var. *courbaril*= 1; *H. courbaril* var. *subsessilis*= 2;
H. courbaril var. *altissima*=3; *H. courbaril* var. *stilbocarpa*= 4;
H. stigonocarpa= 5; *H. martiniana*= 6; *H. intermedia*= 7;
H. parvifolia= 8; *H. aurea*= 9; *H. oblongifolia*= 10.

a) Padrões parciais da faixa A

ESPÉCIE PADRÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	+				+		+			
2	+		+	+	+	+	+		+	
3	+			+	+		+			
4	+	+		+	+		+			
5					+					
6	+	+	+	+	+		+	+	+	+
7					+					
8					+					
9							+			
10	+									
11	+									
12	+									
13	+									
14	+									
15	+									
16				+		+				
17				+		+				
18				+						
19		+		+						
20				+						
21		+		+						
22							+			
23								+		

Os padrões parciais das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

TABELA 28 (continuação)- Ocorrência de padrões parciais para cada faixa, no gênero *Hymenaea*.

H. courbaril var. *courbaril*= 1; *H. courbaril* var. *subsessilis*= 2;
H. courbaril var. *altissima*=3; *H. courbaril* var. *stilbocarpa*=4;
H. stigonocarpa= 5; *H. martiniana*= 6; *H. intermedia*= 7;
H. parvifolia= 8; *H. aurea*= 9; *H. oblongifolia*= 10.

b) Padrões parciais da faixa B

ESPÉCIE PADRÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	+									
1					+					
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+		+	+	+	+	+			+
4					+					
5				+	+	+				
6	+				+					
7	+			+	+	+	+			
8					+		+			
9	+	+			+	+	+		+	
10					+					
11	+			+	+					
12	+			+	+				+	
13	+	+		+	+	+	+			
14	+									

Os padrões parciais das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

TABELA 28 (continuação) - Ocorrência de padrões parciais para cada faixa, no gênero *Hymenaea*.

H. courbaril var. *courbaril*= 1; *H. courbaril* var. *subsessilis*= 2;
H. courbaril var. *altissima*=3; *H. courbaril* var. *stilbocarpa*= 4;
H. stigonocarpa= 5; *H. martiniana*= 6; *H. intermedia*= 7;
H. parvifolia= 8; *H. aurea*= 9; *H. oblongifolia*= 10.

c) Padrões parciais da faixa C

ESPECIE PADRÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	+			+	+					
2	+	+			+					
3	+	+		+	+	+				
4	+	+		+	+	+	+		+	
5					+		+			
6	+				+	+	+			
7				+	+					
8	+			+	+					
9		+		+	+	+	+	+		+
10	+	+	+	+	+	+			+	
11					+					
12	+	+	+			+				
13	+									
14	+									
15	+									
16				+						
17				+						
18				+						
19				+						
20		+								
21								+		+
22									+	
23								+		
24							+			

Os padrões parciais das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

TABELA 28 (continuação) - Ocorrência de padrões parciais para cada faixa, no gênero *Hymenaea*.

H. courbaril var. *courbaril*= 1; *H. courbaril* var. *subsessilis*= 2;
H. courbaril var. *altissima*=3; *H. courbaril* var. *stilbocarpa*= 4;
H. stigonocarpa= 5; *H. martiniana*= 6; *H. intermedia*= 7;
H. parvifolia= 8; *H. aurea*= 9; *H. oblongifolia*= 10.

d) Padrões parciais da faixa D

ESPÉCIE PADRÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	+	+	+	+	+	+	+		+	+
2	+			+	+		+			
3	+	+		+	+		+			
4	+	+		+	+					
5		+		+	+		+			
6					+					
7	+			+	+					
9					+					
10	+									
11	+									
12	+									
13	+									
14	+									
15				+						
16						+		+		
17						+		+		
18								+		
19							+			

Os padrões parciais das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

TABELA 29 - Frequência de ocorrência de cada padrão dentro do gênero Hymenaea. (n= 185)

Hymenaea							
A ₁ = 15,13%	n=28	B ₀ = 0,54%	n= 1	C ₁ = 3,24%	n= 6	D ₁ = 52,43%	n=97
A ₂ = 12,43%	n=23	B ₁ = 2,705	n= 5	C ₁ = 2,16%	n= 4	D ₂ = 9,73%	n=18
A ₃ = 5,95%	n=11	B ₂ = 51,35%	n=95	C ₂ = 0,54%	n= 1	D ₃ = 9,19%	n=17
A ₄ = 9,73%	n=18	B ₃ = 7,03%	n=13	C ₂ = 2,16%	n= 4	D ₄ = 12,43%	n=23
A ₅ = 0,54%	n= 1	B ₄ = 0,54%	n= 1	C ₃ = 1,62%	n= 3	D ₅ = 3,24%	n= 6
A ₆ = 26,95%	n=48	B ₅ = 7,03%	n=13	C ₃ = 9,19%	n=17	D ₆ = 1,08%	n= 2
A ₇ = 1,08%	n= 2	B ₆ = 1,08%	n= 2	C ₄ = 37,30%	n=69	D ₇ = 3,78%	n= 7
A ₈ = 1,08%	n= 2	B ₇ = 6,49%	n=12	C ₄ = 1,08%	n= 2	D ₉ = 0,54%	n= 1
A ₉ = 1,08%	n= 2	B ₈ = 1,08%	n= 2	C ₅ = 1,08%	n= 2	D ₁₀ = 0,54%	n= 1
A ₁₀ = 1,62%	n= 3	B ₉ = 7,57%	n=14	C ₅ = 1,08%	n= 4	D ₁₁ = 0,54%	n= 1
A ₁₁ = 1,08%	n= 2	B ₁₀ = 0,54%	n= 1	C ₆ = 7,57%	n=14	D ₁₂ = 0,54%	n= 1
A ₁₂ = 1,08%	n= 2	B ₁₁ = 1,62%	n= 3	C ₇ = 2,70%	n= 5	D ₁₃ = 1,08%	n= 2
A ₁₃ = 0,54%	n= 1	B ₁₂ = 3,78%	n= 7	C ₈ = 1,62%	n= 3	D ₁₄ = 0,54%	n= 1
A ₁₄ = 0,54%	n= 1	B ₁₃ = 8,11%	n=15	C ₉ = 4,86%	n= 9	D ₁₅ = 0,54%	n= 1
A ₁₅ = 1,08%	n= 2	B ₁₄ = 0,54%	n= 1	C ₁₀ = 11,89%	n=22	D ₁₆ = 1,08%	n= 2
A ₁₆ = 5,40%	n=10			C ₁₁ = 1,08%	n= 2	D ₁₇ = 1,62%	n= 3
A ₁₇ = 3,24%	n= 6			C ₁₂ = 1,62%	n= 3	D ₁₈ = 0,54%	n= 1
A ₁₈ = 0,54%	n= 1			C ₁₃ = 1,62%	n= 3	D ₁₉ = 0,54%	n= 1
A ₁₉ = 5,95%	n=11			C ₁₄ = 0,54%	n= 1		
A ₂₀ = 1,08%	n= 2			C ₁₅ = 1,08%	n= 2		
A ₂₁ = 1,62	n= 3			C ₁₆ = 1,08%	n= 2		
A ₂₂ = 2,70%	n= 5			C ₁₇ = 0,54%	n= 1		
A ₂₃ = 0,54%	n= 1			C ₁₈ = 0,54%	n= 1		
				C ₁₉ = 0,54%	n= 1		
				C ₂₀ = 0,54%	n= 1		
				C ₂₁ = 1,08%	n= 1		
				C ₂₂ = 0,54%	n= 1		
				C ₂₃ = 0,54%	n= 1		
				C ₂₄ = 0,54%	n= 1		

- Os padrões das faixas A, B, C e D estão representados na Figura 1.

padrões parciais da faixa A com a tabela de frequência para a mesma faixa, percebemos que:

O padrão A_1 embora só ocorra em tres taxa, apresenta uma frequência maior que os padrões A_2 , A_3 , e A_4 que se acham mais amplamente distribuídos entre os taxa.

Em relação à faixa B, os padrões B_2 , B_3 , B_7 , B_9 e B_{13} são os que apresentam ampla distribuição, sendo que o padrão B_2 ocorre em todas as espécies. A Tabela 29 de frequências, no entanto, indica que, à excessão do padrão B_2 , todos os demais apresentem baixa frequência. Além disso, o padrão B_7 que só ocorre em três das espécies mais representativas, apresenta frequência de ocorrência comparável a estes outros padrões de distribuição mais ampla.

A faixa C apresenta certos problemas de interpretação, dado que a frequência dos padrões C'_n não podem ser comparadas com as demais diretamente, já que eles são provenientes de padrões onde não se tem certeza da perfeita separação de todos os peptídeos. Apesar disso percebe-se que o padrão C_3 (C_4 está excluído), C_6 , C_9 , C_{10} se acham amplamente distribuídos entre os taxa estudados, embora a frequência de C_9 seja baixa.

A faixa D apresenta os padrões D_1 como o mais amplamente distribuído e o mais frequente de todos, só não tendo ocorrido em H. parvifolia. Os outros padrões, aparentemente são mais restritos, ocorrendo em apenas alguns taxa. Este é o caso dos padrões: D_2 , D_3 , D_4 , D_5 e D_7 . As frequências destes padrões são baixas para todo o grupo, sendo que o padrão D_4 apresenta uma frequência um pouco maior.

De maneira geral pode-se verificar que:

Faixa A (veja na Tabela 28 a qual espécie corresponde que número):
 Padrão A_2 - não ocorre na espécie 2, 8 e 10 (as duas últimas contribuem com poucas sementes). A não ocorrência deste padrão na espécie 2 pode ser devido ao fato de todas as sementes serem provenientes de uma só localidade.

Padrão A_3 - a amostra não ocorre nas espécies 2, 6 (amostras significativas), 3, 8, 9 e 10. Na espécie 6 todas as sementes analisadas são originárias de um único adulto e isso pode estar influenciando na ocorrência do padrão.

Padrão A_4 - não ocorre nas espécies 6, 3, 8, 9, 10.

Padrão A_6 - não ocorre na espécie 6.

Faixa B

Padrão B_3 - não ocorre nas espécies 2, 8 e 9.

Padrão B_7 - não ocorre nas espécies 2, 3, 8, 9, 10.

Padrão B_9 - não ocorre nas espécies 4 (amostra significativa), 3, 8, 10. O não aparecimento deste padrão na espécie 4 é bastante sugestivo já que trata-se de uma espécie cuja amostragem foi grande e que cobriu um número variado de indivíduos adultos, bem como de locais distintos.

Padrão B_{13} - não ocorre nas espécies 3, 8, 9, 10 (todas amostras muito pequenas).

Os padrões de ampla distribuição que não foram observados nos taxa cujo número amostral foi muito baixo, poderiam, talvez, ser observados caso se aumentasse a amostragem. A ausência destes

padrões na espécie 2 pode ser, novamente, devido à procedência das sementes. Entretanto, a ausência do padrão B₉ na espécie 4 parece indicar que este padrão, ou não ocorre nesta espécie ou se trata de um padrão muito raro dentro da espécie, talvez restrito a uma população.

Faixa C

Nesta faixa apresentamos um padrão C'₄ e C₄ que deve ser olhado com cautela. Trata-se de um padrão que na maior parte dos casos foi obtido devido à falta de informações sobre as proteínas desta faixa. No entanto, também foi um padrão observado em certas sementes, só que neste caso sua ocorrência foi bastante rara (Tab. 27 - C₄ = 1,08%). Devido a isso, não estamos incluindo as observações referentes a este padrão, bem como aos padrões: C'₁, C'₂, C'₃, C'₅. Apesar destas dificuldades em se verificar os padrões da faixa C, pode-se observar, olhando-se a Tabela 27 (de frequência de ocorrência dos padrões) e Tabela 26 que mostra a ocorrência dos padrões nos vários taxa - que também neste caso há padrões que parecem ter uma distribuição mais ampla do que outros.

O padrão C₃, apresenta uma frequência relativamente alta (para esta faixa), 9,19%. Das espécies que contribuíram significativamente para o estudo, este padrão não correu na espécie 7. Não ocorreu também nas espécies 8, 9, 10. O padrão C₃ parece ser mais frequente na espécie 1.

C₆ não ocorreu nas espécies 2, 4, 3, 8, 9, 10. A não ocorrência do padrão na espécie 2 pode estar correlacionada à origem destas sementes. Entretanto, sua ausência na espécie 4 é mais significativa, podendo indicar a inexistência deste padrão neste taxon ou que se trata de um padrão muito raro. Este padrão apresentou uma frequência mais alta (33,33%) na espécie 7, ocorrendo em menor frequência nos demais taxa.

C₉ não ocorre nas espécies 1, 3, 9. A ausência deste padrão na espécie 1 é significativa. Sua ausência nesta espécie parece indicar que se trate de um padrão que de fato não existe na espécie 1 ou então que se trata de um padrão bastante raro.

C₁₀ não ocorreu nas espécies 7, 8 e 10. A ausência deste padrão na espécie 10 pode indicar que se trate de um padrão mais raro para esta espécie. Este padrão apresenta ampla distribuição mas baixa frequência dentro de cada taxon, embora a frequência total para o grupo seja relativamente alta (em relação às demais), 11,89%.

Faixa D

D₁ não ocorreu na espécie 8. Sua frequência é alta nos taxa 4 (79,69%), 5 (36,11%), 6 (70%), 1 (27,78%). Nas demais espécies e variedades em que ocorre, sua frequência é baixa.

D₂ não ocorre nas espécies 2 e 6. É possível que a ausência deste padrão nestas duas espécies se deva à procedência destas sementes. Também não ocorreu nos taxa 3, 8, 9 e 10. Este padrão ocorreu em baixa frequência em todos os taxa exceto na espécie 7

(27,78%).

D₃ não ocorreu nos taxa 2, 3, 6, 8, 9, 10. Sua frequência no grupo todo é baixa.

D₄, não ocorreu nos taxa 6,7,3,8,9,10. A ausência deste padrão sobretudo na espécie 7, pode indicar a inexistência do padrão nesta espécie ou que se trata de um padrão muito raro nesta espécie. Este padrão apresenta maior frequência no taxon 2 (50%), o que pode estar relacionado com a procedência das sementes analisadas. Também apresenta um valor alto de frequência na espécie 1 (33,33%). Nas demais espécies sua frequência é baixa.

D₅ não ocorre em 1, 6, 3, 8, 9, 10. A ausência deste padrão, sobretudo na espécie 1, é muito significativa. Nas espécies em que ocorreu este padrão, sua frequência foi baixa.

Pode-se verificar também que para cada uma das faixas existe uma ou algumas espécies que apresentam um maior número de padrões distintos, sendo portanto taxa mais variáveis dentro daquela faixa. Entretanto, uma espécie bastante variável para uma faixa pode não o ser na faixa seguinte. Podemos observar que (Tab.28) em ordem decrescente de número de padrões distintos, temos:

Faixa A

H.courbaril var courbaril > H.courbaril var stilbocarpa > H.stignocarpa > H.intermedia >> H.martiana = H.courbaril var subsessilis

Faixa B

H.stignocarpa > H.courbaril var courbaril > H.courbaril var stilbocarpa = H.intermedia > H.martiana >> H.courbaril var subsessilis

Faixa C

H.courbaril var courbaril = H.courbaril var stilbocarpa = H.stignocarpa > H.courbaril var subsessilis > H.martiana > H.intermedia

Faixa D

H.courbaril var courbaril > H.stignocarpa > H.courbaril var stilbocarpa > H.intermedia > H.martiana = H.courbaril var subsessilis

Apesar da falta de informações para a faixa C, é esta que apresenta o maior número de padrões distintos, sendo assim a faixa mais variável no grupo. É seguida de perto pela faixa A. A faixa menos variável foi a faixa B.

Tanto a faixa B como a D apresentam um número menor de padrões diferentes, no entanto são estas faixas que exibem padrões que são muito frequentes em todos os taxa e que têm alta frequência no grupo como um todo. Padrões B₂ (51,35%) e D₁ (52,43%) são exemplo disso.

Pode-se também observar que o fato de um determinado taxon apresentar um número alto de padrões parciais distintos em determinada faixa, não está inteiramente correlacionado ao tamanho da amostra e à forma como foi feita esta amostra. Assim sendo, nem sempre é o taxon que apresenta maior amostra que tem o maior nú-

mero de padrões distintos. Bem como, nem sempre é o taxon cuja amostra cobriu um número alto de localidades (e portanto populações) distintas que exhibe o maior número de padrões parciais distintos. Por vezes também, espécies cuja amostra de sementes é procedente de um único indivíduo adulto, exhibe maior variação do que outra espécie cujas sementes vêm de locais distintos.

DISCUSSÃO

1) Sobre o Método

Para se estabelecer o método definitivo de extração e preparo das amostras, vários requisitos foram levados em consideração.

Procurou-se inicialmente averiguar se haveria algum meio de extração que fornecesse a melhor separação de proteínas, produzindo bandas nítidas, bem discriminadas e o maior número de bandas estáveis (passíveis de repetibilidade). Verificou-se que todas as soluções extratoras utilizadas produziram o mesmo tipo de separação. Portanto qualquer das soluções testadas preenchiam este pré-requisito. O mesmo já não ocorria quando se adicionava qualquer nova substância ou se alterava qualquer concentração nos tampões do gel ou do tanque - nestes casos a separação das proteínas era totalmente alterada.

O segundo pré-requisito foi o de encontrar uma solução extratora capaz de maximisar a concentração da proteína no extrato, sem contudo alterar a separação das proteínas. Usou-se sempre, no tratamento controle, uma solução extratora de NaCl 1%.

A seguir averiguou-se se haveria formas de se eliminar ou reduzir a viscosidade que era obtida em vários extratos, sem o comprometimento da separação das proteínas. Vários tratamentos foram feitos e juntamente com eles pôde-se observar o efeito de diversas substâncias na separação das proteínas.

No final optou-se pela solução extratora que nos pareceu mais simples e que reunia os pré-requisitos que haviam sido impostos: 1) boa separação das proteínas 2) aumento da concentração protéica e 3) eliminação da viscosidade dos extratos.

Dos tratamentos para se verificar a eficiência de extração (tab. 1 a,b) observou-se que, diversas substâncias pareciam estar aumentando a concentração de proteínas no extrato, no entanto foi a solução salina com Tris (NaCl 1% + Tris 0,1M pH 7), que obteve maior incremento.

Considerando-se que concentrações de Tris acima de 0,1mM interferem com o método de Lowry, diminuindo a leitura da concentração protéica de maneira não linear (Peterson 1979), a concentração protéica real dos extratos era, portanto, superior à detectada pelo método.

Já a adição de SDS não apresenta interferência com este método sendo aconselhado o seu acréscimo a soluções que contenham substâncias que interfiram com o método de Lowry, como uma forma de solubilizar as proteínas e outras substâncias eliminando desta forma a interferência (Peterson 1979). Mesmo assim extratos com SDS apresentaram concentração protéica mais baixa do que os extratos com Tris e a solução extratora de Tris + SDS ocasionou até mesmo uma redução na concentração protéica dos extratos (tab.1 a,b). Isso pode ser efeito do SDS sobre a extração das proteínas ou um efeito de interferência séria, com o método, quando se adiciona SDS e Tris. Entretanto o efeito do SDS isolado, sugere que mesmo que haja alguma interferência esta não seria a única causa da redução do valor da concentração protéica nos extratos. Pode

estar havendo uma certa interferência do Tris com o método, que resulte em uma leitura errônea da concentração de proteínas, no entanto parece também estar havendo uma menor extração de proteínas quando se adiciona o SDS.

Com relação à eliminação da viscosidade dos extratos constatou-se que várias das soluções extratoras agiam de forma a eliminar este problema. No entanto, Tris 0,1M pH 7 que já havia sido testado com relação à eficiência na extração de proteínas, pareceu-nos mais simples. Além disso experimentos variando o pH da solução de Tris verificou-se que o pH 8,9 não eliminava a viscosidade do extrato e que o pH 5,1 precipitou parte da proteína. Optou-se portanto pelo pH 7 uma vez que este pH aproxima-se do pH celular, está acima do ponto isoelétrico da maior parte das proteínas (Préaux & Lontie 1975), e que as soluções de Tris pH 4,6 e Tris pH 5,1 não funcionam mais como tampão (Scopes 1982).

Para a determinação da concentração protéica dos extratos de Hymenaea optou-se pelo método de Lowry (Lowry et al 1951). O método de Coomassie Brilliant Blue G (Bradford 1976) produziu resultados bastante inconsistentes, demonstrando variações abruptas em concentração protéica provavelmente devido à precipitação do corante mesmo durante a leitura. Era possível observar esta precipitação a olho nu, mesmo dentro do tubo de ensaio. Peterson (1979) também aponta este tipo de inconsistência neste método.

Nas amostras para eletroforese foram acrescentados SDS e B-mercaptoetanol.

O SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) é um detergente aniônico que liga-se às proteínas, ocasionando:

1) A dissociação de moléculas oligômeras em suas subunidades que então passam a migrar como cadeias polipeptídicas individuais.

2) Por se tratar de um detergente aniônico e por se ligar facilmente e em grande proporção às proteínas, causa, na maior parte dos casos a eliminação da carga das proteínas tornando-as negativas. Devido a forma como as moléculas de SDS se ligam às proteínas, a quantidade de carga por unidade de massa de proteína se torna constante. Desta forma a migração das proteínas na eletroforese passa a ser proporcional ao seu raio molecular, ou aproximadamente ao seu peso molecular (Weber & Osborn 1969; Weber et al 1972; Gáal et al 1980; Andrews 1981).

Assim, o uso de SDS permite que se estime o peso molecular de cada banda protéica que aparece no gel. Para que isso ocorra, no entanto, é necessário que o SDS se ligue de maneira completa com a proteína. Proteínas que apresentam uma conformação muito comprimida devido à pontes disulfídricas entre os peptídeos, não conseguem se ligar adequadamente ao SDS e por isso sua migração não será dependente do PM das mesmas. Para eliminar este efeito de conformação acrescenta-se B-mercaptoetanol. O B-mercaptoetanol elimina as pontes disulfídricas através de uma reação de redução (Gáal et al 1980; Andrews 1981).

3) Sobre as espécies

A variação protéica dentro de cada taxon de Hymenaea foi bastante alta. Da mesma forma a variação morfológica e de composição química de resinas. Assim a discussão dos resultados será apresentada em partes, discutindo-se inicialmente os resultados obtidos para cada taxon e a seguir a variação que ocorre entre os taxa.

Esta grande variação observada para proteínas corrobora com a suposição de que o gênero seja auto incompatível e que reprodução cruzada seja a regra dentro das espécies (Lee & Langenheim 1975). Por outro lado a repetição de padrões parciais em sementes de plantas diferentes de uma mesma população sugere que o agente envolvido na polinização de Hymenaea seja capaz de se deslocar longas distâncias. É provável que seja um morcego o polinizador efetivo dos taxa estudados de Hymenaea.

Morcegos nectarívoros têm grandes exigências energéticas e por isso necessitam de grandes quantidades de néctar (Helversen & Reyer 1984). Plantas que são polinizadas por morcegos, normalmente, produzem flores em ramos que se projetam acima ou abaixo da copa das árvores e apenas poucas flores se abrem por noite (Faegri & Van der Pijl 1979). Isso obriga o morcego a visitar várias árvores por noite para suprir suas exigências energéticas. Esta busca de alimento realizada pelo morcego, normalmente segue rotas bem definidas e permitiria um fluxo gênico grande mesmo entre indivíduos distantes (Heithaus et al 1975; Howell 1979; Helversen & Reyer 1984; Lemke 1984). Assim, este comportamento de

procura de néctar, aliado à baixa produção de flores "maduras" por árvore por noite, aumentaria as chances de que os grãos de pólen que venham a tocar o estigma de uma flor tenham as mais diversas origens e portanto diferentes informações genéticas. Desta forma as variações obtidas entre sementes de um mesmo fruto devem estar em parte associadas a uma série de eventos correlacionados, quais sejam:

- 1) Auto incompatibilidade das espécies de Hymenaea.
- 2) Antese de poucas flores por árvore por noite.
- 3) Alta exigência energética por parte do polinizador, obrigando-o a visitar muitas flores.
- 4) Grande capacidade de deslocamento do polinizador.

3) Sobre Cada Espécie

a) Hymenaea courbaril var courbaril

Como foi mostrado nos resultados somente dois padrões foram exatamente iguais entre si, sendo que no caso deste taxon estes dois padrões provém da mesma localidade (Acaponeta, México). Já as outras duas sementes da outra localidade no México (Tepic), apresentam um grau de similaridade bem baixo entre elas (fig 2, tab 3).

A análise feita (fig 4) não sugere que haja qualquer tendência de formação de agrupamentos naturais. Não há qualquer indício de que a semelhança de padrões obedeça à uma distribuição geográfica ou possa estar relacionada com o habitat ocupado pelos indivíduos adultos. Pelo contrário, o dendrograma mostra que padrões muito semelhantes provém de sementes cujas árvores-mães estavam localizadas em áreas geográficas e habitats muito distintos.

Quando se comparam estes resultados com as informações que se tem sobre resinas foliares de Hymenaea (Martin et al 1974; 1976), percebe-se que a variabilidade obtida para proteínas é maior e de explicação menos nítida.

As populações de H. courbaril var courbaril distribuídas ao sul da Amazônia apresentam uma grande variabilidade em termos da composição química de suas resinas foliares, produzindo plântulas com resinas diferentes entre si e a da planta-mãe (Martin et al 1974; Stubblebine & Langenheim 1980; Langenheim & Stubblebine

1983). Estas diferenças em composição de resinas não ocorrem nas populações deste taxon que se distribuem mais ao norte da Amazônia (Venezuela e América Central). Aparentemente esta estabilidade de resinas esta associada a habitats mais secos e abertos, enquanto que o alto grau de variação de resinas ocorre em populações de floresta densa e úmida (Martin et al 1974; 1976).

Estas variações em resinas nas populações ao sul da Amazônia, assemelha-se um pouco com o que foi observado para proteínas de reserva. Entretanto o número de padrões obtidos para proteínas de sementes é muito maior, não sendo possível se estabelecer seis tipos básicos como em resinas. Mesmo quando se trata de padrões parciais, estes, dentro de cada faixa, são em número maior do que seis.

As populações da América Central e Venezuela apresentam padrões protéicos tão variáveis quanto as populações mais ao sul.

Se examinarmos a frequência de ocorrência de bandas em cada população considerada, (tab 2) perceberemos que um número razoável de proteínas bastante raras ocorre nestas populações mais ao norte. Estas proteínas raras estão sempre introduzindo uma grande variabilidade na espécie. Por outro lado estas proteínas raras nem sempre se acham restritas a uma única região. Considerando-se que o número de sementes por região é baixo, provavelmente outras regiões poderiam apresentar estas proteínas se fosse aumentada a amostra. Estas proteínas em muitos casos ocorreram em sementes de regiões distintas, não contíguas, em habitats muito diferentes.

A proteína 7, por exemplo, ocorreu na Costa Rica e em Honduras; mesmo dentro da Costa Rica trata-se de uma proteína que ocorreu tanto em Alajuela como em Guanacaste, ou seja em dois ambientes e altitudes diferentes.

A proteína 19, foi observada nas sementes do México e na população da Bolívia, sendo que no México ela ocorreu nas duas populações amostradas, que se situam a duas altitudes diferentes.

Embora os indivíduos da a população de Osa sejam considerados como muito isolados, talvez se tratando de um taxon à parte, proteínas que ocorrem nesta população nem sempre se restringem somente a ela, mesmo quando se tratam de proteínas raras. Este é o caso da proteína 24, que ocorreu em Osa e na Bolívia.

Várias outras proteínas raras parecem restritas a uma única população, entretanto não necessariamente só a este taxon (tab 2; proteínas: 5, 8, 22, 25, 27, 29).

Com relação aos padrões parciais obtidos (tab 6), poucos são os que ocorreram somente em uma população. E neste caso em uma amostragem maior talvez fosse possível que eles aparecessem em outras populações.

Segundo Lee e Langenheim (1975) a população da península de Osa na Costa Rica, provavelmente tratar-se-ia de uma espécie à parte cuja distribuição estaria restrita a esta região. Os dados obtidos para resinas foliares também sugerem a exclusão deste grupo de H. courbaril (Martin et al 1974; 1976). Os resultados de proteínas, no entanto, não necessariamente corroboram com as evidências morfológicas e de resinas. O dendrograma (fig 4) obtido para os dados protéicos mostra que os dados de Osa não formam

um agrupamento tão claro que justifique sua separação dos demais. No dendrograma de média não ponderada (fig 4), os quatro padrões de Osa saem juntos, com baixa similaridade entre alguns deles bem como para com os padrões de outras localidades. No dendrograma de ligação completa (que foi feito mas não esta apresentado na tese), os padrões de Osa saem no mesmo grupo que padrões de outras localidades (Costa Rica, Honduras e Venezuela).

Se compararmos os padrões parciais que apareceram na população de Osa com os das demais populações (fig 1 a,b,c,d e tab 5 e 6) perceberemos que somente os padrões A₁₅, B₀, B₁₄ e D₁₂ são exclusivos desta população, sendo que o padrão B₀ representa a ausência de bandas protéicas nesta faixa.

Os demais padrões:

A₁₀ apareceu também na população da Venezuela.

B₂ ocorreu nas demais populações da Costa Rica (Alajuela e Guanacaste), em Honduras, na Venezuela e na Bolívia.

C₂ ocorreu também no Brasil

C₃ foi encontrado nas outras populações da Costa Rica, em Honduras (com alta frequência) e na Venezuela.

D₃ apareceu na população de Alajuela (Costa Rica) e em Honduras.

D₇ encontrado também na população de Alajuela (Costa Rica).

Apenas as proteínas 8 e 27 são exclusivas da população de Osa, sendo que a proteína 27 ocorreu em outras espécies. Outras proteínas raras são exclusivas de outras populações que não a de Osa. Por exemplo:

Proteínas 5 e 22, ocorreu na população do Brasil e também foi observada em outras espécies.

Proteína 25 exclusiva da população do México.

Proteínas 22 e 29, ocorreu na Bolívia e em outras espécies.

Desta forma, embora a população de Osa tenha apresentado padrões protéicos bastante diferentes dos restantes, não se pode dizer que eles sejam mais diferentes ou dissemelhantes do que outros tantos observados e mesmo entre eles, o grau de similaridade não é tão grande que justifique mantê-los mais unidos do que a qualquer dos outros padrões. No dendrograma (fig 4) é possível observar que padrões de mesmas populações, que não Osa, também podem apresentar baixa similaridade entre si. Os valores de similaridade encontrados em muitos dos casos são comparáveis aos obtidos para os de Osa. Observe (fig 4) por exemplo, a similaridade dos padrões 26 e 30 (Honduras) que é de 0,76 e destes dois com o grupo de padrões de Honduras, 27, 28 e 29 - $S=0,73$. Já a similaridade apresentada pelo padrão 12 (Santarém, Brasil) com os padrões 26 e 30 (Honduras) é de 0,80, o que significa que existe maior semelhança entre o padrão de Santarém e os de Honduras, do que destes últimos com os demais padrões de Honduras.

Pode-se dizer então que, quanto às proteínas, H. courbaril var courbaril :

- 1) apresenta um alto polimorfismo em todas as populações averiguadas, contrariamente ao que foi observado com relação às resinas e caracteres morfológicos nas populações Meso Americanas.

2) os padrões obtidos não parecem estar correlacionados com a distribuição geográfica do taxon ou com o habitat, não sendo possível agrupar-se padrões segundo estes parâmetros.

3) os dados obtidos não permitem afirmar que a população de Osa, considerada por outros autores como muito isolada e diferente das demais populações do taxon, deva ser considerada como uma espécie à parte. A variação de padrões obtida nesta população é compatível com o que foi verificado para as demais e os padrões de Osa não podem ser considerados mais estranhos do que qualquer um dos outros padrões encontrados em outras populações.

b) Hymenaea courbaril var stilbocarpa

Os resultados obtidos para este taxon não diferem muito do que foi observado em H. courbaril var courbaril. Somente que neste caso pôde-se perceber melhor o que estava ocorrendo com um certo número de indivíduos de uma única população e usar esta informação como forma de comparar o que deve ocorrer com outras populações.

A tabela 9 mostra a variação de padrões proteicos dentro de frutos de um mesmo indivíduo, entre os frutos e entre os indivíduos de uma mesma população. Mesmo tomando-se sementes de um mesmo fruto, a variação obtida pode ser muito grande, podendo haver pouca sobreposição de padrões. Por outro lado padrões obtidos em um fruto

podem ser encontrados em outros frutos, porém a medida que se aumenta o número de frutos amostrados, aumenta-se o número de padrões distintos. Isso é o que se pode inferir a partir dos dados obtidos para sementes da árvore 2. Entretanto os padrões encontrados para a árvore 3 apresentam uma menor variação, havendo um fruto cujas as sementes apresentaram o mesmo padrão protéico e este padrão também foi encontrado com frequência nos demais frutos amostrados desta árvore. Isso sugere que a variabilidade de padrões possa ser muito diferente de uma árvore para outra numa mesma população. Esta alta proporção de padrões iguais ou muito similares pode ser indicativo da possibilidade de alguns indivíduos adultos na população poderem apresentar uma certa taxa de autopolinização ou a possibilidade de que possa ocorrer geitonogamia. Pode ainda ocorrer o caso de haver polinização cruzada entre indivíduos próximos parentes, ou seja, geneticamente semelhantes. Este tipo de resposta diferente produzida por plantas de uma mesma população foi relatado para H.courbaril var. stilbocarpa por Stubblebine & Langenheim (1980) e Langenheim & Stubblebine (1983) a respeito das resinas foliares. Nesta espécie é frequente se encontrar plântulas de uma mesma progênie com resinas foliares diferentes entre si e distintas da resina da árvore mãe. Entretanto foi relatado pelos autores acima citados o caso de uma árvore com resinas do tipo II que somente produzia plântulas do tipo II. É possível que o tipo de evento que ocasione uma diminuição na variação de padrões protéicos de sementes de um indivíduo dentro de uma população bastante variável, seja semelhante ao que origina plantas capazes de produzir um só tipo de resinas na pro-

gênie. Os resultados de resinas e de proteínas, sugerem que talvez ocorram diferenças individuais dentro de uma população e que os eventos que geram estas diferenças podem estar ocasionando um aumento de homozigose em alguns indivíduos da população.

O dendrograma (fig 6), indica que também não ocorre a formação de grupos naturais neste taxon tal como o que aconteceu em H. courbaril var courbaril e que padrões idênticos muitas vezes têm procedência de árvores distintas da mesma população ou de populações diferentes de áreas geográficas e habitats distintos.

Os padrões parciais também podem ocorrer em populações de áreas geográficas distintas (tab 14).

Poucas proteínas parecem ser constantes neste taxon, como acontece com as proteínas: 3, 10, 14, 26, 28, 30 e 31. A maior parte delas parece variar muito de um local para outro o que indica que a variabilidade total para o taxon pode ser bem diferente da obtida dentro das populações. A ausência de certas proteínas na população 1 (tab. 7a), como as proteínas 15 e 23, é de certa forma sugestiva, já que a amostragem nesta população foi relativamente grande. Esta ausência de proteínas em certas populações ou ausência de padrões parciais sugere que cada população tenha potencialidades diferentes de combinação de padrões e portanto de variabilidades distintas. Decorre disso que, o que é assumido como sendo a variabilidade potencial total do taxon não corresponde ao que pode estar acontecendo em cada população. Como populações distintas podem apresentar padrões totais idênticos ou pelo menos parciais iguais, o que permitiria uma combinação igual de padrões parciais em populações distintas, além de seus padrões

exclusivos (exclusivos desta ou daquela população), a variabilidade encontrada dentro de cada população é maior do que a obtida entre as populações.

Embora tenham sido detectadas também variações na composição de resinas foliares na progênie de adultos de H. courbaril var stilbocarpa, a variabilidade protéica é muito maior. Os mesmos tipos de composição de resinas que ocorrem em plântulas crescendo sob um mesmo adulto, também podem ser encontrados em plântulas de progênies de outros adultos (Stubblebine & Langenheim 1980; Langenheim & Stubblebine 1983). Com relação às proteínas, pode até haver repetição de padrões totais entre sementes provenientes de adultos diferentes, no entanto este evento parece ser muito mais raro do que o observado com resinas. Praticamente não existem sementes com composição protéica igual e quando são iguais, parece se tratar de uma exceção, mais do que a regra. Mesmo com relação aos padrões parciais ocorre relativamente pouca sobreposição entre árvores diferentes.

c) Hymenaea courbaril var subsessilis

Os dados obtidos para proteínas neste taxon, são muito contrastantes com respeito aos obtidos para resinas foliares. Nas análises feitas de resinas foliares para este taxon, obteve-se variação em termos quantitativos mas não qualitativos. Quando se comparou a composição de resinas de plantas adultas e jovens (plântulas e juvenis), todos os indivíduos foram nitidamente do tipo II (Stubblebine & Langenheim 1980; Langenheim et al 1977, 1983). Em contraste, das dez sementes analisadas, somente duas apresentaram padrões iguais e ainda assim se for considerado que o padrão C₄ das duas sementes seja igual. Existe a possibilidade deles serem diferentes entre si e diferentes dos demais padrões parciais observados nesta faixa. O dendrograma (fig 8) mostra claramente as discrepâncias entre os padrões. O grau de similaridade pode ser tão baixo quanto o obtido entre os padrões 8 e 6 (fig 7) que é de $S=0,66$.

d) Hymenaea courbaril var altissima

Somente duas sementes foram analisadas para este taxon, indicando que também ocorre variação protéica nesta variedade. Os padrões obtidos são diferentes entre si e diferentes dos outros padrões obtidos em H. courbaril. Apesar disso os padrões parciais que ocorreram nas sementes deste taxon foram também observados nas outras variedades de H. courbaril bem como em outras espécies. O dendrograma (fig 15) que compara os padrões dos taxos cujas amostras foram pequenas, mostra que os dois padrões desta variedade não saem agrupados.

e) Complexo H. courbaril

A espécie H. courbaril hoje, compreende diversas variedades que anteriormente eram consideradas como espécies à parte e que foram agrupadas em courbaril por Lee e Langenheim (1975). Sendo assim H. courbaril representa hoje uma espécie com uma distribuição muito ampla, coincidindo com a distribuição do gênero nas Américas e ocupando os mais diversos tipos de ambientes. Em termos morfológicos trata-se de uma espécie muito variável principalmente na sua distribuição pela América do Sul, exce- tuando-se a Venezuela. As populações mais ao norte, incluindo as da Venezuela, são morfológicamente muito estáveis (Lee & Lange- nheim 1975).

Com relação às proteínas de sementes, quando se compara todas as variedades da espécie para as quais obtivemos informações, verifica-se que existe uma sobreposição de padrões parciais em todas as faixas, embora nem todos os padrões se sobreponham. O número de padrões diferentes que ocorreu em cada faixa para cada um dos taxa foi diferente. Ora um dos taxa ora outro apresentou maior variabilidade dentro de uma dada faixa. Há padrões que ficaram restritos a um dos taxa e quando ocorreram em outro taxon, foi em outra espécie que não H. courbaril.

No dendrograma (fig 16) percebe-se que não há qualquer tendência de agrupamento dos padrões de H. courbaril por variedade, distribuição geográfica ou ainda por semelhança de habitat. Existem padrões que são agrupados mas a origem deles é diversa quer com relação ao taxon ao qual pertencem, quer com relação à sua distribuição geográfica, população ou habitat. O que foi obtido para padrões protéicos não encontra paralelo nas informações encontradas para resinas foliares. Com relação às resinas, Martin et al (1974) verificaram que quando se comparavam as variações quantitativas de resinas do tipo II (o tipo mais frequente no gênero) podia-se agrupar os padrões obtidos segundo o habitat. Assim, embora indivíduos de variedades distintas sejam colocados em mesmos grupos, os agrupamentos formados reúnem indivíduos que ocupam o mesmo habitat. Os dados protéicos de forma alguma permitem este tipo de agrupamento. No caso de resinas é possível se justificar estes agrupamentos, supondo-se pressões de seleção semelhantes que estariam afetando igualmente as populações de espécies que ocorrem no mesmo habitat. Com relação aos padrões pro-

téicos, o fator que deve estar influenciando o aparecimento da variabilidade encontrada, parece estar afetando os indivíduos independentemente do habitat ao qual eles pertençam.

Ao contrário do que pode ser feito com resinas foliares, onde são criadas classes de variação qualitativa, não é possível criar estas classes quando se trata de proteínas. No caso das proteínas as variações observadas são descontínuas, do tipo presença ou ausência de uma certa proteína. Além disso a combinação destas bandas origina padrões distintos e quase toda a semente apresenta um padrão diferente da outra, com pelo menos uma proteína a mais ou a menos do que os já existentes.

Os padrões obtidos para a região de Osa na Costa Rica, é o único conjunto de padrões que se mantém lado a lado no dendrograma de média não ponderada. Entretanto a associação destes padrões entre si é tão baixa quanto a esperada para padrões de espécies diferentes. Os padrões de Osa não são mais discrepantes em relação à H. courbaril do que os padrões encontrados nas sementes da Bolívia e resultados semelhantes deveriam ser obtidos se os demais taxa estudados de H. courbaril tivessem tido poucas sementes analisadas.

Nota-se que das proteínas tidas como raras em H. courbaril var courbaril somente poucas ocorreram nos outros taxa de H. courbaril. As proteínas 19 e 22 ocorreram também em H. courbaril var stilbocarpa. A proteína 23 ocorreu nas variedades subsessilis e stilbocarpa. No entanto isso não significa que estas proteínas não tenham ocorrido nas outras espécies do gênero. A proteína 15 só ocorreu na população de Jaboticabal. A proteína 17 foi exclu-

siva de H. courbaril var subsessilis.

H. courbaril var altissima apesar de só ter tido duas sementes analisadas e de não ter tido nenhuma proteína ou padrão parcial que já não houvesse ocorrido nas demais variedades, apresentou uma combinação de padrões parciais ainda inédita na espécie (fig 1 a,b,c,d; tab.26).

Baseado nas resinas foliares verificou-se (Martin et al 1974) que as populações de H. courbaril da América do Central e Venezuela não apresentam nenhuma variação em termos de composição química das resinas, sendo sempre do tipo II. Também não é observada variação morfológica nas populações destas regiões. Embora estas populações não apresentem variação sob o ponto de vista qualitativo, ocorre uma variação em termos quantitativos. Assim plantas de uma mesma população não apresentam variação nas quantidades relativas dos compostos que compõem a resina foliar, mas entre entre populações estas diferenças são significativas. Desta forma pôde-se agrupar os indivíduos segundo as populações às quais eles pertencem, sendo que populações contíguas apresentam grandes semelhanças em resinas. De qualquer forma as diferenças são relativamente pequenas, não havendo nenhuma população com similaridade menor que 0,72. Esta uniformidade em tipos de resina foliar foi correlacionada com menor pressão de herbivoria, ambientes mais xéricos e abertos. Ao contrário, as populações de H. curbaril variedades: courbaril, stilbocarpa, subsessilis e altissima, localizadas na América do Sul (excetuando a população da Venezuela), apresentam uma grande variação na composição de resinas foliares, tanto qualitativa (com o aparecimento de seis

tipos de resinas) como quantitativa. A esta variação em tipos de resina, associa-se uma grande variação nos caracteres morfológicos e uma alta pressão devido ao ataque de herbívoros. Entretanto, análises de agrupamento permitiram que se agrupasse estas taxa segundo sua procedência. Assim sendo existe uma semelhança química maior entre variedades de H. courbaril que sejam de uma mesma localidade do que entre populações de um mesmo taxon mas de locais diferentes (Martin et al 1974).

A variação obtida para proteínas de sementes, não segue o que foi verificado com resinas. As populações Meso-Americanas e da Venezuela de H. courbaril var corbaril, apresentam tanta variação protéica quanto a observada para as demais populações de H. courbaril Sul Americanas. O grau de similaridade entre os padrões de um mesmo taxon e de uma mesma localidade frequentemente é menor do que o obtido entre os taxa e/ou localidades. A variação observada não parece seguir nenhuma norma perceptível. A população de Osa é tão variável quanto as demais e as diferenças entre padrões de sementes desta população são tão grandes quanto as esperadas para padrões de outros taxa.

f) Hymenaea stigonocarpa

Em H. stigonocarpa, de 36 sementes examinadas, foram encontrados 35 padrões distintos, sendo que os dois padrões idênticos são provenientes de sementes de locais diferentes.

A tabela de frequências (tab 17) mostra que poucas são as proteínas estáveis, ou seja que ocorreram com alta frequência em todas as populações amostradas. São elas: proteínas 2, 10, 14, 28 e 30.

Apesar da amostra ser pequena para cada população, há indícios de que a frequência destas proteínas possa ser variável de uma população para outra. Há proteínas que ocorreram com uma frequência muito baixa, tendo sido consideradas raras na espécie. Entretanto algumas destas proteínas ditas raras ocorreram em mais de uma população (tab 17).

Quanto aos padrões parciais ocorre comportamento semelhante ao apresentado pelas proteínas. O padrão A₁ ocorreu em 50% das sementes amostradas e esteve presente em todas as populações, sendo portanto, o padrão parcial mais frequente nesta espécie, muito embora sua frequência de ocorrência pareça variar de uma população para a outra. Na faixa D, o padrão D₁ também ocorreu em quase todas as populações, exceto a de Alpinópolis. Da mesma maneira o número de padrões parciais por faixa e por população (considerando-se apenas as populações 1, 2 e 3 - tabela 21), é muito variável, cada uma das populações podendo ser mais variável em uma das faixas do que as outras o são para aquela faixa e mais variável em uma ou duas faixas do que nas outras faixas. Is-

so indica possibilidades de combinação de padrões parciais, e portanto de variação de padrões totais diferentes entre as populações.

Essa variabilidade de padrões protéicos encontrada em H. stigonocarpa também contrasta com os dados observados para as resinas foliares nesta espécie (Langenheim & Hall 1983; Martin et al 1976; Langenheim et al 1986 a). As populações de H. stigonocarpa cujas resinas foram analisadas, apresentaram somente um tipo de resina foliar (tipo II). Essa estabilidade em resina foliar nesta espécie concorda com a hipótese de que plantas de locais mais xéricos apresentam menos variação, já que esta espécie distribui-se em regiões de Cerrado. Dentro de uma mesma população foi verificado que plantas atacadas e não atacadas por herbívoros apresentaram diferenças quantitativas com relação a alguns dos compostos de suas resinas. O composto que varia é diferente em populações distintas (Langenheim & Hall 1983). Isso indica que a variação de resinas observada entre populações é maior do que a que se observa dentro de cada uma delas. Com relação às proteínas de semente a variação observada dentro de uma população é por vezes maior que a que se observa entre padrões de diferentes populações. Devido à sobreposição de padrões parciais e a grande variação de padrões totais, não se consegue agrupar padrões de uma mesma localidade.

H. stigonocarpa é uma espécie típica de cerrado, vegetação que esta sujeita à queimadas constantes (Rizzini 1976; Heringer 1977). Desta forma é de se esperar que o fogo desempenhe uma forte pressão de seleção especialmente sobre as plântulas de H.

stigonocarpa (Heringer 1971), podendo selecionar rapidamente, genótipos específicos de plantas resistentes a eles (Heringer 1971). Essa seleção de genótipos poderia de alguma forma diminuir a variabilidade genética de plantas nesta área. Essa diminuição de variabilidade genética pode estar de alguma forma também contribuindo para a invariabilidade de resinas foliares. Entretanto a análise de proteínas de sementes mostra exatamente o oposto. A variabilidade de proteínas de reserva é tão alta nesta espécie quanto a encontrada nos outros taxa, incluindo os que apresentaram distribuição em matas úmidas. Portanto apesar do efeito do fogo, esta espécie apresenta uma alta variabilidade genética que se reflete na alta variabilidade protéica apresentada.

Essa alta variabilidade em proteínas de reserva pode indicar que a seleção para resistência a fogo seja completamente independente da seleção para proteínas de reserva. A pressão de seleção que afeta as proteínas seria portanto diferente da de resistência a fogo.

Por outro lado, como a reprodução na maior parte das espécies deste gênero parece ser cruzada, quando se analisam as proteínas de semente, esta se observando o efeito de cruzamento. O genótipo do adulto (árvore mãe), de fato é desconhecido.

Sabe-se que muitas das espécies de cerrado, também têm reprodução vegetativa e é frequente perceber-se uma distribuição agrupada destas espécies. Parte destes agrupamentos é atribuída à reprodução vegetativa, cada uma destas manchas, correspondendo em muitos casos a um só genótipo (Rizzini 1971).

H. stigonocarpa tem capacidade de regeneração, quando ocorre perda do tronco principal e por sóboles. Em H. courbaril no México e Costa Rica, foi observada reprodução vegetativa intensa através de raízes, especialmente na borda de matas onde o indivíduo tenha sido mantido isolado devido à desmatamento (Lee & Langenheim 1975).

Não existem estudos detalhados sobre este tipo de reprodução para H. stigonocarpa. Entretanto a capacidade regenerativa de plantas de cerrado permite que um genótipo se mantenha mesmo após a ação do fogo. A própria ação do fogo rápido permite ainda que sementes de H. stigonocarpa germinem, embora a ação de queimadas consecutivas destruiriam as plântulas (Heringer 1971; Rizzini 1976). Uma vez que algumas plântulas conseguissem se estabelecer na área poderiam manter-se por muito tempo devido à reprodução assexuada e/ou capacidade de regeneração. Assim, embora o fogo possa estar funcionando como uma potente força seletiva ocasionando uma possível perda de genótipos na população de plântulas, uma vez estabelecida, uma plântula teria condições de se manter e ocupar a área indefinidamente apesar da ação de futuras queimadas. Plântulas são o resultado da germinação de sementes e portanto de reprodução sexuada. Assim em populações abertas, cada plântula potencialmente difere geneticamente uma da outra. Portanto cada indivíduo ou agrupamento de indivíduos adultos pode ser geneticamente bastante diferente um do outro. Cada grupo de indivíduos poderia ser considerado como uma ilha no que diz respeito à manutenção de uma reserva de gens. Esses gens se combinariam na reprodução cruzada. Assim ao se fazer a análise de pro-

tefnas de reserva, estaria sendo observado o resultado desta variabilidade que é mantida em cada agrupamento de indivíduos adultos através de reprodução assexuada. Além disso é provável que o polinizador efetivo desta espécie seja um morcego, que pode se deslocar longas distâncias permitindo o fluxo gênico mesmo entre indivíduos ou manchas distantes.

g) Hymenaea martiana

As sementes analisadas desta espécie são provenientes de uma única árvore. Cada semente foi retirada de um fruto diferente de tal forma que esta amostra é uma estimativa da variabilidade que pode potencialmente ocorrer em um único indivíduo.

Observando-se o dendrograma (fig.14), e comparando-se com os demais pode-se verificar que com apenas 10 sementes amostradas, não se obteve nenhum padrão idêntico e que a similaridade entre os padrões obtidos, para esta espécie é das menores encontradas. O valor obtido para os padrões 2 e 3 é de $S=0,595$.

A respeito das resinas de H.martiana só se tem a informação de que a resina era do tipo II. No entanto não existe informação sobre quantas plantas foram analisadas com relação à resina foliar (Martin et al 1976). Quando se analisam as proteínas de sementes, mesmo de sementes de um único indivíduo adulto, tem-se uma idéia sobre os diferentes tipos de genótipos possíveis que estão sendo potencialmente introduzidos na população como contribuição de uma única árvore-mãe.

h) Hymenaea intermedia

Das 18 sementes analisadas em H. intermedia, foram obtidos 17 padrões diferentes. Da região de Manaus (AM), tomou-se sementes de quatro indivíduos adultos distintos e da região de Carajás (PA), sementes provenientes de uma única árvore.

Como pode ser observado na figura 12, não ocorre também tendência de agrupamento dos padrões de uma mesma região. A similaridade entre sementes de Carajás, que têm uma única origem, é muito variável, havendo padrões que são agrupados juntos e que apresentam similaridade 0,699 como é o caso dos padrões 15 e 9. A similaridade entre os padrões que no dendrograma são colocados em posições distantes é muito menor. Padrões de mesmo fruto apresentam menor similaridade entre eles do que, em muitos casos, padrões de sementes de frutos distintos.

Para os padrões de Manaus a situação é semelhante e padrões de uma mesma árvore não apresentam maior similaridade entre si do que os provenientes de outras árvores. Há padrões desta região que mostram maior similaridade com os de Carajás.

A frequência de ocorrência das bandas varia muito entre as populações havendo algumas proteínas que só ocorreram em uma das populações (tab.23). Esses resultados sugerem que algumas proteínas e portanto alguns padrões parciais (e em consequencia totais) possam ser exclusivos de uma das regiões ou muito raros na outra.

De qualquer maneira, quando analisadas todas as proteínas da espécie, tem-se um número maior de proteínas e portanto de pa-

drões protéicos do que os obtidos para cada população. Algumas proteínas cuja frequência é bastante expressiva, na realidade restringiram-se a apenas uma das localidades ou principalmente a uma delas. Desta forma tomá-las como proteínas de importância para a espécie é mascarar o que de fato está ocorrendo.

Com relação às resinas foliares, este grupo apresenta grande variação (Langenheim et al 1977; Stubblebine & Langenheim 1980; Langenheim & Stubblebine 1983) tendo sido reportado 4 tipos distintos de resinas foliares. A variabilidade protéica observada, é bem maior e a variabilidade potencial, considerando-se as possibilidades de combinação entre padrões parciais, ainda maior. Além disso, árvores adultas possuem a capacidade de produzir descendentes com qualquer um dos tipos de resinas, independentemente da região de origem da árvore mãe. No caso das proteínas, aparentemente alguns padrões não podem ser produzidos devido, provavelmente, à ausência de algum tipo de informação genética que codifique algumas das proteínas.

i) Hymenaea oblongifolia, Hymenaea aurea, Hymenaea parvifolia

Essas três espécies, juntamente com H. courbaril var altissima, embora tenham contribuído com poucas sementes, permitiram que se verificasse que nestas espécies também ocorre variação protéica e que os padrões parciais que nelas ocorreram nem sempre foram diferentes dos já obtidos para outros taxa.

Os padrões totais são muito distintos e não ocorre agrupamento dos padrões de uma mesma espécie quando se submetem os dados de presença e ausência de proteínas a uma análise de aglomerados (fig 15).

4) Comparação entre as espécies

Foi mostrado como padrões protéicos se sobrepõem dentro de um dado taxon de forma a não ser possível agrupar-se os padrões quer seja por população, distribuição geográfica ou habitat.

Quando se comparam os padrões de todas as espécies e variedades estudadas a situação não se inverte. Não se consegue delimitar nenhum taxon através dos padrões protéicos obtidos. O método numérico (dendrograma fig 16) agrupa padrões semelhantes independentemente da espécie a que eles pertençam. Padrões de sementes de um mesmo fruto podem ser tão diferentes entre si quanto os padrões de uma outra espécie e vice-versa. Padrões de espécies distintas e até mesmo de regiões bem diferentes, podem ser iguais ou muito similares.

Mesmo quando padrões de um mesmo taxon aparecem no dendrograma lado a lado, é frequente que eles se encontrem em agrupamentos distintos ou que a similaridade entre eles seja muito baixa, havendo uma mistura de padrões das mais diversas localidades. É frequente também que estes agrupamentos se achem interrompidos por um ou vários padrões de outros taxa.

As frequências de bandas por população, por espécie (tabelas 2, 7a,b, 17, 23 e 26), demonstra que algumas proteínas podem estar restritas a uma região, como é o caso da proteína 23 de H. intermedia ou proteínas 3 e 5 em H. stigonocarpa só para citar alguns exemplos. Isso não significa que estas proteínas sejam exclusivas destas espécies. Mais ainda a ocorrência delas pode diferir de um taxon para o outro. Por exemplo: a proteína 23 que

apareceu somente na população de Carajás em H. intermedia, apresenta uma distribuição mais ampla nos outros taxa onde ela ocorre, embora sua frequência nestes taxa seja mais baixa. A proteína 23 apresenta sua maior frequência no gênero em H. intermedia o que sugeria ser uma proteína típica desta espécie. No entanto, como já foi enfatizado, isso está mascarando o fato desta proteína só ter ocorrido em uma das populações. Casos como este não são uma exceção e podem ter um peso grande quando se verificam as possíveis semelhanças entre os taxa estudados, através da frequência de ocorrência de proteínas nas espécies. Ou seja este tipo de evento tem grande influência quando se comparam as semelhanças entre as espécies através de PCA, figura 21 (a,b), (análise de componentes principais) ou dendrograma de distâncias euclidianas (fig. 19,20).

Várias relações entre as espécies foram inferidas a partir da frequência de proteínas e outras ainda podem ser sugeridas, por exemplo:

a proteína 1 (tab 27) não ocorreu em H. courbaril var courbaril embora tenha sido muito expressiva em H. courbaril var subsessilis e H. martiana o que sugeriria uma certa proximidade entre os dois taxa. Com um valor de frequência intermediário encontra-se H. courbaril var stilbocarpa e com baixa frequência para esta proteína estão H. stigonocarpa e H. intermedia. Assim a frequência da proteína 1 sugere a formação de um grupo formado por H. courbaril var subsessilis e H. martiana e outro formado por H. stigonocarpa e H. intermedia, no meio destes dois agrupamentos situar-se-ia H. courbaril var stilbocarpa. H. courbaril

var courbaril com relação a esta proteína estaria separada de todos os taxa. No entanto outras proteínas sugerem outros tipos de agrupamento e apresentam outros tipos de correlação entre as espécies. Não existe portanto uma proteína ou conjunto de proteínas que justifique facilmente qualquer inferência de relação entre as espécies estudadas.

Com relação aos padrões parciais verifica-se algo muito semelhante. Padrões restritos a um ou poucos taxa e neste caso podendo apresentar uma baixa frequência nos taxa onde ocorrem sendo portanto raros no grupo todo, ou uma frequência mais alta e neste caso embora sejam raros no gênero, são frequentes no taxon onde ocorrem. Há ainda os padrões com ocorrência ampla, ou seja aqueles que ocorrem em todos ou quase todos os taxa. No entanto podem distribuir-se de pelo menos três formas:

- 1) apresentam alta frequência em todos ou quase todos os taxa.
- 2) apresentam uma maior frequência em apenas um dos taxa.
- 3) apresentam baixa frequência em todos os taxa mas ocorrem em todos eles.

A frequência de ocorrência de bandas protéicas e de padrões parciais no gênero, sugere que existam gens que apresentam ampla distribuição nos diversos taxa, porém são mantidos com uma frequência relativamente baixa em todas as populações onde ocorrem. Esse tipo de comportamento assemelha-se ao que é observado para a análise de enzimas.

O número de padrões parciais por faixa dentro de cada espécie e variedade oscilou bastante, o que indica que certa espécie

pode ser mais polimórfica em uma faixa do que em outra faixa. Entre as espécies também, a faixa que cada espécie apresentou maior número de padrões difere de tal forma que, novamente, não se encontra qualquer indício de que haja um padrão que permita justificar esta variação de padrões parciais dentro de cada faixa para todas as espécies. Ou seja, não é possível se afirmar que uma dada faixa é a mais variável no gênero como um todo, já que para cada taxon a faixa mais variável parece diferir.

Tomando-se as espécies faixa a faixa e comparando-se as espécies, com respeito ao número de padrões parciais em comum, verifica-se que para cada espécie e para cada faixa este número é diferente.

Deste modo se fossem comparadas as espécies faixa a faixa através do número de padrões parciais em comum, obter-se-ia associações entre os taxa totalmente diferentes de uma faixa para outra. Por exemplo, das seis espécies mais significativas neste estudo, com relação à faixa A, H. martiana apresentou a menor sobreposição de padrões com as demais espécies e/ou variedades e não apresentou nenhum padrão em comum com H. coubaril var subsessilis. Já na faixa B, H. courbaril var subsessilis é o taxon que apresenta o menor número de padrões distintos (apenas tres), no entanto mostrou sobreposição máxima destes padrões com os outros taxa.

Na faixa A, o padrão que apresentou maior frequência no gênero (tab.29) foi o A₅ (26%) e que ocorreu em todas as espécies exceto H. martiana. O padrão D₁ tem uma frequência muito mais alta no gênero mas não foi amostrado em H. parvifolia. Na faixa B,

houve grande sobreposição de padrões, entretanto nesta faixa, como na D, ocorreu um padrão que é comum à metade das sementes amostradas (o padrão B₂ - 51,35%). Contudo, ao contrário da faixa D, na faixa B, vários outros padrões são comuns a mais de um taxon. A faixa D, apresenta o maior número de padrões que só ocorreu em um taxon e também é onde a maior parte dos padrões apresentou frequência muito baixa, muitas vezes ocorrendo em apenas uma semente.

Na faixa A, o padrão A₁ (tab.19 e fig.1a) ocorreu em 50% das sementes de H. stigonocarpa, tendo ocorrido em todas as populações desta espécie, o que sugere que ele seja o padrão mais frequente para esta espécie. Esse padrão nunca foi encontrado nas sementes de H. courbaril var stilbocarpa embora parte das sementes analisadas dos dois taxa fossem provenientes de árvores da mesma região e portanto de populações ocorrendo lado a lado. O padrão A₁ no entanto, aparece em algumas populações de H. courbaril var courbaril, embora sua frequência seja baixa. Pode-se ainda observar que o padrão A₁ ocorreu também em H. intermedia, mas somente nas sementes provenientes de Carajás, e com maior frequência que a com que ocorre em H. courbaril var courbaril. Não é possível portanto correlacionar a presença deste padrão parcial, ou seja este arranjo de proteínas, com uma provável adaptação ao meio ambiente como poderia ser sugerido quando se analisa a ocorrência deste padrão em H. stigonocarpa. Aparentemente o que quer que esteja determinando a frequência deste padrão em cada um dos taxa, difere muito de um taxon para outro.

forem comparadas às sugeridas por Lee e Langenheim (1975) a cerca das relações evolutivas dos taxa de Hymenaea percebe-se que as evidências fornecidas através dos dados obtidos com proteínas não concordam com as afinidades propostas. H. courbaril var stilbocarpa e H. courbaril var subsessilis acham-se relativamente próximas mas sua ligação com H. courbaril var courbaril é fraca. H. intermedia encontra-se mais próxima de H. stigonocarpa do que de H. courbaril var courbaril. Aliás estas duas espécies apresentam-se muito distantes de H. courbaril var courbaril quando se dá maior peso para as proteínas mais variáveis. O dendrograma (fig.16) que mostra as similaridades entre todos os padrões encontrados, apresenta os padrões de H. oblongifolia muito distanciados um do outro e um deles relativamente próximo a H. courbaril var courbaril e H. courbaril var stilbocarpa enquanto que o outro apresenta baixa similaridade com qualquer outro padrão de Hymenaea estando relativamente mais próximo ($S = 0,667$) a H. parvifolia. Esses resultados não sustentam a hipótese de que H. oblongifolia seja o grupo mais antigo de Hymenaea do qual teriam evoluído os demais e que H. intermedia se situaria em uma posição intermediária entre H. courbaril e H. oblongifolia (Lee & Langenheim 1975).

A PCA, figura 21, (análise de componentes principais) pode esclarecer quais são as proteínas que pesaram mais para a separação das espécies. No entanto, como uma proteína pode alcançar uma frequência expressiva em uma espécie mesmo tendo ocorrido em uma só população, os agrupamentos obtidos mascaram o que está ocorrendo dentro de cada taxon. Há padrões absolutamente iguais

entre taxa e em boa parte dos casos isso não é refletido quando se comparam as frequências de proteínas nas diversas espécies.

Bisby e Nicholls (1977) e Harris e Bisby (1980), apresentam vários tipos de agrupamentos entre espécies do complexo *Genisteeae*, baseados em caracteres de origens diferentes. Desta forma dependendo do conjunto de caracteres que se toma em consideração, (caracteres morfológicos, aminoácidos livres, proteínas de sementes, citológicos, entre outros), obtém-se agrupamentos completamente diferentes. Ou seja cada tipo de caráter fornece informações distintas a respeito da relação de parentesco entre as espécies do complexo *Genisteeae*. Essas incongruências sugerem que a pressão de seleção sobre cada um destes caracteres foi bastante distinta e que o passo evolutivo dos mesmos tenha sido diferente e ocorrido independentemente.

Da mesma forma as informações obtidas para *Hymenaea* baseadas em proteínas de reserva, na química de resinas foliares e na morfologia externa, são incongruentes levando a conclusões muito diversas quanto as possíveis afinidades entre os taxa.

As proteínas de sementes não fornecem dados que ajudem a justificar a separação do gênero em duas seções, como foi sugerido por Lee & Langenheim (1975), baseando-se em caracteres morfológicos. Também quando comparadas às resinas foliares, as variações observadas para proteínas sugerem que as pressões de seleção que as determinaram tenham sido diferentes das pressões que permitiram o aparecimento e evolução destas resinas.

Pode-se supor que pressões de seleção sobre cada um destes caracteres: morfológico, composição química de resinas foliares e

tipos de proteínas de reserva - tenham sido diferentes, determinando evoluções diferentes. Além disso, a velocidade de evolução de cada um destes caracteres tenha sido muito distinta. Essas diferenças em passo evolutivo e forma como determinada estrutura evolui podem se dever principalmente a fatores como:

1) diferentes tipos de pressão de seleção atuando diferentemente sobre as diversas estruturas de um organismo.

2) diferenças no arcabouço genético que codifica cada uma das estruturas de um organismo. Algumas estruturas apresentando um arcabouço genético mais rígido (que admite menos mudanças) que outras. Desta forma é este arcabouço genético que permite ou não o aparecimento de variações sobre as quais atuariam as pressões seletivas.

Essas discrepâncias entre morfologia e bioquímica não parecem ser exclusividade das plantas. Anuros (Maxson & Wilson 1975; Wilson et al 1977) apresentam uma morfologia externa muito uniforme e que quase não sofreu alterações ao longo dos tempos, especialmente se comparada à morfologia externa de mamíferos placentários. No entanto, quando se examina a evolução das albuminas de anuros e placentários, percebe-se que ambas parecem ter evoluído em uma velocidade similar e constante.

Por outro lado não existe nada que estabeleça que alterações genéticas que ocorram durante a evolução de espécies, sempre mudem de maneira sucessiva o PM das subunidades protéicas (Jensen & Grumpe 1983). Acredita-se que o peso molecular de proteínas homólogas sejam mais similares entre duas espécies distantes que entre espécies próximas (Jensen & Grumpe 1983). Desta forma as

relações de semelhança apresentadas nas análises de aglomerados, poderiam estar em muitos casos expressando este tipo de situação e fornecendo pouca informação sobre as relações de afinidade entre os taxa. Talvez as relações de parentesco obtidas através de caracteres morfológicos, expressem melhor as afinidades entre os taxa de Hymenaea. De qualquer forma, as variações de padrões protéicos dentro de cada taxon, são muito grandes o que sugere que as mudanças ao nível molecular devam ter sido diversas e em várias direções.

Poder-se-ia supor que parte desta variação se deve a um tipo de seleção neutra (King & Jukes 1969; Kimura 1979; Kimura 1983), o fato de cada semente poder apresentar um padrão protéico diferente, poderia ser indicativo disso. Mais ainda, o fato dos padrões obtidos se repetirem nas mais diversas populações e espécies, não sendo possível correlacioná-los com distribuição geográfica ou com o habitat dos indivíduos, portanto sem um aparente significado adaptativo, poderia sugerir que esta variação tivesse sido gerada, em grande parte, por seleção neutra (Selander 1978). No entanto, vários padrões parciais são repetidos e é pouco provável que um número tão alto de alelos tenha se fixado nas populações por seleção neutra (Smith 1970). Talvez fosse possível tal evento em populações pequenas, que não parece ser o caso das populações de Hymenaea. Além disso é pouco provável que o mesmo tipo de mutação neutra pudesse ocorrer em populações e espécies distintas (Smith 1970).

É possível que parte desta variação seja devida à glicoproteínas, onde é possível ocorrer mudanças na parte glicó das

proteínas - mudanças pós tradução da proteína (Basha & Beevers 1976; Eaton-Mordas & Moore 1978; Winterhalter 1981; Finne & Kru-sius 1982; Higgins 1984). Assim seria possível que os gens que codifiquem a proteína em si sejam diferentes dos que codificam as enzimas envolvidas nas reações de glicolização. Assim, embora não se tenha necessariamente um grupo muito grande de alelos para cada proteína de reserva, pode-se obter variações na corrida devido à ligações diferentes de açúcares, também diferentes, em pontos distintos de uma mesma molécula devido à mudanças nas enzimas envolvidas no processo (Higgins 1984). Essas variações de glicolização poderiam estar originando bandas que apresentariam diferentes Rm no gel.

Além disso é possível ocorrer, pelo menos em alguns casos, reações de glicolização não enzimáticas que normalmente alteram a forma da proteína. Esses tipos de reações são descritos em animais e acredita-se que estejam relacionados ao envelhecimento celular (Cerami et al 1987). É pouco provável que em Hymenaea estivesse se processando este tipo de reação devido a envelhecimento, entretanto não se deve descartar a possibilidade deste evento poder estar acontecendo em algumas das sementes mais velhas, desta forma contribuindo para aumentar a variabilidade amostrada.

Apesar do método de eletroforese em gel de acrilamida com SDS ser considerado pouco sensível para detectar variações em bandas protéicas dentro de populações de uma espécie, resultados semelhantes aos de Hymenaea foram obtidos por Langridge e colaboradores (1981) para Pinus. Em Pinus a variação embora menor que a observada para Hymenaea também ocorre entre indivíduos da mesma

população. Devido à natureza da semente de gimnospermas, é possível se comparar as proteínas do megagametófito (n) com as do embrião ($2n$). Ou seja, pode-se, através dos padrões de proteínas de tecidos da semente, se conhecer o genótipo da árvore mãe e inferir sobre a natureza da base genética da variação destas proteínas.

Por outro lado há evidências de que o SDS pode se ligar diferentemente a certos aminoácidos de uma proteína, mudando a mobilidade do peptídeo na eletroforese (Jong et al 1978). Assim, pequenas substituições de aminoácidos do tipo Thr - Ala, Gln - Leu, e Pro - Thr ou Ala, que mudam as características hidrofóbicas da proteína, influenciam o tipo de ligação das moléculas de SDS aos peptídeos, desta forma alterando a mobilidade de peptídeos que apresentam de fato mesma forma e mesmo tamanho e que portanto deveriam apresentar mesmo PM (Jong et al 1978). Desta forma talvez fosse possível que pelo menos uma parte da variação observada possa ser devido ao efeito de ligação das moléculas de SDS com peptídeos que estejam apresentando substituição de aminoácidos que modificam a hidrofobicidade da proteína. Assim poderíamos estar evidenciando, não diferenças em PM, mas pequenas mutações pontuais.

Outra possível explicação para o polimorfismo observado é a possibilidade dele ter sido produzido devido à mutações somáticas em um mesmo indivíduo mãe. Cada ramo de um mesmo indivíduo poderia ter sofrido mutações distintas e portanto seriam portadores de diferentes informações genéticas (Gill & Halverson 1984; Gill 1986; Sutherland & Watkinson 1986). É de fato pouco provável que

esta seja a causa principal da variação encontrada em Hymenaea. Isso implicaria que o número de mutações somáticas por planta teria que ser muito grande. Praticamente todo o botão teria que estar sofrendo um processo semelhante. Além do mais as mesmas mutações teriam que estar ocorrendo em vários indivíduos da mesma população, em populações distintas e em espécies diferentes com uma frequência alta.

Parecem estar existindo duas forças opostas agindo sobre Hymenaea. Uma delas atua no sentido de aumentar a variabilidade genética e desta forma o polimorfismo protéico. A outra parece agir no sentido contrário; uma força de "restrição" se assim poderíamos chamá-la. Parece se tratar de um tipo de força que estaria impedindo que esta variação saísse fora de certos limites. Assim, embora ocorra um número muito alto de padrões distintos, esta variação não parece ser indefinida, repetindo-se entre os diversos taxa.

Da mesma forma que a herbivoria parece explicar os diferentes padrões de resinas foliares (Martin et al 1974,1976; Langenheim et al 1977; Stubblebine & Langenheim 1980; Langenheim & Stubblebine 1983); predação de sementes pode ser a base da explicação do polimorfismo protéico aqui observado. Sabe-se que várias proteínas, por exemplo as lectinas (Toms & Western 1971; Lis & Sharon 1973; Bell 1978; Liener 1979; Toms 1981; Olnes et al 1982; Puszlai et al 1983; Etzler 1985), têm o poder de aglutinar células sanguíneas ou certos tipos de carboidratos como o glicogênio (Liener, 1976). Desta forma, proteínas deste tipo poderiam existir em Hymenaea de forma a evitar a predação de sementes

por insetos (Janzen 1978). Entretanto alguns insetos conseguem evoluir defesas capazes de escapar às substâncias tóxicas produzidas pelas plantas. Uma vez que estes insetos se tornem aptos a enfrentar as defesas das plantas, sua ação sobre as plantas leva à seleção de plantas capazes de evoluir outras defesas que lhes sejam tóxicas (Feeny 1970; Janzen 1970; Whittaker & Feeny 1971; Janzen 1973; Feeny 1976; Rosenthal et al 1976; Janzen 1981). A este processo de evolução "conjunta", vários autores deram o nome de co-evolução (Beck & Reese 1976; Janzen 1981; Rickleffs 1979). Neste processo co-evolutivo, a pressão de herbívoros comedores de sementes pode ter permitido a evolução não de um tipo de proteína tóxica mas de vários, ou seja a manutenção e fixação de vários alelos por locus. Pimentel & Bellotti (1976) e Pimentel (1984), mostram que é difícil haver evolução de um organismo especialista quando se tem uma grande imprevisibilidade e heterogeneidade de compostos químicos.

Sementes de Hymenaea são atacadas por vários curculeonídeos do gênero Rhinochenus (Janzen 1978; Langenheim et al 1977, 1978, 1983; Lewinson 1980) e outros besouros menores escolitídeos (Lewinson 1980). O ataque de Rhinochenus pode ser bastante alto e diferentes espécies de Hymenaea são atacadas por diferentes espécies de Rhinochenus não havendo praticamente nenhuma sobreposição de espécies de besouros mesmo no caso de espécies simpátricas (Lewinson 1980). Rhinochenus parece, portanto, ser um grupo de besouro bastante especializado embora a não sobreposição de espécies de Rhinochenus pudesse ainda ser explicada devido à preferência de habitat, ou seja, embora várias espécies de

Hymenaea sejam simpátricas, normalmente não são sintópicas, ocorrendo em habitats distintos (mata de galeria e cerrado; mata de igapó e mata de terra firme, etc...) (Lee & Langenheim 1975). A área de distribuição das diversas espécies de Rhinochenus poderia simplesmente se sobrepor às da distribuição de Hymenaea devido a pressões ambientais mais do que por preferências alimentares. Assim, o que se leva em consideração é o tipo de pressão exercida pela predação de sementes e não qual espécie de Rhinochenus a exerce. Portanto, um mesmo tipo de pressão - predação de sementes - poderia explicar a evolução de uma estratégia similar em todo o grupo de plantas, com o aparecimento e manutenção de padrões idênticos em espécies e regiões distintas. Isso de certa forma é o que se observa para resinas onde o tipo de defesa é o mesmo; as variações em composição química observadas são compartilhadas por diversas espécies, todas elas sujeitas ao mesmo tipo de pressão de herbívoros (Langenheim et al 1977; Stubblebine et al 1980). O único tipo de variação observado é quanto às quantidades de alguns compostos que compõem as resinas e isso também é observado quanto à variação da concentração das proteínas.

No entanto, resinas não variam qualitativamente nas áreas onde ocorre menor grau de ataque de herbívoros. Em proteínas isso já não acontece, visto que Rhinochenus é ausente do norte de El Salvador ao México (Langenheim et al 1977) e no entanto a variabilidade protéica observada para sementes desta região é tão alta quanto a de qualquer outra região amostrada. Talvez a pressão de seleção independa da espécie de herbívoro envolvida, pois Rhinochenus não é o único inseto que se alimenta de sementes de

Hymenaea. Além disso nas observações no campo foi possível se observar que grande parte das sementes são atacadas por fungos. Talvez a maior pressão de seleção sobre sementes de Hymenaea não seja a de herbívoros mas seja determinada por outros fatores como o ataque de fungos.

5) Significado evolutivo possível

Essa sobreposição de padrões protéicos entre as espécies talvez seja indicativo de que Hymenaea ainda seja um grupo recente estando suas espécies muito próximas evolutivamente. Não teria havido tempo suficiente para uma divergência ao nível protéico pelo menos. Essa evolução recente pode também explicar a semelhança que existe entre as espécies no tocante às resinas tanto foliares como dos outros órgãos (Martin et al 1974,1976; Langenheim et al 1978, 1982, 1983).

Sabe-se também que resinas fósseis, de depositos de Terciário, encontradas no México, Colômbia e Brasil, apresentam uma estrutura esquelética, pelo menos dos compostos mais importantes, semelhante à estrutura esquelética de compostos de resinas de vários taxa recentes (Langenheim 1967, 1973, 1981; Cunningham et al 1983). Isso significa que a estrutura esquelética destes compostos se manteve estável por este tempo todo.

Essa variabilidade observada para proteínas também é refletida nos caracteres morfológicos de várias das espécies. Diversas espécies do gênero são variáveis quanto à forma e tamanho de fo-

lhas e/ou flores. Quanto ao porte algumas espécies podem variar desde arboretas ou arbustos até árvores emergentes na Amazônia e a distribuição de H. courbaril é prova também que a variabilidade fisiológica desta espécie, pelo menos, deve ser muito grande. Essa grande variabilidade morfológica dificulta a identificação das espécies e o estabelecimento de limites entre os taxa. Há mesmo espécies que apresentam características intermediárias a duas espécies (Lee & Langenheim 1975). Essa dificuldade em estabelecer limites parece ser a regra para Hymenaea e parece concordar com a hipótese de um grupo que ainda está próximo da sua origem em termos evolutivos. Por outro lado poderia se supor que parte desta sobreposição de características morfológicas e de padrões protéicos, se devesse a possíveis hibridações entre as espécies. Isso é teoricamente possível. Várias espécies são simpátricas ainda que não sintópicas, e o número de cromossomos de todas elas é o mesmo ($2n=24$) (Lee & Langenheim 1975). Um polinizador do tipo um morcego teria capacidade de percorrer a distância entre os diferentes habitats onde se distribuem cada uma das espécies a busca de alimento. Entretanto, supor que hibridação pudesse explicar toda a variação observada no gênero é admitir que o grupo se trata de uma enorme população panmítica, onde todos os indivíduos se entrecruzam o tempo todo. Só na situação de uma população panmítica se conseguiria explicar a sobreposição de padrões que ocorre em todas as populações de todas as espécies. A taxa de cruzamento inter específico teria que ser tão alta que praticamente só haveria uma grande espécie e suas variedades.

6) Significado a nível taxonômico

Em termos taxonômicos não é possível a separação de taxa através de padrões protéicos. O estudo sugere que se a amostra fosse aumentada, também aumentaria o número de padrões diferentes. Especialmente devido às combinações entre faixas. De fato já com os padrões parciais observados pode-se perceber que se todas as combinações de padrões parciais forem possíveis a variabilidade para toda população será muito alta.

Faltam entretanto, outros estudos que permitam uma compreensão sobre o que está ocorrendo ao nível das populações para que se pudesse de fato interpretar melhor o significado da variação observada. Seria importante saber como se distribui a frequência dos padrões parciais e totais para um indivíduo adulto e entre os indivíduos adultos de uma mesma população. Isso também deveria ser feito ao longo dos anos, comparando-se a frequência de padrões para um mesmo indivíduo em diferentes anos de frutificação.

Trabalhos mais consistentes sobre o sistema de reprodução também precisam ser realizados. Testes de cruzamento entre espécies e variedades deveriam ser feitos para se ter uma idéia a respeito do isolamento reprodutivo entre os taxa. Talvez se trate de um grupo cujo isolamento reprodutivo ainda não seja completo e tal como as demais características estudadas neste grupo, se verifique que os limites entre os taxa são razoavelmente tênues, talvez indicativo de um grupo ainda recente em fase de diferenciação.

Os padrões totais obtidos através da mistura de várias sementes de uma mesma espécie talvez pudessem fornecer elementos suficientes para a separação dos taxa. Como pode-se verificar nas figuras 3,5,7,9,11 e 13, os padrões totais que seriam obtidos caso pudessem ocorrer todas as proteínas observadas nas sementes de um taxon, ao mesmo tempo em um único padrão, os padrões assim obtidos para cada taxon seriam diferentes. No entanto o procedimento de mistura de várias sementes no caso de Hymenaea ocasionaria uma série de evidências errôneas; sejam elas:

1) O padrão total desta forma obtido tratar-se-ia de uma somatória das proteínas mais frequentes nas sementes da amostra considerada e estaria diretamente sujeito ao tamanho e tipo de amostra. Amostras de uma só população talvez tendessem a não apresentar certas bandas, ou por estas proteínas não ocorrerem na população, ou por serem mais raras do que as outras e portanto forneceriam uma banda muito clara. Se a população de H. intermedia de Carajás não tivesse sido levada em consideração, a proteína 23 não teria aparecido nesta espécie.

2) Relações expressas através da análise numérica destes padrões não representaria nenhuma filogenia, já que os padrões totais estariam mascarando a real variação que existe entre padrões e a sobreposição dos padrões entre as espécies.

Vários outros trabalhos com eletroforese detectaram diferenças de padrões protéicos dentro da mesma espécie, mas nenhum apresentou níveis tão altos aos obtidos para Hymenaea (Derbyshire et al 1981; Langridge et al 1981; Jensen & Grumpe 1983). Vários destes trabalhos empregam técnicas mais sensíveis do que a

aqui empregada, técnicas que geralmente levam em consideração a carga da proteína (Kim & Mossé 1979). Ainda assim nestes trabalhos foi possível delimitar-se taxa através dos padrões protéicos obtidos. Além disso as variações observadas dentro de uma espécie, normalmente estão correlacionadas a diferentes variedades ou a populações geográficas distintas ou ainda a graus de ploidia diferentes (Boulter et al 1967; Crawford 1974; Kim & Mossé 1979; Derbyshire et al 1981).

A variação populacional detectada para Pinus empregando a mesma técnica utilizada neste trabalho, é ainda bem menor que a obtida nas populações de Hymenaea (Langridge et al 1981). Entretanto estes resultados sugerem que o emprego de SDS em eletroforese não elimina toda a variação existente e talvez possa ser também empregado para estudos de variação protéica ao nível populacional. Tanto mais se for de fato constatado que parte desta variação pode ser devido a mutações pontuais (Jong et al 1978) que eventualmente pudessem ocorrer entre indivíduos de uma mesma população e que até o momento nunca foram detectadas em um nível tão baixo.

A falta de coerência entre os dados protéicos, de resinas e morfológicos dificulta o emprego de toda esta informação em termos taxonômicos. Cada um destes conjuntos de informações parecem refletir eventos evolutivos totalmente diferentes. Situação similar é discutida por Bisby & Nicholls (1977) e Harris e Bisby (1980), para o complexo Genisteeae. A tentativa de se estabelecer agrupamentos coerentes baseados em cada um dos tipos de caracteres, leva à formação de grupos de espécies totalmente diferentes.

O mesmo ocorre com Hymenaea e isso parece indicativo de que o passo evolutivo de cada um destes conjuntos de caracteres e as pressões de seleção sobre cada um deles tenha sido muito distintas.

Essas informações sobre a incoerência de diversos tipos de dados taxonômicos e as variações obtidas para Pinus e Hymenaea sugerem que deva se olhar mais atentamente as variações que também possam existir em outros grupos. É provável que esta variação seja mais frequente do que se supunha até o momento, podendo ocorrer em outros grupos. A razão pela qual não existem outros trabalhos que registrem variabilidade semelhante para outros grupos de plantas pode se dever a:

1) Os trabalhos feitos com separação de proteínas de sementes frequentemente são realizados com plantas cultivadas possivelmente apresentando uma variabilidade genética menor do que plantas "selvagens" sendo que várias destas plantas cultivadas são autocompatíveis. Portanto com pouca ou quase nenhuma fecundação cruzada .

2) Muitos dos trabalhos não investigam a variabilidade entre sementes devido às sementes serem muito pequenas e não fornecerem material suficiente para análise. É comum nestes trabalhos usar extratos preparados com farinha de várias sementes (extratos "bulk").

3) Como acredita-se que proteínas de reserva sejam pouco variáveis dentro de uma espécie, não se espera muita variação entre sementes da mesma planta e/ou mesma população e se misturam as sementes.

A variação que foi observada em muitos trabalhos é bem menor que a obtida neste estudo. Normalmente, em outros estudos, poucas bandas protéicas variam e de maneira geral a variação observada parece envolver dois ou poucos alelos a mais, em um ou poucos mais loci em populações distintas. No caso de Hymenaea o tipo de padrões obtidos e frequência dos mesmos sugere uma herança genética, mas cujo mecanismo é complexo. Entretanto faltam trabalhos de cruzamento que possibilitem a interpretação destes padrões.

Resumo

Com o intuito de estudar e comparar a variação em proteínas de sementes foram analisadas as proteínas de reserva de 10 taxa (7 espécies e 3 variedades) de Hymenaea L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, tribo Detarieae). As espécies e variedades estudadas foram: H. courbaril (variedades: courbaril, stilbocarpa, subsessilis e altissima), H. stigonocarpa, H. martiana, H. intermedia, H. parvifolia, H. aurea e H. oblongifolia.

O método empregado na separação de proteínas foi eletroforese em gel de acrilamida com SDS e com B mercaptoetanol.

Foram consistentemente reconhecidas 31 bandas protéicas.

Constatou-se a presença de uma variação muito grande de padrões protéicos dentro das espécies - sementes de um mesmo fruto frequentemente apresentam padrões protéicos distintos, e dentro e entre indivíduos de uma mesma população, extensa variação foi encontrada.

Por outro lado, padrões idênticos foram encontrados entre sementes de populações distintas e mesmo de espécies diferentes.

A variação infraespecífica não está correlacionada com distribuição geográfica e não houve qualquer evidência de separação de variedades da mesma espécie.

A variação interespecífica foi menor do que a variação infraespecífica e, em geral, bandas características de uma única espécie não foram observadas.

Análises de agrupamentos de sementes individuais usando o coeficiente de Jaccard, não evidenciaram a separação de grupos

naturais e frequentemente encontrou-se indivíduos de diversas espécies misturados no mesmo grupo.

As análises de frequência de ocorrência das bandas sugerem algumas afinidades entre as espécies, mas a falta de amostras comparáveis não permitiu uma análise mais aprofundada.

A variação observada parece ter uma base genética mas não foi elucidado o mecanismo de herança. Entretanto este mecanismo parece ser complexo. Os possíveis fatores responsáveis pela manutenção desta variabilidade foram discutidos.

Neste gênero padrões protéicos obtidos com geis de SDS, não parecem ter grande utilidade ao nível de comparações infragenéricas, mas potencialmente forneceria uma ferramenta valiosa para estudos da variação populacional infraespecífica.

Face à extrema variação observada em Hymenaea sugere-se que este método deva ser empregado com cautela em estudos taxonômicos.

Summary

Variation in seed protein composition was studied in 10 taxa (7 species and 3 varieties) of the genus Hymenaea L. (Leguminosae, Caesalpinoideae, tribe Detarieae). The species and varieties included were H. courbaril (varieties courbaril, stilbocarpa, subsessilis and altissima), H. stigonocarpa, H. martiana, H. intermedia, H. parvifolia, H. aurea and H. oblongifolia.

The technique used was electrophoresis in acrylamide gel in the presence of SDS and B - mercaptoethanol.

In all, 31 protein bands could be detected and recognized consistently.

Extensive intraspecific variation in band patterns was encountered, with seeds from a single fruit often showing quite distinct patterns, and with considerable variation within and between individuals in the same population.

On the other hand, identical patterns were found in seeds originating in different populations and even from different species.

Intraspecific variation was apparently not correlated with geographical distribution, and there was no evidence for separation of varieties within a species.

Interspecific variation was less extensive than intraspecific variation, and, in general, bands exclusive to a single species were very rare.

Cluster analysis of individual seed patterns using the Jaccard coefficient and various clustering methods did not produce natural groups, and resulted in heterogeneous assemblages which united individuals from several species.

Analyses of the frequencies of occurrence of the bands suggested some affinities between the species, but lack of comparable samples for each species made it difficult to interpret the results.

The variation observed appears to be genetically determined, but the exact mechanism is not known, and seems to be quite complex. Possible factors responsible for the maintenance of this high level of variation were discussed.

Protein patterns obtained from SDS gel electrophoresis do not appear to be very useful for taxonomic studies at interspecific or infrageneric level in this genus, but may offer a very useful system for studies of genetic variation at population level.

Contrary to suggestions that SDS gels should show less variation than isoenzyme systems, and be more useful for taxonomic studies, the extensive variation observed in Hymenaea seed proteins shows that these methods should be employed cautiously, and that tests for intraspecific variation must always be made.

BIBLIOGRAFIA

- Aitschul, A.M., Yatsu, L.Y., Ory, R.L. & Engleman, M. 1966. Seed Proteins. Ann. Rev. Plant. Physiol. 17:113-136.
- Andrews, A.T. 1981. Electrophoresis: theory, techniques and biochemical and clinical applications. Clarendon Press, Oxford. 326p.
- Arrhenius, S.P. & Langenheim, J.H.L. 1983. Inhibitory effects of Hymenaea & Copaifera leaf resins on the leaf fungus, Pestalotia subcuticularis. Biol. Syst. Ecol. 11 (4):361-366.
- Avise, J.C. 1974. Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zool. 23 (4):465-481.
- Basha, S.M.M. & Beevers, L. 1976. Glycoprotein metabolism in the cotyledons of Pisum sativum during development and germination. Plant Physiol. 57:93-97.
- Bawa, K.S. 1974. Breeding systems of tree species of lowland tropical community. Evolution 28 (1):85-92.
- Beck, S.D. & Reese, J.C. 1976. Insect-plant interactions: nutrition and metabolism. In Biochemical interaction between plants and insects. (Wallace, J.W. & Mansell, R. ed.) Plenum Press, New York. pp 41-
- Bell, E.A. 1978. Toxins in Seeds. In Biochemical aspects of plant and animal coevolution. (Harborne, J.B. ed.) Academic Press. London. pp 143-161.
- Bisby, F.A. & Nicholls, K.W. 1977. Effects of varying character definitions on classification of Genisteae (Leguminosae). Bot.

J. Linn. Soc. 74:97-121.

Boulter, D. 1980. The Evaluation of present results and future possibilities of the use of amino acid sequence data in Phylogenetic studies with specific reference to plant protein. In Chemosystematics: Principles and practice. (Bisby, F.A., Vaughan, J.G. & Wright, C.A. ed.). Academic Press. London, New York. pp 235-240.

Boulter, D. 1983. Plant protein sequence data revisited. In Proteins and nucleic acids in plant systematics. (Jensen, U. & Fairbrothers, D.E. ed). Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. pp 119-123.

Boulter, D. & Derbyshire, E. 1971. Taxonomic aspects of the structure of legume proteins. In Chemotaxonomy of the Leguminosae. (Harborne, J.B., Boulter, D., Turner, B.L. ed). Academic Press. London, New York. pp 285-308.

Boulter, D., Thurman, D.A., Derbyshire, E. 1967. A disc electrophoretic study of globulin proteins of legume seeds with reference to their systematics. New Phytol. 66: 27-36.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72:248-254.

Cerami, A., Vlassara, H. & Brownlee, M. 1987. Glucose and Aging. Sci. Amer. 256 (5):82-88.

Coley, P.D. 1986. Costs and benefits of defense by tannins in a neotropical tree. Oecologia. 70:238-241.

Crawford, D.J. 1974. Variation in seed protein of Chenopodium incanum. Bull. Torrey Bot. Club. 101 (2):77.

- Crawford, D.J. & Giannasi, D.E. 1982. Plant Chemosystematics. BioScience. 32 (2):114-124.
- Cunningham, A., Gay, I.D., Oehlschlager, A.C. & Langenheim, J.H. 1983. ^{13}C NMR and IR analyses of structure, aging and botanical origin of Dominican and Mexican ambers. Phytochemistry. 22 (4):965-968.
- Derbyshire, E., Wright, D.J. & Boulter, D. 1976. Legumin and vicilin storage proteins of legume seeds. Phytochemistry. 15:3-24.
- Derbyshire, D., Muller, H.P., Carvalho, M.T.V., Crocomo, O.J. 1981. Protein profiles of brasilian beans (Phaseolus vulgaris) obtained by electrophoresis in slab polyacrilamide gels. Energ. Nucl. Agric, Piracicaba. 3 (2):100-109.
- Dickerson, R. 1980. Cytochrome c and the evolution of energy metabolism. Sci. Amer. 242 (3):99-110.
- Doll, H. & Brown, A.H.D. 1979. Hordein variation in wild (Hordeum spontaneum) and cultivated (H. vulgare) barley. Can. J. Cytol. 21:391-404.
- Dunn, G. & Everitt, B.S. 1982. An introduction to mathematical taxonomy. Cambridge University Press, Cambridge. 152p.
- Eaton-Mordas, C.A. & Moore, K.G. 1978. Seed glycoproteins of Lupinus angustifolius. Phytochemistry 17:619-621.
- Etzler, M.E. 1985. Plant lectins: molecular and biological aspects. Ann. Rev. Plant Physiol. 36:209-234.
- Faegri, K. & van der Pijl, L. 1979. Principles of pollination ecology. 3^o ed revisada. Pergamon Press. Oxford. 244p

- Fairbrothers, D.E., Mabry, T.J., Scogin, R.L. & Turner, B.L. 1975. The bases of Angiosperm phylogeny: chemotaxonomy. Ann. Missouri Bot. Gard. 62:765-800.
- Feeny, P. 1970. Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. Ecology. 51 (4):565-581.
- Feeny, P. 1976. Plant apparency and chemical defense. In Biochemical interaction between plants and insects. (Wallace, J.W. & Mansell, R. ed.). Plenum Press. New York. pp 1-39.
- Ferguson, A. 1980. Biochemical systematics and evolution. Blackie. Glasgow, London. 194p.
- Finne, J. & Krusius, T. 1982. Preparation and fractionation of glycopeptides. Methods in Enzymology. 83:269-277.
- Gáal, D, Medgyesi, G.A., Vereczkey, L. 1980. Electrophoresis in separation of biological macromolecules. Wiley Interscience Publication. Chichester, New York. 422p.
- Gill, D.E. 1986. Individual plants as genetic mosaics: Ecological organisms versus evolutionary individuals. In Plant Ecology. (Crawley, M.J.). Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburgh. pp 321-343.
- Gill, D.E. & Haverson, T.G. 1984. Fitness variation among branches within trees. In Evolutionary Ecology: 23rd symposium of the British Ecological Society, Leeds 1982. (Shorrocks, B. ed) Blackwell Scientific Publications. Oxford. London, Edinburgh. pp 105-116.
- Gray, J.C. 1980. Fraction I Protein and Plant Phylogeny. In Chemosystematics: Principle and practice. (Bisby, F.A., Vaug-

- han, J.G. & Wright, C.A. ed.). Academic Press. London, New York. pp 167-193.
- Gutfreund, H. 1981. Some problems in molecular evolution. In Biochemical evolution. (Gutfreund, H. ed.) Cambridge. London, New York. pp 1-14.
- Harris, J.A. & Bisby, F.A. 1980. Classification from chemical data. In Chemosystematics: principle and practice. (Bisby, F.A., Vaughan, J.G., Wright, C.A. ed.). Academic Press. London, New York. pp 305-327.
- Heithaus, E.R., Fleming, T.H. & Opler, P.A. 1975. Foraging patterns and resource utilization in seven species of bats in seasonal tropical forest. Ecology 56:841-854.
- Halversen, O.v. & Reyer, H.U. 1984. Nectar intake and energy expenditure in a flower visiting bat. Oecologia 63:178-184.
- Heringer, E.P. 1971. Propagação e sucessão de espécies arbóreas do Cerrado em função do fogo, do cupim, da capina e do Aldrim (inseticida). In III Simpósio sobre o Cerrado. (Ferri, M. coord.). Editora Edgar Blucher Ltda., EDUSP. São Paulo. pp 167-174.
- Higgins, T.J.V. 1984. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. Ann. Rev. Plant Physiol. 35:191-221.
- Howell, D.J. 1979. Flock foraging in nectar-feeding bats: advantages to the bats and to host plants. Amer. Natur. 114:23-49.
- Janzen, D.H. 1970. Herbivores and the number of tree species in tropical forests. Amer. Natur. 104 (940):501-528.
- Janzen, D.H. 1973. Community structure of secondary compounds in plants. Pure Appl. Chem. 34 (3/4):529-538.

- Janzen, D.H. 1978. The ecology and evolutionary biology of seed chemistry as relates to seed predation. In Biochemical aspects of plant and animal coevolution. (Harborne, J.B. ed). Academic Press. London. pp 163-206.
- Janzen, D.H. 1981. The defenses of legumes against herbivores. In Advances in Legume Systematics: International Legume Conference. (Polhill, R.M. & Raven, P.H. ed). vol 2. Royal Botanic Gardens, Kew. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. pp 951-977.
- Jensen, U. & Grumpe, B. 1983. Seed storage proteins. In Proteins and nucleic acids in plant systematics. (Jensen. U. & Fairbrothers, D.E. ed.). Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. pp 238-254.
- Jong, W.W.de, Zweers, A. & Cohen, L.H. 1978. Influence of single amino acid substitution on electrophoretic mobility of Sodium Dodecil Sulfate- protein complexes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 82 (2)532-539.
- Kim, S.I. & Mossé, J. 1979. Electrophoretic patterns of oat prolamines and species relationships in Avena. Can. J. Genet. Cytol. 21:309-318.
- Kimura, M. 1979. The neutral theory of molecular evolution. Sci. Amer. 241 (5):94-104.
- Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press. Cambridge. 367p.
- King, J.L. & Jukes, T. 1969. Non-Darwinian evolution. Science. 164:788-798.

- Lacks, S., Springhorn, S.S. & Rosenthal, A.L. 1979. Effect of the composition of Sodium Dodecil Sulfate preparations on renaturation of enzymes after polyacrilamide gel electrophoresis. Analyt. Biochem. 100:357-363.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of Bacteriophage T₄. Nature. 227:680-685.
- Landzinsky, G. & Hymowitz, T. 1979. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. Theor. Appl. Genet. 54:145-151.
- Langenheim, J.H. 1967. Preliminary investigations of Hymenaea courbaril as resin producer. Journal of the Arnold Arboretum. 48 (3):203-227.
- Langenheim, J.H. 1973. Leguminous resin-producing trees in Africa and South America. In Tropical forest ecosystems in Africa and South America: a comparative review. (Meggers, B.J., Ayensu, E.S. & Duckworth, W.D. ed.). Smithsonian Press. Washington, DC. pp 89-104.
- Langenheim, J.H. 1981. Terpenoids in Leguminosae. In Advances in Legume Systematics. (Polhill, R.M. & Raven, P.H. ed.). vol 2 Proceedings of the International Legume Conference, Kew. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, England. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. pp 627-655.
- Langenheim, J.H. & Lee, Y.T. 1974. Reinstatement of the genus Hymenaea (Leguminosae: Caesalpinioideae) in Africa. Brittonia. 26 (1):3-21.
- Langenheim, J.H. & Hall, G.D. 1983. Sesquiterpene deterrence of a leaf-tying lepto-pteran, Stemona ferrocanelia, on Hymenaea

- stigonocarpa in Central Brazil. Biochem. Syst. Ecol. 11 (1):29-36.
- Langenheim, J.H. & Stubblebine, W.H. 1983. Variation in leaf resin composition between parent tree and progeny in Hymenaea: Implications for herbivory in humid tropics. Biochem. Syst. Ecol. 11 (2):97-106.
- Langenheim, J.H., Stubblebine, W.H., Foster, C. & Nascimento, J.C. 1977. Estudos comparativos da variabilidade na composição da resina da folha entre árvore parental e progênie de espécies selecionadas de Hymenaea. Acta Amazon. 7 (3):335-354.
- Langenheim, J.H., Stubblebine, W.H., Lincoln, D.E. & Foster, C.G. 1978. Implications of variation in resin composition among organs, tissues and populations in the tropical legume Hymenaea. Biochem. Syst. Ecol. 6:299-313.
- Langenheim, J.H., Foster, C.E. & McGinley, R.B. 1980. Inhibitory effects of different quantitative compositions of Hymenaea leaf resins, on generalist herbivore Spodoptera exigua. Biochem. Syst. Ecol. 8:385-396.
- Langenheim, J.H., Arrhenius, S.P. & Nascimento, J.C.. 1981. Relationship of light intensity to leaf resin composition and yield in tropical leguminous genera Hymenaea and Copaifera. Biochem. Syst. Ecol. 9 (1):27-37.
- Langenheim, J.H., Lincoln, D.E., Stubblebine, W.H. & Gabrielli, A.C. 1982. Evolutionary implications of leaf resin pocket patterns in tropical tree Hymenaea (Caesalpinioideae: Leguminosae). Amer. J. Bot. 69 (4):595-607.

- Langenheim, J.H., Convis, C.L., Macedo, C.A. & Stubblebine, W.H. 1986 (a). Hymenaea and Copaifera leaf sesquiterpenes in relation to lepidopteran herbivory in Southern Brazil. Biochem. Syst. Ecol. 14 (1):41-49.
- Langenheim, J.H., Macedo, C.A., Ross, M.K. & Stubblebine, W.H. 1986 (b). Leaf development in tropical leguminous tree Copaifera in relation to microlepidopteran herbivory. Biochem. Syst. Ecol. 14 (1):51-59.
- Langridge, P., Moran, G.F. & Brown, A.D.H. 1981. Biochemical genetics of some seed proteins of Pinnus radiata. Biochem. Genet. 19 (5/6):585-597.
- Lemke, T.O. 1984. Foraging ecology of long-nosed bat, Glossophaga soricina, with respect to resource availability. Ecology. 65 (2):538-548.
- Lester, R.N., Roberts, P.A. & Lester, C. 1983. Analysis of immunotaxonomic data obtained from spur identification and absorption techniques. In Proteins and nucleic acids in plant systematics. (Jensen, U. & Fairbrothers, D.E. ed.). Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. pp 275-300.
- Levin, D.A. 1976. The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. Ann. Rev. Ecol. Syst. 7:121-159.
- Liener, I.E. 1979. Phytohemagglutinins. In Herbivores. Their interaction with secondary plant metabolites. (Rosenthal, G.A. & Janzen, D.H. ed.). Academic Press. New York, London. pp 567-598.
- Lis, H. & Sharon, N. 1973. Biochemistry of plant lectins (Phytohemagglutinins). Ann. Rev. Biochem. 42:541-574.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randal, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- Martin, S.S., Langenheim, J.H. & Zavarin, E. 1974. Quantitative variation in leaf pocket composition in Hymenaea courbaril. Biochem. Syst. Ecol. 2:75-87.
- Martin, S.S., Langenheim, J.H. & Zavarin, E. 1976. Quantitative variation in leaf pocket resin composition in Hymenaea. Biochem. Syst. Ecol. 4:181-191.
- Miège, J. 1975. Les protéines des graines en taxonomie et phylogénie végétales. In Les protéines des graines. Genèse, nature, fonctions, domaines d'application. (Miège, J. ed.). Genève. pp 305-365.
- Millerd, A. 1975. Biochemistry of legume seed proteins. Ann. Rev. Physiol. 26:53-72.
- Olsnes, S., Haylett, T. & Sandvig, K. 1982. The toxic lectin modeccin. Methods Enzymol. 83:357-362.
- Peterson, G.L. 1979. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. Analytical Biochemistry. 100:201-220.
- Pimentel, D. & Bellotti, A.C. 1976. Parasite-host population systems and genetic stability. Amer. Natur. 110 (975):877-888.
- Pimentel, D. 1984. Genetic diversity and stability in parasite-host systems. In Evolutionary Ecology: the 23rd Symposium of the British Ecological Society Leeds 1982. (Shorrocks, B. ed.). Blackwell Sci Publ. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne. pp 295-311.

- Préaux, G. & Lontie, R. 1975. The proteins of barley. In The chemistry and Biochemistry of plant proteins. (Harborne, J.B. & van Sumere, C.F. ed.) Academic Press. New York, London.
- Palzbal, A., Croy, R.R.D., Grant, G. & Stewart, J.C. 1983. Seed proteins: distribution, location and biological role. In Seed Proteins. (Daussant, J., Mossé, J., Vaughan, J. ed). Academic Press, London, New York. pp 53-81.
- Ricklefs, R.E. 1979. Ecology. Chiron Prss, Incorporated. New York & Concord. 966p.
- Rizzini, C.T. 1971. Aspectos ecológicos da regeneração em algumas plantas do cerrado. In III Simpósio sobre o cerrado. (Ferreira, M. coord.). Edgar Blucher Editora Ltda. EDUSP. pp 61-64.
- Rizzini, C.T. 1976. Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos. vol 1. "Hucitec", EDUSP. São Paulo. 327p.
- Rizzini, C.T. 1979. Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos sociológicos e florísticos. vol 2. "Hucitec" Ltda., EDUSP. São Paulo. 374p.
- Rosenthal, G.A., Dahlman, D.L. & Janzen, D.H. 1976. A novel means for dealing with L-Canavaline, a toxic metabolite. Science 192:256-258.
- Scopes, R.K. 1982. Protein purification. Springer-Verlag. New York, Heidelberg, Berlin. 282p.
- Selander, R.K. 1978. Genetic variation in natural populations. In Molecular Evolution. (Ayala, F. ed.). Sinauer Associates, inc. Publishers. Sunderland, Massachussets. pp 21-45.
- Smith, M.J. 1970. Population size, polymorphism and the rate of non-Darwinian evolution. Amer. Natur. 104 (937):231-237.

- Smith, P.M. 1976. The chemotaxonomy of plants. Edward Arnold (Publishers) Limited. 313p.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. 1973. Numerical taxonomy. W.H. Freeman and Company. San Francisco. 572p.
- Soulé, M. 1978. Allozyme variation: its determinants in space and time. In Molecular Evolution. (Ayala, F.J. ed.). Sinauer Associates, inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. pp60-77.
- Stegemann, H. 1975. Properties of and physiological changes in storage proteins. In The chemistry and biochemistry of plant proteins. (Harborne, J.B. & van Sumere, C.F. ed.). Academic Press. New York, London. pp 71-88.
- Stegemann, H., Francksen, H. & Macko, V. 1973. Potato proteins: genetic and physiological changes, evaluated by one and two - dimensional PAA-Gel-Techniques. Z. Naturforsch. 28c:722-732.
- Stubblebine, W.H. & Langenheim, J.H. 1977. Effects of Hymenaea courbaril leaf resin on generalist herbivore Spodoptera exigua (beet armyworm). J. Chem. Ecol. 3 (6):633-647.
- Stubblebine, W.H. & Langenheim, J.H. 1980. Estudos comparativos da variabilidade na composição de resina da folha entre árvore parental e progênie de espécies selecionadas de Hymenaea L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, tribo Detarieae). Acta Amazôn. 10 (2):293-309.
- Stubblebine, W.H., Langenheim, J.H. & Lincoln, D. 1975. Vegetative growth and leaf resin composition in Hymenaea courbaril under photoperiodic extremes. Biochem. Syst. Ecol. 3:219-228.

- Stubblebine, W.H., Langenheim, J.H. & Lincoln, D. 1978. Vegetative response to photoperiod in tropical leguminous tree Hymenaea courbaril L. Biotropica. 10 (1):18-29.
- Herland, W. & Watkinson, A.R. 1986. Do plants evolve differently ? Nature. 370:305.
- Thorpe, J. 1982. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 13:139-168.
- Toms, G.C. & Western, A.- 1971. Phytohemagglutinins. In Chemotaxonomy of the Leguminosae. Academic Press. London, New York. pp367-462.
- Toms, G.C. 1981. Lectins in Leguminosae. In Advances in Legume Systematics. vol 2 Proceedings of the International Legume Conference. (Polhill, R.M. & Raven, P.H. ed). Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, England. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. pp 561-577.
- Vaughan, J.G. 1975. Proteins and taxonomy. In The chemistry and biochemistry of plant proteins. (Harborne, J.B. & van Sumere, C.F. ed.). Academic Press. New York, London. pp 281-298.
- Vaughan, J.G. 1983. The use of proteins in taxonomy and phylogeny. In Seed Proteins. (Daussant, J. & Vaughan, J. ed.). Academic Press. London, New York. pp 135-153.
- Weber, K. & Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by Sodium Dodecil Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244 (16):4406-4412.
- Weber, K., Pringle, J.R. & Osborn, M. 1972. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-Acrylamide gel. Met-

hods Enzymol. 26c:3-27.

Williams, B. & Wilson, K. 1979. Chromatographic techniques. In Principles and techniques of practical biochemistry. (Williams, B. & Wilson, K. ed.) Edward Arnold (Publishers) Limited. pp 52-98.

Wilson, A.C., Steven, S.C. & White, T.J. 1977. Biochemical evolution. Ann. Rev. Biochem. 46:573-639.

Winterhalter, K.H. 1981. Determination of glycosylated hemoglobins. Methods Enzymol. 76:732-739.

Whittaker, R.H. & Feeny, P.P. 1971. Allelochemicals: chemical interactions between species. Science 171:757-770.

Zuckerkindl, E. & Pauling, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. J. Theor. Biol. 8:357-366.