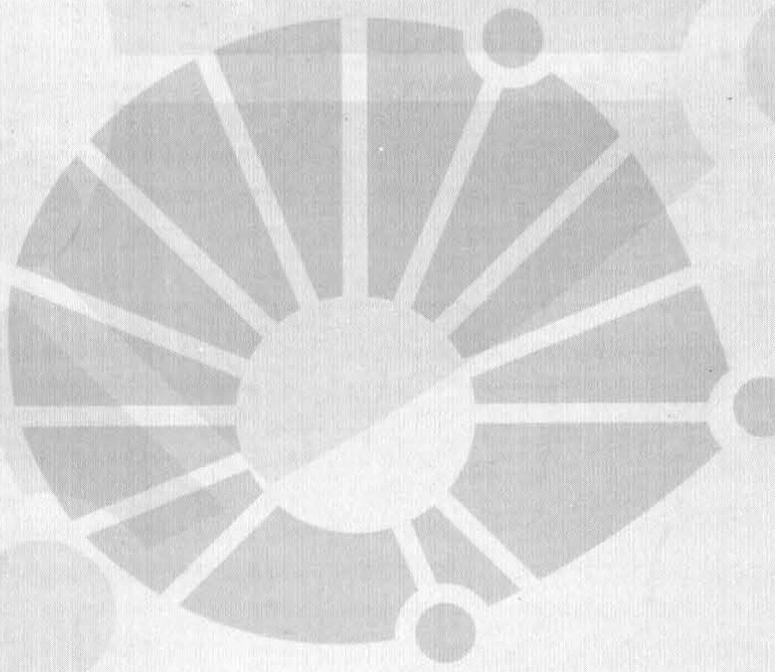


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/44621

IB/ 81639



UNICAMP

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

F226v



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Juliana Sampaio Farinaci

VARIABILIDADE GENÉTICA EM ALGUMAS ESPÉCIES DE *BULBOPHYLLUM*

ORCHIDS (ORCHIDACEAE) DE CAMPOS RUPESTRES

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) *Juliana Sampaio Farinaci* e aprovada pela Comissão Julgadora *Prof. Vera Nisaka Solferini* 16/03/2001

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Vegetal e Melhoramento

Orientadora: Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini

Co-orientador: Prof. Dr. João Semir

2001

1



UNIDADE	IB/85633	
N.º CHAMADA:	TUNICAMP	
	F226v	
V.	Ex	
TOMBO BC/	44621	
PROC.	16-392101	
C	<input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00	
DATA	18/05/01	
N.º CPD		

CM00156301-5

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

Farinaci, Juliana Sampaio
F226v Variabilidade genética em algumas espécies *Bulbophyllum*
 Thouars(Orchidaceae) de campos rupestres /Juliana Sampaio
 Farinaci. - - Campinas, SP.[s.n.], 2001.
 58f: ilus.

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

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

Campinas, 16 de março de 2001

BANCA EXAMINADORA

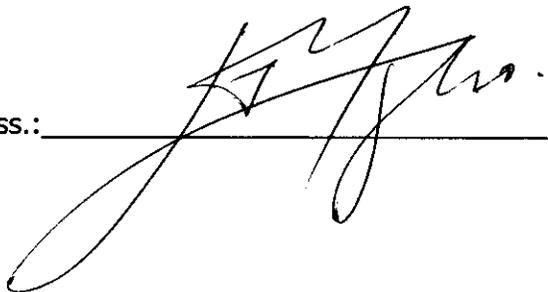
Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini
(Orientadora)

Ass.: Vera Nisaka Solferini

Prof. Dr. George John Shepherd

Ass.: 

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko

Ass.: 

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins

Ass.: _____

A meus pais e meu irmão

AGRADECIMENTOS

À FAPESP por ter me concedido a bolsa (Proc. nº 98/06541-1) e financiamento ao projeto de orquídeas miiófilas (Proc. nº 97/08795-8).

À Vera Nisaka Solferini, minha orientadora, que me acolheu e muito me ensinou sobre a Genética e, sobretudo, sobre muitas outras coisas da vida.

Agradeço imensamente ao Eduardo L. Borba, em primeiro lugar, por sua amizade, por ter-me apresentado às orquídeas de campos rupestres e por dividir e compartilhar comigo seus conhecimentos e suas idéias sobre elas. Também por ter coletado e cedido grande parte das plantas que foram utilizadas. Além disso, agradeço a ele pelas fotos e material bibliográfico cedidos.

Ao Prof. Dr. João Semir, por ter me dado a honra de tê-lo como co-orientador.

Aos Professores Louis Bernard Klaczko, Gorge Shepherd e Vera Solferini pois, além de terem sido meus melhores professores desde a graduação(e justamente por isso), me deram a alegria de estarem juntos compondo minha Banca Examinadora.

Aos Professores Eliana Martins, George Shepherd e Julie Dutilh, por sua colaboração na fase de pré-banca.

Aos queridos Sergio Teixeira, Mariana Mansanares e Veridiana Vaccarelli, que estiveram presentes, incondicionalmente, nos momentos mais difíceis.

Aos colegas de laboratório: Sônia, Flávia Fuchs, Flávia Munin, Karla, Juliana Felix, Juliana José, Veridiana, Fabiana, Tiago, Bruno, Tibúrcio, Tereza, Teresa e Aluana.

À Profa. Dra. Eliana Martins, que permitiu meu acesso ao Laboratório de Biossistemática (Depto. de Botânica) e às que lá me ajudaram: Mariana, Iara e Júlia.

À Dra. Cecília A. F. Pinto Maglio , Centro de Genética, IAC - Campinas, pela gentileza, simpatia e toda a ajuda com a parte de citogenética.

Ao Prof. Dr. Roland Vencovsky e Luciana Carlini, da ESALQ/USP, pela boa vontade e colaboração.

Ao Cássio Van den Berg, pelas indicações de locais de coleta e material bibliográfico.

Àqueles que de alguma forma me ajudaram no trabalho de campo: Eduardo, Veridiana, Julie, Márcio Lucca, Karla, Tibúrcio, Bruno, Alessandra (de Juiz de Fora) e Juliana Felix.

Ao Tibúrcio e ao Tiago, pela assessoria em informática.

Ao pessoal que ajudou a 'plantar' os indivíduos após as coletas: Marisa, Angela, Edu, Ju Felix e Lidyanne (e aos que, com certeza, esqueci).

Ao Sr. Pedro, por tratar com tanto carinho das 'minhas' plantinhas (além das laranjas, chuchus, jabuticabas, queijos, etc.).

Ao Herbert, pela sua ajuda como técnico de laboratório, motorista e auxiliar de campo (e por encontrar as cobras antes que elas me encontrassem).

Às secretárias do Depto. de Genética e Evolução: Ana Rita, Patrícia e Zaira.

Aos amigos da Ruberlei: Carlos, Ricardo, Flávia, Marisa, Angela e Simone.

À Lílian Coelho, psicóloga do SAPPE, por ter ajudado a evitar que eu enlaoquecesse.

À D.Marlene, mãe do Edu, pela hospedagem em B.H. e à Alessandra e suas tias, pela hospedagem em Juiz de Fora.

Ao pessoal do Parque Florestal Quedas de Rio Bonito, em Lavras, por ter autorizado a coleta no local.

A todos aqueles cujos nomes não serão citados, mas que muito ajudaram pelo simples fato de serem meus amigos.



SUMÁRIO

Lista de Figuras	IX
Lista de Tabelas	IX
Resumo	X
Abstract	XI
Introdução	1
Objetivos	11
Materiais e Métodos	12
Coletas	12
Variabilidade Genética	16
Citogenética	19
Resultados	20
Variabilidade Genética	20
Citogenética	28
Discussão	30
Conclusões Gerais	38
Referências Bibliográficas	40
Apêndice - protocolos de revelação dos sistemas enzimáticos	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Aspecto geral dos campos rupestres.	2
Figura 2.	Inflorescências de <i>Bulbophyllum involutum</i> , <i>B. weddellii</i> e <i>B. ipanemense</i> .	5
Figura 3.	Indivíduo de <i>B. weddellii</i> num afloramento rochoso.	7
Figura 4.	Polinizador numa flor de <i>Bulbophyllum ipanemense</i> .	7
Figura 5.	Pontos de coleta	14
Figura 6.	Géis de eletroforese	24
Figura 7.	Dendrograma representativo das similaridades genéticas em <i>Bulbophyllum ipanemense</i> e <i>B. weddellii</i> .	26
Figura 8.	Representação gráfica das frequências gênicas nos locos <u>MDH1</u> e <u>PGI2</u>	27
Figura 9.	Metáfases mitóticas.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Identificação, localização geográfica e número de indivíduos das populações de <i>Bulbophyllum</i> coletadas.	15
Tabela 2.	Sistemas enzimáticos testados nas diferentes condições de corrida.	18
Tabela 3.	Variabilidade genética em 8 locos enzimáticos.	23
Tabela 4.	Frequências alélicas nos 8 locos para as 5 amostras de <i>Bulbophyllum</i> estudadas.	25
Tabela 5.	Matriz de coeficientes de similaridade e/ou distância genética.	26

RESUMO

Bulbophyllum ipanemense, *B. involutum* e *B. weddellii* são orquídeas de campos rupestres que crescem diretamente sobre as rochas e são polinizadas por fêmeas de *Pholeomyia* (Diptera: Milichidae). Dezesesseis amostras destas espécies, coletadas em diferentes localidades nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Bahia foram analisadas citogeneticamente. Somente cinco destas amostras apresentaram-se constituídas por indivíduos diplóides, com $2n=38$, sendo as demais possivelmente poliplóides, com $2n=ca.72$. As amostras diplóides foram analisadas quanto à estruturação e variabilidade genéticas através de eletroforese de isozimas utilizando oito locos enzimáticos. Foi encontrado grande polimorfismo enzimático e alta variabilidade genética (H_e entre 36,9% e 49,7%). O valor de F_{ST} ($=0,0524$) para *B.ipanemense* indica uma estruturação genética moderada, mas que não deve ser negligenciada. Estes resultados não são esperados em espécies de distribuição disjunta, cujos polinizadores são pequenos insetos que, julga-se, não sejam capazes de voar longas distâncias. Assim, a alta homogeneidade genética entre as amostras estudadas sugere que a dispersão de sementes nestas espécies deve ser um fator mais importante na manutenção do fluxo gênico do que geralmente se julga. Também é possível que amostras de diferentes localidades estejam sujeitas a diferentes pressões seletivas, pois o fluxo gênico não é totalmente livre, mesmo entre amostras de localidades bastante próximas. Isto indica que as amostras locais devem de fato representar populações distintas. A comparação com outro trabalho realizado com orquídeas também rupícolas e miiófilas de campos rupestres indica que a alta variabilidade encontrada pode estar relacionada às características ecológicas comuns a estas plantas. A alta incidência de indivíduos poliplóides sugere que esta possa ser uma característica com algum valor adaptativo no ambiente que estas plantas ocupam.

ABSTRACT

Bulbophyllum ipanemense, *B. involutum* and *B. weddellii* are orchids from 'campos rupestres' that grow directly on rocks and are pollinated by *Pholeomyia* (Diptera: Milichidae) females. Sixteen samples of these plants, collected in different localities in Minas Gerais, São Paulo and Bahia were analyzed cytogenetically. Only five out of these sixteen samples were constituted by diploid individuals, with $2n=38$. The other samples have putative polyploids, with $2n=ca.72$. Eight loci were studied in the diploid samples through isozyme electrophoresis. Genetic variability was high, with great enzymatic polymorphism and H_e between 36.9% and 49.7%. The F_{ST} score ($=0.0524$) in *B.ipanemense* suggests moderate, but not negligible, genetic structure. These results were not expected for species with disjunct distribution whose pollinators are small insects, as they are not supposed to be able to fly great distances. Therefore, genetic homogeneity shown by the studied samples suggests that seed dispersal might be more important for gene flow maintenance than it is generally thought. As gene flow is not completely free, even between samples from rather close localities, it is also possible that the different localities are exposed to different selective pressures. This indicates that the local samples may actually represent distinct populations. Comparison with similar results from another study of rupicolous and fly-pollinated orchids from 'campos rupestres' indicates that the high genetic variability may be related to the ecological features that these plants have in common. The high incidence of polyploids in *Bulbophyllum* may suggest some relation between polyploidization and fitness.

1. INTRODUÇÃO

Os campos rupestres são ambientes que ocorrem em regiões montanhosas do Brasil, acima de 900m de altitude, podendo ser encontrados principalmente nos Estados de Minas Gerais e Bahia. Estes ambientes são caracterizados por solo raso e arenoso com presença de numerosos afloramentos rochosos (Figura 1) de tamanho variável. A vegetação é herbácea e sub-arbustiva, crescendo tanto sobre as rochas nuas (espécies rupícolas, epilíticas ou saxícolas) como em solo arenoso ou em solo de rochas recém-decompostas. As regiões montanhosas em que ocorrem os campos rupestres são descontínuas e as espécies vegetais apresentam-se em populações disjuntas (Giulietti e Pirani, 1988). Em espécies cujas populações estão geograficamente subdivididas, a troca de genes entre indivíduos pertencentes a uma mesma população local é mais provável do que entre indivíduos de diferentes localidades. Desta forma, as frequências gênicas podem diferir de uma população para outra, efeito que é chamado estruturação genética (Hartl e Clark, 1997). Nos campos rupestres, os afloramentos rochosos podem ser comparados a ilhas, de modo que podem ocorrer barreiras que diminuem ou até impeçam totalmente o fluxo gênico entre populações de espécies vegetais restritas a eles (Harley, 1995). Assim, é esperado que em espécies deste tipo de ambiente haja aumento dos efeitos de deriva genética e a endogamia possa ser mais freqüente. Conseqüentemente, haveria perda de variabilidade genética intrapopulacional e aumento na divergência entre populações de uma mesma espécie (Hartl e Clark, 1997). Isto, associado à instabilidade climática e a um processo alternado de expansão e fragmentação do habitat, possivelmente causa o alto grau de endemismo observado nestas regiões (Giulietti e Pirani, 1988).



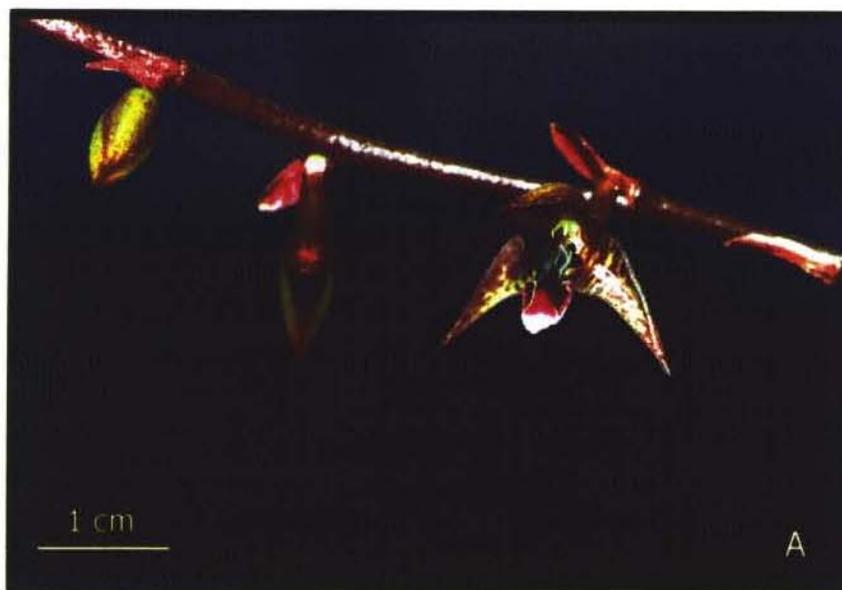
Figura 1: Aspecto geral dos campos rupestres: afloramentos rochosos com vegetação característica (Serra do Cipó - Santana do Riacho, MG).

Devido à ausência de mobilidade das plantas, o sistema reprodutivo é um dos principais fatores que afetam a estrutura genética das espécies vegetais pois, se este sistema promover polinização entre indivíduos de populações distintas, também permitirá que os alelos sejam compartilhados entre elas, reduzindo a diferenciação interpopulacional (Loveless e Hamrick, 1984). Por outro lado, espécies que tenham agentes polinizadores ou dispersores com padrões de mobilidade restritos podem apresentar um baixo fluxo gênico entre as populações. Neste caso, pode haver aumento de endogamia com consequente redução na heterozigosidade, e deriva genética, provocando redução da variabilidade genética intrapopulacional com aumento da diferenciação interpopulacional (Loveless e Hamrick, 1984; Hamrick e Godt, 1990). Assim, o grau de estruturação genética pode ser influenciado também pelo padrão de forrageamento do polinizador, de acordo com seu hábito de visitar sempre as flores mais próximas, favorecendo a endogamia (algumas abelhas), ou de realizar vôos mais longos entre as visitas, favorecendo a polinização cruzada (geralmente beija-flores, borboletas ou morcegos, por exemplo) (Levin & Kerster, 1968; Schaal, 1980; Schmitt, 1980; Waser, 1980; Ellstrand e Marshall, 1985; Fenster, 1991; Godt e Hamrick, 1993).

As Orchidaceae formam uma das maiores e mais diversas famílias de monocotiledôneas. Nesta família, geralmente as espécies são autocompatíveis, mas a estrutura da flor apresenta adaptações que favorecem fortemente a polinização cruzada (Pijl e Dodson, 1966; Dressler, 1981). Nestas plantas o posicionamento da região estigmática em relação à polínia (massa compacta através do qual o pólen é transferido) diminui as chances de que ocorra fecundação sem a intervenção de um polinizador. Este sistema, portanto, é bastante flexível, pois um indivíduo isolado tem potencial para efetuar autopolinização, o que também pode ter grande importância na colonização de novos

locais (Pijl e Dodson, 1966). Considera-se que o isolamento reprodutivo em orquídeas é dado principalmente através da especificidade de polinizadores (Dressler, 1968; Paulus e Gack, 1990). Este fator não necessariamente estaria associado à incompatibilidade genética entre grupos de plantas taxonomicamente próximos, como espécies de um mesmo gênero (Pijl e Dodson, 1966).

O gênero *Bulbophyllum* Thouars, de distribuição pantropical, está entre os maiores da família Orchidaceae (ca. 1000 espécies) e concentra-se principalmente nos trópicos da Ásia e Oceania, sendo encontradas cerca de 55 espécies no Brasil (Pabst e Dungs, 1975, 1977). Neste gênero algumas espécies ocorrentes nos campos rupestres apresentam a morfologia de suas estruturas vegetativas extremamente semelhantes, o que dificulta a identificação taxonômica. Algumas populações, a princípio identificadas como *B. warmingianum* Cogn. ou *B. ipanemense* Hoehne, foram segregadas por Borba *et al.* (1998) como uma espécie nova, *B. involutum* Borba, Semir & F. Barros, com base em caracteres morfológicos, químicos e reprodutivos. Pertencentes ao mesmo grupo de espécies, *B. involutum* (Figura 2.A), *B. weddellii* (Lindl.) Rchb. f. (Figura 2.B) e *B. ipanemense* (Figura 2.C) compartilham características particularmente interessantes, pois são encontradas no mesmo tipo de habitat, possuem eventos fenológicos sincronizados e são miiófilas, sendo a polinização feita por diferentes espécies de dípteros do mesmo gênero (Borba e Semir, 1998). Apesar de ser pouco conhecido o comportamento dos insetos que polinizam estas espécies em particular, moscas freqüentemente apresentam padrões de movimento restritos e têm a característica de permanecer por um longo período de tempo na mesma flor e, muitas vezes, quando saem retornam rapidamente a ela (Loveless e Hamrick, 1984; Meve e Liede, 1994; Borba e Semir, 1999). Isto propiciaria baixo fluxo gênico entre populações, ao menos no que se



Fotos: E.L. Borba



Figura 2: Inflorescências de (A) *Bulbophyllum involutum*, (B) *B. weddellii* e (C) *B. ipanemense*.

refere à dispersão de pólen. No entanto, deve-se levar em conta que campos rupestres são áreas abertas sujeitas a ventos fortes, e é possível que as sementes sejam assim transportados por grandes distâncias.

Outra característica importante nestas espécies é que os indivíduos têm capacidade de sobreviver por tempo indeterminado propagando-se vegetativamente (Figura 3), o que pode aumentar as chances de produção de sementes viáveis ao longo do tempo.

Bulbophyllum ipanemense, *B. involutum* e *B. weddellii* ocorrem em afloramentos rochosos de campos rupestres principalmente em São Paulo, Minas Gerais e Bahia e apresentam hábito rupícola. *B. involutum* e *B. weddellii* ocorrem simpatricamente, ao longo da Cadeia do Espinhaço. Já *B. ipanemense* ocorre mais ao sul, desde a região de Juiz de Fora, MG (leste) à Serra da Canastra, MG (oeste), podendo ainda ser encontrada em algumas localidades no Estado de São Paulo e em Alto Paraíso, GO. Estas três espécies têm período de floração coincidente, estendendo-se de janeiro a julho, e sua polinização é feita exclusivamente por fêmeas de *Pholeomyia* (Diptera: Milichiidae) (Figura 4), provavelmente atraídas pelo odor e morfologia das flores, que mimetizam o local de oviposição (sapromiiofilia). Foi observada uma relação de especificidade, em que cada espécie de planta atrai espécies diferentes de polinizadores (Borba e Semir, 1998). Foi também observado por Borba *et al.* (1999), através de experimentos de polinização controlada, que as três espécies são autocompatíveis e não apresentam agamospermia, não parecendo, contudo, ocorrer autopolinização espontaneamente na natureza. Estes mesmos autores (Borba e Semir, 1999) descreveram um mecanismo que dificulta a autogamia em *B. involutum* e *B. ipanemense*, pois o polinário, logo após sua remoção, tem dimensões incompatíveis com a entrada da cavidade estigmática, possuindo quase o dobro do diâmetro desta. Nestas duas espécies, os polinizadores permanecem por algum



Foto: E.L. Borba

Figura 3: Indivíduo de *Bulbophyllum weddellii* num afloramento rochoso (Serra do Cipó - Santana do Riacho, MG). Observar os ramos de propagação vegetativa.



Foto: E.L. Borba

Figura 4: Polinizador numa flor de *Bulbophyllum ipanemense*. Fêmea de *Pholeomyia* sp. com o polinário aderido ao dorso do tórax.

tempo na mesma flor após retirar o polinário ou podem voar um pouco e logo retornar à mesma planta. Isto teoricamente facilitaria a ocorrência de autopolinização, não fosse o fato de que é necessário que se passem aproximadamente duas horas até que as polínias tenham desidratado o suficiente para que possam encaixar na cavidade estigmática da flor, a fim de realizar a polinização. Já em *B. weddellii* não ocorre este mecanismo, e o labelo atua como uma alavanca reagindo à pressão que o polinizador faz ao tentar se livrar da substância viscosa que envolve as polínias. Assim, o inseto, com o polinário aderido ao seu tórax, é lançado para fora da flor e não retorna mais a ela. Portanto, as três espécies apresentam barreiras que evitam a ocorrência de autopolinização, mas estes mecanismos estão relacionados ao comportamento do polinizador e não à incompatibilidade genética. Sabe-se também que a taxa de frutificação nas três espécies é baixa tanto na natureza quanto nos cruzamentos manuais, e também a formação de inflorescências é pouco freqüente em condições naturais, com apenas cerca de 50% dos indivíduos florescendo a cada ano (Borba e Semir, 1998). Neste mesmo trabalho foi descrito que há a necessidade de ventos com velocidades entre 1,0 e 1,5 m/s para que a polinização seja possível, pois somente nestas condições o labelo da flor se move, pressionando o polinizador contra a coluna estigmática.

Vale mencionar que, ainda que a polinização seja fundamental, pouco se sabe a respeito da influência da dispersão de sementes na manutenção do fluxo gênico nestas plantas, pois em orquídeas as sementes não possuem endosperma e podem ser carregadas pelo vento a longas distâncias (Pijl e Dodson, 1966).

Com isto, uma vez que em plantas os efeitos da fragmentação de habitat podem ser influenciados por vários fatores, o melhor conhecimento sobre a genética das populações de *B. weddellii*, *B. involutum* e *B. ipanemense* pode contribuir para o

entendimento dos processos ocorrentes em espécies vegetais com distribuição disjunta. Os estudos a respeito dos efeitos de fragmentação sobre a estrutura genética em populações de espécies tropicais são escassos (Young *et al.*, 1996) Em campos rupestres existem apenas dois trabalhos de genética de populações em plantas. Num deles (Jesus, *et al.*, no prelo), com uma espécie de Asteraceae (*Proteopsis argentea*), foi encontrada alta estruturação genética e baixa variabilidade. Em outro trabalho (Borba *et al.*, no prelo), com espécies de orquídeas do gênero *Pleurothallis*, foi encontrada alta variabilidade genética e estruturação moderada. Estes dados indicam que em *Pleurothallis* há homogeneidade entre as populações, quando o esperado seria encontrar alta estruturação genética em plantas que apresentam-se restritas a afloramentos rochosos e cujos polinizadores supostamente não são capazes de efetuar polinização entre populações distantes. Assim, fica mais evidente a relevância de estudos sobre genética de populações em espécies de campos rupestres, a fim de elucidar os padrões até agora observados.

O conhecimento a respeito da citogenética em Orchidaceae de ambientes tropicais também é limitado (Dematteis e Daviña, 1999). A poliploidia é o tipo de variação cromossômica dominante na evolução vegetal (Guerra, 1988). Este fenômeno pode ser visto como um mecanismo capaz de aumentar a variabilidade genética dos indivíduos, além de ser considerado um fator facilitador de especiação rápida (Levin, 1983; Soltis e Rieseberg, 1986; Barrett e Shore, 1989; Samuel *et al.*, 1990; Murawski *et al.*, 1994; Crawford, 1989 e 1990). Em Orchidaceae encontram-se espécies poliplóides, bem como variações cromossômicas intraespecíficas, como foi sugerido por Jones e Daker (1968) para *Catasetum planiceps*. Em *Bulbophyllum*, a maior parte das espécies estudadas apresenta $2n=38$ e o número base do gênero é considerado $x=19$ (Lim e Jones, 1982; Daker, 1968; Goldblatt, 1994). No entanto são encontradas referências a triplóides,

pentaplóides e aneuplóides (Daker, 1970; Lim e Jones, 1982; Jones e Daker, 1968). Classicamente, são reconhecidos dois tipos de poliplóides: os autopoliplóides, considerados menos freqüentes na natureza, que são provenientes de duplicações no conjunto cromossômico de uma só espécie, e os alopoliplóides ou anfiplóides, provenientes da hibridação entre dois ou mais genomas distintos. Há ainda uma situação intermediária, que parece ser a mais freqüente em condições naturais (Guerra, 1988; Forni-Martins, 2000), na qual o poliplóide é formado pela hibridação entre espécies muito próximas, com conjuntos cromossômicos parcialmente distintos entre si. Neste caso, a poliploidização subsequente à hibridação levaria a uma fertilidade quase normal, gerando o chamado alopoliplóide segmentar. Considera-se que a alta ocorrência de poliplóides na natureza seja um indicador da freqüência e do sucesso da hibridação interespecífica (Jones e Daker, 1968). Muitas vezes é possível reconhecer a origem da poliploidia através de estudos do comportamento meiótico. Contudo, em algumas espécies são conhecidos genes que controlam o pareamento entre cromossomos homeólogos, impedindo a formação de multivalentes e possibilitando a formação de gametas viáveis, como ocorre no trigo hexaplóide *Triticum aestivum* (Riley e Chapman, 1958). Assim, determinar se um citótipo é auto ou alopoliplóide não é tarefa simples, sendo muitas vezes necessários estudos genéticos, químicos, citológicos e morfológicos para determinar a natureza do poliplóide (Murawski *et al.*, 1994).

2. OBJETIVOS

No presente trabalho, pretendeu-se explorar aspectos da genética de populações vegetais em campos rupestres, tais como variabilidade e estruturação genéticas. Uma vez que pouco se sabe a respeito da genética de populações vegetais neste tipo de ambiente, optou-se por estudar orquídeas miiófilas com distribuição disjunta, sobre as quais já se tinha algum conhecimento de biologia reprodutiva. Foram estudadas amostras de *Bulbophyllum ipanemense*, *B. weddellii* e *B. involutum*, provenientes de diversas localidades, através de eletroforese de isozimas em gel de amido, bem como de estudos citogenéticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coletas:

Os indivíduos de *B. weddellii*, *B. ipanemense* e *B. involutum* foram coletados em diversas localidades nos Estados de Minas Gerais, Bahia e São Paulo (Tabela 1 e Figura 5). Procurou-se realizar amostragens aleatórias e representativas de todo o afloramento rochoso. Os indivíduos retirados localizavam-se em rochas diferentes, buscando assim evitar a coleta de clones de um mesmo genet, uma vez que estas espécies apresentam reprodução vegetativa. Foi retirada somente uma pequena parte de cada planta, de modo que os indivíduos permaneceram representados em seu ambiente natural.

A Figura 5 ilustra os locais onde foram realizadas as coletas, bem como a área onde supostamente é possível encontrar as espécies em questão nestes campos rupestres, baseado em viagens de campo e material de herbário. Foram feitas nove coletas de *B. ipanemense*, três de *B. involutum* e uma de *B. weddellii*. Também foi feita uma coleta em Morro do Chapéu, BA, mas quando os indivíduos floresceram foi constatado que se trata de outra espécie, ainda não identificada taxonomicamente. Além disso, ainda foi feita uma coleta em Diamantina, MG; quando os indivíduos floresceram, percebeu-se que havia duas espécies (*B. involutum* e *B. weddellii*). Como nem todos os indivíduos floresceram, optou-se por não utilizar este material. A identificação, localização geográfica e número de indivíduos coletados em cada localidade encontram-se na Tabela 1.

Todos os indivíduos coletados estão sendo cultivados em casa de vegetação do Depto. de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, UNICAMP. Tanto o clima da cidade de Campinas, SP (onde as plantas estão em cultivo) quanto dos locais onde se encontram as populações naturais podem ser considerados "Cwb", segundo a classificação de Köppen (1948). Espécimes provenientes de cada uma das localidades foram herborizados com as respectivas inflorescências e serão depositados no Herbário UEC.

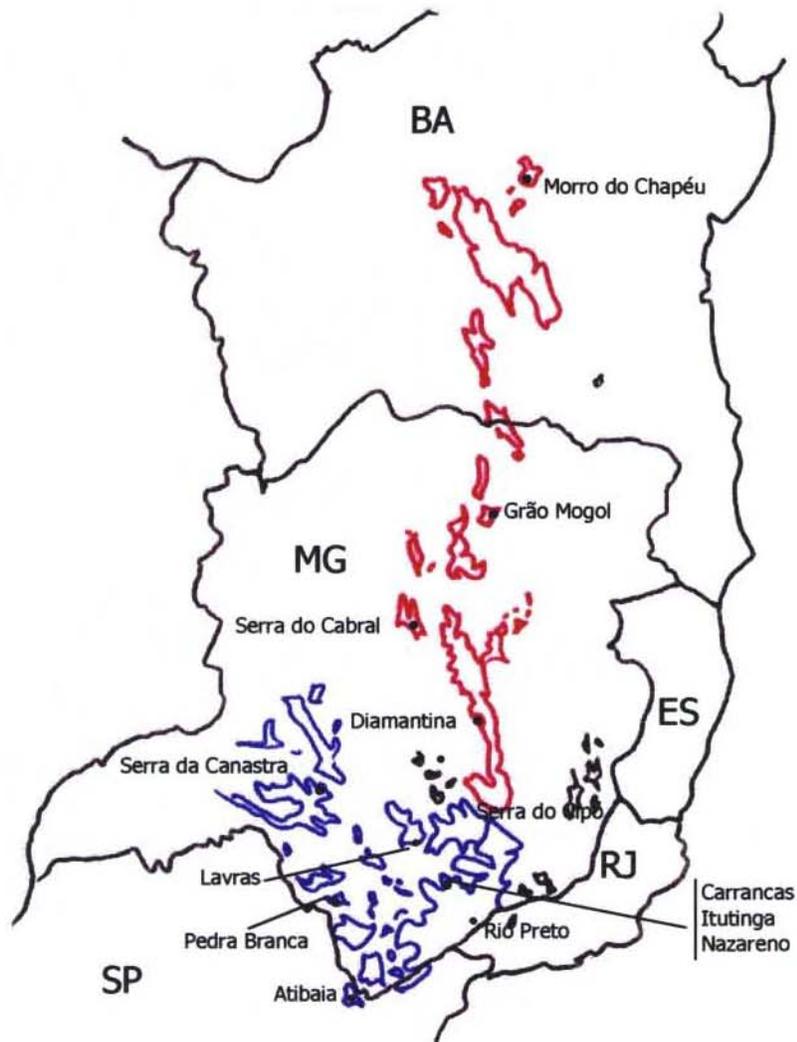


Figura 5: Pontos de coleta de *Bulbophyllum ipanemense*, *B. involutum* e *B. weddellii* (Área representada: acima de 900m de altitude)

Tabela 1- Identificação, localização geográfica e número de indivíduos das populações de *Bulbophyllum* coletadas

espécie	identificação da coleta	Município	Localidade	localização geográfica	número de indivíduos	data da coleta (mês/ano)
	JSF01	Atibaia, SP	Pedra Grande	23°07'01"S, 46°33'01"O	27	03/1998
	JSF02	Carrancas, MG	Carrancas A1	21°30'28"S, 44°33'00"O	42	12/1997
	JSF03		Carrancas A3	21°28'25"S, 44°37'00"O	19	12/1997
	JSF04	Itutinga, MG	Itutinga	21°17'53"S, 44°39'28"O	25	12/1997
<i>B. ipanemense</i>	JSF05	Rio Preto, MG	Rio Preto	21°45'51"S, 43°21'01"O	39	07/1998
	JSF06	Pocinhos do Rio Verde, MG	Pedra Branca	21°58'14"S, 46°21'43"O	28	02/1999
	JSF07	Lavras, MG	Lavras	21°19'58"S, 44°58'23"O	22	02/1999
	JSF08	Nazareno, MG	Nazareno	21°12'59"S, 44°36'41"O	31	12/1997
	JSF09	São Roque de Minas, MG	Serra da Canastra	20°13'35"S, 46°27'06"O	40	10/1998
	JSF10	Santana do Riacho, MG	Serra do Cipó	19°19'30"S, 43°33'50"O	27	12/1997
<i>B. involutum</i>	JSF11	Joaquim Felício, MG	Serra do Cabral	17°43'S, 44°17'O	30	01/1999
	JSF12	Grão Mogol, MG	Grão-Mogol	16°33'34"S, 42°53'23"O	29	12/1997
<i>B. weddellii</i>	JSF13	Santana do Riacho, MG	Serra do Cipó	19°14'50"S 43°30'40"O	26	12/1997
<i>Bulbophyllum</i> sp.	JSF14	Morro do Chapéu, BA	Morro do Chapéu	11°33'00"S, 41°09'22"O	16	02/1998
<i>B. involutum/ B. weddellii</i>	JSF15	Diamantina, MG	Diamantina A1	18°16'29"S, 43°40'15"O	35	07/1999
	JSF16		Diamantina A2	18°17'56"S 43°41'01"O	34	07/1999

3.2. Variabilidade Genética

A variabilidade genética foi estudada através de eletroforese de isozimas em gel de amido (Sigma hydrolysed potato starch) a 8,5%. Foi utilizado material fresco de folhas dos indivíduos, com as amostras coletadas no momento da análise, sempre pela manhã.

O material foi homogeneizado individualmente em placas de polipropileno em tampão de Tris 0,1M com pH ajustado para 7,0 com solução 1N de ácido clorídrico, acrescido de sacarose 0,2M; polivinilpirrolidona (PVP) 0,6%; etilenodiaminatetraacetato (EDTA) 1mM; albumina bovina 0,15%; dietilditiocarbamato de sódio (DIECA) 0,06M; borato de sódio 0,03M e β -mercaptoetanol 0,1% (modificado a partir de Sun e Ganders, 1990). As amostras foram absorvidas em tiras de papel de filtro (Whatman #3). Ao extrato de um dos indivíduos de cada gel foi adicionado Azul de Bromofenol, a fim de visualizar a frente de corrida. O procedimento padrão de eletroforese em gel de amido e as colorações utilizadas são os descritos em Shaw e Prasad (1970) e Alfenas (1991,1998) com modificações. Os sistemas enzimáticos amostrados estão apresentados na Tabela 2. Tais sistemas foram testados em várias condições de corrida (sistemas tampão gel/eletrodo) para a padronização das análises:

-Sistema 1a (Stuber *et al.*, 1977, modificado) - Eletrodo: solução de L-Histidina 65mM ajustada para pH 6,5 com uma solução de ácido cítrico 0,2M. Gel: solução idêntica à de eletrodo, acrescida de 3 partes de água destilada por parte de tampão. Condições de corrida: 200 V por aproximadamente 7 h.

-Sistema 1b (Stuber *et al.*, 1977, modificado) - Eletrodo: solução de L-Histidina 65mM ajustada para pH 6,5 com uma solução de ácido cítrico 0,2M. Gel: solução idêntica

à de eletrodo, acrescida de 6 partes de água destilada por parte de tampão. Condições de corrida: 200 V por aproximadamente 7 h.

-Sistema 2 (Shaw e Prasad, 1970, modificado) - Eletrodo: solução de ácido bórico 0,3M e hidróxido de sódio 60mM, pH 8,0. Gel: solução de Tris 10mM ajustada para pH 8,5 com solução de ácido clorídrico 1N. Condições de corrida: 30 mA por 3 h.

-Sistema 3 (Clayton e Tretiak, 1972) - Eletrodo: solução de ácido cítrico 0,04M ajustada para pH 6.1 com N-(3-aminopropil)-Morfolina. Gel: solução idêntica à de eletrodo, diluída na razão de 1:20 em H₂O. Condições de corrida: 50 mA por aproximadamente 4h.

-Sistema 4 - Eletrodo: solução de hidróxido de lítio 0,03M e ácido bórico 0,2M, pH 8,0, com EDTA 0,006M. Gel: solução idêntica à de eletrodo diluída na razão de 1:10 em H₂O. Condições de corrida: 50 mA por aproximadamente 4 h.

-Sistema 5 (Clayton e Tretiak, 1972) – Eletrodo: solução de tris 0,25M com ácido cítrico 0,04M, pH 8,0. Gel: solução idêntica à de eletrodo diluída na razão de 1:25 de H₂O. Condições de corrida: 50 mA por aproximadamente 5 h.

-Sistema 6 (Poulik, 1957) - Eletrodo: solução de ácido bórico 0,3M e hidróxido de sódio 60mM, pH 8,0. Gel: Solução de Tris 0,02M e ácido cítrico 1,25mM, pH 8,6. Condições de corrida: 200V por 10h.

-Sistema 7 (Ridgway *et al. apud* King e Dancik, 1983) - Eletrodo: solução de hidróxido de lítio 0,06M e ácido bórico 0,03M, pH 8,1. Gel: solução estoque de Tris 0,03M e ácido cítrico 0,005M, pH 8,5 a ser usada diluída na razão 1:10. Condições de corrida: 15 mA por aproximadamente 7h.

As análises foram executadas no programa BIOSYS 2 (Swofford & Selander, 1997) para a determinação dos parâmetros de variabilidade genética: proporção de

locos polimórficos (P), número médio de alelos por loco polimórfico (A), heteroziguidade média observada (H_o) e esperada (H_e), estatística F e coeficientes de similaridade e distância de Nei.

Os géis foram fotografados para registro, além de serem diafanizados e armazenados, a fim de possibilitar o esclarecimento de posteriores dúvidas na interpretação.

Tabela 2: Sistemas enzimáticos testados nas diferentes condições de corrida.

Sistema enzimático	Sistema Tampão gel/eletrodo							
	1a	1b	2	3	4	5	6	7
Aconitase (4.2.1.3)				X				
α -Amilase (3.2.1.1)				X			X	
Aldolase (4.1.2.13)	X		X					
Ascorbato oxidase (1.10.3.3)				X			X	
Aspartato aminotransferase (2.6.1.1)		X	X	X			X	
Desidrogenase da alanina (1.4.1.1)				X			X	
Desidrogenase alcoólica (1.1.1.1)	X	X	X					
Desidrogenase do 6-fosfogluconato (1.1.1.44)				X				
Desidrogenase da β -galactose (1.1.1.48)				X			X	
Desidrogenase da glicose 6-fosfato (1.1.1.49)	X			X	X			
Desidrogenase do glutamato (1.4.1.2)				X	X			
β -hidroxiácido desidrogenase (1.1.1.30)					X			
Desidrogenase do isocitrato (1.1.1.42)	X	X	X	X	X	X		X
Desidrogenase do lactato (1.1.1.27)				X			X	
Desidrogenase do malato NAD dependente (1.1.1.37)	X			X			X	
Desidrogenase do malato NADP dependente (1.1.1.40)		X	X	X	X		X	
Desidrogenase do sorbitol (1.1.1.14)				X			X	
Desidrogenase da xantina (1.2.1.37)		X		X			X	
Desidrogenase do xiquimato (1.1.1.25)	X	X	X	X	X	X		X
Diaforase (1.8.1.4)	X		X	X	X	X		
Esterases α e β (3.1.1.1)	X	X	X		X	X		X
Fosfatase ácida (3.1.3.2)	X		X		X			
Fosfatase alcalina (3.1.3.1)				X			X	
Fosfoglicomutase (5.4.2.2)	X	X		X			X	
Fosfoglicose isomerase (5.3.1.9)	X	X		X	X			
Fumarase (4.2.1.2)			X		X			
Hexoquinase (2.7.1.1)	X							
Leucil-aminopeptidase (3.4.11.1)	X	X	X	X	X	X	X	
Manose 6-fosfato isomerase (5.3.1.8)	X			X	X			
Peptidases (3.4.11.10)			X		X			
Peroxidase (1.11.1.7)	X			X	X	X	X	

X: Sistemas tampão testados

X: Sistemas tampão nos quais os sistemas enzimáticos tiveram resolução

3.3. Citogenética:

Verificou-se, ao longo do trabalho, que muitos indivíduos apresentavam padrão não compatível com o esperado para herança dissômica. Assim, optou-se por estudar também seu cariótipo. Foram então feitas lâminas utilizando a região meristemática de raízes dos próprios indivíduos em cultivo. As pontas de raiz foram coletadas entre 8h00 e 9h00 e tratadas com 8-hidroxiquinoleína 0,02M por 4-5 horas a 14-16°C, segundo procedimento descrito em Jones e Daker (1968). O material foi fixado em solução Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético). A coloração foi feita com solução de Giemsa a 2% (Guerra, 1983), após hidrólise com HCl 5N por 25 minutos. O velame era retirado das raízes antes de proceder o esmagamento.

Procurou-se fazer a contagem de pelo menos dois indivíduos provenientes de cada localidade, investigando se havia uma variação no nível de ploidia entre indivíduos de cada amostra.

4. RESULTADOS

4.1. Variabilidade Genética:

No total, foram testados 450 indivíduos das 16 localidades amostradas. Entretanto não foi possível efetuar a leitura das frequências gênicas de todos eles, pois muitos não apresentaram resolução satisfatória nos géis, mesmo quando testados mais de uma vez. Além disso, vários deles não se adaptaram à casa de vegetação e não sobreviveram, impossibilitando sua réplica.

Através da análise citogenética, foi constatado que nove das quatorze amostras locais restantes compõem-se provavelmente de indivíduos poliplóides. Devido ao alto polimorfismo, dentre os poliplóides foram observados indivíduos que pareciam apresentar pelo menos três alelos para alguns locos como MDH1 e PGI2. Entretanto, não foi possível determinar o tipo de herança destes indivíduos e não foram estimadas suas frequências alélicas e os parâmetros de diversidade genética, como foi feito no estudo dos diplóides. Desta forma, as análises de variabilidade genética somente foram feitas para as amostras diplóides e os resultados observados para as demais (poliplóides) serão apresentados separadamente. As cinco amostras analisadas foram:

<i>B. ipanemense:</i>	Rio Preto
	Itutinga
	Nazareno
	Serra da Canastra
<i>B. weddellii:</i>	Serra do Cipó

Apesar de terem sido testados 31 sistemas enzimáticos, somente 7 apresentaram resolução: desidrogenase do 6-fosfogluconato (6PGD), desidrogenase do malato NAD dependente (MDH), desidrogenase do isocitrato (IDH), fosfoglucoisomerase (PGI), fosfoglucomutase (PGM), esterase (EST), leucil aminopeptidase (LAP). Os sistemas aspartato aminotransferase (AAT), diaforase (DIA) desidrogenase do xiquimato (SKDH) também apresentaram atividade, mas não puderam ser incluídos nas análises devido à baixa resolução. Da mesma forma, desidrogenase alcoólica (ADH) e desidrogenase do malato NADP dependente (ME) não foram incluídos devido à baixa e infreqüente atividade enzimática. Os protocolos utilizados na revelação dos 7 sistemas que apresentaram boa resolução encontram-se no Apêndice.

Exemplos de géis mostrando a alta variabilidade genética encontrada podem ser vistos na Figura 6. Os sistemas EST, IDH, LAP e 6PGD apresentaram somente uma zona de atividade enzimática. O sistema PGM apresentou duas zonas de atividade, interpretadas como dois locos enzimáticos (PGM1 e PGM2). O sistema PGI apresentou duas zonas de atividade enzimática, sendo que uma delas mostrou expressão variável, sendo possivelmente influenciada pelo estágio de desenvolvimento da planta; por este motivo, só foi lido um loco (PGI2). O sistema MDH também apresentou duas zonas de atividade bem distintas. No entanto só foi lido o loco MDH1, pois a segunda zona de atividade parece representar mais de um loco enzimático, e não foi possível identificá-los com segurança. Assim, foram analisados oito locos enzimáticos.

Todos os oito locos estudados apresentaram-se polimórficos nas cinco populações estudadas (critério de 95%). A heterozigosidade média (Tabela 3) variou de 36,9% a 49,7%. As diferenças entre a heterozigosidade esperada e observada não foram significativas, resultando em baixos valores de F_{IS} (Tabela 3). Isto indica que não ocorre

endogamia nestas populações, não havendo excesso nem deficiência de heterozigotos. As frequências alélicas nas cinco populações analisadas encontram-se na Tabela 4, onde nota-se que a amostra de *B. weddellii* tem um alelo exclusivo a ela no loco PGI2, representado em alta frequência (53,1%), e também um alelo exclusivo no loco MDH1, sendo o segundo mais freqüente (17,5%). No loco IDH há uma inversão nas frequências alélicas, de modo que o alelo mais freqüente em *B. ipanemense* é o menos freqüente em *B. weddellii*. No entanto, não foi detectado loco diagnóstico entre *B. ipanemense* e *B. weddellii*.

O F_{ST} para as quatro populações de *B. ipanemense* foi 0,0524. O dendrograma da Figura 7 representa a análise de agrupamento (UPGMA) feita utilizando-se o coeficiente de Nei (1978, unbiased genetic identity). Nesta figura pode-se ver que todas as amostras locais são bastante semelhantes geneticamente, mas *B. weddellii* (Serra do Cipó) encontra-se mais distanciada, com aproximadamente 9% de distância genética com relação à outra espécie, *B. ipanemense*. A matriz de similaridade/distância genética de Nei (1978) é apresentada na Tabela 5.

A representação gráfica para as frequências alélicas, em *B. ipanemense*, nos locos PGI2 e MDH1 encontram-se na Figura 8, onde observa-se a grande quantidade de alelos presentes, além das variações tanto na presença quanto nas frequências dos alelos menos freqüentes. Nota-se ainda que as amostras Itutinga e Nazareno, apesar da pequena distância geográfica que as separa (aproximadamente 20km), apresentam um dos alelos (o menos freqüente) diferente no loco PGI2.

Além disso, apesar deste resultado não ter sido quantificado por se tratar de poliplóides, observou-se que nas três amostras de *B. involutum* o loco 6PGD apresentou-se monomórfico.

Tabela 3- Variabilidade genética em 6 locos enzimáticos: cinco amostras de *Bulbophyllum ipanemense* e *B.weddellii*. N=tamanho médio da amostra por loco; Ap=número médio de alelos por loco; H_o =heterozigosidade média observada; H_e =heterozigosidade média esperada por Hardy-Weinberg; F_{IS} =coeficiente de fixação.

Espécie	Localidade	N	Ap	Heterozigosidade média		F_{IS}
				H_o	H_e^*	
<i>B.ipanemense</i>	S.Canastra	27,1	3,5	0,436	0,421	-0,036
	Rio Preto	22,8	3,0	0,409	0,441	0,072
	Nazareno	18,9	2,5	0,324	0,369	0,122
	Itutinga	16,8	2,6	0,408	0,428	0,047
<i>B.weddellii</i>	S. Cipó	12,5	2,5	0,619	0,497	-0,245

* Baseado em Nei, 1978 (unbiased estimate)

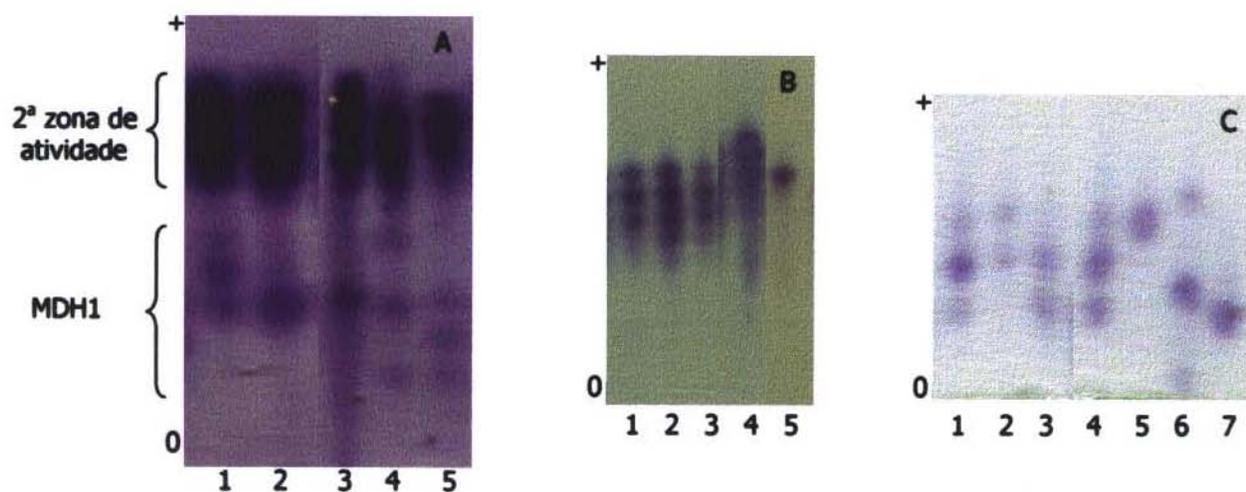


Figura 6: Géis de eletroforese. Exemplos mostrando alelos mais comuns em alguns sistemas enzimáticos. (A) MDH com duas zonas de atividade. Interpretação dos genótipos da MDH1 para os indivíduos: 1-100/130, 2e3-100/100, 4-60/130, 5-60/100; (B) Interpretação dos genótipos na PGI2: indivíduos 1a3-87/100, 4-100/112, 5-100/100; (C) Interpretação dos genótipos na 6PGD: indivíduos 1e4-100/160, 5-160/160, 6-40/190, 7-100/100, 2e3-indivíduos possivelmente poliplóides, heterozigotos para os alelos 100 e 160.

Tabela 4: Frequência alélica nos 8 locos para as 5 amostras de *Bulbophyllum* estudadas

LOCO	ESPÉCIE	<i>B.ipanemense</i>				<i>B.weddellii</i>
	Localidade	S.Canastra	Rio Preto	Nazareno	Itutinga	S.Cipó
<u>6PGD</u>	(N)	35	30	23	20	19
	alelos	-	0,067	-	-	-
	40	0,929	0,650	0,870	0,575	0,868
	140	0,014	-	-	-	-
	160	0,057	0,250	0,130	0,425	0,132
<u>MDH1</u>	(N)	34	32	25	22	20
	alelos	-	-	-	-	-
	60	-	-	0,120	0,045	-
	70	-	-	-	-	0,175
	75	-	0,047	-	-	-
	100	0,765	0,922	0,820	0,932	0,800
	125	0,044	-	-	-	-
<u>PGI2</u>	(N)	21	17	19	15	16
	alelos	0,262	0,324	0,500	0,500	-
	82	0,143	0,059	-	-	-
	87	-	0,059	-	-	-
	95	0,333	0,441	0,421	0,433	0,281
	100	0,190	0,118	-	0,067	-
	108	0,071	-	0,079	-	0,188
<u>EST</u>	(N)	28	28	19	19	18
	alelos	0,018	-	-	-	-
	90	0,018	-	0,053	-	0,056
	94	0,857	0,893	0,842	0,947	0,861
	100	0,107	0,107	0,105	0,053	0,083
<u>PGM1</u>	(N)	20	19	19	15	2
	alelos	0,600	0,421	0,316	0,400	0,500
	92	-	-	-	0,100	-
	94	0,400	0,579	0,684	0,500	0,500
<u>PGM2</u>	(N)	20	19	19	15	2
	alelos	0,600	0,421	0,316	0,533	0,500
	100	0,400	0,579	0,684	0,467	0,500
<u>LAP</u>	(N)	32	14	11	11	5
	alelos	0,391	0,071	0,500	0,409	0,300
	85	0,063	0,214	-	0,227	0,500
	94	0,531	0,643	0,500	0,364	0,200
	100	0,016	0,071	-	-	-
<u>IDH</u>	(N)	27	23	16	17	18
	alelos	0,019	-	0,031	0,088	-
	90	0,870	0,717	0,938	0,824	0,417
	100	0,111	0,283	0,031	0,088	0,583

*Os alelos estão representados por sua migração relativa ao alelo mais freqüente no padrão (migração relativa 100)

Tabela 5: Matriz de coeficientes de similaridade e/ou distância genética nas 5 amostras de *Bulbophyllum* estudadas.

Localidade	<i>B. ipanemense</i>				<i>B. weddellii</i>
	S da Canastra	Rio Preto	Nazareno	Itutinga	S do Cipó
S da Canastra	***	0,040	0,037	0,041	0,086
Rio Preto	0,961	***	0,041	0,020	0,070
Nazareno	0,964	0,960	***	0,027	0,130
Itutinga	0,960	0,980	0,974	***	0,097
S do Cipó	0,918	0,933	0,878	0,908	***

Abaixo da diagonal: identidade genética de Nei (1978 – unbiased estimate)
 Acima da diagonal: distância genética de Nei (1978 – unbiased estimate)

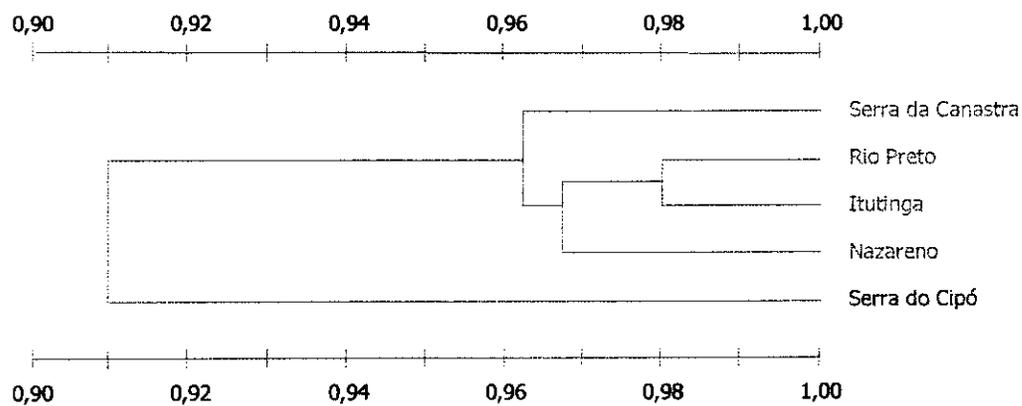


Figura 7: Dendrograma representativo das similaridades genéticas em *Bulbophyllum ipanemense* e *B. weddellii*. UPGMA utilizando coeficiente de identidade genética de Nei, 1978. (coeficiente de correlação cofenética = 0,908)

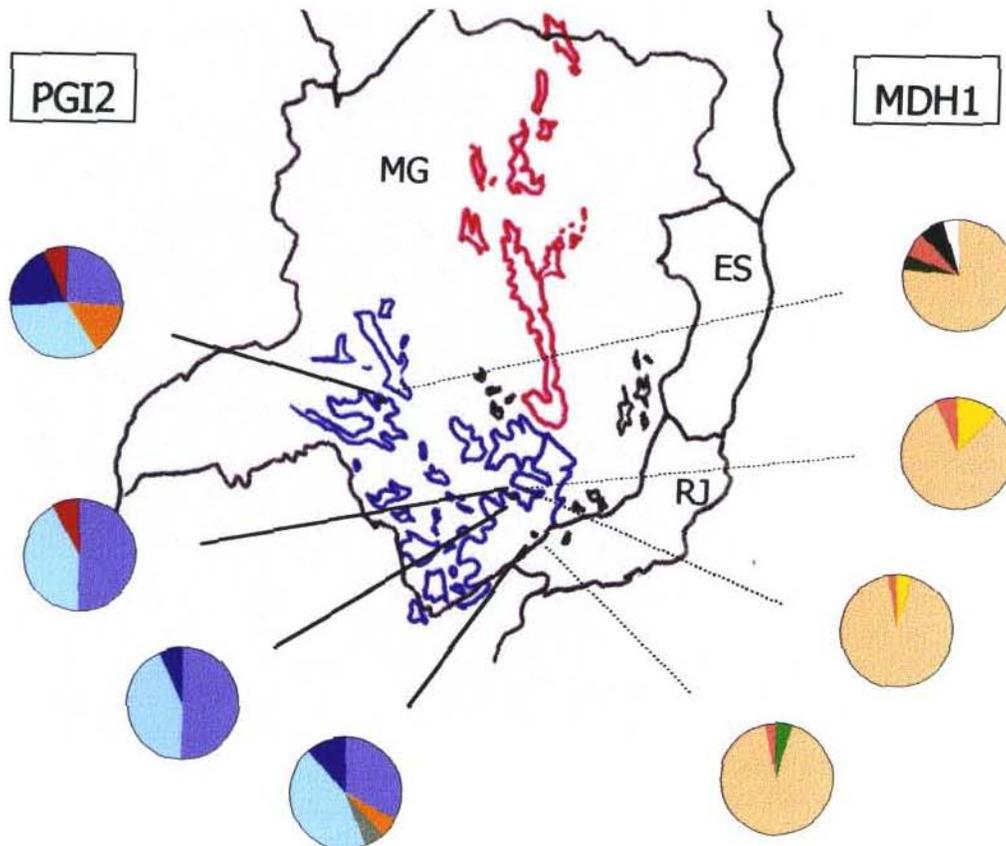


Figura 8: Representação gráfica das frequências gênicas nos locos PGI2 e MDH1 nas amostras de *B.ipanemense*. Do alto para baixo: Serra da Canastra, Nazareno, Itutinga e Rio Preto.

4.2. Citogenética:

Não foram detectadas diferenças na ploidia entre indivíduos de uma mesma localidade. Foi encontrado $2n=38$ nas amostras de Rio Preto, Itutinga, Nazareno e Serra da Canastra de *B.ipanemense* e na amostra da Serra do Cipó de *B.weddellii*. Este resultado está de acordo com as contagens feitas para a grande maioria das espécies do gênero (Lim e Jones, 1982; Daker, 1968; Goldblatt, 1994). Nas outras onze amostras analisadas, foram encontrados cerca de 72 cromossomos ($2n=ca.72$). Exemplos de células em mitose de indivíduos com $2n=38$ e $2n=ca.72$ podem ser vistos na Figura 9.

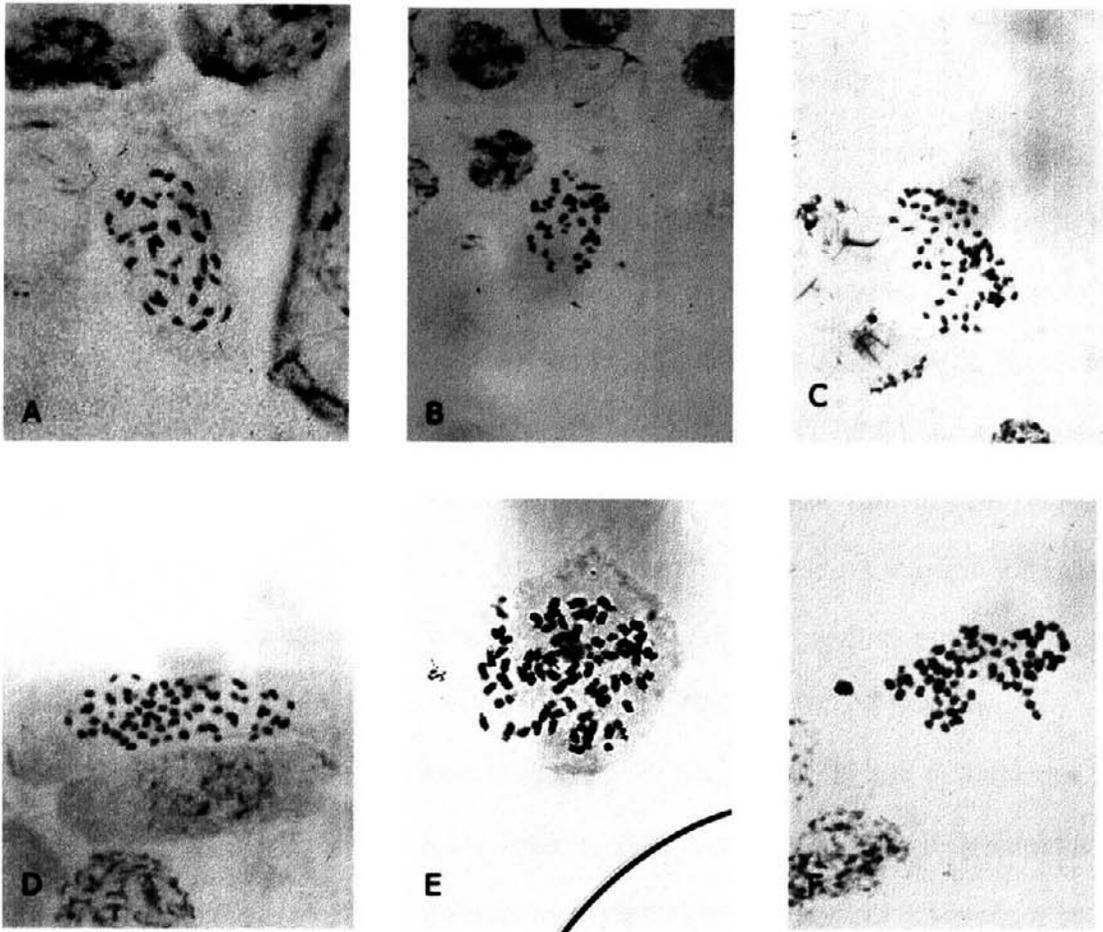


Figura 9: Metáfases mitóticas: indivíduos com $2n=38$ de (A) *Bulbophyllum weddellii* (Serra do Cipó) e (B) *B. ipanemense* (Serra da Canastra); indivíduos com $2n=ca.72$ de *B. ipanemense* de (C) Atibaia e (D) Carrancas, (E) *Bulbophyllum* sp (Morro do Chapéu) e (F) *B. involutum* (Serra do Cipó).

5. DISCUSSÃO

No tocante à variabilidade genética considera-se que em espécies vegetais, em média, 50% dos locos sejam polimórficos e a diversidade genética seja de aproximadamente 15% (Hamrick e Godt, 1990). Espécies de fecundação cruzada, com flores hermafroditas, que não apresentem apomixia e tenham ciclo de vida longo devem apresentar índices de variabilidade genética ainda mais altos. Foi estimado por Loveless e Hamrick (1984), com base na revisão de trabalhos publicados, que a heterozigosidade média em populações de espécies com estas características seria no máximo 22%. Devido à escassez de estudos sobre os níveis e padrões de variação genética em Orchidaceae, é difícil fazer generalizações a esse respeito (Wong e Sun, 1999). Entretanto, em alguns trabalhos com espécies de orquídeas alógamas (por exemplo: Ehlers e Pedersen, 2000 Scacchi *et al.*, 1987, 1990; Scacchi e De Angelis, 1989, Sun, 1996), foram detectados altos níveis de variabilidade genética, se comparados ao estimado por Loveless e Hamrick (1984).

As espécies de *Bulbophyllum* do presente trabalho apresentam várias semelhanças com relação a algumas espécies de *Pleurothallis* estudadas por Borba *et al.* (no prelo), pois todas elas são orquídeas de hábito rupícola e podem ser muitas vezes encontradas num mesmo afloramento rochoso. O sistema de polinização nestas espécies apresenta convergência evolutiva (Dressler, 1981), além de possuírem barreiras à autogamia. Os estudos genéticos em *Pleurothallis* (Borba *et al.*, no prelo) revelaram polimorfismo enzimático (P) variando de 33,3 a 83,3% e H_e de 13 a 42%, sendo a estruturação genética moderada. Alguns destes valores são ainda mais altos que os conhecidos para Orchidaceae.

Os resultados encontrados para *Bulbophyllum ipanemense* e *B. weddellii* mostram alta variabilidade genética, com H_e variando de 36,9 a 49,7%. Estes dados são compatíveis com o verificado por Borba *et al.* (no prelo), indicando que a alta variabilidade genética pode estar associada não somente a características comuns a todas as orquídeas, como a anemocoria (as sementes, desprovidas de endosperma, podem ser levadas pelo vento a longas distâncias), mas também ao hábito rupícola e à miofilia.

O $F_{ST}=0,0524$ encontrado para *B.ipanemense* indica estruturação genética moderada (Wright, 1978), significando que apenas cerca de 5% da diferenciação genética observada pode ser explicada por diferenças entre as amostras, sendo que quase 95% das diferenças estão dentro das próprias amostras. Isto também ocorre, de maneira semelhante, em *Pleurothallis* (Borba *et al.*, no prelo). Assim, estas espécies, além de terem alta variabilidade genética, apresentam homogeneidade entre as amostras de diferentes locais. Este resultado não seria esperado, se for considerado que estas plantas têm distribuição disjunta e são polinizadas por pequenos insetos que, acredita-se, não sejam capazes de voar longas distâncias (Loveless & Hamrick, 1984; Meve & Liede, 1994; Borba e Semir, 1999). De acordo com isso, grupos de indivíduos de diferentes localidades estariam sujeitos aos efeitos da deriva genética, que acarretaria alta estruturação genética. Como isto não foi observado (Tabela 3), é provável que a dispersão de sementes desempenhe um papel muito mais importante do que se julga nestas espécies, possivelmente por estarem em áreas abertas (que ofereceriam menos obstáculos à dispersão das sementes pelo vento). Contudo, há poucos estudos que analisem a eficiência relativa da dispersão de pólen *versus* dispersão de sementes na manutenção do fluxo gênico (Loveless e Hamrick, 1984). É ainda importante salientar que estas plantas apresentam longos ciclos de vida, devido à propagação vegetativa. Com isto, aumentam

as chances, ao longo do tempo, de que um indivíduo tenha seus genes transportados para outros locais, ocasionando uma certa 'resistência' aos efeitos de deriva genética (Loveless e Hamrick, 1984). Portanto, quanto mais longo for o ciclo de vida dos indivíduos, mais lenta deve ser a divergência entre as populações e é possível que estas populações estejam isoladas há relativamente pouco tempo para se diferenciarem.

Observa-se, através da análise de agrupamento (Tabela 5 e Figura 7), que as cinco amostras estudadas através de isozimas apresentam-se bastante semelhantes, com mais de 90% de similaridade. Apesar disso, é possível observar diferenças entre as duas espécies, *B. weddellii* (Serra do Cipó) e *B. ipanemense* (demais localidades), tanto na Tabela 4 como no dendrograma (Figura 7). Entretanto, não foi detectado loco diagnóstico destas espécies. A observação das diferenças entre as amostras Itutinga e Nazareno (Tabela 4 e Figura 8) reforça que, apesar da homogeneidade observada entre as amostras de *B. ipanemense* (F_{ST} moderado), o nível de estruturação entre elas não é negligenciável, mesmo entre conjuntos de indivíduos geograficamente próximos. Assim, o fluxo gênico entre os indivíduos de diferentes localidades não deve ser completamente livre, ainda que freqüente. Outra possibilidade é a de que existam diferentes pressões seletivas atuando sobre a enzima fosfoglicoisomerase (PGI), ou sobre locos gênicos ligados a ela. De qualquer forma, estes resultados indicam que as amostras das diferentes localidades, apesar de muito semelhantes, provavelmente representam populações distintas.

Os baixos valores de F_S encontrados nas amostras locais indicam que não há endogamia, o que é esperado, uma vez que estas espécies de *Bulbophyllum* apresentam barreiras à autofecundação, como foi descrito anteriormente. Já as baixas taxas de frutificação e aborto de frutos recém-formados, freqüentemente observadas nestas

espécies (Borba *et al.*, 1999), podem ser resultado de barreiras pós-zigóticas entre indivíduos geneticamente semelhantes.

No tocante aos estudos citogenéticos, dentre as espécies estudadas no presente trabalho, somente foi encontrada referência a número cromossômico em *B.ipanemense* ($2n=38$), e sabe-se apenas que o espécime utilizado foi coletado no Brasil, não sendo citada a localidade (Lim e Jones, 1982). No presente trabalho foi possível identificar com clareza $2n=38$ nos indivíduos diplóides de *B.ipanemense* (Serra da Canastra, Rio Preto, Itutinga e Nazareno) e *B.weddellii* (Serra do Cipó), o que concorda com trabalhos anteriores no gênero. Em orquídeas geralmente é difícil romper o fuso mitótico através dos pré-tratamentos comuns, além de os cromossomos serem pequenos, dificultando a obtenção de um bom espalhamento das células (Jones e Daker, 1968; Lim e Jones, 1982; Daker, 1970). Esta dificuldade afetou principalmente a contagem nas células de indivíduos que apresentavam número bem superior a $2n=38$, pois muitas vezes os cromossomos apresentavam-se sobrepostos ou a célula se rompia. Desta forma, não foi possível determinar o número cromossômico exato, e estes indivíduos foram considerados $2n=ca.72$. Ainda que este número seja aproximado, pode-se sugerir que tais indivíduos possam ser tetraplóides, já que o dobro de $2n=38$ é 76, número bastante próximo ao observado. É possível que tenha ocorrido redução no número de cromossomos devido a aneuploidia decrescente posterior à poliploidização. Entretanto, não pode ser descartada a possibilidade de que estas plantas possuam cromossomos extranumerários (cromossomos B). Porém, devido à congruência observada entre os resultados dos estudos citogenéticos e de variabilidade de isozimas, estes indivíduos foram considerados poliplóides, pois não seria esperado que cromossomos B afetassem a expressão gênica. De qualquer forma, foi possível distinguir nas lâminas os indivíduos que não são diplóides.

não são diplóides. Vale ainda mencionar que não se pôde notar qualquer modificação morfológica associada à poliploidia, nem mesmo aumento no tamanho dos indivíduos.

Apesar das diversas desvantagens geralmente atribuídas à poliploidia (Levin, 1983; Guerra, 1988), o fato de que a maioria das amostras coletadas é poliplóide sugere a possibilidade deste ser outro mecanismo capaz de manter alta variabilidade genética. É possível que plantas poliplóides tenham uma maior "flexibilidade" do ponto vista genético, uma vez que podem apresentar mais de dois alelos para cada loco gênico. Isto representa mais combinações alélicas possíveis e, no caso de enzimas multiméricas, pode significar maiores possibilidades de formação de enzimas híbridas. Os aloploplóides ainda apresentam "fixação de heterozigotos", pois cada parental doa um alelo ao gameta do híbrido e estes alelos segregam-se independentemente. Contudo, não foi possível determinar, no material estudado, se trata-se de um caso de auto ou aloploplóidia.

Indivíduos poliplóides podem estar mais aptos a enfrentar condições ambientais variáveis, pois têm uma amplitude metabólica maior. Esta proposição é discutida por vários autores, entre eles Levin, 1983; Briggs e Walters, 1984; Barrett e Shore, 1989; Crawford, 1989, 1990; Soltis e Rieseberg, 1986; Soltis e Soltis, 1999; Murawski *et al.*, 1994; Samuel *et al.*, 1990 e parece ser cada vez mais aceita a visão de que a poliploidização não deve mais ser encarada como um evento raro que produz espécies de origem única e genótipo uniforme (Soltis e Soltis, 1999). É provável que em *Bulbophyllum* a poliploidia desempenhe um papel importante na adaptação dos indivíduos com relação às restrições do ambiente em que vivem. Isto porque os campos rupestres representam um ambiente onde os organismos estão sujeitos a variações ambientais de grande amplitude. Esta condição ainda é reforçada pelo hábito rupícola, que limita a disponibilidade de nutrientes e água, além da variação de temperatura nas rochas entre

dia e noite poder ser severa. Assim, a enorme variabilidade resultante da poliploidia é potencialmente vantajosa, pois é capaz de alterar as características genéticas, citológicas, bioquímicas, fisiológicas e de desenvolvimento dos organismos, gerando macromutantes que oferecem às populações possibilidades de resposta às exigências de determinados ambientes (Levin, 1983; Briggs e Walters, 1984). Numa revisão feita por Levin (1983) são citados vários aspectos relevantes com relação à poliploidização. Foi observado para algumas espécies (entretanto, nenhuma delas é da família Orchidaceae) que poliplóides apresentam diminuição da densidade e aumento no tamanho dos estômatos, o que pode ser relacionado a menores taxas de transpiração no poliplóide do que em seu parental diplóide. Este fator seria de especial interesse se considerados o hábito e habitat das plantas em questão. A poliploidização também pode provocar alterações quantitativas (aumento) e qualitativas nos metabólitos secundários como alcalóides, terpenóides e flavonóides podendo, entre outras coisas, conferir maior resistência a patógenos e herbívoros. Além disso, foi observado em *Corchorus* e *Oryza* que os poliplóides apresentavam germinação mais baixa que os diplóides, e que isto pode estar relacionado a uma maior dormência das sementes, possibilidade que não foi analisada em *Bulbophyllum*. Por fim, além do aumento na variabilidade genética dos poliplóides aumentar a homeostase dos organismos, a própria redundância de alelos ligeiramente diferentes repetidos várias vezes pode modular a atividade gênica.

Quanto ao processo de poliploidização, este pode ocorrer tanto por duplicação somática de um híbrido como pelo envolvimento de gametas não reduzidos e, neste caso, o resultado pode ser um autopoliplóide ou um alopoliplóide. Revisões sobre o assunto revelaram que o envolvimento de gametas não reduzidos parece estar relacionado à maioria dos casos já estudados. Algumas linhagens de milho, por exemplo, produzem mais

de 3% de gametas femininos não reduzidos, mas as plantas tetraplóides não competem bem com as diplóides, quando em cultivo (Briggs e Walters, 1984). Assim, parece possível que certas quantidades de poliplóides estejam sendo constantemente produzidas na natureza, mas que estes só sobrevivam em determinadas condições ecológicas que favoreçam seu estabelecimento. Se este for o caso de *Bulbophyllum*, é razoável imaginar que os poliplóides tenham sido originados em múltiplos eventos, sendo favorecidos pelas condições ambientais na maioria das populações. Esta hipótese ainda é reforçada pela alta frequência de poliploidização recorrente em plantas que têm sido estudadas extensivamente (por exemplo: *Heuchera grossulariifolia*, *Draba norvergica* e *Tragopogon* spp.) (Soltis e Soltis, 1999). Poliplóides com origens múltiplas parecem realmente ocorrer mais frequentemente que os de origem única (Arft e Ranker, 1998). Entretanto, é também possível que a poliploidia tenha surgido numa só população, posteriormente se difundindo para outras localidades. Para ambas as hipóteses é necessário que se assuma a maior adaptabilidade dos poliplóides com relação aos diplóides, pelo menos no que diz respeito às condições ecológicas específicas dos locais onde estes foram encontrados.

O presente estudo aponta para a necessidade de novos trabalhos a respeito da citogenética destas espécies, incluindo contagem cromossômica e regularidade de meiose, com abordagem populacional, a fim de entender a origem, abrangência e a alta incidência da variação cromossômica observada. Pode-se ressaltar, inclusive, que a abordagem populacional é relevante nos estudos citogenéticos de plantas em geral, pois a detecção e análise dos poliplóides é fundamental na compreensão dos processos evolutivos nos vegetais.

Outra questão a ser elucidada diz respeito aos sistemas de reprodução, complementando os experimentos de polinização controlada conduzidos por Borba *et al.*

(1999), incluindo mais populações, e devendo-se dar especial atenção ao cruzamento entre indivíduos com números cromossômicos diferentes. Além disso, são também necessárias novas abordagens no estudo da variabilidade genética destes organismos, utilizando outros marcadores com o objetivo de melhor quantificar a variabilidade existente.

Este trabalho contribui, ainda que de maneira exploratória, para um melhor entendimento a respeito da genética das populações vegetais em campos rupestres, uma vez que, apesar da grande relevância biológica destes ambientes e da grande extensão que ocupam no território brasileiro, são pouco estudados.

6. CONCLUSÕES GERAIS

⇒ Foi encontrada alta variabilidade genética nas cinco amostras de *B.ipanemense* e *B.weddellii* analisadas através de eletroforese. Os valores de heterozigosidade média (H_e) indicam uma variabilidade incomum em comparação a outras espécies vegetais, inclusive orquídeas. Entretanto os resultados do presente trabalho assemelham-se aos encontrados em outro grupo de orquídeas miiófilas de campos rupestres brasileiros (*Pleurothallis*).

⇒ A estruturação populacional (F_{ST}) em *B.ipanemense* foi moderada, quando o esperado em espécies de distribuição disjunta e polinizadas por pequenos insetos seria encontrar alta estruturação genética. Isto indica que a dispersão de sementes pode ser um fator mais importante que a dispersão de pólen nestas espécies. Também é possível que a longevidade indeterminada dos indivíduos retarde os efeitos de deriva genética, mantendo a homogeneidade genética entre as populações.

⇒ Embora as amostras apresentem-se homogêneas entre si, as diferenças entre elas não são negligenciáveis, indicando que as amostras locais representam de fato populações distintas.

⇒ Ainda que não tenham sido encontrados locos diagnósticos entre *B.ipanemense* e *B.weddellii*, as duas espécies se diferenciaram na análise de agrupamento.

⇒ Os indivíduos com número cromossômico superior a $2n=38$ foram considerados poliplóides, possivelmente tetraplóides ($2n=ca.72$). A alta incidência destes poliplóides nestas espécies pode ser consequência de maior adaptabilidade destes indivíduos a ambientes que imponham sérias restrições reprodutivas e nutricionais. As vantagens adaptativas devem estar relacionadas a uma maior "flexibilidade" genética dos poliplóides em comparação aos diplóides. No entanto, é necessário que a origem desta variação

cromossômica seja melhor investigada, a fim de esclarecer o possível envolvimento de cromossomos B.

⇒ O presente trabalho contribui para um melhor entendimento sobre genética de populações vegetais de campos rupestres, um ambiente pouco estudado, apesar da importância e representatividade no território brasileiro.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Alfenas, A.C.; Peters, I; Brune, W. & Passador, G.C. 1991. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Alfenas, A.C. 1998. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Editora UFV, Viçosa.
- Arft, A.M. e Ranker, T.A. 1998. Allopolyploid origin and population genetics of the rare orchid *Spiranthes diluvialis*. **American Journal of Botany** **85**: 110-122.
- Barrett, S.C.H. e Shore, J.S. 1989. Isozyme variation in colonizing plants. *In*: **Isozymes in Plant Biology**. D.E. Soltis e P.S. Soltis (ed). Dioscorides, Portland.
- Borba, E.L.; Semir, J. & Barros, F. 1998. *Bulbophyllum involutum* Borba, Semir & F.Barros (Orchidaceae), a new species from the brazilian "campos rupestres". **Novon** **8**: 225-229
- Borba, E.L. e Semir, J. 1998. Wind-assisted fly pollination in three *Bulbophyllum* (Orchidaceae) species occurring in the Brazilian campos rupestres. **Lindleyana****13**: 203-218.
- Borba, E.L.; Shepherd, G.J. e Semir, J. 1999. Reproductive systems and crossing potential in three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) occurring in Brazilian 'campo rupestre' vegetation. **Plant Systematics and Evolution** **217**:205-214.
- Borba, E.L. e Semir, J. 1999. Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. **Plant Systematics and Evolution** **217**: 197-204

- Borba, E.L.; Felix, J.M.; Solferini, V.N. e Semir, J. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. **American Journal of Botany**. (no prelo)
- Briggs, D. e Walters, S.M. 1984. **Plant Variation and Evolution**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Crawford, D.J. 1989. Enzyme electrophoresis and plant systematics. *In: Isozymes in Plant Biology*. D.E. Soltis e P.S. Soltis (ed). Dioscorides, Portland.
- Crawford, D.J. 1990. **Plant molecular systematics: macromolecular approaches**. Wiley-Interscience, Nova York.
- Daker, M.G. 1970. The chromosomes of orchids: IV. Bulbophyllinae Schltr. **Kew Bulletin** **24**: 179-184.
- Dematteis, M e Daviña, J.R. 1999. Chromosome studies on some orchids from South America. **Selbyana** **20**: 235-238.
- Dressler, R.L. 1968. Observations on orchids and Euglossine bees in Panama and Costa Rica. **Revista de Biologia Tropical** **15**:143-183.
- Dressler, R.L. 1981. **The orchids: natural history and classification**. Harvard University Press, Cambridge.
- Ehlers, B.K. e Pedersen, H.Æ. 2000. Genetic variation in three species of *Epipactis* (Orchidaceae): geographic scale and evolutionary inferences. **Biological Journal of the Linnean Society** **69**: 411-430.
- Ellstrand, N.C. & Marshall, D.L. 1985. Interpopulation gene flow by pollen in wild radish, *Raphanus sativus*. **The American Naturalist** **126**:606-616.
- Fenster, C.B. 1991. Gene flow in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae) I. Gene dispersal. **Evolution** **45**:398-409.

- Forni-Martins, E.R. 2000. Poliploidia, um processo evolucionário. *In: Tópicos atuais em Botânica: Palestras convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica*. T.B. Cavalcanti (org). Embrapa, Brasília. pp 29-34.
- Giulietti, A.M. & Pirani, J.R. 1988. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. **Proc. of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro. pp. 39-69.
- Godt, M.J.W. & Hamrick, J.L. 1993. Patterns and level of pollen mediated gene flow in *Lathyrus latifolius*. **Evolution** **45**:98-110.
- Goldblatt, P (ed.).1994. **Index to plant chromosome numbers 1990-1991**. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, Vol 51. St.Louis.
- Guerra, M.S. 1983. O uso de Giemsa em citogenética vegetal - comparação entre a coloração simples e o bandeamento. **Ciência e Cultura** **35**: 190-193.
- Guerra, M.S. 1988. **Introdução à Citogenética Geral**. Guanabara, Rio de Janeiro.
- Hamrick, J.L. & Godt, M.J.W. 1990. Allozyme diversity in plant species. In: A.D.H. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler & B.S. Weir (eds.) **Plant population genetics, breeding and genetic resources**, pp. 43-63. Sinauer, Sunderland.
- Harley, R.M. 1995. Introduction. *In*: B.L. Stannard (ed.). **Flora of the Pico das Almas: Chapada Diamantina-Bahia, Brazil**. Royal Botanic Gardens, Kew. pp 1-40.
- Hartl, D.L. e Clark, A.G. 1997. **Principles of Population Genetics**. Sinauer, Sunderland.
- Jesus, F.F.; Solferini, V.N.; Semir, J. e Prado, P.I.K.L. Local differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. **Plant Systematics and Evolution**. (no prelo)

- Jones, K & Daker, M.G. 1968. The Chromossomes of Orchids III. Catasetineae Schltr. **Kew Bulletin. 22:** 421-427.
- King, J.N. e Dancik, B.P. 1983. Inheritance and linkage of isozimes in white spruce (*Picea glauca*). **Canadian Journal of Genetics and Cytology 25:** 430-436
- Köeppen, W. **Climatologia con un estudio de los climas de la Tierra.** (Trad. P.R.H.Peres). Fondo de Cultura Economica, Cidade do México.
- Levin, D.A. & Kerster, H.W. 1968. Local gene dispersal in *Phlox*. **Evolution 22:**130-139.
- Levin, D.A. 1983. Poliploidy and novelty in flowering plants. **The American Naturalist 122:** 1-25.
- Lim, K.Y. & Jones, K. 1982. The Chromosomes of Orchids VI: *Bulbophyllum*. **Kew Bulletin. 37:** 217-219.
- Loveless, M.D. & Hamrick, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics 15:**65-95.
- Meve, U. & Liede, S. 1994. Floral biology and pollination in stapeliads - new results and a literature review. **Plant Systematics and Evolution 192:**99-116.
- Murawski, D.A.; Fleming, T.H.; Ritland, K. e Hamrick, J.L. 1994. Mating system of *Pachycereus pringlei*: an autotetraploid cactus. **Heredity 72:** 86-94.
- Nei, M. 1978. Estimation of of average heterozigosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics 89:** 583-590.
- Pabst, G.F.J. & Dungs, F. 1975. **Orchidaceae Brasiliensis, Vol. 1.** Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- Pabst, G.F.J. & Dungs, F. 1977. **Orchidaceae Brasiliensis, Vol. 2.** Kurt Schmiersow, Hildesheim.

- Paulus, H.F. & Gack, C. 1990. Pollination of *Ophrys* (Orchidaceae) in Cyprus. **Plant Systematics and Evolution** **169**:177-207.
- Pijl, L. van der & Dodson, C.H. 1966. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. University of Miami Press, Coral Gables.
- Riley, R. e Chapman, V. 1958. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. **Nature** **182**: 713-715.
- Samuel, R.; Pinsker, W. e Ehrendorfer, F. 1990. Allozyme polymorphism in diploid and polyploid populations of *Galium*. **Heredity** **65**:369-378.
- Scacchi, R; Lanzara, P e De Angelis, G. 1987. Study of eletrophoretic variability in *Epipactis helleborine* (L.) Crantz, *E. palustris* (L.) Crantz and *E. microphylla* (Ehrh.) Swartz (fam. Orchidaceae). **Genetica** **72**: 217-224.
- Scacchi, R e De Angelis, G. 1989. Isoenzyme Polymorphisms in *Gymnadenia conopsea* and its inferences for systematics within this species. **Biochemical Systematics and Ecology**. **17**: 25-33.
- Scacchi, R; De Angelis, G e Lanzara, P. 1990. Allozyme variation among and within eleven *Orchis* species (fam. Orchidaceae), with special reference to hybridizing aptitude. **Genetica** **81**:143-150.
- Schaal, B.A. 1980. Measurement of gene flow in *Lupinus texensis*. **Nature** **284**:450-451.
- Schmitt, J. 1980. Pollinator foraging behavior and gene dispersal in *Senecio* (Compositae). **Evolution** **34**:934-943.
- Shaw, C.R. & Prasad, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes- a compilation of recipes. **Biochemical Genetics** **4**: 297-320.

- Soltis, D.E. e Rieseberg, L.H. 1986. Autopoliploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae): Genetic insights from enzyme electrophoresis. **American Journal of Botany** **73**: 310-318.
- Soltis, D.E. e Soltis, P.S. 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Trends in Ecology and Evolution** **14**: 348-352.
- Sun, M. 1996. Effects of population size, mating system, and evolutionary origin on genetic diversity in *Spiranthes sinensis* and *S. hongkongensis*. **Conservation Biology** **10**: 785-795.
- Sun, M. & Ganders, F.R. 1990. Outcrossing rates and allozyme variation in rayed and rayless morphs of *Bidens pilosa*. **Heredity** **64**:139-143.
- Swofford, D.L. e Selander, R.B. 1997. **Byosys-2. A Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Genetics**. Illinois Natural History Survey, Illinois.
- Waser, N.M. 1982. A comparison of distances flown by different visitors to flowers of the same species. **Oecologia** **55**:251-257.
- Wong, K.C. e Sun, M. 1999. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). **American Journal of Botany** **86**: 1406-1413.
- Wright, S. 1978. **Evolution and the Genetics of Populations - Vol 4**. The University of Chicago Press, Chicago.
- Young, A.; Boyle, T. & Brown, T. 1996. The genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution** **11**:413-418.

Apêndice: Protocolos utilizados para revelação dos sistemas enzimáticos que apresentaram boa resolução:

1) 6PGD (1.1.1.44) (6-fosfogluconato desidrogenase)

tampão: tris-HCl; 0,1M; pH 8,0

substrato: ácido 6-fosfogluconico - 25 mL

NADP - 5 mg

MgCl₂ - 50 mg

MTT - 5 mg

NBT - 6 mg

PMS - 0,3 mg

2) PGI (5.3.1.9) (fosfoglicose isomerase)

tampão Tris - HCl 0,1 M pH 8,4 - 30 mL

substrato: frutose 6-fosfato - 7 mg

NADP - 3 mg

MgCl₂ - 30 mg

MTT - 2 mg

NBT - 12 mg

glicose 6-fosfato DH - 10 unidades

PMS - 0,6 mg

3) MDH (1.1.1.37) (desidrogenase do ácido málico)

tampão Tris - HCl 0,1 M pH 8,4 - 30 mL

substrato: MDH substrato* - 5mL

NAD - 7,5 mg

MTT - 5 mg

NBT - 6 mg

PMS - 0,5 mg

*MDH substrato: L- malato - 1,34 g

H₂O - 10 mL

ajustar pH para 7,0 com Na₂CO₃ 5N

H₂O q.s.p. - 100mL

4) PGM (5.4.2.2) (fosfoglicomutase)

tampão: tris-HCl 0,05M; pH 8,0 - 30 mL

substrato: glicose 1-fosfato - 75 mg

MgCl₂ - 60 mg

NADP - 5 mg

MTT - 2 mg

NBT - 6 mg

glicose 6-fosfato DH - 20 unidades

PMS - 0,5 mg

5) IDH (1.1.1.42) (isocitrato desidrogenase)

tampão: tris-HCl 0,1M; pH 8,4 - 30 mL

substrato: ácido isocítrico - 70 mg

NADP - 6 mg

MgCl₂ - 60 mg

MTT - 2 mg

NBT - 6 mg

PMS - 0,6 mg

6) LAP (3.4.11.1) (leucil-aminopeptidase)

tampão: tris-maleato 0,2M; pH 6,0 - 30mL

substrato: l-leucil β-naftilamida - 30 mg

fast garnet - 30 mg

7) EST (3.1.1.1) (Esterase)

tampão: fosfato de potássio 0,1M; pH7,0 - 25 mL

substrato: á-naftil acetato em solução (0,2g em 10mL de acetona e 10mL de água)-0,5mL

β-naftil acetato em solução (0,2g em 20 mL de acetona)-0,5mL

fast blue BB - 15mg