

ANA APARECIDA BANDINI ROSSI

FILOGEOGRAFIA, DIFERENCIAÇÃO GEOGRÁFICA E  
CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE  
*Psychotria ipecacuanha* DAS FLORESTAS ATLÂNTICA E AMAZÔNICA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007

ANA APARECIDA BANDINI ROSSI

FILOGEOGRAFIA, DIFERENCIAÇÃO GEOGRÁFICA E  
CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE  
*Psychotria ipecacuanha* DAS FLORESTAS ATLÂNTICA E AMAZÔNICA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 01 de março de 2007.

---

Prof. Carlos Roberto de Carvalho  
(Co-Orientador)

---

Prof. Jorge Abdala Dergam dos Santos  
(Co-Orientador)

---

Dra. Eveline Teixeira Caixeta

---

Prof. Lyderson Facio Viccini

---

Prof. Luiz Orlando de Oliveira  
(Orientador)

*Dedico aos meus pais, José e Palmira;  
ao meu esposo e companheiro Osvaldo; aos  
meus queridos filhos Fernanda e Fernando, a  
minha irmã Maria e ao meu irmão Edson.  
Obrigada pelo apoio, carinho, solidariedade e,  
sobretudo, pelo amor incondicional.*

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram no desenvolvimento deste trabalho. Em especial:

A Deus, pelas forças em todos os momentos desta caminhada;

A Universidade Federal de Viçosa, pela acolhimento e qualificação;

A Universidade do Estado de Mato Grosso, pela oportunidade de qualificação;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade deste aperfeiçoamento;

Ao IEF (Instituto Estadual de Florestas), por permitir a realização de coletas na Unidade de Conservação Parque Estadual do Rio Doce;

Ao Prof. Dr. Luiz Orlando de Oliveira, pelos sábios conselhos fornecidos durante a orientação, pelo incentivo e, sobretudo, pela humildade no repasse de seus conhecimentos. Obrigado pela confiança e amizade; Obrigado por ter sido, durante todo o tempo, meu orientador e amigo.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto de Carvalho, pelas sugestões, orientações e pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento.

Ao Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos, pela orientação e pelas contribuições fornecidas durante todo o desenvolvimento do trabalho;

Ao Prof. Dr. Wagner Campos Otoni, pelo companheirismo e sugestões.

Aos meus pais, pelos ensinamentos e pelos exemplos de vivência;  
com eles aprendi a importância de valorizar a vida e a respeitar o próximo;

Ao meu esposo Osvaldo Saragosa Rossi e ao meu filho Fernando Saragosa Rossi pelo companheirismo, incentivo, apoio e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho;

A minha filha Fernanda Saragosa Rossi e ao seu esposo Marcio Cristiano Luis, pela compreensão e pelas alegrias;

A Lourdes Iarema e ao Rogério, pela amizade, companheirismo e apoio dado a mim e a minha família durante nossa estadia em Viçosa;

A Maurecilne Lemes da Silva pela amizade e carinho durante este período;

A Roberta, a Maria Antonia e ao Maninho, pela amizade e pelas coletas de material na região de Mato Grosso, sem os quais este trabalho não teria se concretizado;

A Andreia pelos ensinamentos e ajuda na realização dos trabalhos de laboratório e também pelas palavras amigas;

Ao Wellington pelas orientações e incentivo no desenvolvimento do trabalho de citogenética;

Aos colegas Francismar, Bruna, Gisele, Celice, Luiz, Milene, Márcia, Maíra, Fernanda, Magali, Poliana, Mariana, Beatriz, Cassiana, Isabela enfim, a todos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e do Laboratório de Citogenética Vegetal pelo convívio e amizade;

Aos demais colegas e amigos de pós-graduação, professores e funcionários do curso de Pós-Graduação em Genética e melhoramento, pelos ensinamentos, convívio e amizade;

## **BIOGRAFIA**

ANA APARECIDA BANDINI ROSSI, filha de José Bandini e Palmira Christina Polotto Bandini, nasceu em 25 de outubro de 1965, em Marialva - Paraná. Em 1982 casou-se com Osvaldo Saragosa Rossi. Em maio de 1983 nasceu Fernanda Saragosa Rossi e em março de 1986 Fernando Saragosa Rossi, seus dois queridos filhos.

Diplomou-se como Bióloga em janeiro de 1996 pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), na cidade de Alta Floresta MT.

Em maio de 1996, ingressou na UNEMAT como professora substituta na área de Biologia Geral e em junho de 1998 tornou-se professora efetiva nesta Instituição de Ensino Superior.

Concluiu o curso de Mestrado em Botânica em 2003 na Universidade Federal de Viçosa. Durante este período desenvolveu pesquisa na área de Biologia Reprodutiva de plantas.

Em março de 2003, iniciou o Curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Biologia Molecular de plantas.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS .....	4
<hr/>	
<b>CAPÍTULO I: FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DE <i>Psychotria</i> <i>ipecacuanha</i> .....</b>	<b>6</b>
<hr/>	
RESUMO .....	6
INTRODUÇÃO .....	8
MATERIAL E MÉTODOS .....	11
Populações amostradas .....	11
Extração de DNA .....	13
Amplificação, purificação e sequenciamento .....	14
Análise das seqüências .....	15
Estimação da rede de haplótipos .....	16
Análises dos clados aninhados (“Nested Clade Analysis”) e teste por associação geográfica .....	17
RESULTADOS .....	20
Haplótipos .....	20
Compartilhamento dos haplótipos .....	22
Estimação da rede de haplótipos e aninhamento .....	25
Análise de clados aninhados (NCA) .....	27
DISCUSSÃO .....	32
Inferência da história demográfica entre as florestas Atlântica e Amazônica .....	32
Estrutura filogeográfica de <i>Psychotria ipecacuanha</i> na Floresta Atlântica .....	36
Estrutura filogeográfica de <i>Psychotria ipecacuanha</i> na Floresta	

Amazônica .....	37
Conclusões e implicações para conservação .....	39
REFERÊNCIAS .....	41
<hr/>	
<b>CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA DIVERSIDADE GENÉTICA E DIFERENCIAÇÃO GEOGRÁFICA ENTRE POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Psychotria ipecacuanha</i> (RUBIACEAE) NAS FLORESTAS ATLÂNTICA E AMAZÔNICA .....</b>	<b>48</b>
<hr/>	
RESUMO .....	48
INTRODUÇÃO .....	51
MATERIAL E MÉTODOS .....	56
Material Vegetal .....	56
Extração de DNA total .....	58
Seleção de primers e otimização do PCR .....	59
PCR - Amplificação de ISSR .....	60
Análise dos dados .....	62
RESULTADOS .....	66
Polimorfismo revelado por marcadores de ISSR .....	66
Diversidade genética dentro de populações .....	67
Diferenciação genética entre populações .....	69
Similaridade genética entre populações e estrutura geográfica .	71
DISCUSSÃO .....	79
Estrutura populacional .....	79
Diversidade genética entre populações .....	81
O efeito da disjunção na diversidade genética .....	83
Conclusões e implicações para conservação .....	85
REFERÊNCIAS .....	87
<hr/>	
<b>CAPÍTULO III: CYTOGENETIC CHARACTERIZATION AND NUCLEAR DNA CONTENT OF <i>Psychotria ipecacuanha</i> .....</b>	<b>94</b>
<hr/>	
SUMMARY .....	94
INTRODUCTION .....	96
MATERIALS AND METHODS .....	98

Plant material .....	98
Flow cytometry .....	98
Cytogenetic preparations .....	100
Image analysis .....	101
RESULTS .....	102
DISCUSSION .....	105
Flow cytometry .....	105
Cytogenetics .....	106
REFERENCES .....	110
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	115
ANEXOS .....	118

## RESUMO

ROSSI, Ana Aparecida Bandini, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Filogeografia, diferenciação geográfica e caracterização citogenética de populações naturais de *Psychotria ipecacuanha* das florestas Atlântica e Amazônica.** Orientador: Luiz Orlando de Oliveira. Co-Orientadores: Carlos Roberto de Carvalho, Jorge Abdala Dergam dos Santos e Wagner Campos Otoni.

Poaia (*Psychotria ipecacuanha*) é um pequeno arbusto perene que cresce abundantemente em áreas úmidas e sombrias das florestas tropicais do Brasil. A espécie foi utilizada pelos nativos brasileiros que ensinaram as propriedades medicinais aos colonizadores europeus. As raízes de poaia alcançaram utilidades mundiais como expectorante, amebicida, e agente vomitivo, devido à presença de alcalóides isoquinolínicos farmacologicamente ativos. Porém, a intensa coleta de plantas nativas e à negligência de replantio após a coleta das raízes conduziu a um severo declínio de suas populações nativas. Populações remanescentes ocorrem naturalmente em três regiões extremamente discretas das florestas tropicais: 1) a América central e partes adjacentes da América do Sul; 2) parte do sudoeste da Amazônia brasileira; e 3) Floresta Tropical Atlântica ao longo da costa brasileira. Os estudos realizados na presente investigação utilizaram técnicas combinadas que incluiu filogeografia molecular baseada em cpDNA, estrutura de população via ISSR, e citogenética para caracterizar populações naturais de poaia das florestas Atlântica e Amazônica do Brasil. As análises permitiram elaborar e avaliar hipóteses dos fatores históricos e ecológicos que moldaram a atual distribuição das populações existentes e

adicionar informações para a compreensão da história evolutiva desta importante espécie medicinal. As análises de clado aninhado e análises de ISSR revelaram diferenças notáveis entre as florestas. Diversidade de haplótipo de cpDNA foi maior na Floresta Atlântica, que abrigou 11 dos 12 haplótipos encontrados. Um único haplótipo foi encontrado na Floresta Amazônica. Nenhum dos haplótipos foi compartilhado pelas florestas, o que indica a presença de monofilia recíproca. As análises de clado aninhado indicaram a fragmentação alopátrica como sendo a principal força que moldou as diferenças entre florestas. Quando comparada a Floresta Amazônica, a Floresta Atlântica exibiu altos níveis de diversidade genética como demonstrado pelos maiores valores de  $H_E$ ,  $H_B$  e  $I$ , tanto como uma média das populações como de grupo, como revelado pelas análises de ISSR. AMOVA revelou que a maioria da diversidade genética foi particionada entre tipos de floresta. Fluxo gênico entre florestas é na atualidade insignificante. As análises de citometria de fluxo evidenciaram dois grupos com quantidade de DNA distinta ( $2C = 1.24$  pg e  $2C = 2.05$  pg). Poaia demonstrou um cariótipo consistindo de 11 pares de cromossomo ( $2n = 22$ ), dos quais 4 são metacêntricos e 7 são submetacêntricos. As análises de citogenética revelaram que as populações naturais podem estar experienciando poliploidização e sugerem que esta espécie seja tetraplóide. Em geral, as análises indicaram um evento de colonização recente como origem das populações da Floresta Amazônica e uma origem antiga para as populações da Floresta Atlântica. A Floresta Atlântica foi considerada como um centro de diversidade para poaia. Implicações para conservação são discutidas.

## ABSTRACT

ROSSI, Ana Aparecida Bandini, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2007. **Phylogeography, geographic differentiation and cytogenetic characterization of natural populations of *Psychotria ipecacuanha* from the Atlantic and Amazon forests.** Advisor: Luiz Orlando de Oliveira. Co-advisors: Carlos Roberto de Carvalho, Jorge Abdala Dergam dos Santos, and Wagner Campos Otoni.

Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*) is a small perennial shrub, which grew abundantly under shady areas of tropical rain forests of Brazil. The species was employed by native Brazilians who taught the medicinal properties to European settlers. Ipecac roots have achieved worldwide usefulness as an expectorant, amoebicide, and vomitive agent because of its pharmacological active isoquinoline alkaloids. However, overharvesting of wild plants and negligence in replanting ipecac plants after uprooting has led to a severe decline of native ipecac populations. Remaining populations occur naturally in the understory of tropical forests from three widely discrete regions: 1) Central America and adjacent parts of South America; 2) Southwestern part of the Brazilian Amazon; and 3) Atlantic Rain Forest along the Brazilian coast. The studies carried out in the present investigation used a combined approach that included molecular phylogeography based on cpDNA, population structure via ISSR, and cytogenetics to characterize natural populations of ipecac from the Atlantic and Amazon forests of Brazil. The analyses allowed us to develop and evaluate hypotheses on the historical and ecological factors that shaped the distribution of extant populations and

added a substantial amount of information to the understanding the evolutionary history of this important medicinal species. Both nested clade analyses and ISSR analyses revealed remarkable differences between forests. Diversity of cpDNA haplotype was much higher in the Atlantic Forest, which harbor 11 out of the 12 haplotypes found. Only a single haplotype was uncovered in the Amazon Forest. None of the haplotypes was shared across forest types, which indicated the presence of reciprocal monophyly. The nested clade analyses pointed allopatric fragmentation as the main causal force that shaped the differences between forests. When compared to the Amazon Forest, the Atlantic Forest exhibited higher levels of genetic diversity as shown by the greater values of  $H_E$ ,  $H_B$  and  $I$ , both as a mean of populations and as a group, as revealed by the ISSR analyses. AMOVA revealed that most of the genetic diversity was partitioned between forest types. Gene flow between forests is negligible at the present time. The flow cytometry analyses evidenced two groups with distinct DNA amount ( $2C = 1.24$  pg and  $2C = 2.05$  pg). Ipecac showed a karyotype consisting of 11 chromosome pairs ( $2n = 22$ ), of which 4 are metacentric and 7 are submetacentric. The cytogenetic analyses revealed that natural populations may be experiencing polyploidization and suggested that this species can be a tetraploid. Overall, the analyses indicated a recent colonization event as the origin of the populations found in the Amazon Forest and an ancient origin for the populations of the Atlantic Forest. The later forest was considered as a center of diversity for ipecac. Implications for conservation are discussed.

## INTRODUÇÃO GERAL

A filogeografia pode ser definida como um campo de estudo que integra princípios e processos que governam as distribuições espaciais e temporais de linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies muito próximas entre si (Avice 2000, Templeton 2004). Como delineamento teórico, a filogeografia permite caracterizar processos de diversificação ao nível de espécie e a formulação de hipóteses de biogeografia histórica. A filogeografia molecular tem sido empregada com sucesso para explorar associação entre redes de haplótipos e geografia em um grande número de espécies vegetais, animais e de microorganismos (Templeton 2004).

Os domínios morfoclimáticos da Amazônia e da Mata Atlântica compreendem as florestas tropicais de maior diversidade no mundo (Ab'Saber 1977). Entre essas duas florestas encontra-se uma extensão geográfica de vegetação mais aberta e baixa, incluindo o Chaco argentino e paraguaio, a caatinga no nordeste do Brasil e o cerrado na região central brasileira. Essa extensão geográfica tem sido considerada por muitos autores como um impedimento à migração das espécies entre as duas maiores regiões florestais da América do Sul (florestas Amazônica e Atlântica), tornando-se clara as diferenças na composição florística entre elas (Oliveira-Filho e Ratter, 1995). Por outro lado, a distribuição disjunta de um número considerável de espécies na Floresta Atlântica e na Floresta

Amazônica sugere a possibilidade de ligação entre elas no passado (Rizzini, 1963; Andrade-Lima, 1982). Tem sido proposta a existência de corredores de migração histórica de elementos da flora das florestas Atlântica e Amazônica (Bigarella *et al.*, 1975). As relações filogeográficas e a avaliação da distribuição intraespecífica da diversidade genética em espécies com distribuição disjunta nestas duas florestas tem sido pouco explorada.

*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae) apresenta distribuição disjunta em três grandes áreas: a) Florestas da América Central (Panamá e Costa Rica) e norte da América do Sul (Colômbia); b) sul da Floresta Amazônica brasileira (nos Estados de Rondônia e Mato Grosso; e, c) na Floresta Atlântica (principalmente nos Estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro) (Velo, 1947; Assis e Giulietti, 1999). É uma espécie reconhecida mundialmente como planta medicinal, apresentando atividades farmacológicas comprovadas, cujos princípios bioativos já foram isolados e identificados. Segundo Carrinconde *et al* (1995), são quatro as principais propriedades terapêuticas da poaia: amebicida, emética (provoca vômitos), expectorante e diaforética/febrífuga; o que está de acordo com a ação farmacológica dos seus alcalóides principais. Ocorre em agregados (reboleiras) e habita exclusivamente áreas de sub-bosque com baixos níveis de luminosidade (Velo, 1947). *Psychotria ipecacuanha* consta na lista das espécies ameaçadas de extinção no Estado de Minas Gerais (Mendonça e Lins, 2000), o único estado brasileiro dentro da área de ocorrência da espécie a publicar uma lista de conservação de espécies vegetais. As populações naturais de *Psychotria ipecacuanha* presentes no Brasil, sofreram um extenso processo extrativista,

devido a grande demanda do mercado externo. Atualmente, a espécie vem diminuindo sua densidade populacional e algumas populações naturais foram extintas devido à fragmentação de seus habitats. Como consequência destes processos, a espécie pode estar sofrendo impactos importantes na estrutura genética populacional e uma redução da diversidade genética.

A diversidade genética é um fator importante para a persistência das populações em ambientes variáveis, e é reconhecida como um componente fundamental da biodiversidade (Mace *et al.* 1996). O entendimento do processo de divergência ao nível de população é fundamental para o estudo da diversificação evolutiva e do reconhecimento de diferentes ações de conservação. Processos ecológicos e históricos, como deriva genética, fluxo gênico e migração, moldaram a atual distribuição da diversidade genética de uma espécie a compreensão destes processos é essencial para a elaboração e implementação de programas de conservação e manejo.

Este estudo se propõe a investigar os padrões filogeográficos e a estrutura genética de populações de *Psychotria ipecacuanha* atualmente encontradas nas florestas Atlântica e Amazônica, bem como caracterizar citogeneticamente e determinar o conteúdo de DNA da espécie.

## REFERÊNCIAS

- Ab'Saber AN.** 1977. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. Primeira Aproximação. *Geomorfologia*, **53**: 1-23.
- Andrade-Lima D.** 1982. Present-day forest refuges in Northeastern Brazil. *Biology diversification in the tropics* (ed. G.T. Prance), pp. 245–251. Plenum Press, New York.
- Assis MC, Giulietti AM.** 1999. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de “ipecacuanha” - *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, **22**: 205-216.
- Avice JC.** 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard Univ. Press, Cambridge.
- Bigarella JJ, Andrade-Lima D, Riehs PJ.** 1975. Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **47**: 411-464.
- Carrinconde C, Moraes D, Fritschen M, et al.** 1995. *Plantas medicinais e plantas alimentícias*. Olinda: Centro Nordestino de Medicina Popular.
- Costa LP.** 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*, **30**: 71-86.
- Mace GM, Smith TB, Bruford MW, Wayne, RK.** 1996. An overview of the issues. *In: Molecular genetic approaches in conservation*. Eds. Smith, TB; Wayne, RK. Oxford University Press, New York, 3-12.

**Mendonça MP, Lins LV.** 2000. *Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, Fundação Zêo-Botânica de Belo Horizonte.

**Oliveira-Filho, AT, Ratter JA.** 1995. A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edinburgh Journal of Botany* 52:141-194.

**Pio Correia M.** 1969. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. IBDF, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro. IV.

**Rizzini CT.** 1963. A flora do cerrado. Análise florística das savannas centrais. *In Simpósio sobre o cerrado* (M.G. Ferri, org.). Edusp, São Paulo.

**Templeton AR.** 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, **13**: 789-809.

**Veloso HP.** 1947. As condições ecológicas da *Cephaelis ipecacuanha* Rich. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **45**: 361-372.

## CAPÍTULO I

---

### FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DE *Psychotria ipecacuanha*

#### RESUMO

As florestas Atlântica e Amazônica constituem as duas maiores extensões geográficas da América do Sul. Atualmente encontram-se separadas por uma extensa região geográfica intermediária. Várias espécies apresentam padrão de distribuição disjunta na Floresta Atlântica e na Floresta Amazônica. Neste estudo foi realizada uma análise filogeográfica molecular em *Psychotria ipecacuanha*, uma espécie medicinal, que no Brasil apresenta distribuição disjunta nas florestas Atlântica e Amazônica. As análises foram baseadas na variabilidade de duas regiões do gene *trnT-trnL* do genoma de cloroplasto. Os dados foram obtidos de 107 indivíduos provenientes de 23 populações sobre a extensão geográfica da espécie nas duas florestas. Doze haplótipos de cpDNA foram identificados. Os haplótipos não foram compartilhados pelas duas florestas, demonstrando, portanto monofilia recíproca. A diversidade de haplótipos foi maior para as populações da Floresta Atlântica (onde foram identificados 11 dos 12 haplótipos), enquanto que para as populações da Floresta Amazônica apenas um haplótipo foi observado. Uma única rede contendo os 12 haplótipos foi obtida. Os padrões filogeográficos sugerem uma colonização

mais recente na Floresta Amazônica em relação à Floresta Atlântica e a Floresta Atlântica como um possível refúgio para a espécie. A análise de clado aninhado do conjunto de haplótipos indicou que a fragmentação alopátrica é o principal processo influenciando a distribuição espacial atual dos haplótipos dentro da espécie, enquanto que na Floresta Atlântica o processo preponderante foi o fluxo gênico restrito com isolamento por distância. Em geral, as análises indicaram um evento de colonização recente como origem das populações da Floresta Amazônica e uma origem antiga para as populações da Floresta Atlântica. A Floresta Atlântica foi considerada como um centro de diversidade para poaia.

**Palavras chaves:** Filogeografia, diversidade genética, *Psychotria ipecacuanha*.

## INTRODUÇÃO

Filogeografia, a combinada análise de dados genealógicos e distribuição geográfica, têm se tornado uma poderosa ferramenta para inferir eventos biogeográficos históricos (Avice, 2000). Padrões de variação em marcadores nucleares e de organelas citoplasmáticas têm permitido inferências de eventos biogeográficos passados em todo tipo de escala geográfica desde local até continental (Avice, 2004, Takayama *et al.*, 2006; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). Apesar de progressos recentes nas abordagens filogeográficas, o conhecimento dos eventos biogeográficos históricos ainda permanece incompleto devido a lacunas nas amostragens taxonômicas e seus habitats.

A maioria das investigações filogeográficas moleculares em angiosperma tem objetivado a identificação de refúgios glaciais e rotas de colonizações pós-glaciais traçadas por espécies de árvores e arbustos de florestas temperadas do Velho Mundo (Demesure *et al.*, 1996; Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997; Liepelt *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2003). Comparativamente, poucos estudos têm se dedicado aos padrões de variação genética em espécies tropicais (Chiang *et al.*, 2001; Cannon e Manos, 2003; Collevatti *et al.*, 2003).

As florestas Atlântica e Amazônica são as duas maiores florestas tropicais da América do Sul. A Floresta Atlântica brasileira foi considerada um dos oito maiores *hotspot* de biodiversidade para conservação (Myers *et*

*al.*, 2000). A Floresta Atlântica ocorre ao longo da costa brasileira e está sujeita ao desflorestamento desde a chegada dos europeus. Atualmente, menos de 8 % de sua extensão original de 1,3 milhões de km<sup>2</sup> permanecem. Apesar da perda expressiva de habitat, a Floresta Atlântica ainda abriga uma parcela significativa da diversidade biológica do Brasil, com altíssimos níveis de endemismo (Rocha *et al.*, 2006). A Floresta Amazônica, é a maior floresta tropical do mundo, com uma área original de 4,1 milhões de km<sup>2</sup> que abriga grande quantidade da biodiversidade mundial (Auler *et al.*, 2004). Entre a Floresta Atlântica e a Floresta Amazônica encontra-se uma faixa de vegetação mais aberta, incluindo o chaco argentino e paraguaio, a caatinga no nordeste do Brasil, e o cerrado no Brasil central. Este corredor seco de vegetação aberta, também chamado “a maior disjunção da América do Sul” (Brieger, 1969), foi considerado como um importante impedimento para migração de espécies entre as duas regiões de Floresta Tropical (Moojen, 1948; Raven e Axelrod, 1974; Rizzini, 1979; Mori *et al.*, 1981; Por, 1992). Rizzini (1963) e Prance (1982) sugerem conexões passadas entre as Florestas Atlântica e Amazônica através do cerrado, uma vez que ocorre a distribuição disjunta de várias espécies nestas duas áreas separadas geograficamente.

*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (= *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich.) (Rubiaceae) denominada de poaia ou ipeca é uma planta medicinal que apresenta distribuição disjunta, ocorre em três grandes áreas dos domínios de florestas: a) Florestas da América Central (Panamá e Costa Rica) e norte da América do Sul (Colômbia); b) sul da Floresta Amazônica brasileira (nos Estados de Rondônia e Mato Grosso; e, c) na Floresta

Atlântica (principalmente nos Estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro) (Veloso, 1947; Assis e Giuliatti, 1999). *Psychotria ipecacuanha* sofreu um intenso processo extrativista, uma vez que suas raízes constituem em fonte de alcalóides farmacologicamente ativos, está listada entre as espécies ameaçadas de extinção no Estado de Minas Gerais (Mendonça e Lins, 2000), o único estado brasileiro dentro da área de ocorrência da espécie que publicou uma lista de conservação de espécies vegetais.

Neste estudo, avaliou-se a estrutura filogeográfica de haplótipos de DNA cloroplastídico de *Psychotria ipecacuanha* para respondermos as seguintes questões: (i) Qual dos dois domínios florestais apresenta uma maior diversidade? (ii) Os padrões filogeográficos de *Psychotria ipecacuanha* apoiam a existência de linhagens divergentes em congruência com a disjunção das florestas Atlântica e Amazônica? (iii) Há indícios de uma colonização recente em alguma das duas florestas? (iv) O padrão atual da diversidade genética de *Psychotria ipecacuanha* indica regiões de refúgios para a espécie? (v) Há indícios de fluxo gênico recente entre as populações de *Psychotria ipecacuanha* entre as duas florestas?

Os conhecimentos obtidos neste estudo poderão ser aplicados na elaboração de estratégias de conservação e manejo para a espécie, pois proporcionará um conhecimento sobre a distribuição espacial e temporal da atual diversidade genética da *Psychotria ipecacuanha* e sobre as relações evolutivas históricas entre suas populações.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ***Populações amostradas***

Neste estudo, foram avaliados 107 indivíduos de *Psychotria ipecacuanha* distribuídos em 23 populações. Doze dessas populações foram amostradas na Floresta Atlântica e onze na Floresta Amazônica. As populações amostradas em cada floresta com as respectivas localizações geográficas e o tamanho da amostra por população e por floresta estão relacionadas na Tabela 1. O material vegetal foi amostrado durante expedições de coleta de germoplasma empreendidas entre 1995 e 2006. A posição de cada população foi georeferenciada por meio de coordenadas geográficas (GPS II Plus, Garmin Corp. USA), tomadas durante as expedições de coleta. As populações de VB1, VB2, TAN, BBU, MAN, FRA e LAM da Floresta Amazônica foram amostradas por moradores locais. As posições geográficas destas populações foram estimadas por meio do Google Earth, de acordo com as informações fornecidas pelos coletores. As localidades das populações amostradas foram escolhidas de tal forma a abranger a maior distribuição possível da espécie. Foram coletadas folhas jovens, completamente expandidas, de uma haste por reboleira (agregado) em cada população. O material foliar foi envolto em papéis molhados para reter a umidade e acondicionado no campo em sacos plásticos de polietileno. Posteriormente, o material foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  no laboratório de sequenciamento de DNA (seqDNA).

**TABELA 1.** Populações amostradas com as respectivas abreviações, código da população (CP), localização geográfica, tamanho da amostra (N) e distribuição dos haplótipos. NH = número de haplótipos por floresta e população.

Populações	CP	Latitude (S)	Longitude (W)	N	Distribuição dos haplótipos											NH		
<b>FLORESTA ATLÂNTICA</b>					<b>73</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>J</b>	<b>L</b>	<b>M</b>	<b>11</b>
Trilha da Lagoa do Meio (TLM)	1	19°38'34"	42°30'56"	5				2	3									2
Trilha do Vinhático (TVI)	2	19°45'44"	42°28'56"	10	3							7						2
Trilha Central (TCE)	3	19°33'44"	42°37'57"	3	1					1		1						3
Visconde do Rio Branco (VRB)	4	21°00'37"	42°50'26"	11	6			1				1		2	1			5
Raposo (RAP)	5	21°06'40"	42°05'43"	18	14					1		1	2					4
Guaraciaba (GUA)	6	20°34'14"	43°00'28"	17	6	8				2						1		4
Dores de Guanhões (DOG)	7	19°02'17"	42°57'27"	2	2													1
Una (UNA)	8	15°20'00"	39°22'00"	2	2													1
Ponte Nova (PTN)	9	20°25'2,6"	42°53'42"	1	1													1
Carangola (CAR)	10	20°44'28"	42°01'33"	1	1													1
Irupi (IRU)	11	20°20'58"	41°38'25"	1				1										1
Conceição do Macabu (CON)	12	22°05'26"	41°52'12"	2	2													2
<b>FLORESTA AMAZÔNIA</b>					<b>34</b>													<b>1</b>
Prata (PRA)	13	15°30'26"	58°01'50"	6												6		1
Rio Vermelho (RVE)	14	15°17'38"	57°51'43"	6												6		1
Soroteca (SOR)	15	15°31'34"	58°00'42"	2												2		1
Tangará da Serra (TAN)	16	14°04'38"	57°03'45"	1												1		1
Mozar (MOZ)	17	15°04'57"	57°58'00"	3												3		1
Vila Bela da Santíssima Trindade 1 (VB1)	18	15°00'29"	59°57'02"	3												3		1
Vila Bela da Santíssima Trindade 2 (VB2)	19	14°59'04"	59°58'49"	3												3		1
Fazenda Manilha (MAN)	20	14°58'00"	57°57'00"	3												3		1
Fazenda Raizama (FRA)	21	14°53'00"	57°16'00"	3												3		1
Barra do Bugres (BBU)	22	14°51'00"	57°48'00"	2												2		1
Lambari D'Oeste (LAM)	23	15°19'27"	58°00'10"	2												2		1
Total				<b>107</b>	<b>38</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>34</b>		<b>12</b>

### ***Extração de DNA***

DNA genômico total foi extraído de aproximadamente 100 mg de folhas jovens de uma mesma haste, usando protocolo de CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987), com poucas modificações. O tecido foliar foi macerado em almofariz na presença de nitrogênio líquido. O material foi transferido para microtubos de 2 mL, ao qual foram adicionados 800 µL de tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M cloreto de sódio; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 2% polivinilpirrolidona (PVP) e 2% β-mercaptoetanol) e incubado a 65°C por 5 minutos. A seguir, foram adicionados 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v:v). Os tubos foram agitados por 1 minuto em vórtex e centrifugados a 13.000 rpm em centrífuga 5415D, (Eppendorf) por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e precipitado com o mesmo volume de isopropanol gelado por 12 horas. Após este período, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos e o precipitado foi lavado uma vez com etanol 70% e uma vez com etanol 95%. Depois da secagem por 15 minutos em temperatura ambiente, o precipitado foi ressuscitado em 200 µL de TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) contendo RNase (40 µg/mL) e a solução incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, a solução foi precipitada com a adição de acetato de amônio 7,5 M na proporção 1:10 (acetato:DNA ressuscitado) e 2/3 do volume de isopropanol gelado por 4 horas. A seguir, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado uma vez com etanol 70% e uma vez com etanol 95% e ressuscitado em 40-60 µL de TE. A qualidade e a concentração do DNA foram confirmadas por eletroforese em

gel de agarose 0,8% com marcador de DNA  $\lambda$ . As soluções estoque foram preparadas por diluições com água ultrapura autoclavada, de forma a se obter uma solução de trabalho com concentração final de aproximadamente 10 ng/ $\mu$ L de DNA genômico.

### **Amplificação, purificação e sequenciamento**

A região *trnT-trnL* do genoma de cloroplasto foi amplificada com os *primers* A (5'-CATTACAAATGCGATGCTTCT-3') e D (5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3'), descritos por Taberlet *et al.* (1991). Para as amostras que as amplificações falharam ou cujos produtos possuíam baixa qualidade com o uso da combinação de *primers* A e D, a estratégia de amplificação foi redesenhada, de tal forma que o fragmento foi amplificado usando duas reações independentes. A primeira reação foi conduzida com a combinação de *primers* A e B (5'-TCTACCGATTTCGCCATATC-3'), que tem como alvo amplificar a região espaçadora intergênica entre o exon 5' de *trnT* (UGU) e *trnL* (UAA) (Taberlet *et al.*, 1991). A amplificação com este conjunto de *primers* resultou em um fragmento denominado "AB". A segunda reação foi conduzida com os *primers* C (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3') e D e amplificou o íntron *trnL* (UAA) (Taberlet *et al.*, 1991). Esta segunda amplificação resultou em um fragmento denominado "CD".

As reações da polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas em um volume final de 25  $\mu$ L, contendo: Tris-HCl 10 mM (pH8,3); 50 mM KCl; 0,1% de tween 20; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5  $\mu$ M de cada *primer*; 0,2 mM de cada dNTP; 1,25 U de *Taq* DNA polimerase; 1,25  $\mu$ l dedimetil-sulfóxido (DMSO); aproximadamente 60 ng de DNA e água ultrapura. As amplificações foram

conduzidas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, um programa *touch down* de sete ciclos de 94°C por 1 minuto, 58→52°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, seguidos por 28 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 72°C por 1,5 minutos e 1 ciclo de extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente selecionados para purificação e sequenciamento.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit de purificação QIA-quick (Qiagen). O DNA obtido foi seqüenciado em seqüenciador automático ABI Prism 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ou o seqüenciador MegaBace DNA Analysis System 500 (Amersham Biosciences Corp), utilizando o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*. Os fragmentos “AD”, “AB” e “CD” foram seqüenciados nas direções *forward* e *reverse* com os *primers* A e D; A e B, C e D, respectivamente.

### **Análise das seqüências**

As seqüências foram importadas para o SEQUENCHER version 4.0.5 (Gene Codes Corp.) sendo editadas e corrigidas manualmente. O alinhamento completo das seqüências foi realizado com a introdução de *gaps* para compensar a presença de *indels*. O sequenciamento da região *trnT-trnL* resultou em dois fragmentos, uma vez que as regiões amplificadas com os *primers* A e B e com os *primers* C e D não se sobrepõe. Para detecção das diferentes seqüências (haplótipos), uma matriz foi construída combinando os fragmentos “AB” e “CD” para os 107 indivíduos das 23

populações analisadas. O haplótipo é resultante da junção das duas regiões do genoma cloroplastídico analisadas.

### ***Estimação da rede de haplótipos***

O programa computacional TCS versão 1.13 (Clement *et al.*, 2000), foi utilizado para obter um cladograma não enraizado de haplótipos que revela as relações genealógicas entre as 107 seqüências. O TCS aplica a estatística da parcimônia pelo algoritmo desenvolvido por Templeton *et al.* (1992). O programa reúne as seqüências originais em haplótipos e calcula uma matriz de distância (número de diferenças mutacionais) para todas as comparações par a par dos haplótipos até que a probabilidade exceda 95%. O número de diferenças mutacionais acima deste limite é o número máximo de conexões mutacionais entre pares de seqüências justificado pelo critério de parcimônia (Clement *et al.*, 2000). Os *indels* foram considerados como o quinto caráter, e foram codificados de tal forma que cada *indel*, independentemente de seu tamanho, foi considerado um único evento de mutação. Os “loops” presentes na rede foram resolvidos utilizando critérios baseados na teoria da coalescência (Crandall e Templeton, 1993), resumido por Pfenninger e Posada (2002) como: (i) Critério da freqüência: haplótipos são mais prováveis de estarem conectados com os haplótipos de maior freqüência do que com os haplótipos raros; (ii) Critério topológico: haplótipos são mais prováveis de serem conectados com os haplótipos do interior do que com os haplótipos da extremidade; (iii) Critério geográfico: haplótipos são mais prováveis de estarem conectados com os haplótipos da mesma

população ou região do que com haplótipos que ocorrem em populações distantes.

***Análises dos clados aninhados (“Nested Clade Analysis”) e teste por associação geográfica***

Para inferir os processos que levaram aos atuais padrões filogeográficos da espécie, utilizou-se a análise de clados aninhados (NCA) (Templeton *et al.*, 1995). Para NCA, os haplótipos são aninhados em clados hierárquicos de acordo com as regras padronizadas em Templeton *et al.* (1987) e Templeton e Sing (1993). Os haplótipos são as menores unidades de análise e são considerados clados de nível zero. O aninhamento inicia na extremidade da rede de haplótipo e move-se um passo mutacional para o interior da rede, unindo todos os haplótipos que estão conectados por este passo dentro de um subconjunto chamado de clado de nível 1. Este procedimento é então repetido nas porções mais interiores da rede de haplótipo até todos os haplótipos terem sido colocados dentro de um subconjunto de clado de nível 1. Os clados de nível 2 são formados utilizando as mesmas normas de aninhamentos, tendo os clados de nível 1 como unidade. O procedimento é repetido até obter um nível de aninhamento que resulte em apenas um único clado. Os clados resultantes são designados por ‘C-N’ onde ‘C’ é o nível de aninhamento do clado e ‘N’ é o número de um clado particular em um dado nível de aninhamento (Templeton *et al.*, 1987). O aninhamento resgata a informação temporal mais confiável contida na rede de haplótipo (Templeton, 1998; 2001; 2004).

Com base nas localizações geográficas das amostras no cladograma aninhado, três medidas de distâncias foram calculadas: (i) distância do clado ( $D_c$ ), que é a medida de como geograficamente está espalhado um particular haplótipo ou clado; (ii) distância do clado aninhado ( $D_n$ ), que é a medida de quanto um haplótipo particular ou clado está espalhado geograficamente em relação ao clado dentro do qual está aninhado; e (iii) distância interior-extremidade (I-E), que é a diferença média nos valores de  $D_c$  [(I-E)  $D_c$ ] e  $D_n$  [(I-E)  $D_n$ ] entre haplótipos ou clados do interior (ancestral) e extremidade (descendente) (Templeton *et al.*, 1995). Associação entre haplótipo e geografia foi testada por uma análise de contingência permutacional exata (10.000 permutações ao acaso), usando o programa GEODIS versão 2.5 (Posada *et al.*, 2000). O resultado da análise de clados aninhados foi utilizado para investigar associações geográficas, através da análise de contingência permutacional pelo teste de  $\chi^2$  (Hudson *et al.*, 1992; Templeton e Sing, 1993; Templeton *et al.*, 1995), na qual cada localização geográfica (população) foi considerada como uma categoria variável. O teste de contingência foi realizado nos clados com mais de um haplótipo ou clado, seguindo o algoritmo descrito por Templeton e Sing (1993). Essa análise permitiu testar a hipótese nula de que não há associação entre os clados e a localização geográfica da população de origem. A hipótese nula foi contrastada com a hipótese alternativa de que os clados estejam agrupados de acordo com a localização geográfica da população de origem. A análise evidencia interpretações filogeográficas mais ajustadas que permitem distinguir entre a história e a estrutura da população (Templeton e Sing, 1993; Templeton *et al.*, 1995; Crandall e Templeton, 1993; Templeton,

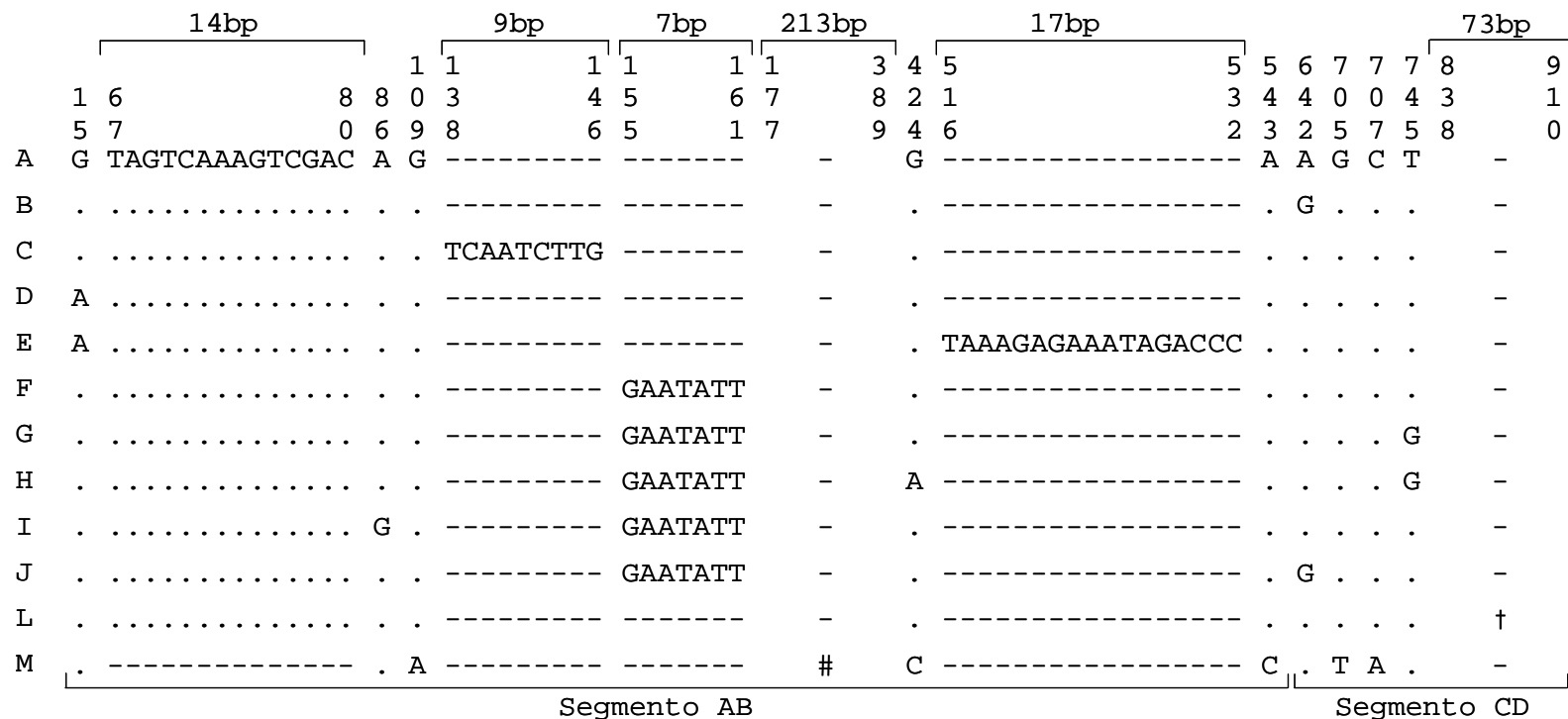
1998). A chave de inferência revisada de Templeton (2004), anexo 1, foi usada para interpretar associações significativas entre haplótipos e geografia e fazer a inferência biológica apropriada.

## RESULTADOS

### ***Haplótipos***

Doze haplótipos foram distinguidos entre os 107 indivíduos analisados. O alinhamento das seqüências revelou a presença de 15 sítios polimórficos que foram caracterizados por *indels* ou substituições de bases.

O fragmento “AB” apresentou dez sítios polimórficos, dos quais cinco foram substituições de bases e cinco foram *indels*. Os *indels* do segmento “AB” se caracterizaram por 14; 9; 7; 213 e 17 pares de bases (Fig. 1). Os dez sítios polimórficos do segmento “AB” revelaram oito diferentes haplótipos. Dentre eles o haplótipo M foi o maior, com 506 pb, e ocorreu somente na Floresta Amazônica. O haplótipo M apresentou uma inserção de 213 pb entre as posições 177 e 389, uma deleção de 14 pb entre as posições 67 e 80 e três substituições de nucleotídeos nas posições: 109 (G→A), 424 (G→C) 543 (A→C) não detectadas nas demais seqüências. Exibiu, também, três deleções de 9, 7 e 17 pb entre as posições 138 e 146, 155 e 161 e 516 e 532, respectivamente. Os outros sete haplótipos foram detectados na Floresta Atlântica e diferiram entre si pela presença de três *indels* (9, 7 e 17 pb), variando de tamanho (307, 314, 316 e 324 pb), de acordo com a inserção ou deleção dos *indels* e por três substituições nas posições 15 (G→A), 86 (A→G), e 424 (G→A) (Fig. 1).



# = CAACGATTAATAGAGCGATATAGAATTCGATTTATTTACCAC TAATACACTAATACAATTCGAATATTATTTAAATTTGATATATCTATTTATTTTTATTATTTT  
ATTATTTTTGAGTTTTAGATAAATAAAATTAAGTTTTTCGTTTTTGAATTCAAATGGCTTTTGAACCTCTTTTTATTGTATTATCTTATTTGATTCTATATCATAGAT

† = TGGTGTGAATAGATTCTAGCTTATTGATCAAATGATTCCTCCATAGTCTGATAAATCTTTGATTAATTGGG

**FIG. 1.** Alinhamento de seqüências dos sítios polimórficos do fragmento de cpDNA que define doze haplótipos em *Psychotria ipecacuanha*. Cada fragmento combina 553 bp da região espaçadora intergênica entre o éxon 5' do *trnT* (UGU) e *trnL* (UAA) (segmento “AB”) e 479 bp do intron do *trnL* (segmento “CD”). Cada ponto indica similaridade ao Haplótipo A e cada traço indica um *gap*. (# e † correspondem aos dois maiores “*indels*”, cujas seqüências estão mostradas acima).

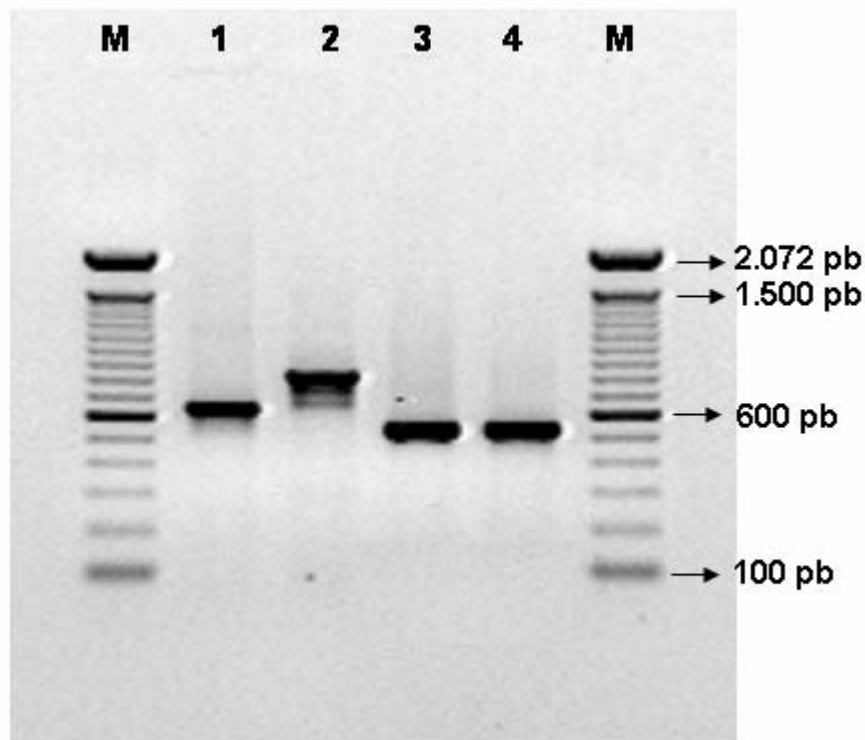
No fragmento “CD” do cpDNA ocorreram substituições de nucleotídeos em quatro posições (642, A→G; 705, G→T; 707, C→A; 745, T→G) e um indel de 73 pb entre as posições 838 e 910. No total, cinco diferentes seqüências foram reveladas para o intron *trnL*, com dois diferentes tamanhos (406 e 479 pb) (Fig. 1).

O alinhamento combinando os dois segmentos (“AB” e “CD”) resultou em uma seqüência de 1032 pb. O haplótipo M encontrado na Floresta Amazônica possui um tamanho de 912 pb. Os haplótipos de A a L encontrados na Floresta Atlântica variaram de tamanho em virtude da presença de *indels*.

A Fig. 2 demonstra os produtos de amplificação dos segmentos “AB” e “CD” em indivíduos das florestas Atlântica e Amazônica. A amplificação do segmento “AB” resultou em dois fragmentos de tamanhos diferentes. O fragmento maior apresentou aproximadamente 850 pb e foi exclusivo dos indivíduos da Floresta Amazônica, o qual depois de analisado deu origem ao haplótipo M. O fragmento menor apresentou 630 pb e foi exclusivo das populações da Floresta Atlântica. Os dados revelaram que é possível um diagnóstico molecular de origem geográfica em nível de floresta.

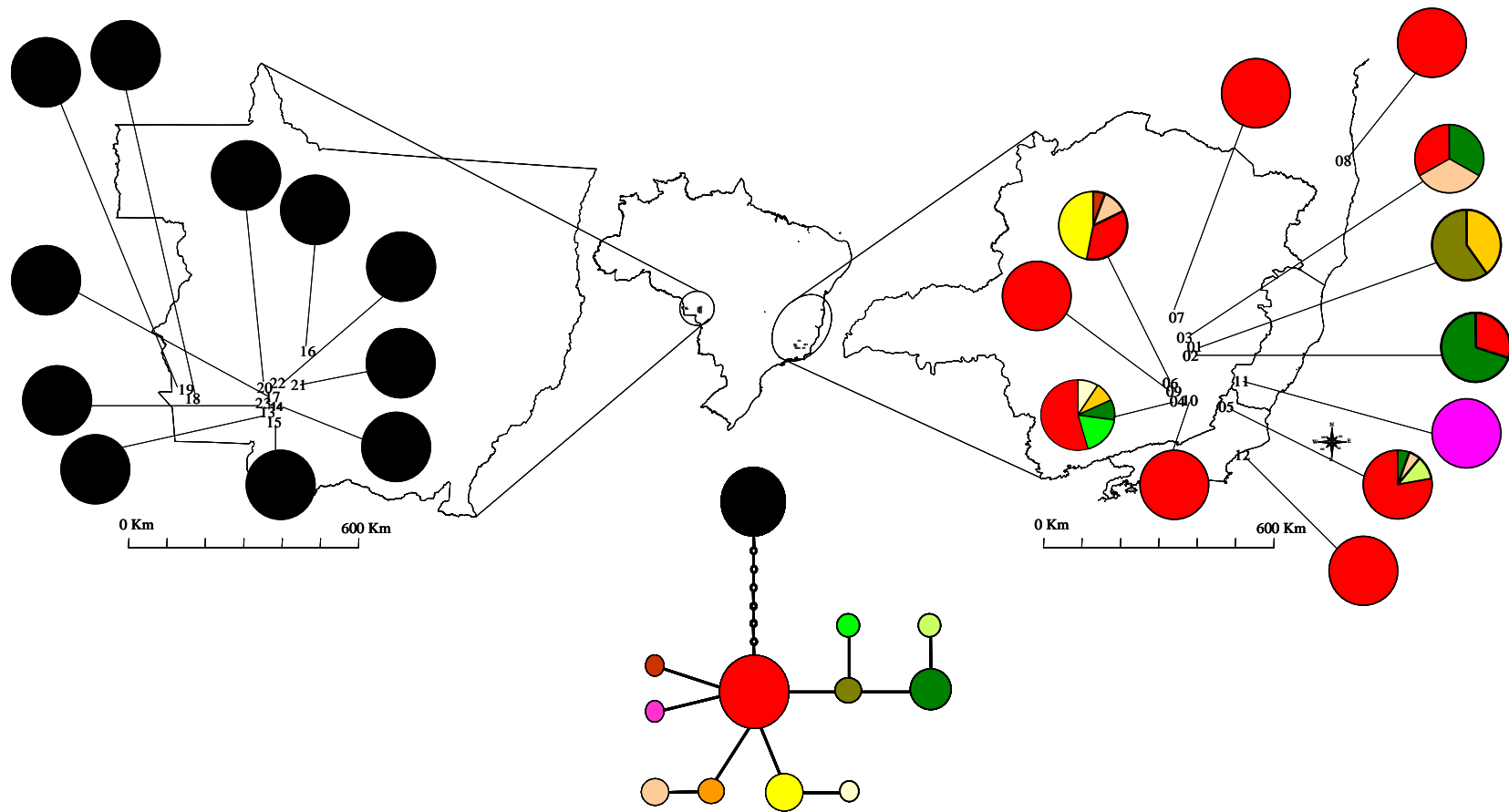
### **Compartilhamento dos haplótipos**

A distribuição dos 12 haplótipos entre as 23 populações de *Psychotria ipecacuanha* está demonstrada na Tabela 1 e Fig. 3. Sete haplótipos (B, C, F, H, I, J, L) foram exclusivos, cada um, para uma única população. Dentre estes, o haplótipo B, foi encontrado na população GUA e foi o que apresentou maior freqüência.



**FIG. 2.** Diagnóstico molecular da origem geográfica por meio de eletroforese dos produtos de amplificação via PCR. M = marcador molecular. 1 e 2 = Fragmento “AB” de cpDNA de indivíduos com origem na Floresta Atlântica e Floresta Amazônica, respectivamente. 3 e 4 = Fragmentos “CD” de cpDNA de indivíduos com origem na Floresta Atlântica e Floresta Amazônica, respectivamente.

Quatro haplótipos foram compartilhados entre as populações da Floresta Atlântica. Um único haplótipo foi encontrado em todas as populações da Floresta Amazônia. O haplótipo D foi compartilhado pelas populações TLM e VRB. O haplótipo E foi compartilhado pelas populações TCE, RAP e GUA. O haplótipo G foi compartilhado pelas populações TVI, TCE, VRB e RAP. O haplótipo A, mais comum para *Psychotria ipecacuanha*, apareceu em 10 populações das 12 analisadas na Floresta Atlântica. O haplótipo M foi exclusivo das populações da Floresta Amazônica.



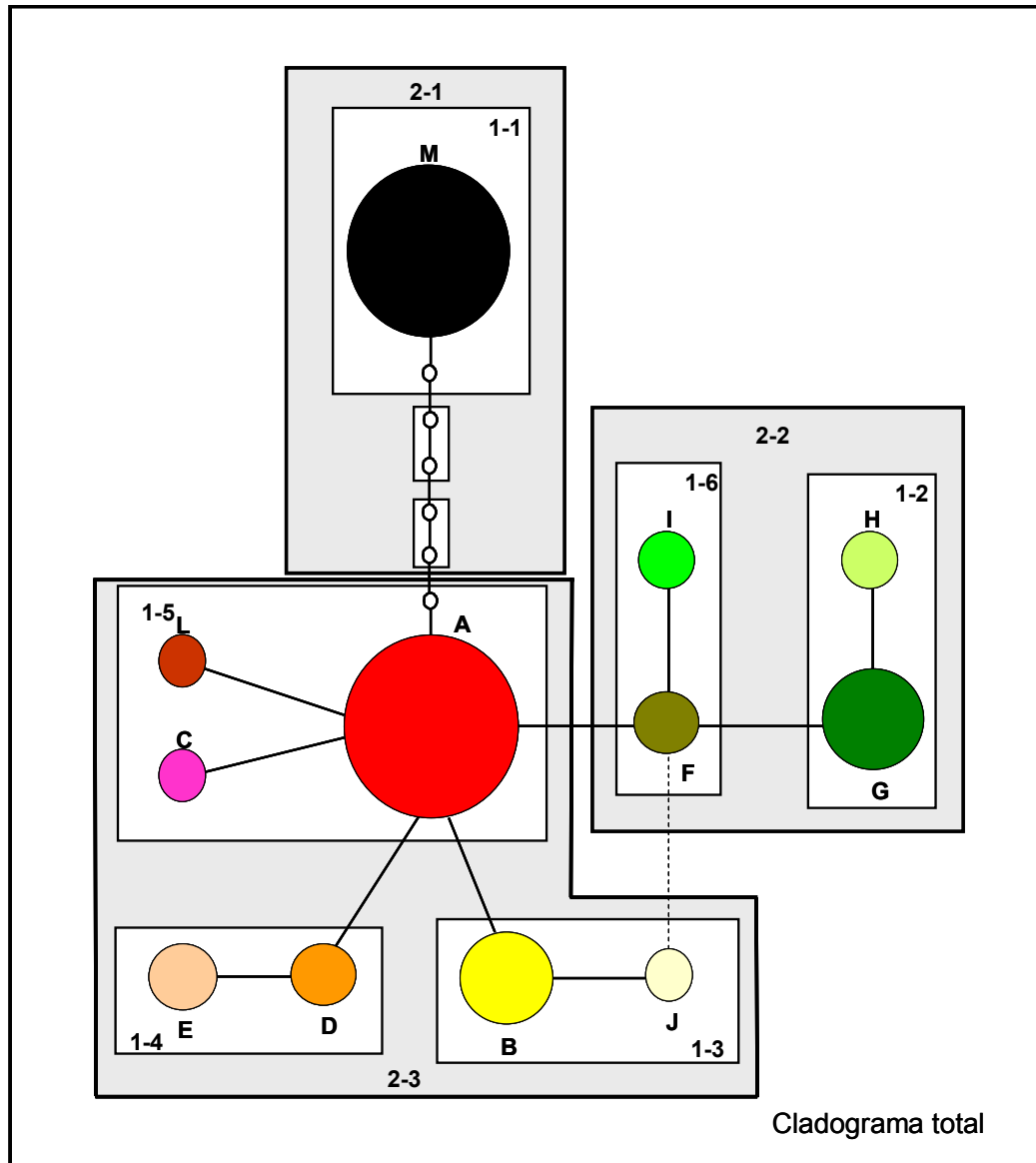
**FIG. 3.** Distribuição geográfica de doze haplótipos de cpDNA em *Psychotria ipecacuanha* nas Florestas Atlântica e Amazônica. Os números no mapa se referem ao código da população apresentado na Tabela 1. A rede de haplótipos (veja Fig. 4) está sendo mostrada como referência para interpretação das relações genealógicas entre os haplótipos.

As duas florestas não compartilharam haplótipos, apresentando portanto monofilia recíproca com relação aos haplótipos de cpDNA. A diversidade de haplótipos foi maior para as populações da Floresta Atlântica (onde foram identificados 11 dos 12 haplótipos), enquanto que para as populações da Floresta Amazônica a diversidade de haplótipos é muito baixa (apenas um haplótipo foi observado).

### ***Estimação da rede de haplótipos e aninhamento***

Uma única rede contendo todos os 12 haplótipos foi obtida (Fig. 4). Esta rede de haplótipo inicialmente continha um “loop” (ABJF) que foi resolvido usando o critério da frequência e o critério geográfico. O haplótipo J foi conectado em direção ao haplótipo B, que tem maior frequência, em detrimento da ligação ao haplótipo F, que possui menor frequência. O número máximo de conexões parcimoniosas entre dois haplótipos vizinhos mais divergentes (haplótipo A e M) foi de sete eventos de mutação.

No processo de estimação da rede de haplótipos foi detectado seis nodos interiores (representados na Fig 4 por pequenos círculos abertos) para os quais nenhuma das 107 seqüências pôde ser alocada. De acordo com Templeton (1998), estes nodos representam haplótipos intermediários inferidos entre dois haplótipos próximos na rede que diferem por duas ou mais mutações. Esses haplótipos intermediários se encontram extintos ou estão com uma frequência tão baixa na população de forma que não puderam ser amostrados.



**FIG. 4.** Rede de haplótipos de cpDNA obtida com TCS 1.13 e conjunto de clados aninhados em *Psychotria ipecacuanha*. “Indels” foram considerados como o 5º estado de caracter e codificados de tal forma que cada um deles, independentemente do tamanho, foi considerado como um único caracter. Os dados foram agrupados de acordo com as regras estabelecidas em Templeton *et al.* (1995). Os haplótipos estão representados por círculos coloridos e identificados por letras. Cada linha na rede representa um evento de mutação e círculos vazios representam haplótipos extintos ou não amostrados. Clados de 1º nível (1-1 até 1-6), clados de 2º nível (2-1 até 2-3) e cladograma total estão indicados por caixas. O “loop” ABJF foi esclarecido (linha pontilhada) usando o critério de frequência, conforme Crandall e Templeton (1993).

A análise de clado aninhado foi aplicada na rede de acordo com as regras de Templeton *et al.* (1995) e revelou que dois níveis de aninhamento foram necessários antes do cladograma total. Os haplótipos foram agrupados em seis clados de primeiro nível e três clados de segundo nível (Fig. 4). O haplótipo M encontrado nas populações da Floresta Amazônica foi restrito ao clado 2-1. Enquanto isso, os 11 haplótipos encontrados nas populações da Floresta Atlântica foram distribuídos nos clados 2-2 e 2-3.

O clado de segundo nível 2-2 contém dois clados de primeiro nível aninhado: um clado de interior (1-6) e um clado de extremidade (1-2). O clado de interior 1-6 consiste dos haplótipos I e F encontrados nas populações VRB e TLM, respectivamente. O clado 1-2 da extremidade também foi formado por dois haplótipos H e G, sendo o haplótipo H encontrado na população de RAP e o haplótipo G distribuído em quatro populações (TVI, TCE, VRB e RAP).

O clado de segundo nível 2-3 é formado por três clados de primeiro nível: 1-3, 1-4 e 1-5. O clado de extremidade 1-3 consiste do haplótipo raro J encontrado na população VRB e do haplótipo B encontrado com grande frequência na população GUA. O clado de extremidade 1-4 foi formado pelos haplótipos E e D, que foram compartilhados por três (RAP, GUA e VRB) e duas (VRB e TVI) populações, respectivamente. O clado de interior 1-5 consiste do haplótipo ancestral A, amplamente distribuído, e dos haplótipos raros C e L.

### ***Análise de clados aninhados (NCA)***

A análise de contingência aninhada para associações geográficas está demonstrada na Tabela 2. Clados sem variação de localização geográfica não

necessitam de serem testados (Templeton, 1998) e, portanto não foram incluídos nas análises.

**TABELA 2.** Análise aninhada de contingência exata das associações geográficas obtidas com Geodis 2.5, geradas a partir de 10.000 permutações aleatórias. A rede de haplótipos e o desenho de clado aninhado foram aqueles mostrados na Fig. 4. Somente clados com variação geográfica ou genética foram testados. Clados com um valor de probabilidade menor que 0.05 sugerem uma associação significativa entre haplótipos / subclados com localidade.

Clados	Estatística de $\chi^2$	Probabilidade
1-2	7,2000	0,1533
1-3	9,0000	0,1128
1-4	7,0000	0,2008
1-5	44,8120	0,1178
1-6	5,0000	0,1010
2-2	13,7889	0,0061*
2-3	37,7469	0,0244*
Cladograma Total	143,0406	0,0000*

\* significativo ao nível de 0.05

Esta análise comparou a hipótese nula de nenhuma associação entre estrutura da rede e distribuição geográfica dos haplótipos contra a hipótese alternativa de que os componentes da rede são agrupados de acordo com suas localizações geográficas. A hipótese nula não pode ser rejeitada para os clados de primeiro nível. A não rejeição da hipótese nula implica que os membros dos clados de primeiro nível foram agrupados ao acaso e não de acordo com suas localizações geográficas. Por outro lado, a rejeição da hipótese nula para os clados de segundo nível e cladograma total, indica que os haplótipos estão agrupados de acordo com um padrão geográfico.

Os resultados da análise de distância geográfica para o conjunto de dados de cpDNA de *Psychotria ipecacuanha* estão apresentados na Tabela 3.

**TABELA 3.** Resultado da análise de clado aninhado. Para cada clado são listados os membros e suas posições na rede, as distâncias correspondentes ao clado ( $D_c$ ), ao clado aninhado ( $D_n$ ) e o contraste interior-extremidade (I-E). São indicadas as distâncias significativamente menores (S) ou maiores (L) juntamente com seus níveis de significância  $P < 0.05$ , onde P é a probabilidade de um valor gerado ao acaso ser igual ou menor (maior) que o valor observado.

Clado	Membros do clado	Posição	$D_c$	P	$D_n$	P
1-2	G	I	34,44	-0,092	42,96	-0,092
	H	E	0	-0,362	133,18 <sub>L</sub>	+0,046
	I-E	—	34,44	+0,464	-90,22 <sub>S</sub>	-0,046
1-3	B	I	0	-0,112	8,39	-0,112
	J	E	0	+1,000	43,45	+0,112
	I-E	—	0	-0,112	-35,05	-0,112
1-4	D	I	47,01	-0,488	50,30	-0,317
	E	E	62,68	+0,375	61,59	+0,375
	I-E	—	-15,66	-0,403	-11,29	-0,373
1-5	A	I	205,56 <sub>L</sub>	+0,030	204,30 <sub>L</sub>	+0,027
	C	E	0	-1,000	55,14	-0,096
	L	E	0	-1,000	96,02	-0,309
	I-E	—	205,56 <sub>L</sub>	+0,030	128,72 <sub>L</sub>	+0,021
1-6	F	I	0	-0,101	36,23	-0,101
	I	E	0	-0,396	119,55	+0,101
	I-E	—	0	+0,3960	-83,31	-0,101
2-2	1-2	E	50,73	-0,451	50,53	-0,318
	1-6	I	55,61	+0,439	55,74	+0,373
	I-E	—	4,88	+0,440	5,21	+0,373
2-3	1-3	E	14,07 <sub>S</sub>	-0,000	92,89	-0,192
	1-4	E	56,04	-0,220	69,45 <sub>S</sub>	-0,047
	1-5	I	185,72	+0,349	183,64	+0,261
	I-E	—	153,29 <sub>L</sub>	+0,024	101,00	+0,074
CT	2-1	E	52,49 <sub>S</sub>	-0,000	819,30 <sub>S</sub>	-0,011
	2-2	I	167,03 <sub>S</sub>	-0,000	863,26 <sub>S</sub>	-0,030
	2-3	E	83,61 <sub>S</sub>	-0,000	924,00	+0,050
	I-E	—	93,79	+0,128	-25,840	-0,186

I, interior; E, extremidade; CT, cladograma total. Probabilidades com valores maiores (+) ou menores (-) que o valor esperado, obtidas com 10000 permutações aleatórias.

A análise incluiu estimativa dos parâmetros de distâncias geográficas ( $D_c$ ,  $D_n$ , e I-E) entre haplótipos ou clados que foram utilizados para interpretar processos históricos e contemporâneos de acordo com a chave de Templeton (2004). A Tabela 4 demonstra a cadeia de inferência correspondente para cada clado aninhado que apresentou estrutura genética espacial significativa, evidenciada pela significância de qualquer um dos três parâmetros de distância.

**TABELA 4.** Análise de contingência aninhada das associações geográficas e inferências filogeográficas realizadas da análise de haplótipo aninhada de *Psychotria ipecacuanha*. Apenas clados demonstrando associações significativas entre haplótipos e geografia e/ou subclados foram analisados.

Clados	Chave do clado*	Inferências
1-2 (G-H)	1 - 2: não - 11: não - 17: não	Resultado inconcluso
1-5 (A, C, L)	1, 2 <sup>c</sup> , 3: não, 4: não	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
2-3 (B, J/ D-E/ A, C, L)	1 - 2 <sup>a, d</sup> - 3: não - 4: não	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
Cladograma Total (G-H/ F, I/ B, J/ D-E/ A, C, L)	1 - 2 <sup>b</sup> - 3 <sup>c</sup> - 5 <sup>a</sup> , b - 15: sim - 16: sim	Fragmentação alopátrica

\*Os números indicam a escolha feita na chave dicotômica de Templeton (2004). As letras sobrescritas referem para subseções dos parágrafos numerados consecutivamente da chave de Templeton (2004).

Dentro da extensão geográfica da Floresta Atlântica não foram obtidos parâmetros de distâncias estatisticamente significativas para os clados 1-3, 1-4, 1-6 e 2-2, excluindo então qualquer inferência nestes níveis de aninhamento. Por outro lado, parâmetros significativos foram encontrados em todos os níveis de aninhamento (1-2, 1-5, 2-3 e cladograma total), demonstrando que a

hipótese nula de que não haveria associação entre haplótipos e geografia foi claramente rejeitada.

As inferências para os clados 1-5 e 2-3 revelaram fluxo gênico restrito com isolamento por distância, sendo, portanto o processo que mais contribuiu para a distribuição espacial dos haplótipos de cpDNA nas populações da Floresta Atlântica que se encontram nesses clados. Em nível de cladograma total, a fragmentação alopátrica é inferida como processo primário responsável pela diferenciação entre as populações da Floresta Amazônica (clado 2-1) e as populações da Floresta Atlântica (clados 2-2 e 2-3) na atualidade. Esta inferência é apoiada por (i) dispersão restrita significativa ( $D_c$ ) da Floresta Amazônica, clado da extremidade 2-1; e (ii) a completa separação do clado 2-1 dos demais clados no grupo aninhado ao longo da Floresta Atlântica.

## DISCUSSÃO

### ***Inferência da história demográfica entre as florestas Atlântica e Amazônica***

Análise filogeográfica de *Psychotria ipecacuanha* foi realizada em dois tipos florestais onde esta espécie ocorre naturalmente: Floresta Atlântica e Floresta Amazônica. As análises filogeográficas demonstraram que os 107 indivíduos foram separados em dois grupos que coincidem com as duas florestas: (i) clado 2-1 constituído pelas populações da Floresta Amazônica e (ii) clados 2-2 e 2-3 formado pelas populações da Floresta Atlântica.

Uma propriedade da NCA é que a polaridade temporal dos clados na rede pode ser combinada com medidas de distâncias associadas com padrões de dispersão, expansão e colonização para inferir a direção desses movimentos (Templeton, 2002). Por exemplo, haplótipos que se dispersam de uma população ancestral serão mais derivados (descendentes) e provavelmente aparecerão como haplótipos ou clados em posição na extremidade da rede, uma expectativa apoiada pela teoria da coalescência (Castelloe e Templeton, 1994). O haplótipo M, único e exclusivo da Floresta Amazônica, está na extremidade da rede, sugerindo ser um haplótipo mais recente (derivado) e conectado por sete eventos de mutação ao haplótipo A, mais antigo (ancestral) e presente nas populações da Floresta Atlântica. Este cenário, aliado ao número de haplótipos encontrado em cada floresta, indica que as populações

de *Psychotria ipecacuanha* da Floresta Amazônica são mais recentes que as populações da Floresta Atlântica.

O padrão de distribuição espacial e temporal dos haplótipos de *Psychotria ipacacuanha* pode ser atribuído às diferenças históricas das duas florestas. Grande parte da zona de contato do cerrado com a Floresta Amazônica apresenta uma depressão geomorfológica com altitude variando de 100 a 500 m, sendo possível que, durante os períodos mais secos do Quaternário, essa conexão tenha sofrido mudanças drásticas, com efeito negativo na flora da Floresta Amazônica ali presente (Ab'Saber, 1983; 1988; Silva, 1996; Salgado-Labouriau, *et al.*, 1997). Este processo pode ter ocasionado um gargalo gênico e induzido a colonização por um número pequeno de indivíduos (efeito fundador) nas populações de *Psychotria ipecacuanha* da Floresta Amazônica. Diferentemente, a região de conexão entre o cerrado e a Floresta Atlântica parece ter sido menos influenciada pelas mudanças climáticas do Quaternário (Brown e Ab'Saber, 1979), o que pode ter favorecido a manutenção das populações de *Psychotria ipecacuanha* na Floresta Atlântica e, conseqüentemente, preservado a diversidade genética existente na espécie.

A existência de padrões de distribuição disjunta em várias espécies de plantas da Floresta Atlântica e Floresta Amazônica sugerem a possibilidade de conexão entre as floras destas florestas no passado, através de conexões que se estendiam pelo cerrado (Rizzini, 1963; Prance, 1982). Com base no atual padrão filogeográfico molecular identificado para *Psychotria ipecacuanha*, propomos algumas hipóteses de migração histórica para explicar a presente

distribuição disjunta da espécie nas florestas Atlântica e Amazônica: (i) o habitat da espécie se constituía em um contínuo que foi fragmentado com as oscilações climáticas, resultando na extinção da espécie na faixa intermediária entre as duas florestas. Se esta hipótese fosse verdadeira a diversidade genética de haplótipos seria alta nas duas florestas; (ii) a região que hoje se constitui o cerrado, poderia ter sido habitado pela espécie antes da fragmentação das florestas Atlântica e Amazônica e a partir daí a migração ter ocorrido em direção às duas florestas. Esta hipótese também não explica a baixa diversidade encontrada na Floresta Amazônica. A não ser que durante a migração em direção a Floresta Amazônica a espécie tenha sofrido repetidos ciclos de retração e expansão, ocasionando o efeito fundador, e o mesmo evento não teria ocorrido na rota em direção a Floresta Atlântica, já que a mesma apresenta alta diversidade de haplótipos; (iii) o centro de diversidade para a espécie seria a Floresta Amazônica e a migração teria ocorrido deste centro em direção a Floresta Atlântica. Esta hipótese é fortemente rejeitada pelo padrão filogeográfico revelado neste estudo que sugere uma colonização relativamente recente para *Psychotria ipecacuanha* na Floresta Amazônica; (iv) o centro de diversidade para a espécie seria a Floresta Atlântica e a migração teria ocorrido da Floresta Atlântica em direção a Floresta Amazônica. Esta hipótese é fortemente apoiada pelo padrão filogeográfico revelado neste estudo para *Psychotria ipecacuanha*.

Cabrera e Willink (1973) mencionaram que as florestas de Galeria presentes na região do cerrado formam atualmente uma rede de conexão entre as florestas Atlântica e Amazônica. Porém, para *Psychotria ipecacuanha* esta

conexão não é possível, uma vez que as florestas de galeria são de pequenas extensões e, portanto, não propícia para ocorrência da espécie em estudo. Durante expedições de coleta de campo, foi observado que a espécie sofre drásticas consequências com a fragmentação, ou seja, é extinta ou em via de extinção em habitats de extensões pequenas, justificando assim sua não ocorrência nas florestas de galeria.

A fragmentação alopátrica foi inferida como o principal processo influenciando a distribuição espacial dos haplótipos no cladograma total. Para existir uma evidência de fragmentação alopátrica, as linhagens gênicas devem estar separadas por vários eventos de mutação e por algum tipo de barreira geográfica (Avise, 2000), conforme observado nas populações de *Psychotria ipecacuanha*: (i) o clado 2-1 da Amazônia está separado do clado 2-3 por seis haplótipos intermediários (hipotéticos), que podem ter sido extintos durante os eventos de expansão e contração das populações no processo de colonização e ou estão em uma frequência tão baixa que não puderam ser amostrados; (ii) a Floresta Atlântica encontra-se atualmente separada da Floresta Amazônica por uma grande extensão geográfica de 1.500 km, o cerrado, que ocupa a região intermediária entre a Floresta Amazônica e a Floresta Atlântica, constituindo-se em uma barreira geográfica para o intercâmbio de muitas espécies entre estas duas florestas (Costa, 2003). Esta barreira física pode ter reduzido o fluxo gênico (migração) entre as populações de *Psychotria ipecacuanha*.

### ***Estrutura filogeográfica de *Psychotria ipecacuanha* na Floresta Atlântica***

De acordo com Tzedakis *et al.* (2002) e Huang *et al.* (2004) uma área demonstrando alta diversidade genética implica que: (i) esta área pode ter sido um refúgio, ou seja, uma área que durante as flutuações climáticas, manteve-se como um habitat estável, e pode ter favorecido a manutenção da diversidade genética; ou (ii) esta área pode ser uma zona intermediária que recebe organismos de diferentes fontes resultando em alta diversidade genética em relação às fontes originais. No primeiro caso, os haplótipos dentro desta área são proximamente relacionados, enquanto que no caso posterior podem ser incluídos haplótipos mais distantes. A maior diversidade genética de *Psychotria ipecacuanha* encontra-se nas populações da Floresta Atlântica e, portanto, esta área pode ser o centro de diversidade genética da espécie e, provavelmente, foi um refúgio no Brasil para *Psychotria ipecacuanha* durante o Quaternário. O haplótipo ancestral, identificado na Floresta Atlântica não se sobrepõe ao haplótipo derivado encontrado na Floresta Amazônica, estando, portanto, localizados em regiões geográficas distintas. Rowe *et al.* (2004) propõem que haplótipos ancestrais devem estar próximos a refúgios, enquanto que os derivados são mais prováveis de ocorrerem nas extremidades conduzindo a expansão, reforçando assim que a Floresta Atlântica se constitui em um refúgio para *Psychotria ipecacuanha*.

O fluxo gênico é um importante componente da estrutura genética das espécies, pois reduz a divergência genética entre as populações (Nason, *et al.*, 1997). O fluxo gênico restrito com isolamento por distância foi inferido como o principal processo influenciando a distribuição espacial dos haplótipos na

Floresta Atlântica. O compartilhamento de haplótipos na Floresta Atlântica, ocorreu entre a maioria das populações. O haplótipo ancestral “A” foi compartilhado entre dez populações das doze analisadas, evidenciando a existência de fluxo gênico. Porém dentre os dez haplótipos derivados (mais recentes) sete foram exclusivos (B, C, F, H, I, J, L) a determinadas populações, sugerindo que o fluxo gênico é limitado, pois a presença de haplótipos exclusivos reforça a inferência de isolamento por distância. Segundo Wright (1943), populações separadas por longas distâncias e com limitado fluxo gênico podem tornar-se diferenciadas geneticamente uma das outras pelo processo de “isolamento por distância”. A ocorrência de fluxo gênico restrito entre as populações da Floresta Atlântica, pode ser justificada pela fragmentação de seu habitat que tem ocasionado à subdivisão das populações, tornando-as isoladas umas das outras e assim dificultando o intercâmbio de pólen pelos agentes polinizadores. Por outro lado, a fragmentação pode também ter ocasionado a redução ou extinção dos agentes polinizadores e dos pássaros dispersores de sementes, limitando ainda mais o fluxo gênico entre as populações de *Psychotria ipecacuanha*.

### ***Estrutura filogeográfica de Psychotria ipecacuanha na Floresta Amazônica***

A ausência de variação de haplótipos dentro e entre as onze populações da Floresta Amazônica analisadas, reforça a hipótese de que essas populações são derivadas de uma colonização relativamente recente. Ao invés de serem relíquias de uma ampla Floresta Tropical Úmida que cobria toda extensão geográfica da área de coleta e que, subsequentemente, tornou-se fragmentada,

dando origem a manchas de florestas úmidas (refúgios) durante as fases geralmente secas do Cenozóico (Terciário e Quartenário). Van der Hammen e Hooghiemstra (2000), revisando a história da vegetação e do clima da Floresta Amazônica no Terciário Tardio e no Quartenário, estimaram que as chuvas durante o Último Máximo Glacial podem ter-se reduzido em 30-50%, levando a uma substancial retração das florestas pluviais úmidas e à formação de refúgios florestais. Se a hipótese de refúgios na Floresta Amazônica for verdadeira para *Psychotria ipecacuanha*, e assumindo que a espécie já ocorria na Floresta Amazônica com ampla distribuição e era polimórfica para haplótipos de cpDNA, seria mais provável que as atuais populações fossem fixadas ou quase fixadas para diferentes haplótipos devido ao efeito ao acaso da deriva genética em populações fragmentadas, e apresentaria uma diversidade de haplótipos. Dessa forma, os resultados do presente trabalho, sugerem a não ocorrência de refúgios para a espécie na Floresta Amazônica. Os resultados reforçam o proposto por alguns estudos que as florestas da Amazônia jamais foram afetadas por condições climáticas secas e, portanto, nunca sofreram fragmentação por vegetação intermediária (Colinvaux *et al.*, 2000; Colinvaux e de Oliveira 2000; 2001; Jones, 2001). Adicionalmente, os dados podem ainda indicar que populações de *Psychotria ipecacuanha* não ocorriam nesta região no período em que se deu a formação dos refúgios e, conseqüentemente, possuem baixa diversidade genética.

### **Conclusões e implicações para conservação**

O padrão de diversidade genética revelada neste estudo permite também subsidiar a elaboração de estratégias de conservação e manejo da espécie. Atualmente, *Psychotria ipecacuanha* é uma espécie ameaçada, por ter sofrido intenso extrativismo nos dois séculos passados e por ter suas áreas de ocorrência natural reduzidas no presente. Portanto, sua conservação tem atualmente sido alvo de muitas preocupações. As principais ameaças para esta espécie incluem a perda de habitat, degradação e fragmentação, com conseqüente isolamento das populações, como já detectado por Oliveira e Martins (2002).

A importância da diversidade genética para a persistência a longo prazo de populações e espécies, já foi reconhecida (Young e Clarke, 2000; Frankham *et al.*, 2002; Frankham, 2005). Nossos resultados indicam a Floresta Atlântica como o maior centro de diversidade genética para *Psychotria ipecacuanha*. Esta área geográfica atuou como um refúgio no passado, e tem sido local de vários processos evolutivos que estão entre os mais influentes da história desta espécie, tais como expansão, colonização de novas áreas e intercâmbio de material genético. Portanto, proteger este reservatório de diversidade genética é de grande importância para conservação da espécie.

Os dados demonstraram ainda que a baixa variabilidade genética das populações localizadas na Floresta Amazônica é de origem histórica, ocorrida durante o processo de disjunção das florestas Atlântica e Amazônica. A não ocorrência de fluxo/dispersão gênico pode ser sugerida pela revelação de haplótipos privativos para cada floresta e pela quantidade de mutação que os

separam, com ausência de haplótipos intermediários. Portanto, apesar das populações de *Psychotria ipecacuanha* da Floresta Amazônica não apresentarem diversidade genética quanto a haplótipos de cpDNA, é necessário a conservação de amostras desta região, já que o haplótipo M foi exclusivo para esta floresta.

Os resultados indicam que a estrutura genética de *Psychotria ipecacuanha* na Floresta Amazônica é consequência de um evento de colonização recente por poucos indivíduos, que ocasionou uma uniformidade genética nessas populações. Por outro lado, na Floresta Atlântica, o fluxo gênico e as condições climáticas favoráveis a espécie, proporcionaram-lhe a manutenção e o acúmulo da diversidade genética, podendo esta região ser considerada como um refúgio para a espécie.

## REFERÊNCIAS

**Ab'Saber AN.** 1983. O domínio dos cerrados: Introdução ao conhecimento. *Revista do Servidor*, **111**: 41-55.

**Ab'Saber AN.** 1988. O pantanal mato-grossense e a teoria dos refúgios. *Revista Brasileira de Geografia*, **50**: 9-57.

**Assis MC, Giulietti AM.** 1999. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de “ipecacuanha” - *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, **22**: 205-216.

**Auler AS, Wang X, Edwards RL, Cheng H, Cristalli OS, Smart PL, Richards DA.** 2004. Palaeoenvironments in semi-arid northeastern Brazil inferred from high precision mass spectrometric speleothem and travertine ages and the dynamics of South American rainforests. *Speleogenesis and evolution of Karst Aquifers*, **2**: 1-4.

**Avise JC.** 2000. *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.

**Avise JC.** 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

**Brieger FG.** 1969. Contribuição à fitogeografia do Brasil com referência especial as orquídeas. *Anais do XX Congresso Nacional de Botânica*, 41-44.

**Brown KS, Ab'Saber AN.** 1979. Ice-age refuges and evolution in the Neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological and pedological data with modern biological endemism. *Paleoclimas*, **5**: 1-30.

**Cabrera AL, Willink A.** 1973. *Biogeografía de América Latina*. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Washington.

**Cannon CH, Manos PS.** 2003. Phylogeography of the Southeast Asian stone oaks (*Lithocarpus*). *Journal of Biogeography*, **30**: 211-226.

**Castelloe J, Templeton AR.** 1994. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **3**: 102–113.

**Chiang TY, Chiang YC, Chen YJ et al.** 2001. Phylogeography of *Kandelia kandel* in East Asiatic mangroves based on nucleotide variation of chloroplast and mitochondrial DNAs. *Molecular Ecology*, **10**: 2697-2710.

**Clement M, Posada, D, Crandall KA.** 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**:1657-1659.

**Colinvaux PA, DE Oliveira PE.** 2000. “Palaeoecology and climate of the Amazon basin during the last glacial cycle”. *Journal Quaternary Science*, **15**: 347-56.

**Colinvaux PA, DE Oliveira PE.** 2001. “Amazon plant diversity and climate through the Cenozoic”. *Palaeogeography Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **166**: 51-63.

**Colinvaux PA, DE Oliveira PE, Bush MB.** 2000. Amazonian and Neotropical plant communities on glacial time scales: The failure of the aridity and refuge hypotheses”. *Quaternary Science Reviews*, **19**: 141-69.

**Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD.** 2003. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. *Molecular Ecology*, **12**: 105-115.

**Costa LP.** 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*, **30**: 71-86.

**Crandall KA, Templeton AR.** 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, **134**: 959-969.

**Demesure B, Comps B, Petit RJ.** 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution*, **50**: 2515-2520.

**Doyle JJ, Doyle JL.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11–15.

**Dumolin-Lapègue S, Demesure B, Fineschi S, LeCorre V, Petit RJ.** 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics*, **146**: 1475-1487.

**Frankham R.** 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation*, **126**: 131-140.

**Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA.** 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

**Huang SF, Hwang SY, Wang JC, Lin TP.** 2004. Phylogeography of *Trochodendron aralioides* (Trochodendraceae) in Taiwan and its adjacent areas. *Journal of Biogeography*, **31**: 1251-1259.

**Hudson RR, Boss DD, Kaplan NL.** 1992. A statistical test for detecting geographic subdivision. *Molecular Biology and Evolution*, **9**: 138-151.

**Jones N.** 2001. "Never say die". *New Scientist*, **169**: 36-39.

**Liepelt S, Bialozot R, Ziegenhagen B.** 2002. Wind-dispersed pollen mediates postglacial gene flow among refugia. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **99**: 14590-14594.

**Lorenz-Lemke AL, Mäder G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM, Freitas LB.** 2006. Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Molecular Ecology*, **15**: 4487–4497.

**Mendonça MP, Lins LV.** 2000. *Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, Fundação Zêo-Botânica de Belo Horizonte.

**Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**: 853-858.

**Moojen J** .1948. Speciation in the Brazilian spiny rats (Genus *Proechimys*, Family Echimyidae). *University of Kansas Publications, Museum of Natural History*, **1**: 301-406.

**Mori SA, Boom BM, Prance,GT.** 1981. Distribution patterns and observation of eastern Brazilian coastal forest tree species. *Brittonia*, **33**: 233-245.

**Nason JD, Hamrick JL.** 1997. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees. *Journal of Heredity*, **88**: 264-276.

**Oliveira LO, Martins ER.** 2002. A quantitative assessment of genetic erosion in ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). *Genetic Resources and Crop Evolution*, **49**: 607-617.

**Pfenninger M, Posada D.** 2002. Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution*, **56**: 1776-1788.

**Petit RJ, Aguinagalde I, de Beaulieu JL et al.** 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*, **300**: 1563-1565.

**Posada D, Crandall KA, Templeton AR.** 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, **9**: 487-488.

**Por FD.** 1992. *Sooretama: the Atlantic rain forest of Brazil*. SPB Academic Publishing, The Hague.

**Prance GT.** 1982. Forest refuges: Evidence from woody Angiosperms. *In Biological diversification in the tropics* (G.T. Prance, ed.). Columbia University Press, New York.

**Raven PH, Axelrod DI.** 1974. Angiosperm biogeography and past continental movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **61**: 539-673.

**Rizzini CT.** 1963. A flora do cerrado. Análise florística das savannas centrais. *In Simpósio sobre o cerrado* (M.G. Ferri, org.). Edusp, São Paulo, p.126-177.

**Rizzini CT.** 1979. *Tratado de fitogeografia do Brasil. Aspectos sociológicos e florísticos*. Hucitec-Edusp, São Paulo, v.2.

**Rocha CFD, Bergallo HG, Sluys MV, Alves MAS.** 2006. *Biologia da Conservação: Essências*. Editora RiMA, São Carlos, SP.

**Rowe KC, Heske EJ, Brown PW, Paige K.** 2004. Surviving the ice: northern refugia and postglacial colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **101**: 10335-10359.

**Salgado-Labouriau MI, Barberi M, Vicentini KRF, Parizzi, MG.** 1997. A dry climatic event during the late quaternary of tropical Brazil. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **99**: 115-129.

**Silva JMC.** 1996. Distribution of Amazonian and Atlantic birds in gallery forests of the cerrado region, South America. *Ornitologia Neotropica*, **7**: 1-18.

**Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J.** 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**: 1105-1109.

**Takayama K, Kajita T, Murata J, Tateishin.** 2006. Phylogeography and genetic structure of *Hibiscus tiliaceus* – speciation of a pantropical plant with sea-drifted seeds. *Molecular Ecology*, **15**: 2871-2881.

**Templeton AR.** 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, **13**: 789-809.

**Templeton AR.** 2002. Out of Africa again and again. *Nature*, **416**: 45-51.

**Templeton AR.** 2001. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology*, **10**: 779-791.

**Templeton AR.** 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, **7**: 381-397.

**Templeton AR, Routman E, Phillips CA.** 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, **140**: 767-782.

**Templeton AR, Sing CF.** 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, **134**: 659-669.

**Templeton AR, Crandall KA, Sing CF.** 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence. III. *Cladogram estimation*. *Genetics*, **132**: 619-633.

**Templeton AR, Boerwinkle E, Sing CF.** 1987. Cladistic analysis of phenotypic association with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, **117**: 343-351.

**Tzedakis PC, Lawson IT, Forgley MR, Hewitt GM.** 2002. Buffered tree population changes in a Quaternary refugium: evolutionary implications. *Science*, **297**: 2044–2047.

**Van Der Hammen T, Hooghiemstra H.** 2000. “Neogene and Quaternary history of vegetation, climate, and plant diversity in Amazonia”. *Quaternary Science Review*, **19**: 725-42.

**Veloso HP.** 1947. As condições ecológicas da *Cephaelis ipecacuanha* Rich. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **45**: 361-372.

**Young AG, Clarke GM.** 2000. *Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

**Wright S.** 1943. Isolation by distance. *Genetics*, **28**: 114-138.

## CAPÍTULO II

---

### **AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA DIVERSIDADE GENÉTICA E DIFERENCIAÇÃO GEOGRÁFICA ENTRE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Psychotria ipecacuanha* (RUBIACEAE) NAS FLORESTAS ATLÂNTICA E AMAZÔNICA**

#### **RESUMO**

*Psychotria ipecacuanha* é uma espécie medicinal que no Brasil ocorre nas florestas Atlântica e Amazônica. Atualmente está ameaçada em consequência do intenso extrativismo sofrido no passado e da fragmentação de seu habitat no presente. Apesar da grande importância econômica da espécie como fonte de alcalóides isoquinolínicos, pouco se conhece sobre a diversidade e a distribuição da variação genética em relação a extensão geográfica em que ocorre. Marcadores ISSR foram utilizados para detectar a variação genética e a estrutura populacional em 11 populações de *Psychotria ipecacuanha*, sendo cinco da Floresta Atlântica e seis da Floresta Amazônica. Para este estudo foram selecionados 14 *primers* de ISSR que produziram um total de 193 bandas com uma porcentagem de 97,4 de polimorfismo em nível de espécie. As populações da Floresta Atlântica exibiram níveis de diversidade genética superiores quando comparada as populações da Floresta Amazônica. A média

do  $G_{ST}$  para as populações dentro da Floresta Atlântica e Floresta Amazônica foi estimada em 0,306 e 0,425 respectivamente. Da variância molecular total, 65,3% foram atribuídas a divergências regionais entre florestas. O  $\Phi_{ST}$  foi estimado em 0,341 para a Floresta Atlântica e em 0,432 para a Floresta Amazônica, indicando que 34,1% e 43,2 % da variabilidade genética está distribuída entre populações nas respectivas florestas. A estimativa de  $\theta^B$  pelo método Bayesiano dentro das florestas Atlântica e Amazônia ( $\theta^B = 0,348$  e 0,404, respectivamente) foi consistente com os resultados da estrutura genética da AMOVA, demonstrando que a maior diferenciação genética ocorreu dentro de populações do que entre populações. Os dendrogramas e a análise de coordenadas principais foram consistentes na formação de dois clados, os quais demonstraram um padrão geográfico explicável. O padrão de diversidade genética apresentado por *Psychotria ipecacuanha* revelou que: (I) a Floresta Atlântica seria formada por populações de origem mais antiga em relação a Floresta Amazônica, e se constitui centro de diversidade para a espécie. (II) a origem das populações de poaia na Floresta Amazônica seria resultado de colonizações recentes aos invés de se constituírem de mosaicos de habitats (refúgios) em consequência de fragmentações passadas de uma população amplamente distribuída. Apesar da diversidade genética da Floresta Atlântica ser maior do que a diversidade da Floresta Amazônica, a conservação de *Psychotria ipecacuanha*, requer amostragem das duas florestas, devido ao acúmulo de diferenças genéticas particulares a cada floresta. Os níveis de

polimorfismo genético detectado ainda asseguram as práticas de conservação, apesar do tamanho limitado de muitas populações.

**Palavras chaves:** Conservação, diversidade genética, diferenciação genética, ISSR, *Psychotria ipecacuanha*.

## INTRODUÇÃO

A conservação de recursos genéticos das florestas tropicais é vital para a preservação da biodiversidade, pois estas não só mantêm a maior diversidade, como também permite a ocorrência de um grande número de interações ecológicas. O desconhecimento dos reais valores dessa biodiversidade tem-se constituído em obstáculos para o reconhecimento da necessidade de introduzir estratégias de conservação dos recursos biológicos nos planos nacionais de desenvolvimento. Nas últimas décadas, a extinção de várias formas de vida tem aumentado consideravelmente. Estima-se que aproximadamente 25% das espécies de plantas vasculares existentes serão extintas nos próximos 50 anos (Kala, 2000). Muitos fatores estão envolvidos com a extinção das espécies, como por exemplo, a destruição de habitats e, conseqüentemente, a fragmentação de populações. A perda de habitat é a principal ameaça à biodiversidade terrestre e é concentrada nas regiões tropicais, onde a biodiversidade é máxima (Brooks *et al.*, 2002). A mata atlântica, por exemplo, está incluída entre os 25 *hotspots* de biodiversidade para conservação prioritária (Myers *et al.*, 2000). Historicamente, a destruição de habitats no Brasil foi mais acentuada nas regiões costeiras do sul-sudeste do país e atualmente apenas 8% da cobertura vegetal da Floresta Atlântica do leste brasileiro ainda permanecem (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2002). Entretanto áreas florestadas e relativamente pouco perturbadas estão agora ameaçadas, como

por exemplo, na Amazônia. Laurance *et al.* (2001) prevêm a fragmentação e a degradação extensiva da Amazônia, a substancial perda da biodiversidade em torno de 2020. Existem poucos estudos sobre a conservação de germoplasma de espécies vegetais nativas de ecossistemas tropicais, principalmente em espécies de porte herbáceo. Um grande número de espécies de plantas medicinais e aromáticas brasileiras esteve, ou ainda está, sob o impacto de coleta silvestre intensiva (Garcia *et al.*, 1996), podendo inclusive levar ao seu desaparecimento local ou extinção.

A perda de populações locais e a subsequente perda da área de ocupação para cada espécie resultam em perda da diversidade genética e redução do potencial evolutivo, características estas que são importantes para a adaptação das espécies frente a mudanças ambientais (Crandall *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2003). Muitos programas de conservação de plantas raras ou ameaçadas visam manter os níveis existentes de variabilidade genética, evidenciando a importância de pesquisas em genética de populações para a conservação (James e Ashburner, 1997). Considerando estes fatores, o sucesso de qualquer programa de conservação depende do conhecimento da variabilidade genética existente na espécie.

*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae) é mundialmente conhecida como espécie medicinal. Suas propriedades farmacológicas provêm de alcalóides ativos presentes em suas raízes. Os alcalóides emetina e cefelina estão presentes nas raízes de *Psychotria ipecacuanha* durante todo o decorrer do ano e praticamente não apresentam variação sazonal (Garcia *et al.*, 2005). Os indivíduos de *Psychotria ipecacuanha* são perenes e se desenvolvem em

agregados, denominados reboleiras, em áreas de sub-bosque que recebem baixos níveis de radiação luminosa (Veloso, 1947). A espécie é distílica e apresenta certo grau de compatibilidade intraforma, embora sua frutificação seja maior em polinizações legítimas (Rossi *et al.*, 2005). *Psychotria ipecacuanha* pode se reproduzir tanto pela via sexual quanto pela via clonal (Caminha, 1943; Pio Correia, 1969). Atualmente, a espécie está ameaçada como consequência da fragmentação de seus habitats e do intenso extrativismo sofrido no passado. No presente, suas áreas de ocorrência natural se encontram extremamente reduzidas. *Psychotria ipecacuanha* está listada entre as espécies ameaçadas de extinção no Estado de Minas Gerais (Mendonça e Lins, 2000), o único estado brasileiro dentro da área de ocorrência da espécie que publicou uma lista de conservação de espécies vegetais. *Psychotria ipecacuanha* apresenta distribuição disjunta em três grandes áreas: a) Florestas da América Central (Panamá e Costa Rica) e norte da América do Sul (Colômbia); b) sul da Floresta Amazônica brasileira (nos Estados de Rondônia e Mato Grosso; e, c) na Floresta Atlântica (principalmente nos Estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro) (Veloso, 1947; Assis e Giulietti, 1999). Atualmente, a Floresta Atlântica e a Floresta Amazônica, locais de ocorrência da espécie e de coleta do material para este estudo, se encontram isoladas geograficamente por um longo período de tempo devido a uma vasta savana (o bioma Cerrado) e uma região semi-árida (o bioma Caatinga). O Cerrado e a Caatinga resultaram em uma grande disjunção de flora e fauna entre as Florestas Atlântica e Amazônica e, presentemente, pode dificultar ou

mesmo impedir a dispersão de espécies e o fluxo gênico entre populações de uma mesma espécie localizadas nestas duas florestas.

Marcadores ISSR (*inter-simple sequence repeat*) (Zietkiewicz *et al.*, 1994) são amplamente utilizados em estudos de diversidade genética por não necessitar de informação prévia da seqüência de DNA, ter baixos custos de desenvolvimento e os procedimentos laboratoriais podem ser transferidos para qualquer espécie de planta (Barth *et al.*, 2002). Os *primers* de ISSRs são seqüências de microsatélite, ancoradas ou não na extremidade 5' ou 3' por nucleotídeos degenerados. A adição de diferentes bases nas extremidades 5' ou 3' torna seu sítio de ligação mais específico e reproduzível (Gupta *et al.*, 1994; Zietkiewicz *et al.*, 1994; Fang *et al.*, 1997). Os primers de ISSR amplificam a região entre os dois sítios de ligação. *Indels*, perda ou ganho de sítios de ligação dentro da região amplificada são detectados como bandas polimórficas (Yang *et al.*, 1996). Esta técnica tem demonstrado ser uma poderosa ferramenta para a investigação da variação genética dentro de espécies (Wolfe e Liston, 1998). A natureza hipervariável dos marcadores ISSR e o seu potencial para estudos em nível de populações têm sido registrados em estudos de populações naturais (Esselman *et al.*, 1999; Culley e Wolfe, 2001).

Neste estudo a diversidade genética de populações naturais de *Psychotria ipecacuanha* das Florestas Atlântica e Amazônica, foi analisada por meio de marcadores de ISSRs, objetivando responder as seguintes questões: Qual é o nível de variação de ISSR em *Psychotria ipecacuanha*? Como a diversidade

genética está fracionada dentro e entre as populações de poaia da Floresta Atlântica? E dentro e entre as populações da Floresta Amazônica? Qual das duas florestas apresenta maior diversidade genética? Qual a proporção da diversidade genética compartilhada pelas duas florestas? Qual o efeito da disjunção das florestas Atlântica e Amazônica na distribuição da diversidade e na estrutura populacional de *Psychotria ipecacuanha*? As respostas para estas questões terão implicações importantes para a eficiência e efetividade na elaboração de programas de conservação e manejo da espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

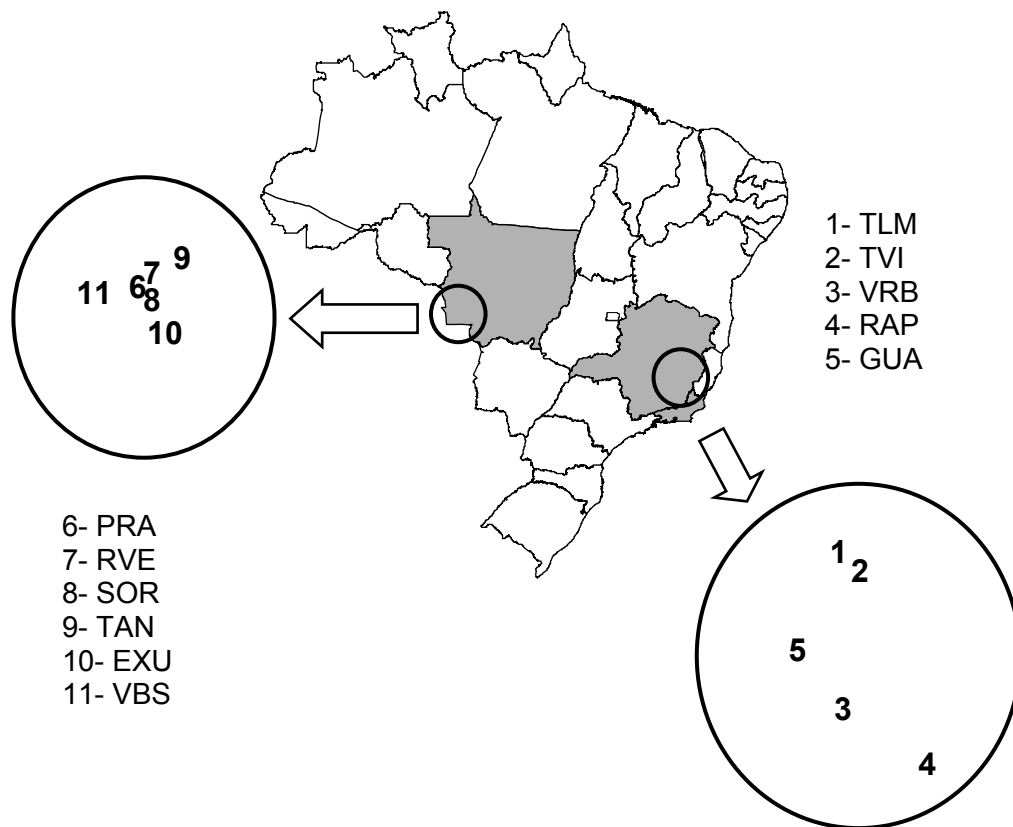
### Material Vegetal

Um total de 166 indivíduos representando 11 populações naturais de *Psychotria ipecacuanha* foi amostrado em duas florestas brasileiras: Floresta Atlântica e Floresta Amazônica. Na Tabela 1 encontram-se relacionadas às populações amostradas em cada floresta, as respectivas localizações geográficas e o tamanho da amostra por população e por floresta. A distribuição geográfica das populações pode ser visualizada na Fig. 1.

**TABELA 1.** Populações de *Psychotria ipecacuanha* amostradas com as respectivas abreviações e localizações geográficas.

Populações	Código das Populações	Tamanho da amostra	Latitude (S)	Longitude (W)
FLORESTA ATLÂNTICA		75		
Trilha da Lagoa do Meio - PERD	TLM	14	19°38'34"	42°30'56"
Trilha do Vinhático - PERD	TVI	14	19°45'44"	42°37'57"
Visconde do Rio Branco	VRB	15	21°00'37"	42°50'26"
Raposo	RAP	17	21°06'40"	42°05'43"
Guaraciaba	GUA	15	20°34'14"	43°00'27"
FLORESTA AMAZÔNICA		91		
Prata	PRA	17	15°30'26"	58°01'50"
Rio Vermelho	RVE	15	15°17'38"	57°51'43"
Soroteca	SOR	15	15°31'34"	58° 00'42"
Tangará da Serra	TAN	15	14°04'38"	57°03'45"
Exu	EXU	18	15°40'41"	57°32'03"
Vila Bela da Santíssima Trindade	VBS	11	15°00'29"	59°57'02"

Na Floresta Atlântica foram amostradas cinco populações. Duas destas populações, TLM e TVI, estão localizadas no Parque Estadual do Rio Doce, e encontram-se em grandes áreas de matas conservadas. As outras três populações; VRB, RAP e GUA; foram amostradas em áreas de propriedade particular e podem ser consideradas de habitats fragmentados e de pequeno tamanho.



**FIG. 1.** Distribuição das populações de *Psychotria ipecacuanha* amostradas na Floresta Atlântica (a direita) e na Floresta Amazônica (a esquerda). Os códigos das populações correspondem aos demonstrados na TABELA 1.

Na Floresta Amazônica, foram amostradas seis populações: PRA, RVE, SOR, TAN, EXU e VBS. VBS é a que se encontra mais distante geograficamente, encontra-se a oeste do Pantanal, enquanto que as demais populações encontram-se ao leste do Pantanal. O pantanal constitui-se em um isolamento geográfico entre VBS e as demais populações da Floresta Amazônica. Todas as populações da Floresta Amazônica foram coletadas em áreas particulares, podendo ser consideradas como sendo de habitats fragmentados.

Folhas jovens foram coletadas para extração de DNA. O material foliar foi envolto em papéis molhados para reter a umidade e acondicionado no campo em sacos plásticos de polietileno. Posteriormente, o material foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , no laboratório de sequenciamento de DNA (seqDNA).

### ***Extração de DNA total***

DNA genômico total foi extraído de aproximadamente 100 mg de folhas jovens usando protocolo de CTAB descrito por Doyle & Doyle (1987), com poucas modificações. O tecido foliar foi macerado em almofariz na presença de nitrogênio líquido. O material foi transferido para microtubos de 2 mL de capacidade, ao qual foram adicionados 800  $\mu\text{L}$  de tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M cloreto de sódio; 20 mM EDTA; 2 % CTAB; 2% polivinilpirrolidona (PVP) e 2%  $\beta$ -mercaptoetanol) e incubado a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. A seguir, foram adicionados 700  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v:v). Os tubos foram agitados por 1 minuto em vórtex e centrifugados a

13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e precipitado com o mesmo volume de isopropanol gelado por 12 horas. Após este período, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos, e o precipitado foi lavado uma vez com etanol 70% e uma vez com etanol 95%. Depois da secagem por 15 minutos em temperatura ambiente, o precipitado foi ressuspenso em 200  $\mu$ L de TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) contendo RNase (40  $\mu$ g/mL) e a solução incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, a solução foi precipitada com a adição de acetato de amônio 7,5 M na proporção 1:10 (acetato:DNA ressuspenso) e 2/3 do volume de isopropanol gelado por 4 horas. A seguir, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado uma vez com etanol 70% e uma vez com etanol 95% e ressuspenso em 40-60  $\mu$ L de TE. A qualidade e a concentração do DNA foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% com marcador de DNA  $\lambda$ . As soluções estoque foram preparadas por diluições com água Milli-Q autoclavada de forma a se obter uma solução de trabalho com concentração final de aproximadamente 10 ng/ $\mu$ L de DNA genômico.

### ***Seleção de primers e otimização do PCR***

Um conjunto contendo 100 *primers* de ISSR foi obtido da Universidade de British Columbia (UBC set nº 9). Todos os *primers* foram testados para amplificação inicial em duas amostras da Floresta Atlântica e duas amostras da Floresta Amazônica. Com base no padrão de amplificação das quatro amostras

25 *primers* foram selecionados. A seguir foram otimizadas as condições para detectar ISSRs nestas quatro amostras. Os efeitos da concentração de *primer* (0,15; 0,20; 0,25 e 0,33  $\mu$ M), DNA template (20, 40, 80 e 120 ng),  $MgCl_2$  (2; 2,5 e 3 mM), formamida (1,5; 2, 2,5%) e a influência da temperatura de anelamento (gradiente de 45- 56°C) na reprodutibilidade do padrão de bandejamento foram analisados. A otimização dos *primers* foi determinada por avaliações visuais dos padrões de bandejamento para intensidade, polimorfismo e repetitividade. Todos os parâmetros avaliados afetaram o padrão de bandejamento. Utilizando-se os 25 *primers* e as condições otimizadas selecionou-se 14 *primers* que produziram maior número de bandas confiáveis e polimorfismo reproduzível para as análises definitivas. Seqüências e características destes *primers* estão mostradas na Tabela 2.

### ***PCR - Amplificação de ISSR***

Amplificações foram realizadas em um volume total de 20  $\mu$ L contendo: 10 mM Tris-HCl (pH8,3); 50 mM KCl; 0,1% de tween 20; 2,5 mM  $MgCl_2$ ; 0,2 mM de cada dNTP; 0,2  $\mu$ M de *primer*, 0,75 U de Taq DNA polimerase, 2% formamida, aproximadamente 30 ng de DNA template e água Milli-Q. As amplificações foram conduzidas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 45-53°C (dependendo *do primer* utilizado) por 45 segundos e 72°C por 1,5 minutos e 1 ciclo de extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos

de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de corrida TBE 1X (89,15 mM de Tris Base; 88,95 mM de Ácido Bórico e 2,23 mM EDTA), em voltagem constante de 110 V por quatro horas. A coloração do gel foi feita com brometo de etídeo (0,6 ng/mL). Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados, por comparação, com o marcador molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Em seguida, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta usando o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene).

**TABELA 2.** *Primers* usados para amplificação de ISSR em 166 indivíduos de *Psychotria ipecacunha* amostrados em 11 populações. Temperatura de anelamento (T<sub>m</sub>), número de bandas (NB) e porcentagem de bandas polimórficas (PBP).

Código	Primer		Espécie	NB (PBP)	
	Seqüência (5' - 3')*	T <sub>m</sub> (°C)		Floresta Atlântica	Floresta Amazônica
UBC 801	(AT) <sub>8</sub> T	50	11 (100)	09 (88,9)	09 (100)
UBC 814	(CT) <sub>8</sub> A	46	14 (100)	07 (71,4)	12 (91,7)
UBC 824	(TC) <sub>8</sub> G	48	13 (100)	13 (100)	05 (40,0)
UBC 834	(AG) <sub>8</sub> YT	45	19 (89,5)	17 (70,6)	16 (81,2)
UBC 835	(AG) <sub>8</sub> YC	52	15 (100)	14 (100)	12 (75,0)
UBC 836	(AG) <sub>8</sub> YA	46	13 (92,3)	11 (72,7)	08 (75,0)
UBC 845	(CT) <sub>8</sub> RG	46	16 (100)	13 (100)	13 (100)
UBC 848	(CA) <sub>8</sub> RG	52	10 (100)	06 (83,3)	09 (66,7)
UBC 850	(GT) <sub>8</sub> YC	46	13 (100)	12 (83,3)	08 (87,5)
UBC 855	(AC) <sub>8</sub> YT	53	15 (100)	09 (77,8)	12 (58,3)
UBC 866	(CTC) <sub>6</sub>	52	12 (100)	12 (100)	10 (70,0)
UBC 873	(GACA) <sub>4</sub>	48	08 (100)	06 (100)	08 (75,0)
UBC 880	(GGAGA) <sub>3</sub>	45	17 (88,2)	15 (73,3)	13 (61,5)
UBC 891	HVH(TG) <sub>7</sub>	53	17 (100)	16 (93,3)	15 (60,0)
Total			193 (97,4)	160 (86,9)	150 (75,3)

\*Y = C ou T; R = A ou G; H = A, C ou T; V = A, C ou G

### **Análise dos dados**

Os fragmentos de ISSR foram codificados como caracteres binários: presença (1) ou ausência (0) de bandas. Apenas bandas robustas e inequívocas foram avaliadas. Bandas com intensidade fraca ou coalescentes com outras bandas foram excluídas. As bandas que se apresentaram monomórficas para todas as amostras foram descartadas das análises posteriores.

Os dados da matriz de presença/ausência foram analisados utilizando o programa POPGENE 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) para estimar os seguintes parâmetros de diversidade: porcentagem de locos polimórficos (P), índice de diversidade de Shannon (I) e a diversidade gênica de Nei ( $H_E$ ) (Nei, 1973). P, I e  $H_E$  foram calculados em três níveis: em nível de população, de florestas e de espécie. Para examinar a estrutura genética populacional entre as populações, o coeficiente de diferenciação gênica ( $G_{ST}$ ), foi estimado em nível de floresta e de espécie. A identidade genética e a distância genética entre populações foram também computadas usando o modelo apresentado em Nei (1978).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi usada para revelar a distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações. Nesta análise, a diversidade genética total foi particionada em três níveis hierárquicos distintos: diferença entre florestas, entre populações e entre indivíduos dentro de população. A AMOVA foi realizada de acordo com Excoffier *et al.* (1992), com o auxílio do programa Arlequin 3.01 (Excoffier *et al.*, 2006). A significância da diferenciação foi testada com 1000 permutações, onde P denota a

probabilidade de se observar um valor ao acaso igual ou maior ao valor observado. Visto que ISSRs são marcadores dominantes e a espécie em estudo se propaga vegetativamente, os dados também foram analisados usando o software Hickory versão 1.0.4 (Holsinger e Lewis, 2005), baseado em um método Bayesiano (Holsinger *et al.*, 2002) que não requer pressuposições sobre o sistema reprodutivo e o equilíbrio de Hardy-Weinberg. No programa Hickory a diversidade genética ( $H_B$ , análogo ao  $H_E$ ) e a diferenciação populacional ( $\theta^\beta$ , análogo ao  $\Phi_{ST}$ ) foram determinadas com cinco repetições de cada um dos quatro diferentes modelos (*full model*, *f = 0 model*, *theta = 0 model* e *f free model*) para assegurar a consistência dos resultados. A escolha do modelo foi baseada no *Deviance Information Criterion* (DIC) (Spiegelhalter *et al.*, 2002). Modelos com menores DIC são preferidos, mas diferenças maiores que seis unidades no DIC entre os diferentes modelos são requeridas para indicar que há favorecimento de um modelo sobre o outro (Holsinger e Lewis, 2005).

O programa NTSYS-pc (Rohlf, 2005) foi empregado para a realização da análise de agrupamento baseado na média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA), empregando o coeficiente de Dice que é similar ao coeficiente de Nei e Li (1972). O coeficiente de Dice é definido como  $2a/2a+b+c$ , onde a é soma das duplas presenças, para dois setores comparados (1-1) com peso duplo tanto no numerador quanto no denominador, b e c são os pares discordantes entre os setores, correspondendo as duas combinações de presença e ausência (1-0; 0-1). O índice de similaridade de

Dice não atribui qualquer significado genético para a coincidência de ausência de bandas.

Para construir fenogramas representativos das distâncias genética entre populações, a matriz dos valores de  $F_{ST}$  par-a-par das populações foi gerada usando o Arlequin 3.01 (Excoffier *et al.*, 2006), bem como a matriz das distâncias genéticas de Nei (1978) pelo POPGENE 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). As respectivas matrizes foram importadas para o MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) para construir dendrogramas pelos métodos do vizinho mais próximo (NJ) e UPGMA, respectivamente. A significância dos agrupamentos foram testados pelo coeficiente de correlação cofenética (CCC), calculado entre os elementos da matriz original e os da matriz cofenética com o NTSYS-pc (Rohlf, 2005). O suporte para cada nó foi testado usando 1000 replicações de *bootstrap* no programa Phylip 3.66. O teste de Mantel (Mantel, 1967) como implementado na rotina de MXCOMP com NTSYS-pc (Rohlf, 2005), com 900 permutações, foi realizado para investigar a correlação entre  $F_{ST}$  e a matrizes cofenética baseada na distância da Diversidade Genética de Nei e na Identidade Genética de Nei. O teste de Mantel foi utilizado também para investigar a correlação entre distância genética (dada pela estimativa de  $F_{ST}$ ) e a distância geográfica das populações amostradas. A matriz de distância geográfica foi gerada calculando a distância em quilômetros entre todas as 11 populações, utilizando as coordenadas geográficas. O teste de Mantel produz uma correlação ( $r$ ) que varia de -1 para +1 e representa a relação entre duas matrizes. Este teste compara o  $Z$  observado com o  $Z$  randômico. Para valores de  $r$  negativos,

quanto mais baixa é a frequência de  $Z_{rdm} \leq Z_{obs}$ , mais alta é a correlação ( $r$ ) entre as duas matrizes. Para valores de  $r$  positivos, quanto mais baixa é a frequência de  $Z_{rdm} \geq Z_{obs}$ , mais alta é a correlação ( $r$ ) entre as duas matrizes.

## RESULTADOS

### ***Polimorfismo revelado por marcadores de ISSR***

Foram analisados 100 *primers* de ISSR em dois indivíduos selecionados ao acaso em cada uma das duas florestas. Durante o processo de análise, foram examinados visualmente as imagens dos géis de eletroforese e comparados os efeitos que os fatores testados tiveram sobre o padrão de bandejamento. Os fatores avaliados foram: concentração de magnésio e formamida, temperatura de anelamento durante a amplificação, reprodutibilidade, intensidade e número de produto amplificado. Posteriormente, foram selecionados 14 *primers* para analisar todas as populações incluídas neste estudo (Tabela 2). As bandas fracas ou coalescentes foram desconsideradas das análises. Os 14 *primers* selecionados produziram um total de 193 bandas, que variaram entre 400 pb a aproximadamente 2,1 kb, correspondendo a uma média de 13,8 bandas por *primer* (Tabela 2). Dos 193 locos investigados 97,4% foram polimórficos em nível de espécie. Cinco bandas foram monomórficas para todos os 166 indivíduos e foram descartadas das análises posteriores. Cada indivíduo demonstrou um fenótipo particular de ISSR. Comparações dos dados revelaram notáveis diferenças entre as duas florestas. A Floresta Amazônica, quando comparada a Floresta Atlântica, demonstrou menor número de bandas (150 contra 160), menor porcentagem de

bandas polimórficas (75,3% contra 86,9%), menor número de bandas exclusivas (33 contra 43), e menor número de bandas raras (29 contra 49). Para este estudo, bandas raras são aquelas nas quais a frequência é menor que 10% do número total de bandas em cada floresta. A comparação do padrão de bandeamento entre as populações das Florestas Atlântica e Amazônica indicou que 39,4% das bandas foram únicas para cada floresta.

### ***Diversidade genética dentro de populações***

A estimativa da diversidade genética em nível de espécie e de tipo de floresta está resumida na Tabela 3. O índice de diversidade gênica de Shannon (I) em nível de espécie foi de 0,510. A heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) foi de 0,345 quando o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o modelo de cruzamento ao acaso foram assumidos ( $F=0$ ).  $H_E$  foi, assim, similar a estimativa de  $H_B$  (0,355) que não assume o equilíbrio de Hardy-Weinberg e nem pressuposições sobre o sistema reprodutivo da espécie. Correlações significantes foram encontradas entre as estimativas de  $H_E$  e  $H_B$  ( $r^2 = 0,966$ ;  $P < 0,01$ ), entre as estimativas de  $H_E$  e I ( $r^2 = 1,000$ ;  $P < 0,01$ ), e entre as estimativas de  $H_B$  e I ( $r^2 = 0,966$ ;  $P < 0,01$ ).

Quando as análises foram realizadas em nível de florestas, a porcentagem de polimorfismo (P) foi de 73,94 para a Floresta Atlântica, quando considerada como um grupo e de 42,87 como uma média das populações. Na Floresta Amazônica, a porcentagem de polimorfismo foi menor (60,11) quando considerada como um grupo e como a média de suas populações (26,86). Comparada à Floresta Amazônica, a Floresta Atlântica exibiu níveis de

diversidade genética superiores, como demonstrado pelos maiores valores de  $H_E$ ,  $H_B$  e  $I$ , tanto como uma média das populações, quanto como um grupo.

A média dos valores de  $H_E$ ,  $H_B$  e  $I$ , ao nível de população, foram: 0,141 – 0,094; 0,144 – 0,098; e 0,213 – 0,140 para a comparação Floresta Atlântica – Floresta Amazônia, respectivamente. Ao nível de floresta, os valores de  $H_E$ ,  $H_B$  e  $I$  para a comparação Floresta Atlântica – Floresta Amazônica foram: 0,204 – 0,162; 0,199 – 0,180; e 0,314 – 0,251, respectivamente.

**TABELA 3.** Diversidade genética dentro de populações.

Populações	N	P (%)	$H_E$	$H_B$	$I$
<b>FLORESTA ATLÂNTICA</b>					
TLM	14	40,96	0,138	0,131	0,207
TVI	14	40,96	0,131	0,135	0,197
VRB	15	47,87	0,151	0,162	0,230
RAP	17	45,74	0,157	0,152	0,236
GUA	15	38,83	0,129	0,138	0,194
Média		42,87	0,141	0,144	0,213
Grupo	75	73,94	0,204	0,199	0,314
<b>FLORESTA AMAZÔNICA</b>					
PRA	17	34,04	0,131	0,123	0,192
RVE	15	27,66	0,098	0,096	0,148
SOR	15	27,66	0,089	0,094	0,134
TAN	15	29,26	0,094	0,107	0,143
EXU	18	25,00	0,088	0,089	0,131
VBS	11	17,55	0,064	0,077	0,094
Média		26,86	0,094	0,098	0,140
Grupo	91	60,11	0,162	0,180	0,251
Espécie	166	100,00	0,345	0,355	0,510

N, tamanho da amostra; P (%), porcentagem de polimorfismo;  $H_E$  diversidade gênica de Nei (1973) (assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg);  $H_B$ , estimativa da diversidade genética pelo método Bayesiano (sem assumir equilíbrio de Hardy-Weinberg);  $I$ , índice de diversidade gênica de Shannon.

Dentre as populações da Floresta Atlântica, VRB e RAP apresentaram maior diversidade genética, como demonstrado pelos maiores valores de  $H_E$ ,  $H_B$  e  $I$  ( $H_E = 0,151$  e  $0,157$ ;  $H_B = 0,162$  e  $0,152$ ;  $I = 0,230$  e  $0,236$ ), enquanto que GUA apresentou a menor diversidade genética ( $H_E = 0,129$ ;  $H_B = 0,138$  e  $I = 0,194$ ). Na Floresta Amazônia PRA exibiu os maiores índices de diversidade ( $H_E = 0,131$ ;  $H_B = 0,123$  e  $I = 0,192$ ), enquanto VBS apresentou os menores índices ( $H_E = 0,064$ ;  $H_B = 0,077$  e  $I = 0,094$ ) (Tabela 3).

### ***Diferenciação genética entre populações***

A média de  $G_{ST}$  para as populações dentro da Floresta Atlântica e Floresta Amazônica foi estimada como 0,306 e 0,425, respectivamente, indicando que houve diferenciação entre populações dentro de cada região (Tabela 4). A estimativa da diferenciação genética pelo método Bayesiano na Floresta Atlântica e na Floresta Amazônica ( $G_{ST-B} = 0,289$  e  $0,347$ , respectivamente) foi consistente com os resultados da estrutura genética de Nei. A maior diferenciação genética foi encontrada entre as populações da Floresta Amazônica como indicado pelo maior valor  $\Phi_{ST}$ ,  $\theta^{\beta}$ ,  $G_{ST}$ , e  $G_{ST-B}$  (0,432; 0,404; 0,425 e 0,347, respectivamente), quando comparadas aos valores apresentados entre as populações da Floresta Atlântica (0,341; 0,348; 0,306 e 0,289, respectivamente) (Tabela 4).

Dentre os modelos avaliados para as análises da diversidade genética, por meio do programa Hickory, o “*full model*” foi o escolhido por apresentar menor DIC, em nível de espécie e de floresta. Na Floresta Atlântica o “*full*

*model*” revelou um DIC de 2021,2 no qual a média do  $\theta^B$ , o estimador de  $F_{ST}$ , foi 0,348 (SD = 0,0192; intervalo de confiança 2,5% = 0,3113 e de 97,5% = 0,3854). Na Floresta Amazônica o menor DIC foi de 1605,9, obtido com o “*full model*” (média do  $\theta^B$  = 0,4042; SD = 0,0260; intervalo de confiança 2,5% = 0,3556 e de 97,5% = 0,4573). Em nível de espécie, o menor DIC (3832,8) também foi revelado pelo “*full model*” (média do  $\theta^B$  = 0,6838; SD = 0,0104; intervalo de confiança 2,5% = 0,6622 e de 97,5% = 0,7031). Os resultados de “*f = 0 model*” indicaram que não há nenhuma evidência de desvios das proporções genótípicas esperadas pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* dentro das populações nos níveis avaliados. Enquanto que a estimativa do “*theta = 0 model*” revelou evidências que há subdivisão genética das populações de *Psychotria ipecacuanha*.

**TABELA 4.** Estatística F de Wright para diferenciação genética\*.

	$\Phi_{ST}$	$\theta^B$	$G_{ST}$	$G_{ST-B}$
Floresta Atlântica	0,341	0,348	0,306	0,289
Floresta Amazônica	0,432	0,404	0,425	0,347
Espécie	0,786	0,684	0,474	0,666

\* $\Phi_{ST}$  = estimativa da diferenciação genética entre populações usando AMOVA;  $\theta^B$  = análogo ao  $\Phi_{ST}$  estimado utilizando o *full model* com o programa Hickory;  $G_{ST}$  = diferenciação genética de Nei (1987), calculado com POPGENE 1.31, assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $F_{IS} = 0$ );  $G_{ST-B}$  = análogo ao  $G_{ST}$ , estimado utilizando o *full model* com o programa Hickory (sem assumir o equilíbrio de Hardy-Weinberg).

A AMOVA revelou que 65,3% da variância molecular total foi atribuída para divergências regionais entre florestas, 13,3% para diferenças populacionais dentro de cada floresta e 21,4% para diferenças individuais

dentro de populações (Tabela 5). Quando a análise de variância molecular foi realizada sem considerar a distribuição regional das populações nas duas florestas, 69,58% da variância total foi atribuída para populações e 30,42% para diferenças individuais dentro de populações (Tabela 5). Quando a análise de variância molecular foi realizada dentro de cada floresta, a Floresta Atlântica apresentou 34,13% da variância total entre populações e 65,87% dentro de populações. Por outro lado a Floresta Amazônica apresentou 43,20% da variância atribuída para diferenças entre populações, e 56,80% para diferenças individuais dentro de populações (Tabela 5). O resultado da estimativa de  $\theta^{\beta}$  pelo método Bayesiano dentro das florestas Atlântica e Amazônica ( $\theta^{\beta} = 0,348$  e  $0,404$ , respectivamente) foi consistente com os resultados da estrutura genética da AMOVA, demonstrando que a maior diferenciação genética ocorreu dentro de populações do que entre populações.

### ***Similaridade genética entre populações e estrutura geográfica***

A Tabela 6 demonstra uma estimativa da identidade genética e distância genética de Nei (1978) para todas as comparações par-a-par entre as populações. A distância genética de Nei varia de 0 a 1 e quanto mais próxima de 1 for a estimativa entre duas populações mais distante geneticamente as duas populações serão. A distância genética média para todas as comparações foi 0,364, variando de 0,0526 entre RAP e TLM (ambas populações da Floresta Atlântica) até 0,6858 entre GUA e EXU (populações das Florestas Atlântica e Amazônica, respectivamente).

**TABELA 5.** Análise de variância molecular (AMOVA) para diferentes níveis hierárquicos em populações de *Psychotria ipecacuanha*.

Fonte de Variação	GL	Soma dos quadrados	Componente de variância	Varição (%)	Valor de P*
Dois níveis hierárquicos:					
Entre populações	10	3769,00	24,30	69,58	<0,001
Dentro de populações	155	1647,10	10,623	30,42	
Total	165	5416,04	34,93		
Três níveis hierárquicos					
Entre Florestas	1	2778,47	32,43	65,30	<0,001
Entre populações dentro das florestas	9	990,49	6,61	13,30	<0,001
Dentro de populações	155	1647,10	10,63	21,40	<0,001
Total	165	5416,04	49,67		
Análise dentro da floresta Atlântica					
Entre populações	4	469,58	6,94	34,13	<0,001
Dentro de populações	70	937,88	13,40	65,87	
Total	74	1407,47	20,34		
Análise dentro da floresta Amazônia					
Entre populações	5	520,91	6,34	43,20	<0,001
Dentro de populações	85	709,22	8,34	56,80	
Total	90	1230,18	14,69		

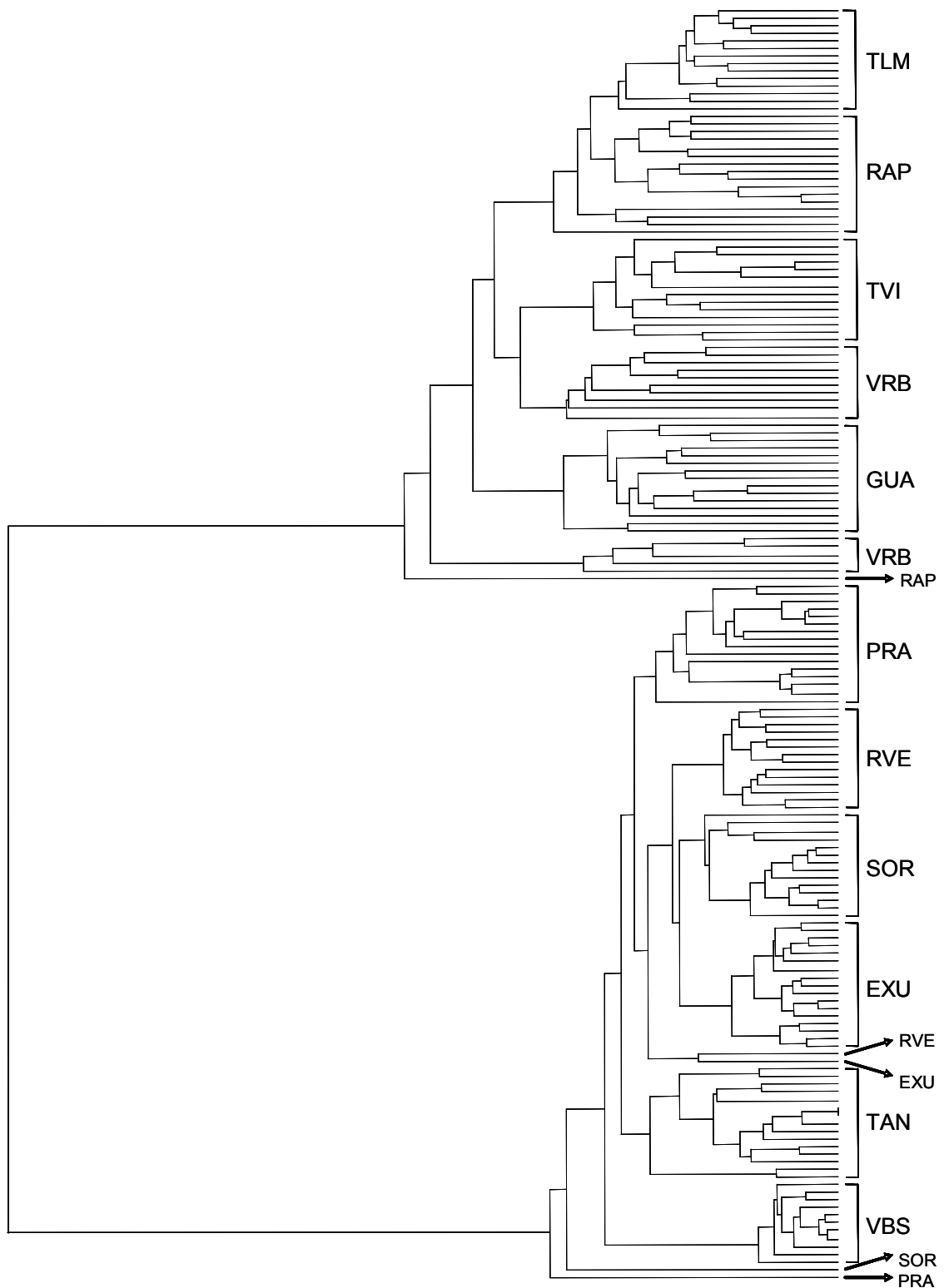
\*Valores de P são as probabilidades de ter um componente de variância maior que os valores observados ao acaso. As probabilidades foram calculadas por 1000 permutações ao acaso.

**TABELA 6.** Identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal), entre as 11 populações de *P. ipecacuanha* estimadas pelo método de Nei (1978).

	TLM	TVI	VRB	RAP	GUA	PRA	RVE	SOR	TAN	EXU	VBS
TLM	-	0,9107	0,8995	0,9488	0,8702	0,6030	0,5650	0,5667	0,5718	0,5496	0,5675
TVI	0,0935	-	0,9376	0,9138	0,9288	0,5941	0,5566	0,5574	0,5585	0,5313	0,5415
VRB	0,1059	0,0644	-	0,9202	0,9224	0,5780	0,5505	0,5465	0,5338	0,5244	0,5326
RAP	0,0526	0,0902	0,0832	-	0,8959	0,6092	0,5764	0,5741	0,5649	0,5456	0,5573
GUA	0,1390	0,0738	0,0808	0,1099	-	0,5682	0,5324	0,5239	0,5348	0,5037	0,5086
PRA	0,5058	0,5207	0,5481	0,4956	0,5653	-	0,9389	0,9174	0,9349	0,9319	0,8773
RVE	0,5710	0,5859	0,5969	0,5509	0,6304	0,0631	-	0,9355	0,9247	0,9460	0,8778
SOR	0,5680	0,5845	0,6043	0,5549	0,6465	0,0863	0,0667	-	0,9003	0,9322	0,8773
TAN	0,5590	0,5826	0,6277	0,5711	0,6259	0,0673	0,0783	0,1050	-	0,9402	0,8662
EXU	0,5986	0,6324	0,6455	0,6059	0,6858	0,0706	0,0556	0,0702	0,0617	-	0,8722
VBS	0,5666	0,6134	0,6299	0,5847	0,6762	0,1309	0,1303	0,1309	0,1437	0,1367	-

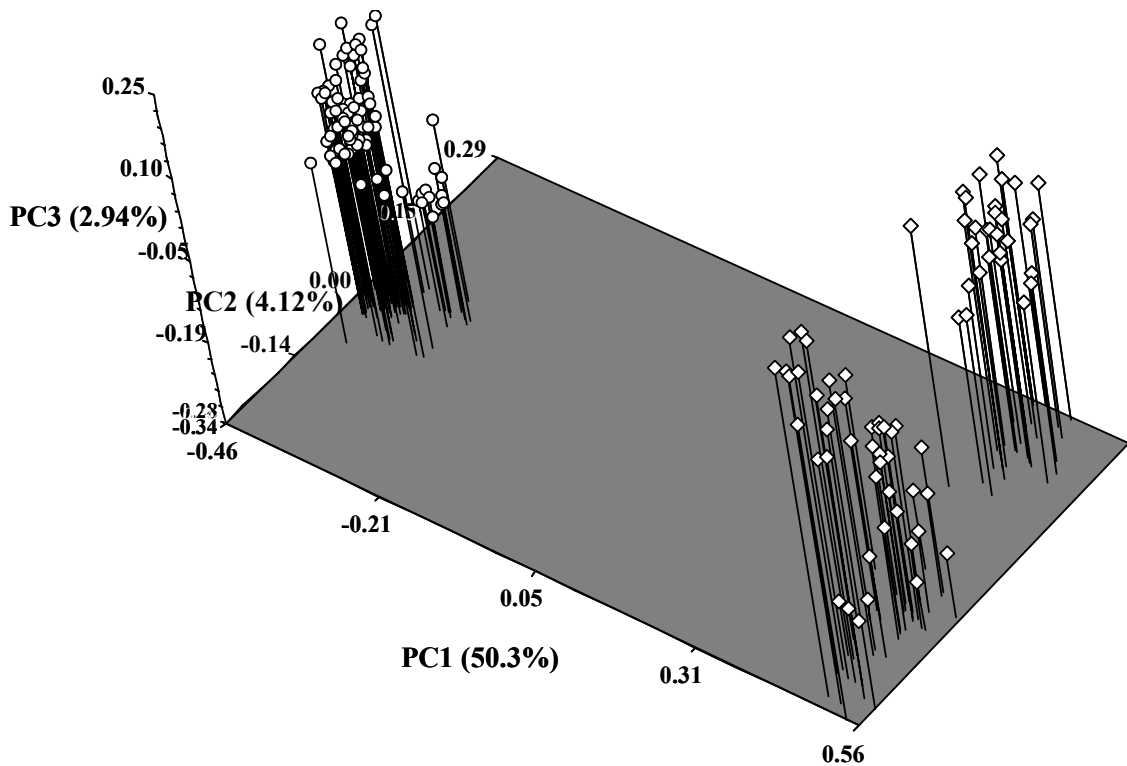
A média da distância genética de Nei (1978) foi maior entre florestas (0,591) do que dentro de florestas (Floresta Atlântica = 0,089 e Floresta Amazônica = 0,093). Na Floresta Atlântica, a distância genética entre as populações variou de 0,0526 (RAP e TLM) a 0,139 (GUA e TLM), com média de 0,089. A distância genética entre as populações da Floresta Amazônica variou de 0,0556 (EXU e RVE) a 0,1413 (VBS e TAN), com média de 0,093. Os resultados indicaram que as populações de RAP e TLM na Floresta Atlântica e as populações de EXU e RVE na Floresta Amazônica foram as mais próximas geneticamente dentro de cada uma das floresta.

O dendrograma mostrado na Fig. 2 ilustra a formação de dois clados. Um clado contém exclusivamente indivíduos das populações da Floresta Atlântica e o outro clado contém exclusivamente indivíduos das populações da Floresta Amazônica. Dentro de cada clado, a maioria dos indivíduos formou agrupamentos bem definidos com indivíduos da mesma população. A formação dos dois clados foi geograficamente estruturada, pois nenhum indivíduo com origem nas populações da Floresta Atlântica foi alocado no clado contendo indivíduos com origem em populações da Floresta Amazônica, e vice versa. Indivíduos de uma mesma população demonstraram maior similaridade, bem como, os indivíduos de uma mesma floresta. Para avaliar o grau de ajuste entre as matrizes de dissimilaridade e as matrizes resultantes dos agrupamentos na formação do dendrograma, comparamos as estimativas dos coeficientes de correlação cofenética (CCC).



**FIG. 2.** Dendrograma de UPGMA em 166 indivíduos de 11 populações de *Psychotria ipecacuanha* baseado em 193 bandas de ISSR. Coeficiente de correlação cofenética  $r = 0.98016$ . Para os códigos das populações ver Tabela 1.

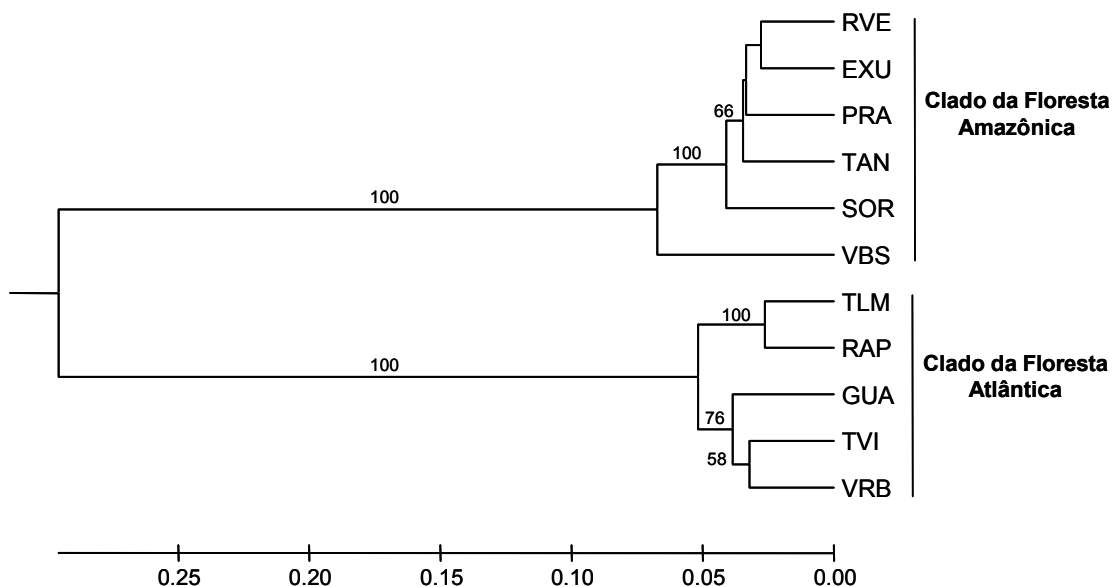
Valores de CCC superiores a 0,8 indicam boa representatividade entre as distâncias e quanto maior o valor do coeficiente, menor é a distorção provocada pelo agrupamento (Bussab *et al.*, 1990). O alto valor de CCC ( $r = 0,98$ ) entre as duas matrizes indica a robustez do agrupamento apresentado. Análise de coordenadas principais complementou a análise de agrupamento, fornecendo uma representação espacial das relativas semelhanças genéticas entre indivíduos (Fig. 3).



**FIG. 3.** Gráfico das três primeiras coordenadas principais para cada indivíduo de *Psychotria ipecacuanha* amostrados na floresta Atlântica (losângulos) e na Floresta Amazônia (círculos). Os valores das coordenadas principais estão demonstrados em parênteses.

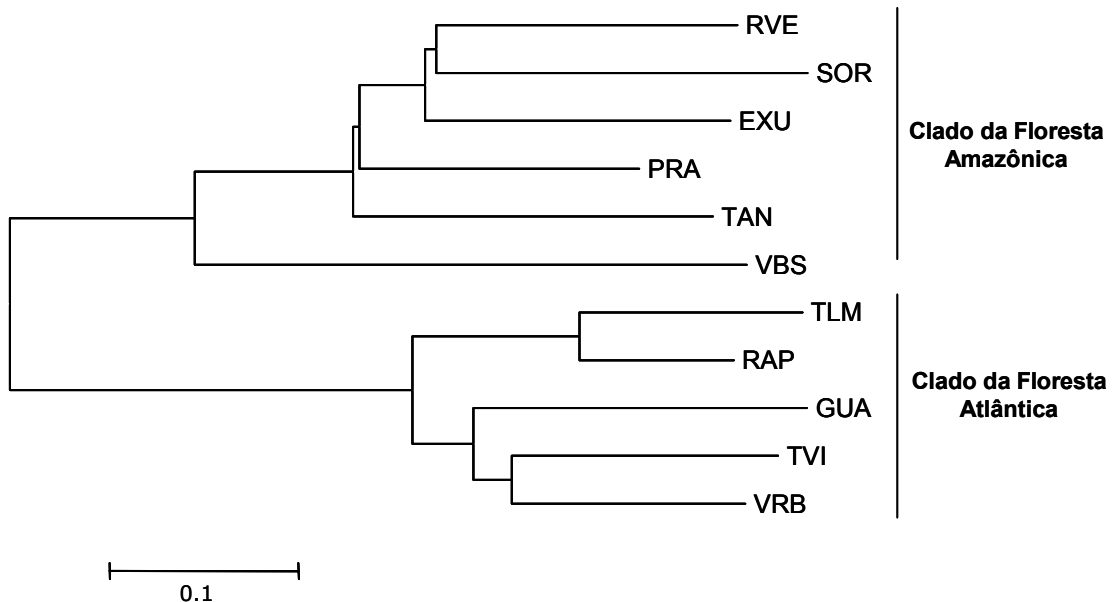
O gráfico tridimensional separou claramente o clado da Floresta Atlântica do clado da Floresta Amazônica (Fig. 3), os quais já haviam sido revelados pela análise de UPGMA. O resultado da análise de coordenadas principais demonstra um agrupamento mais denso na Floresta Amazônica, como consequência da similaridade entre os indivíduos desta floresta. Por outro lado, demonstra também, a maior diversidade dentro do agrupamento da Floresta Atlântica. A maioria da variação foi explicada pela primeira dimensão (50,3%), que em conjunto com a segunda e terceira dimensões explicaram 57,94% da variação.

Para melhor visualização dos grupos formados, os agrupamentos foram construídos tendo as populações como unidade de análise. Foi construído um dendrograma pelo método UPGMA baseado nas distâncias de Nei (1978) par-a-par entre populações (Fig. 4) e um dendrograma pelo



**FIG. 4.** Dendrograma gerado pelo método UPGMA baseado nas Distâncias de Nei (1978) de 193 bandas de ISSR entre as 11 populações de *Psychotria ipecacuanha* analisadas. Os valores de *bootstrap* acima de 50% estão demonstrados.

método do vizinho mais próximo (NJ) baseado nos valores de  $F_{ST}$  obtidos pela AMOVA (Fig. 5). Estes dendrogramas confirmaram a separação das populações em dois clados de acordo com o tipo de floresta.



**FIG.5.** Dendrograma gerado pelo método do vizinho mais próximo baseado nos valores de  $F_{ST}$  obtidos pela AMOVA entre as 11 populações de *Psychotria ipecacuanha* derivado de 193 bandas de ISSR.

Foram encontradas correlações significativas entre  $F_{ST}$  e a identidade genética de Nei ( $r = -0,95607$ ,  $p [Z_{rdm} \leq Z_{obs}] = 0,0001$ ),  $F_{ST}$  e a diversidade genética de Nei ( $r = 0,94976$ ,  $p [Z_{rdm} \geq Z_{obs}] = 0,0001$ ). Correlação significativa foi encontrada também entre  $F_{ST}$  e a distância geográfica ( $r = 0,94101$ ,  $p [Z_{rdm} \geq Z_{obs}] = 0,0001$ ). O alto valor encontrado na correlação entre matriz de distâncias geográficas e genéticas sugere um padrão espacial da variabilidade genética existente entre as populações e que estas estão estruturadas no espaço.

## DISCUSSÃO

### ***Estrutura populacional***

O padrão de distribuição da variabilidade genética nas populações de *Psychotria ipecacuanha* indica que, tanto na Floresta Atlântica quanto na Floresta Amazônica, a maior variação genética encontra-se dentro de populações do que entre populações. Este padrão foi encontrado para a maioria das espécies de plantas tropicais estudadas (Aldrich *et al.*, 1998; Margis *et al.*, 2002; White *et al.*, 1999; Gillies *et al.*, 1999; Cardoso *et al.*, 2000; Lowe *et al.*, 2000). Segundo Loveless e Hamrick (1984), espécies que apresentam mecanismos eficientes de dispersão de sementes e pólen favorecem o fluxo gênico entre populações, homogeneizando suas frequências alélicas e reduzindo a divergência genética por deriva e seleção, resultando em uma maior variação genética dentro das populações do que entre elas. Dispersores de pólen e sementes, dependendo de sua capacidade de vôo, podem promover um aumento da variabilidade dentro de populações, enquanto diminuem a divergência entre populações ao mantê-las ligadas por fluxo gênico. A menor divergência entre do que dentro das populações de *Psychotria ipecacuanha* em cada floresta, pode ser em parte explicada pela autoincompatibilidade apresentada pela espécie e pela propagação vegetativa.

A espécie apresenta heterostilia na forma de distilia. Os indivíduos de *Psychotria ipecacuanha* ocorrem em agregados denominados de reboleiras.

As reboleiras são constituídas de indivíduos com apenas uma forma floral, brevistila ou longistila. Uma população de *Psychotria ipecacuanha* é composta de várias reboleiras que se encontram dispersas em seu habitat. O sucesso reprodutivo da espécie depende do fluxo de pólen entre as formas florais (polinizações legítimas) e como estas formas florais se encontram em reboleiras separadas dentro das populações, a espécie é dependente de polinizadores. Tendo em vista, as atuais situações de fragmentação que se encontram os habitats naturais de *Psychotria ipecacuanha* e particularidades reprodutivas desta espécie, é improvável que o maior componente da diversidade genética seja ocasionada por fluxo gênico atual. O padrão de diversidade genética detectado na espécie pode então ser explicado pelo ciclo de vida perene dos indivíduos nas populações e pela reprodução assexuada apresentada pela espécie. Neste contexto, uma reboleira de *Psychotria ipecacuanha* pode inicialmente ter sido formada por poucos propágulos geneticamente distintos, que sofreram sucessivas multiplicações clonais e assim mantiveram a diversidade genética ocasionada por fluxo gênico antigo através da reprodução assexuada da espécie. A manutenção dos diferentes genótipos da espécie através de sua propagação clonal contribui para a conservação da variabilidade genética na população ao longo dos anos.

Em geral, espécies autógamas possuem baixa diversidade genética dentro de populações e alta diferenciação genética entre populações comparadas com espécies alógamas (Hamrick e Godt, 1996). Portanto, os dados de estrutura genética de populações em *Psychotria ipecacuanha* sugerem que a espécie seja de natureza alógama. Estes resultados são

consistentes com os documentados em estudo de populações de *Psychotria ipecacuanha* da Floresta Atlântica, onde as maiores porcentagens de frutificação foram registradas em polinizações legítimas (Rossi *et al.*, 2005). O sistema reprodutivo das espécies vegetais superiores, normalmente afeta a diferenciação genética (Hamrick e Godt, 1989). Para espécies com reprodução cruzada, estimativas da diferenciação genética entre populações baseada em dados de AMOVA com marcadores de RAPD tem normalmente sido < 28%. Para espécies com autofecundação, a estimativa da variação genética interpopulacional tem normalmente sido > 70% (Nybom e Bartish, 2000). As estimativas da variação genética detectada entre as populações de *Psychotria ipecacuanha* com ISSR (Floresta Atlântica = 34,13% e Floresta Amazônica = 40,92%), foram próximas às estimativas de Nybom e Bartish (2000) para espécies com reprodução cruzada.

### ***Diversidade genética entre populações***

A diversidade genética de uma espécie ou população é resultado dos efeitos combinados da história genealógica e processos evolutivos. Portanto, além do sistema reprodutivo, dos fatores ecológicos e da história de vida do organismo é necessário também compreender como esses fatores influenciam a dinâmica evolutiva e ecológica das populações (Loveless *et al.*, 1998). Baixos níveis de polimorfismo de ISSR foram revelados nas populações de *Psychotria ipecacuanha* da Floresta Amazônica em relação as populações da Floresta Atlântica. As Florestas Atlântica e Amazônica apresentaram níveis de diversidade genética diferenciados, indicando que fatores ecológicos e/ou evolutivos podem ter atuado ou estar atuando de

forma diferenciada nas populações destas florestas. A diferenciação quanto aos níveis de diversidade genética entre as populações das duas florestas, pode também ser explicada pelos processos históricos da dispersão da espécie durante a disjunção das duas florestas.

O processo histórico da disjunção das florestas Atlântica e Amazônica e a distribuição disjunta de *Psychotria ipecacuanha* nos permitem propor os seguintes cenários para explicar o atual padrão de diversidade genética apresentado pela espécie: (I) a Floresta Atlântica seria formada por populações de origem mais antiga em relação à Floresta Amazônica, e se constitui centro de diversidade para a espécie. (II) a origem das populações de poaia na Floresta Amazônica seria resultado de colonizações recentes ao invés de se constituírem de mosaicos de habitats (refúgios) em consequência de fragmentações passadas de uma população amplamente distribuída.

Os resultados reforçam a hipótese de que a Floresta Atlântica seja o centro de diversidade para a espécie, pois os maiores índices de diversidade foram detectados nas populações dessa floresta. Sugere-se também a hipótese de que as populações da Floresta Amazônica sejam resultado de colonizações recentes e que os menores níveis de diversidade genética abrigada em suas populações pode estar refletindo eventos de extinção e recolonização durante as flutuações climáticas do período Quaternário. Os eventos de extinções durante o processo de colonização da Floresta Amazônica podem ter ocasionado os gargalos gênicos e subsequentes colonizações por poucos indivíduos (o efeito fundador), oriundos de sementes e raízes gemíferas de indivíduos sobreviventes.

### ***O efeito da disjunção na diversidade genética***

A disjunção das Florestas Atlântica e Amazônica, ocasionada por sucessivos eventos climatológicos, resultou em uma separação espacial destas duas grandes áreas geográficas pela formação de uma extensa área xeromórfica entre elas. Esta extensão geográfica entre as duas maiores regiões florestais da América do Sul (florestas Atlântica e Amazônica) tem sido considerada por muitos autores como um impedimento à migração das espécies (Oliveira-Filho e Ratter, 1995). Porém, a distribuição disjunta de várias espécies na Floresta Atlântica e na Floresta Amazônica sugere a possibilidade de ligação entre elas no passado (Rizzini, 1963; Mori, 1989, Andrade-Lima, 1982).

*Psychotria ipecacuanha* apresenta distribuição disjunta nestas duas florestas brasileiras. A disjunção das florestas Atlântica e Amazônica pode ter fragmentado o que se constituía uma população contínua de *Psychotria ipecacuanha*, através de uma região intermediária de habitat não favorável a espécie. Este ambiente não favorável pode ter imposto uma pressão de seleção extremamente forte aos indivíduos de *Psychotria ipecacuanha* ali existentes e qualquer genótipo não adaptado pode ter sido eliminado rapidamente. A estrutura genética das populações de *Psychotria ipecacuanha* revelada neste estudo, como a menor diversidade nas populações da Floresta Amazônica e um alto índice de diferenciação entre as populações das duas Florestas, podem estar refletindo o resultado cumulativo deste efeito. Portanto, a estrutura detectada nas populações de *Psychotria ipecacuanha* existentes na Floresta Amazônica pode ser

resultado da baixa variabilidade inerente ao efeito fundador e a deriva genética causada pela pressão da disjunção.

Segundo Wright (1943), populações separadas por longas distâncias e com limitado fluxo gênico podem tornar-se diferenciadas geneticamente uma das outras pelo processo de “isolamento por distância”. A alta porcentagem de variação atribuída para divergências regionais entre florestas para a espécie *Psychotria ipecacuanha*, pode ser explicada como um efeito da disjunção que dificulta ou mesmo impede o fluxo gênico entre essas duas florestas para a espécie em estudo.

O processo de disjunção das duas florestas ocasionou a formação das matas de galeria que ocorre ao longo da região do cerrado. Segundo Oliveira-Filho e Ratter (1995), as matas de galeria servem de corredores méxicos para os elementos dependentes de maior umidade nas floras dessas florestas. A presença das matas de galeria poderia então sugerir um habitat favorável para *Psychotria ipecacuanha* nesta região intermediária, se constituindo em um corredor para intercâmbio da espécie entre as duas florestas. Porém, não há nenhum registro histórico da ocorrência de poaia nas matas de galeria e/ou de coletas realizadas nestas matas. Este fato pode ser justificado pela característica ecológica da espécie que ocorre em subbosque úmido das florestas tropicais e sofrem redução e extinção de suas populações em fragmentos pequenos. Portanto, apesar do ambiente ter propiciado a presença de matas de galeria durante a disjunção das duas florestas, as atuais matas de galeria não constituem corredores para o intercâmbio da espécie entre as populações da Floresta Atlântica e da Floresta Amazônica.

### **Conclusões e implicações para conservação**

A manutenção da variação genética é um dos maiores objetivos para a conservação de espécies ameaçadas de extinção (Awise e Hamrick, 1996). A principal meta da conservação é assegurar a sobrevivência contínua de populações e manter seu potencial evolutivo. O conhecimento dos níveis reais da variação genética entre e dentro populações de espécies raras e ameaçadas fornecem informações essenciais para a formulação de apropriadas estratégias de conservação (Falk e Holsinger, 1991; Milligan *et al.*, 1994). A intensa perda de habitat e a fragmentação, atualmente atribuída à pressão antrópica, tem ocasionado uma diminuição nas populações de *Psychotria ipecacuanha* determinando sua inclusão na lista de espécies ameaçadas de extinção. Apesar da atual fragmentação e da redução das populações de *Psychotria ipecacuanha*, este estudo ainda detectou uma relevante diversidade genética em suas populações, fato este que pode ser atribuído à longevidade dos indivíduos e ao alto índice de reprodução vegetativa apresentado por *Psychotria ipecacuanha*. Estes fatores podem estar perpetuando o polimorfismo antigo já existente nos indivíduos desta espécie.

Os resultados obtidos neste estudo permitem-nos fazer inferências para a conservação da diversidade genética de *Psychotria ipecacuanha*. Para as populações da Floresta Atlântica a moderada diferenciação encontrada entre suas populações, indica que a estratégia mais efetiva para preservar sua variação genética pode ser conservar um grande número de indivíduos em grandes populações. Portanto populações como TLM e TVI

que já se encontram em áreas de preservação, podem ser mantidas como fonte da variabilidade genética da espécie nesta floresta. Na Floresta Amazônica, as populações de PRA e RVE abrigam relativamente as maiores quantidades de diversidade genética entre as populações pesquisadas e podem portanto serem consideradas como prioridades para ações de conservação *in situ*.

Apesar da diversidade genética da Floresta Atlântica ser maior do que a diversidade da Floresta Amazônica, a conservação *ex situ* de *Psychotria ipecacuanha*, requer amostragem das duas florestas, devido ao acúmulo de diferenças genéticas particulares a cada área. Nas estratégias de conservação *ex situ* deve-se, portanto, evitar a mistura de indivíduos das duas florestas, para preservar a identidade de cada uma delas. Os níveis de polimorfismo genético mantidos nesta espécie nas duas florestas analisadas asseguram as práticas de conservação, apesar do tamanho limitado de muitas populações.

## REFERÊNCIAS

**Aldrich PR, Hamrick JL, Chavarriaga P, Kochert G.** 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology*, **7**: 933-944.

**Andrade-Lima D.** 1982. Present-day forest refuges in Northeastern Brazil. *Biology diversification in the tropics* (ed. G.T. Prance), pp. 245–251. Plenum Press, New York.

**Assis MC, Giulietti AM.** 1999. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de “ipecacuanha” - *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, **22**: 205-216.

**Avise JC, Hamrick JL.** 1996. *Conservation genetics: case histories from nature*. New York, NY: Chapman and Hall.

**Barth S, Melchinger AE, Lubberstedt.** 2002. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, **11**: 495-505.

**Brooks TM, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Rylands AB, Konstant WR, Flick P, Pilgram J, Olfield S, Magin G, Hilton-Taylor C.** 2002. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation Biology*, **16**: 909-923.

**Bussab WO, Miazaki ES, Andrade DF.** 1990. *Introdução à análise de agrupamentos*. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística.

**Caminha Filho A.** 1943. A ipecacuanha: *Evea ipecacuanha* (Brotero) Standley. *Boletim Ministério Agricultura, Rio de Janeiro*, **32**: 33-52.

**Cardoso SRS, Eloy NB; Provan J, Cardoso MA, Ferreira PCG.** 2000. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. Populations estimated by AFLP analysis. *Molecular Ecology*, **9**: 1753–1760.

**Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK.** 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**: 290-295.

**Culley TM, Wolfe AD.** 2001. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity*, **86**: 545-556.

**Doyle JJ, Doyle JL.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11–15.

**Esselman EJ, Jianqiang L, Crawford DJ, Windus JL, Wolfe AD.** 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *Inesperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, **8**: 443–451.

**Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM.** 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**: 479–491.

**Excoffier L, Laval G, Schneider S.** 2006. Arlequin ver 3.01. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG). Institute of Zoology. University of Berne

**Falk DA, Holsinger KE.** 1991. *Genetics and conservation of rare plants*. New York: Oxford University Press.

**Fang DQ, Roose ML, Krueger RR, Federici CT.** 1997. Fingerprinting trifoliolate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and intersimple sequences repeat marker. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**: 211–219.

**Fundação SOS Mata Atlântica e INPE.** 2002. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1995-2000. Relatório final. São Paulo.

**Garcia ES, Silva ACP, Gilbert B et al.** 1996. Fitoterápicos. In: *Workshop - Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas*. Campinas. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas “André Tosello”.

**Garcia RMA, Oliveira LO, Moreira MA, Barros WS.** 2005. Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**: 233-243.

**Gillies ACM, Navarro C, Lowe AJ, Newton AC, Hernandez M, Wilson J, Cornelius JP.** 1999. Genetic diversity in mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assed using RAPDs. *Heredity*, **83**: 711–732.

**Gupta M, Chyi Y-S, Romero-Severson J, Owen JL.** 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, **89**: 998–1006.

**Hamrick JL, Godt MJW.** 1989. Allozyme diversity in plant species. In: *Plant population genetics, Breeding and genetic resources* (eds. Brown, A.H.D, Clegg, M.T.,Kahler, A.L., Weir, B.S.), pp. 43-63. Sinaeur Associates Inc., Sunderland, MA.

**Hamrick JL, Godt MJW.**1996. Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise JC, Hamrick JL. Eds. *Conservation genetics, case histories from nature*. New York: Chapman and Hall, 281-304.

**Holsinger KE, Lewis PO.** 2005. *Hickory: A package for analysis of population genetic data v.1.0.4*. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs, USA.

**Hoffmann AA, Hallas RJ, Dean JA, Schiffer M.** 2003. Low potential for climatic stress adaptation in a rainforest *Drosophila* species. *Science*, **301**: 100-102.

- Holsinger KE, Lewis PO, Dey DK.** 2002. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Molecular Ecology*, **11**: 1157–1164.
- Kala CP.** 2000. Status and conservation of rare and endangered medicinal plants in the Indian trans-Himalaya. *Biological Conservation*, **93**: 371-379.
- James EA, Ashburner GR.** 1997. Intraspecific variation in *Astelia australiana* (Liliaceae) and implications for the conservation of this Australian species. *Biological Conservation*, **82**: 253-261.
- Laurence WF, Cochrane MA, Bergen S, Fearnside PM, Delamonica P, Barber C, D'Angelo S, Fernandes T.** 2001. The future of the Brazilian Amazon. *Science*, **291**: 438-439.
- Loveless MD, Hamrick JL, Foster RB.** 1998. Population structure and mating system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. *Heredity*, **81**: 134-143.
- Loveless MD, Hamrick JL.** 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **15**: 65–95.
- Lowe AJ, Gillies ACM, Wilson J, Dawson IK.** 2000. Conservation genetics of bush mango from central/west Africa: implications from random amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular Ecology*, **9**: 831–841.
- Kumar S, Tamura K, Nei M.** 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, **5**:150-163.
- Mantel NA.** 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**: 209-220.

**Margis R, Felix D, Caldas JF, Salgueiro F, De Araujo DSD, Breyne P, Van Montagu M, De Oliveira D, Margis-Pinheiro M.** 2002. Genetic differentiation among three neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest. *Biodiversity and conservation*, **11**: 149-163.

**Milligan BG, Leebens-Mack J, Strand AE.** 1994. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Molecular Ecology*, **12**: 844–855.

**Mori SA.** 1989. *Eastern, Extra-Amazonian Brazil. Floristic inventory of tropical countries: the status of plant systematics, collections, and vegetation, plus recommendations for the future* (ed. D.G. Campbell and H.D. Hammond), pp. 545. New York Botanical Garden, Bronx, NY, USA.

**Myers N, Mittermeier CG, da Fonseca GAB e Kents J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**: 853-858.

**Nei M.** 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **70**: 3321-3323.

**Nei M.** 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**: 583-590.

**Nei M.** 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

**Nei M, Li W-H.** 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy Science of the USA*, **76**: 5269-5273.

**Nybom H, Bartish I.** 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **3/2**: 93–114.

**Oliveira-Filho, AT, Ratter JA.** 1995. A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edinburgh Journal of Botany* 52:141-194. Pio Correia M. 1969. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. IBDF, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro. IV.

**Pio Correia M.** 1969. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. IBDF, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro. IV.

**Rizzini CT.** 1963. Nota prévia sobre a divisão fitogeográfica do Brasil. *Revista Brasileira de Geografia*, **25**: 1–64.

**Rohlf FJ.** 2005. *NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. New York: Exeter, Software.

**Rossi AAB, Oliveira LO e Vieira MF.** 2005. Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, **28**: 285-294.

**Veloso HP.** 1947. As condições ecológicas da *Cephaelis ipecacuanha* Rich. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **45**: 361-372.

**Smith TB, Kark S, Schneider CJ, Wayne RK, Moritz C.** 2001. Biodiversity hotspots and beyond: the need for preserving environmental transitions. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**: 431.

**Spiegelhalter DJ, Best NG, Carlin BP, van der Linde A.** 2002. Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, **64**: 483–689.

**Ziekiewicz E, Rafalski A, Labuda D.** 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**: 176–183.

**White GM, Boshier DH, Powell H.** 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. *Molecular Ecology*, **8**: 1899-1909.

**Wolfe AD, Liston A.** 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ, eds. *Molecular systematics of plants. II. DNA sequencing*. Norwell: Kluwer Academic Publishers, p.43–86.

**WRIGHT S.** 1943. Isolation by distance. *Genetics*, **28**: 114-138.

**Yang W, Oliveira AC, Godwin I, Schertz K, Bennetzen JL.** 1996. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: Variability in chinese sorghums. *Crop Science*, **36**: 1669-1666.

**Yeh FC, Yang RC, Boyle T.** 1999. *POPGENE. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis*. Release 1.31. Edmonton: University of Alberta.

## CAPÍTULO III

---

### CYTOGENETIC CHARACTERIZATION AND NUCLEAR DNA CONTENT OF *Psychotria ipecacuanha*

#### SUMMARY

*Psychotria ipecacuanha*, ipecac, is a perennial, medicinal herb that grows in clusters in the understory of humid and shady areas of the Brazilian Atlantic and Amazon forests. Cytogenetic studies performed in this species have reported  $2n = 22$  chromosomes, with limited karyotypic information. The present study was conducted in order to apply cytogenetic and flow cytometric tools in samples of ten ipecac populations, five from the Atlantic and five from the Amazon forest, with the purpose of characterizing their karyotype and measuring their  $2C$  DNA content. The flow cytometry analyses evidenced two groups with distinct DNA amounts: MOZ population with  $2C = 1.24$  pg and GUA, TVI, TLM, VRB, RAP, MAN, RVE, BBU and PRA populations with  $2C = 2.05$  pg. Metaphasic chromosomes obtained from root apical meristems of GUA, TLM and TVI showed a karyotype consisting of 11 chromosome pairs, 4 metacentric (4, 5, 8 and 9) and 7 submetacentric (1, 2, 3, 6, 7, 10 and 11), with lengths varying from 3.97 to 2.53  $\mu\text{m}$ . The secondary constriction was identified in the long arm of chromosome 6. Cytogenetic characterization also revealed that the chromosomes 2 – 3; 4 – 5; 6 – 7; 8 – 9

and 10 – 11 are cytogenetically similar, with regard to total length, short and long arm size, and chromosomic class, suggesting that this species might be a tetraploid organism.

**Keywords** 2C DNA content, chromosome, cytogenetics, flow cytometry, ipecac, *Psychotria ipecacuanha*.

## INTRODUCTION

*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae), also known as ipecac, occurs naturally in three well-defined tropical geographic regions: 1 – Central America and northern parts of South America; 2 – Southwestern part of the Brazilian Amazon; and 3 – Atlantic Rain Forest along the Brazilian coast (Skorupa and Assis 1998, Assis and Giulietti 1999). Ipecac populations are generally very small and discontinuous, due to fragmentation of its habitat.

Ipecac is an important medicinal plant (Yoshimatsu *et al.* 1994), inasmuch as this species produces the alkaloids emetine and cephaeline (Shamma 1972, Bruneton 1995, Scharman *et al.* 2000), which have been used as expectorant for bronchitis, croup, asthma and whooping cough (Yoshimatsu *et al.* 1994). Due to these properties, this species has been intensely explored since the XVI century (Oliveira and Martins 1998), with the result that ipecac is considered an organism in extinction (Mendonça and Lins 2000).

On account of the medicinal importance of ipecac, most researches are dedicated to the pharmacological properties of this species, which raises gaps in others scientific areas, as taxonomy (Assis and Giulietti 1999). Nevertheless, Assis and Giulietti (1999) and Souza *et al.* (2006) obtained cytogenetic data in ipecac that contribute with taxonomy studies in this species. Apart from taxonomy, others authors have highlighted that cytogenetic information may also contribute with evolutionary (Galasso *et al.* 2001, Doyle *et al.* 2004) and plant breeding (Ohmido *et al.* 1998, Harper and

Cande 2000, Klein *et al.* 2000, Galasso *et al.* 2001, Stephens *et al.* 2004) researches.

Initially, Assis and Giulietti (1999), using meiotic cells, related that ipecac possesses  $2n = 22$ . The same chromosomic number was also mentioned by Rout *et al.* (2000), who used root tips obtained from somatic embryos. Souza *et al.* (2006) not only confirmed the chromosomic number in meiotic cells, but also reported that this species exhibited small, morphologically similar metacentric chromosomes.

In spite of these studies, neither work has characterized the ipecac mitotic chromosomes for the purpose of assembling its karyotype. In this context, the present study was conducted in order to apply cytogenetic techniques for obtaining good quality metaphasic cells, to classify the homologous sets of chromosomes, and to assemble the karyotype of ipecac. In addition, we used flow cytometry tools to measure the 2C DNA content in this species.

## MATERIALS AND METHODS

### *Plant material*

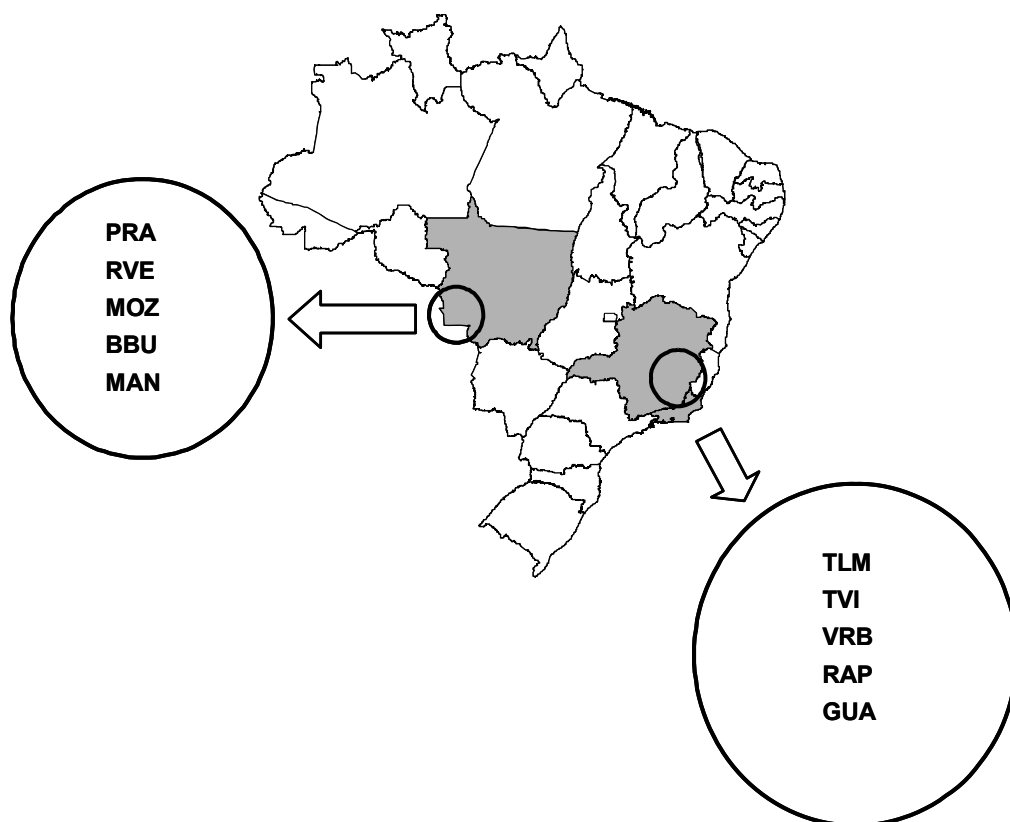
Samples of ten *P. ipecacuanha* populations were collected in the Atlantic and Amazon forest, being five of each area and three plants per population (Table 1 and fig. 1). All the plants were maintained in green house in hydroponic solution. The cytogenetic and flow cytometric analyses were carried out at the Laboratory of Cytogenetics and Cytometry, Department of General Biology, UFV.

**TABLE 1.** Description of the original localization of *Psychotria ipecacuanha* populations.

Populations	Latitude (S)	Longitude (W)
ATLANTIC FOREST		
Trilha da Lagoa do Meio (TLM)	19°38'34"	42°30'56"
Trilha do Vinhático (TVI)	19°45'44"	42°37'57"
Visconde do Rio Branco (VRB)	21°00'37"	42°50'26"
Raposo (RAP)	21°06'40"	42°05'43"
Guaraciaba (GUA)	20°34'14"	43°00'27"
AMAZON FOREST		
Prata (PRA)	15°30'26"	58°01'50"
Rio Vermelho (RVE)	15°17'38"	57°51'43"
Mozar (MOZ)	15°04'57"	57°58'00"
Barra do Bugres (BBU)	57°48'00"	14°71'00"
Manilha (MAN)	57°57'00"	14°98'00"

### *Flow cytometry*

Vigorous and young leaves were collected from all plants of *P. ipecacuanha* and from the internal standard, *Lycopersicon esculentum* (1.96 picogramas – pg). The internal standard was gently supplied by Dr. Jaroslav Doležel, Experimental Institute of Botany, Czech Republic.



**FIG. 1** – Map showing the locations of populations of *Psychotria ipecacuanha*. Population symbols are in accordance with Table 1.

The flow cytometry analyses were accomplished as described in the CyStain PI absolute P Partec<sup>®</sup> protocol, with few modifications. The leaves were placed in distilled water at 4 °C and cut into 2 cm<sup>2</sup> fragments. Nuclei suspension was obtained by chopping the leaves in 0.5 mL of Partec<sup>®</sup> extraction buffer. The suspension was filtered in nylon filter with 30 µm mesh diameter, after 2 min incubation. Subsequently, the nuclear suspension was stained with 1.5 mL Partec<sup>®</sup> staining solution, supplemented with 15 µM propidium iodide (PI) + 50 µM RNase, for 15 min in the dark, and analyzed with a Partec PAS<sup>®</sup> flow cytometer (Partec<sup>®</sup> GmbH, Munster, Germany), equipped with a Laser source and a series of filters (TK 420, TK 560 and RG 610). The equipment was calibrated and aligned using microbeads and

standard solutions, according to the manufacturer's recommendations (Partec®). FlowMax® software (Partec®) was used for data analyses. More than 10,000 nuclei were analyzed, and three independent replications and average values of the 2C DNA content are reported in pg.

The 2C DNA content of ipecac populations was measured by the peak corresponding to nuclei stained with PI in G0/G1 of internal standard and of the sample, with the internal standard peak calibrated to channel 100. The first ipecac population (MOZ) analyzed by flow cytometry was used as internal standard to measure the DNA amount of the others populations.

### ***Cytogenetic preparations***

Owing to unavailability of ipecac seeds, stakes of the ten samples of *P. ipecacuanha* populations were rooted in Hoagland solution (Hoagland and Arnon 1938). Roots showing 0.5 – 1.0 cm were treated with 2.0, 2.5 or 3.0 µM microtubule inhibiting amiprofos-methyl (Nihon Bayer Agrochem K. K.®) or oryzalin (Sigma®) solutions, for periods of 3, 4, 5, 6 h, at 30 °C, or 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 or 24 h, at 4 °C. They were subsequently washed with distilled water for 20 min, and then fixed in fresh methanol:acetic acid (Merck®) solution (3:1). The fixative was changed three times and the samples were stored at - 20 °C.

Ipecac roots were washed and macerated with an enzymatic solution of pectinase (Sigma®) and distilled water, in a ratio of 1:20, 1:30 or 1:40 (enzyme: distilled water), for 1h45min, 2h, 2h15min and 2h30min at 32 °C. Next, the roots were washed for 30 min in distilled water, fixed again and stored at – 20 °C.

The slides were prepared using the technique of cell dissociation of enzymatically macerated roots, and subsequently air-dried on a hot plate at 50 °C (Carvalho and Saraiva 1993, 1997). The slides were immediately stained with a 5% Giemsa solution (Merck®) in phosphate buffer (pH 6.8) for 5 min, washed twice in distilled water and air-dried.

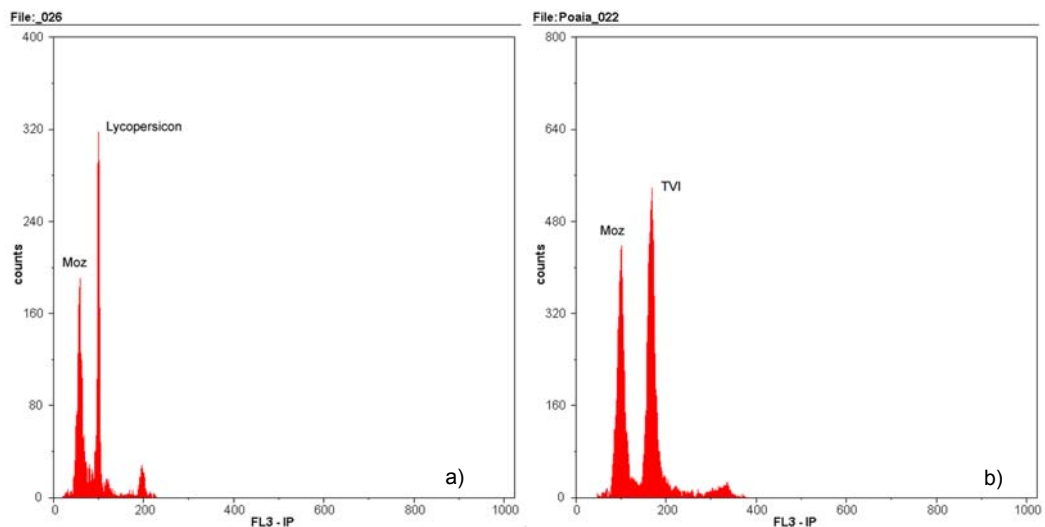
### ***Image analysis***

Images of the chromosomes were captured with a CoolSNAP-Pro *cf* (Roper Scientific) video camera of 12 bits, assembled on an Olympus™ BX-60 fluorescence microscope with a 100x objective lens and a WB filter. The frame was digitalized using an Image Pro®-Plus analysis system (Media Cybernetics). Image analysis was performed on a Power Macintosh G4® computer, using the freely available (<http://reg.ssci.liv.ac.uk>) Image SXM software (Barrett 2002). This is a spin-off of the public domain image analysis application NIH Image, developed by Rasband (1998).

The morphometry of the ipecac chromosomes was characterized following the arm length (in micrometers) criteria described by Levan *et al.* (1964) and revised by Guerra (1986), except of the chromosome with secondary constriction (SC), whose portion was discounted of total length.

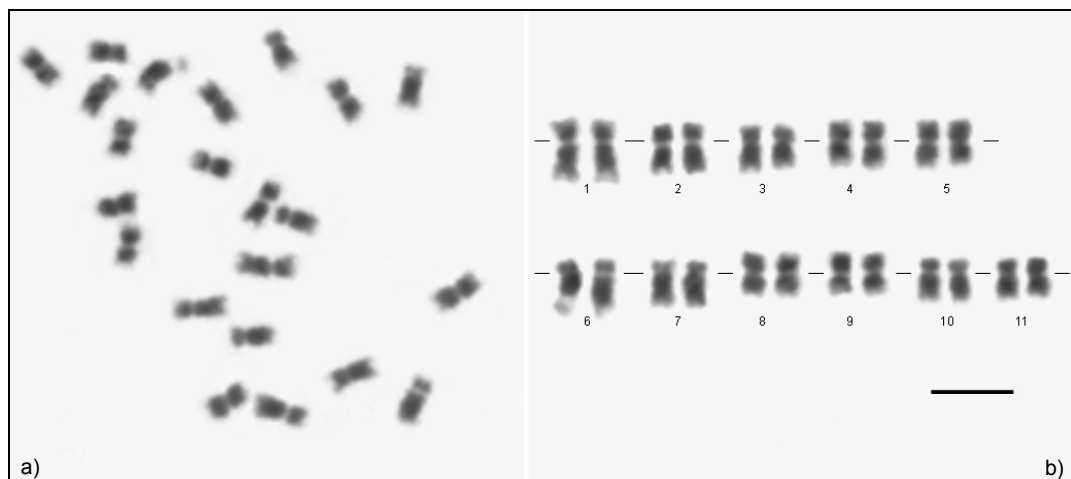
## RESULTS

Flow cytometry analyses of the nuclei suspension stained with PI generated histograms with peaks corresponding to the average of the G0/G1 relative nuclei DNA content of ipecac, and the comparative standard. The high quality of the nuclear suspensions, with intact nuclei isolated in sufficient quantity, allowed the obtention of histograms showing CVs inferior to 3% and, consequently, enough resolution to discriminate between the G0/G1 peaks of the internal standard and samples (Fig. 2 a – b) and to calculate the 2C DNA amount of all populations. The results evidenced that MOZ population possesses a nuclear DNA amount of 1.24 pg (Fig. 2a), whereas the other nine ipecac populations showed 2.05 pg (Fig. 2 b).



**FIG. 2.** Estimation of absolute genome size in *P. ipecacuanha*. DNA – histogram showing G0/G1 peaks resulting from simultaneous processing and analysis of nuclear suspensions of tissue from young and vigorous leaves, stained with PI. a) *L. esculentum* (internal standard 2C = 1.96 pg, channel 100) and MOZ ipecac population (2C = 1.24 pg). b) MOZ population (internal standard 2C = 1.24 pg, channel 100) and TVI population (2C = 2.05 pg), representing the other eight ipecac populations. Note that MOZ population possesses 0.81 pg less than the other populations.

Cytogenetically, it was possible to characterize the chromosomes and assemble the karyotype of 3 ipecac populations (GUA, TVI and TLM), because of difficult rooting of the stakes. Ipecac roots treated with 3.0  $\mu\text{M}$  oryzalin for 16 h at 4  $^{\circ}\text{C}$ , with enzymatic solution in a ratio of 1:40 for 2 h, whose meristems were cellular dissociated and air-dried provided excellent standard C-metaphases. These metaphases exhibited few overlapped chromosomes and well-defined primary and secondary constrictions, which facilitated the pairing of homologues and assembly of the first karyogram for this species (Fig. 3 a – b).



**FIG. 3.** Chromosomes obtained from root apical meristems of GUA, TLM and TVI *P. ipecacuanha* populations treated with 3  $\mu\text{M}$  oryzalin solution for 16 h at 4 $^{\circ}\text{C}$ . a) Dispersed metaphasic chromosomes, stained with Giemsa 5%, displayed well-defined centromeric and secondary constrictions. b) Karyogram of *P. ipecacuanha* showing 4 metacentric (4, 5, 8 and 9), 7 submetacentric (1, 2, 3, 6, 7, 10 and 11) chromosomes and emphasizing the secondary constriction in the long arm of the chromosome 6. The karyograms of the 3 populations not showed differences, therefore was demonstrated only TVI population karyogram. Note that the chromosomic pairs 2 – 3; 4 – 4; 6 – 7; 8 – 9 and 10 – 11 are cytogenetically similar (Table 2), suggesting that this species is tetraploid. Bar = 5  $\mu\text{m}$ .

The morphometric characterization of the chromosomes was carried out in 20 metaphases of GUA, TVI and TLM populations. The 11 ipecac chromosomes showed lengths varying from 3.97 to 2.53  $\mu\text{m}$  (Fig. 3 a, table 2). This species presents four metacentric (4, 5, 8 and 9) and seven submetacentric chromosomes (1, 2, 3, 6, 7, 10 and 11). The secondary constriction was located in the long arm of chromosome 6. No karyotype difference was observed among the three ipecac populations.

**TABLE 2.** Cytogenetic morphometry and classification of the *P. ipecacuanha* chromosomes ( $2n = 22$ ).

Chrom	Fl	Arm		r	Cc*	RI
		short	long			
1	3.97	1.32	2.65	2.01	SM	12.71
2	3.09	1.18	1.91	1.62	SM	9.88
3	2.96	1.17	1.79	1.53	SM	9.48
4	2.79	1.47	1.32	0.90	M	8.94
5	2.72	1.45	1.27	0.88	M	8.72
6	2.67	0.88	1.79	2.03	SM	8.53
7	2.64	0.74	1.90	2.57	SM	8.45
8	2.64	1.32	1.32	1.00	M	8.44
9	2.63	1.18	1.45	1.23	M	8.42
10	2.60	0.88	1.72	1.96	SM	8.33
11	2.53	1.01	1.52	1.50	SM	8.10

\*SM = submetacentric. M = metacentric. Chrom: chromosome. Fl: full length ( $\mu\text{m}$ ). r: ratio between arms. Cc: chromosome class. RI: relative length (%).

## DISCUSSION

### *Flow cytometry*

As a result of the high quality nuclei suspensions, the flow cytometry histograms presented CVs inferior to 3%. Brown *et al.* (1991) and Doležel (1997) related that in order to distinguish the peaks among plants simultaneously analyzed by flow cytometry, the CV should be smaller than half of the difference between these plants, being that CVs below 3% are considered appropriate for measurement by this technique. Additionally, the PI fluorochrome, added to the Partec® staining solution, collaborated with the obtention of CVs below 3%. Doležel *et al.* (1992, 1998) and Doležel and Bartoš (2005) highlighted that PI, as well as ethidium bromide, is recommended for absolute DNA measurements.

Given that the DNA content of MOZ was the first to be measured, with 1.24 pg (Fig. 2 a), this plant was used as internal standard in the flow cytometry measurement of each one of the nine populations (Fig. 2 b), seeing that Doležel and Bartoš (2005) mentioned that the flow cytometry estimative is more accurate when the chromatin structure of the standard and the sampled nuclei is similar and converts in a common way to compounds that interfere with the accessibility of fluorochromes to the DNA. Besides, the utilization of MOZ population as internal standard was also important because the existence of two groups was evidenced in all analyses, with varied DNA amounts: MOZ, 2C = 1.24 pg, and others nine populations, 2C = 2.05 pg (Fig. 2 b).

The difference in 2C DNA content showed by MOZ population, compared to the other populations, can be correlated with the ploidy level and/or lengths of the chromosomes. Nevertheless, Greilhuber (1998) and Murray (2005) reported that the intraspecific variability in genome size is an important phenomenon during plant speciation, and can precede phenotypic differences.

Distinct authors also evidenced intraspecific differences in 2C DNA content in soybean (Graham *et al.* 1994, Rayburn *et al.* 1997), sunflower (Michaelson *et al.* 1991), pea (Arumuganathan and Earle 1991) and maize (Rayburn *et al.* 1989). In some cases, these results were correlated with environmental gradients or development conditions (Doležel and Bartoš 2005, Knight *et al.* 2005). Šmarda (2006) detected, by flow cytometry, intraspecific and intrapopulational variability in *Festuca pallens*, and related that two geographically distant populations differed 1.092-fold in DNA content. In this research, a difference of 1.650-fold was detected.

### **Cytogenetics**

The standardization of the cytogenetic protocol was a fundamental step for supplying metaphasic chromosomes and enabling the assembly of the first karyogram of ipecac. Microtubule inhibiting agent oryzalin was efficient in the accumulation of metaphases in sufficient number for accomplishment of the morphometric analyses. Enzymatic maceration in solution with the proportion of 1:40 for 2 h was effective in cell wall elimination without damage in the chromatin structure, so avoiding inadequate Giemsa staining (Fig. 3 a – b).

Moreover, cell dissociation of macerated ipecac root meristems, in association with air-dried slide preparations, was suitable for providing chromosomes well-spread in the same focus plane, without cytoplasmic background, overlaps or structural deformations, which facilitated the observation of primary and secondary constrictions. Identical results were obtained in *Zea mays* (Carvalho and Saraiva 1993, 1997), *Capsicum annuum* (Almeida and Carvalho 2004), *Aniba rosaeodora* (Contim *et al.* 2005), *Coffea canephora* (Clarindo and Carvalho 2006) and *Bixa orellana* (Almeida *et al.* 2006). We considered these methodologies to be fundamental, as they supply more adequate chromosomic preparations in comparison with those yielded by the squashing technique (Carvalho and Saraiva 1993), usually applied in cytogenetic studies of ipecac (Assis and Giulietti 1999, Rout *et al.* 2000, and Souza *et al.* 2006).

In accordance with Ohmido *et al.* (1998), Guzzo *et al.* (2000), Bauchan *et al.* (2001) and Clarindo and Carvalho (2006), the digital image analysis tools also contributed for providing high quality images of metaphasic cells and for discriminating subtle measurement differences in chromosomes.

As a consequence of the difficult rooting of the ipecac stakes, in this study, the karyogram of this species was assembled according to morphometric information obtained from metaphasic chromosomes of GUA, TVI and TLM populations (Fig. 3 b), since the three populations did not show karyotypic differences. The determination of the number of mitotic chromosomes was also accomplished by Rout *et al.* (2000); however, this author used root apical meristem of somatic embryos. Alternatively, the ipecac cytogenetic works of Assis and Giulietti (1999) and Souza *et al.*

(2006) were carried out in meiotic cells. These data evidence the difficulty in the characterization of the mitotic chromosomes of ipecac.

Ipecac possesses  $2n = 22$  chromosomes (Fig. 3 a – b, table 2), the same result mentioned by Assis and Giulietti (1999), Rout *et al.* (2000) and Souza *et al.* (2006). In contrast to previous researches (Assis and Giulietti 1999, Rout *et al.* 2000, Souza *et al.* 2006), the methodologies used in the present study allowed verifying the occurrence of four metacentric (4, 5, 8 and 9) and seven submetacentric (1, 2, 3, 6, 7, 10 and 11) chromosomes. Additionally, the secondary constriction was identified in chromosome 6.

Different from the results related in this study, Souza *et al.* (2006), applying the squash technique in anther, reported that this species possesses small metacentric chromosomes with similar morphology, and did not identify the chromosome with secondary constriction.

In addition, the morphometric data of ipecac suggest that this species is a tetraploid plant (Fig. 3 b), in that the chromosomal pairs 2 – 3, 4 – 5, 6 – 7, 8 – 9 and 10 – 11 are cytogenetically similar with regard to total length, short and long arm size, and chromosomal class (Table 2). This observation allows the suggestion that the chromosomal complement of this species is smaller than  $x = 11$ . The process of polyploidization is a common and important phenomenon in genome evolution of plants (Soltis *et al.* 2003, Madlung *et al.* 2005). However, this event involves changes in genome structure (Wolfe 2001, Madlung *et al.* 2005) and gene expression (Otto e Whitton 2000).

In this study, the cytogenetic methodology permitted the obtention of high quality metaphasic chromosomes and, consequently, an accurate

description of the karyotype of *Psychotria ipecacuanha*. Morphometric data also allowed proposing the hypothesis that this species may be a tetraploid organism. Moreover, flow cytometry analyses detected the occurrence of populations with DNA content of 1.24 pg (MOZ population) and 2.05 pg (the other populations).

## REFERENCES

- Almeida PM, Carvalho CR.** 2004. NOR-associated heterochromatin of pepper chromosomes stained with acridine orange. *Caryologia*, **2**: 177-181.
- Almeida PM, Carvalho CR Clarindo WR.** 2006. Classical and molecular cytogenetics tools to resolve the *Bixa* karyotypes. *Cytologia*, **71**: (in press).
- Arumuganathan K, Earle ED.**1991. Estimation of nuclear DNA content of plant by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter*, **9**: 229-241.
- Assis MC, Giulietti AM.** 1999. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de “ipecacuanha” - *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, **22**: 205-216.
- Bauchan GR, Hossain MA.** 2001. A computerized image analysis system to characterize small plant chromosomes. *Microscopy and Analysis*, **48**: 5-7.
- Barret SD.** 2002. Software for scanning microscopy. *Proceedings of the Royal Microscopy Society*, **37**: 7-14.
- Brown SC, Devaux P, Marie D, Bergounioux C, Petit P.** 1991. Analyse de la ploidie par cytométrie en flux. *Cahier*, **105**: 1-16.
- Bruneton J.** 1995. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Lavoisier, Paris.
- Carvalho CR, Saraiva LS.** 1993. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. *Heredity*, **70**: 515-519.
- Carvalho CR, Saraiva LS.** 1997. High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. *Journal of Plant Reserch*, **110**: 417-420.

**Clarindo WR, Carvalho CR.** 2006. A high quality chromosome preparation from cell suspension aggregates culture of *Coffea canephora*. *Cytologia*, **71**: 243-249.

**Contim LAS, Carvalho CR, Martins FA, Freitas DV.** 2005. Nuclear DNA content and karyotype of Rosewood (*Aniba rosaeodora*). *Genetics and Molecular Biology*, **28**: 754-757.

**Doležel J.** 1997. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*, **38**: 285-302.

**Doležel J, Bartoš J.** 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, **95**: 99-110.

**Doležel J, Greilhuber J, Lucretti S, Meister A, Lysák MA., Nardi L, Obermayer R.** 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, **82**: 17-26.

**Doležel J, Sgorbati S, Lucretti S.** 1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, **85**: 625-631.

**Doyle JJ, Doyle JL, Rauscher JT, Brown AHD.** 2004. Evolution of the perennial soybean polyploidy complex (*Glycine* subgenus *Glycine*): a study of contrasts. *Biological Journal of the Linnean Society*, **82**: 583-897.

**Galasso I, Schmidt T, Pignone D.** 2001. Identification of *Lens culinaris* ssp. *culinaris* chromosomes by physical mapping of repetitive DNA sequences. *Chromosome Research*, **9**: 199-209.

**Graham MJ, Nickell CD, Rayburn AL.** 1994. Relationship between genome size and maturity group in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, **88**: 429-432.

**Greilhuber J.** 1998. Intraspecific variation in genome size: a critical reassessment. *Annals of Botany*, **82**: 27-35.

- Guerra MS.** 1986. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética*, **9**: 741-743.
- Guzzo F, Campagnari E, Levi M.** 2000. A new FISH protocol with increased sensitivity for physical mapping with short probes in plants. *Journal of Experimental Botany*, **51**: 965-970.
- Harper LC, Cande WZ.** 2000. Mapping a new frontier; development of integrated cytogenetics maps in plant. *Functional Integrated, Genomics*, **1**: 89-98.
- Hoagland DR, Arnon DI.** 1938. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experimental Station. *Circular n.347*.
- Klein PE, Klein RR, Cartinhour SW, Ulanich PE, Dong J, Obert JA, Morishige DT, Schlueter SD, Childs KL, Ale M, Mullet JE.** 2000. A high-throughput AFLP-based method for constructing genetic and physical maps: progress toward a sorghum genome map. *Genome Research*, **10**: 789-807.
- Knight CA, Molinari NA, Petrov DA.** 2005. The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype. *Annals of Botany*, **95**: 177-190
- Levan A, Fredga A, Sanderberg AA.** 1964. Nomenclature for centromeric position in chromosome. *Hereditas*, **52**: 201-220.
- Madlung A, Tyagi AP, Watson B, Jiang H, Kagochi T, Doerge RW, Martienssen R, Comai L.** 2005. Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids. *The Plant Journal*, **41**: 221-230.
- Mendonça, MP, Lins LV.** 2000. *Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, Fundação Zôo-Botânica de Belo Horizonte.
- Michaelson MJ, Price HJ, Johnston JS, Ellison JR.** 1991. Variation of nuclear DNA content in *Helianthus annuus* (asteraceae). *American Journal Botany*, **78**: 1238-1243.

**Murray BG.** 2005. When does intraspecific C-value variation become taxonomically significant? *Annals of Botany*, **95**: 119-125.

**Ohmido N, Akiyama Y, Fukui K.** 1998. Physical mapping of unique nucleotide sequences in identified rice chromosomes. *Plant Molecular Biology*, **38**: 1043-1052.

**Oliveira LO, Martins ER.** 1998. *O desafio das plantas medicinais brasileiras: I- O caso da poaia (Cephaelis ipecacuanha)*. Campos de Goytacazes, RJ: UENF.

**Otto S, Whitton J.** 2000. Polyploid incidence e evolution. *Annual Review of Genetics*, **34**: 401-437.

**Rasband W.** 1998. *NIH Image is a public domain program developed at the U.S. National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nib-image/>.*

**Rayburn AL, Auger JA, Benzinger ES, Hepburn AG.** 1989. Detection of intraspecific DNA content variation in *Zea mays* L. by flow cytometry. *Journal of Experimental Botany*, **40**: 1179-1183.

**Rayburn AL, Biradar DP, Bullock DG, Nelson RL, Gourmet C, Wetzel JB.** 1997. Nuclear DNA content diversity in Chinese soybean introductions. *Annals of Botany*, **80**: 321-325.

**Rout GR, Samantaray S, Das P.** 2000. In vitro somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Scientia Horticulturae*, **86**: 71-79.

**Scharman EJ, Hutzler JM, Rosencrance JG, Tracy TS.** 2000. Single dose pharmacokinetics of syrup of ipecac. *Therapeutic Drug Monitoring*, **49**: 566-573.

**Shamma M.** 1972. *The isoquinoline alkaloids: Chemistry and pharmacology*. Academic Press, New York.

**Skorupa LA; Assis MC.** 1998. Collecting and conserving ipecac (*Psychotria ipecacuanha*, Rubiaceae) germplasm in Brazil. *Economic Botany*, **52**: 209-210.

**Șmarda P.** 2006. DNA ploidy levels and intraspecific DNA content variability in *Romanian fescues* (*Festuca* L., Poaceae) measured in fresh and herbarium material. *Folia Geobotanica*, **41**: 417-432.

**Soltis DE, Soltis PS, Tate JA.** 2003. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist*, **161**: 173-191.

**Souza MM, Martins ER, Pereira TNS, Oliveira LO.** 2006. Reproductive studies on ipecac (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich; Rubiaceae): meiotic behavior and pollen viability. *Brazilian Journal of Biology*, **66**: 151-159.

**Stephens JL, Brown SE, Lapitan NLV, Knudson DL.** 2004. Physical mapping of barley genes using an ultrasensitive fluorescence in situ hybridization technique. *Genome*, **47**: 179-189.

**Wolfe KH.** 2001. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews Genetics*, **2**: 333-341.

**Yoshimatsu K, Aor K, Schimomura K.** 1994. Clonal propagation of *Cephaelis ipacacuanha* (II): characteristics of regenerated plants field-cultivated in two districts. *Journal of Plant Physiology*, **144**: 22-25.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados no primeiro capítulo sugerem que:

- A diversidade de haplótipos é maior para as populações da Floresta Atlântica (onde foram identificados 11 dos 12 haplótipos), enquanto que para as populações da Floresta Amazônica a diversidade de haplótipos é baixa (apenas um haplótipo foi observado);
- As duas florestas não compartilham haplótipos, apresentando, portanto monofilia recíproca para os haplótipos de cpDNA;
- A espécie foi claramente separada em dois grupos de acordo com suas duas regiões de ocorrência no Brasil. Um grupo constituído exclusivamente pelas populações da Floresta Atlântica e o outro constituído exclusivamente pelas populações da Floresta Amazônica;
- A não ocorrência de fluxo gênico entre as duas florestas é sugerida pela revelação de haplótipos privativos para cada floresta e pela quantidade de mutação que os separam com ausência de haplótipos intermediários;
- A Floresta Atlântica é atualmente o centro de diversidade genética para *Psychotria ipecacuanha*. Portanto, proteger este reservatório de diversidade genética é de grande importância para conservação da espécie;

- A estrutura genética de *Psychotria ipecacuanha* na Floresta Amazônica foi devido ao evento de colonização recente por poucos indivíduos, o que ocasionou uma uniformidade genética nesta região.

O segundo capítulo nos permite inferir que:

- Os marcadores ISSR revelaram maior diversidade genética nas populações da Floresta Atlântica e menor diversidade nas populações da Floresta Amazônica;
- A maior variação genética encontra-se dentro de populações do que entre populações de *Psychotria ipecacuanha* tanto na Floresta Atlântica quanto na Floresta Amazônica;
- Apesar da atual fragmentação e da redução das populações de *Psychotria ipecacuanha*, por meio dos marcadores ISSR foi possível ainda detectarem uma relevante diversidade genética nas populações naturais desta espécie;
- Na Floresta Atlântica as populações de TLM e TVI, que já se encontram em áreas de preservação, podem ser mantidas como fonte da variabilidade genética da espécie;
- Na Floresta Amazônica, as populações de PRA e RVE que apresentaram relativamente os maiores índices de diversidade genética entre as populações, podem ser consideradas como prioridades para ações de conservação *in situ*;

- Apesar da diversidade genética da Floresta Atlântica ser maior do que a diversidade da Floresta Amazônica, a conservação *ex situ* de *Psychotria ipecacuanha*, requer amostragem das duas florestas, devido ao acúmulo de diferenças genéticas particulares a cada área;
- Os níveis de polimorfismo genético mantidos nesta espécie nas duas florestas analisadas asseguram as práticas de conservação, apesar do tamanho limitado de muitas populações.

O terceiro capítulo permite inferir que:

- *Psychotria ipecacuanha* possui  $2n = 22$  cromossomos;
- Seu cariótipo apresenta 4 cromossomos metacêntricos e 7 submetacêntricos;
- Possui uma constrição secundária no braço longo do cromossomo número 6;
- A poliploidização é um processo que pode estar ocorrendo nas populações naturais de *Psychotria ipecacuanha*;
- A espécie apresenta dois grupos de populações com relação ao conteúdo absoluto de DNA, um grupo representado por MOZ com  $2C = 1,24$  pg e o outro grupo constituído pelas demais populações com  $2C = 2,05$  pg.

**ANEXOS**

## **Inference Key for the Nested Haplotype Tree Analysis of Geographical Distances (Templeton, 2004)**

Start with haplotypes nested within a 1-step clade and work up to clades nested within the total tree. If the tree is not rooted through an outgroup or if none of the clades nested at the total tree level have the sum of the outgroup probabilities of their haplotypes greater than or equal to 0.95, regard all clades nested at the total tree level as tips. When rooting is deemed reliable, interiors should also refer to the older clades in a nesting category, and tips to their evolutionary descendants.

This key is applied only if there are some significant values for  $D_c$ ,  $D_n$ , or I-T within the nesting clade. If there are no statistically significant distances within the clade, the null hypothesis of no geographical association of haplotypes cannot be rejected (either panmixia in sexual populations, extensive dispersal in non-sexual populations, small sample size, or inadequate geographical sampling). In that case, move on to another clade at the same or higher level.

1. Are all clades within the nesting clade found in separate areas with no overlap?
  - NO – Go to step 2.
  - YES - Go to step 19.
2. Is at least one of the following conditions satisfied?
  - a. The  $D_c$ 's for one or more tips are significantly small and the  $D_c$ 's for one or more of the interiors are significantly large or non-significant.
  - b. The  $D_c$ 's for one or more tips are significantly small or non-significant and the  $D_c$ 's for some but *not* all of the interiors are significantly small.
  - c. The  $D_c$ 's for one or more interiors are significantly large and the  $D_c$ 's for the tips are either significantly small or non-significant
  - d. The I-T  $D_c$  is significantly large.
  - NO - Go to step 11.
  - YES - Go to step 3.
  - Tip/Interior Status Cannot be Determined - **Inconclusive Outcome.**
3. Is at least one of the following conditions satisfied?
  - a. Some  $D_n$  and/or I-T  $D_n$  values are significantly reversed from the  $D_c$  values.
  - b. One or more tip clades show significantly large  $D_n$ 's.
  - c. One or more interior clades show significantly small  $D_n$ 's.
  - d. I-T has a significantly small  $D_n$  with the corresponding  $D_c$  value non-significant.
  - NO - Go to step 4.

- YES - Go to step 5.
4. Are both of the following conditions satisfied?
- a. The clades (or 2 or more subsets of them) with significantly small  $D_c$  or  $D_n$  values have ranges that are completely or mostly non-overlapping with the other clades in the nested group (particularly interiors).
  - b. The pattern of completely or mostly non-overlapping ranges in the above condition represents a break or reversal from lower level trends within the nested clade series (applicable to higher-level clades only).
- **NO - Restricted Gene Flow with Isolation by Distance (Restricted Dispersal by Distance in Non-sexual species).** This inference is strengthened if the clades with restricted distributions are found in diverse locations, if the union of their ranges roughly corresponds to the range of one or more clades (usually interiors) within the same nested group (applicable only to nesting clades with many clade members or to the highest level clades regardless of number), and if the  $D_c$  values increase and become more geographically widespread with increasing clade level within a nested series (applicable to lower level clades only).
  - YES - Go to step 9.
5. Are both of the following conditions satisfied?
- a. The clades (or 2 or more subsets of them) with significantly small  $D_c$  values have ranges that are completely or mostly non-overlapping with the other clades in the nested group (particularly interiors).
  - b. The pattern of completely or mostly non-overlapping ranges in the above condition represents a break or reversal from lower level trends within the nested clade series (applicable to higher-level clades only).
- NO - Go to step 6.
  - YES - Go to step 15.
6. Do clades (or haplotypes within them) with significant reversals or significant  $D_n$  values without significant  $D_c$  values define two or more geographically concordant subsets.
- No - Go to step 7.
  - YES - Go to step 13.
  - **TOO FEW CLADES (< 2) TO DETERMINE CONCORDANCE – Insufficient Genetic Resolution to Discriminate between Range Expansion/Colonization and Restricted Dispersal/Gene Flow -** Proceed to step 7 to determine if the geographical sampling is sufficient to discriminate between short versus long distance movement.
7. Are the clades with significantly large  $D_n$ 's (or tip clades in general when  $D_n$  for I-T is significantly small) separated from the other clades by intermediate geographical areas that were sampled?
- NO - Go to step 8.
  - YES - **Restricted Gene Flow/Dispersal but with some Long Distance Dispersal.**

8. Is the species absent in the non-sampled areas?
- NO - **Sampling Design Inadequate to Discriminate between Isolation by Distance (Short Distance Movements) versus Long Distance Dispersal**
  - YES - **Restricted Gene Flow/Dispersal but with some Long Distance Dispersal over Intermediate Areas not Occupied by the Species; or Past Gene flow Followed by Extinction of Intermediate Populations.**
9. Are the different geographical clade ranges identified in step 4 separated by areas that have not been sampled?
- NO - **Allopatric Fragmentation.** (If inferred at a high clade level, additional confirmation occurs if the clades displaying restricted by at least partially nonoverlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps.)
  - YES - Go to step 10.
10. Is the species absent in the non-sampled areas?
- NO - **Geographical Sampling Scheme Inadequate to Discriminate Between Fragmentation and Isolation By Distance.**
  - YES - **Allopatric Fragmentation.** (If inferred at a high clade level, additional confirmation occurs if the clades displaying restricted by at least partially nonoverlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps.)
11. Is at least one of the following conditions satisfied?
- a. The  $D_c$  value(s) for some tip clade(s) is/are significantly large.
  - b. The  $D_c$  value(s) for all interior(s) is/are significantly small.
  - c. The I-T  $D_c$  is significantly small.
- NO - Go to step 17
  - YES - **Range Expansion**, go to step 12.
12. Are the  $D_n$  and/or I-T  $D_n$  values significantly reversed from the  $D_c$  values?
- NO - **Contiguous Range Expansion.**
  - YES - Go to step 13.
13. Are the clades with significantly large  $D_n$ 's (or tip clades in general when  $D_n$  for I-T is significantly small) separated from the geographical center of the other clades by intermediate geographical areas that were sampled?
- NO - Go to step 14.
  - YES - **Long Distance Colonization Possibly Coupled with Subsequent Fragmentation** (subsequent fragmentation is indicated if the clades displaying restricted but at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps) **or Past Fragmentation Followed by Range Expansion.** To see if secondary contact is involved, perform the supplementary tests given in Templeton, *Molecular Ecology* **10**: 779-791, 2001. To discriminate the type of movement leading to this pattern, go to step 21.

14. Is the species present in the intermediate geographical areas that were not sampled?

- YES - **Sampling Design Inadequate to Discriminate between Contiguous Range Expansion, Long Distance Colonization, and Past Fragmentation.**
- NO - **Long Distance Colonization and/or Past Fragmentation** (not necessarily mutually exclusive). If inferred at a high clade level, fragmentation rather than colonization is inferred if the clades displaying restricted but at least partially nonoverlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps. If the branch lengths are short, a colonization event is inferred, perhaps associated with recent fragmentation. To discriminate the type of movement leading to this pattern, go to step 21.

15. Are the different geographical clade ranges identified in step 5 separated by areas that have not been sampled?

- NO - **Past Fragmentation and/or Long Distance Colonization** (not necessarily mutually exclusive). If inferred at a high clade level, fragmentation rather than colonization is inferred if the clades displaying restricted but at least partially nonoverlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps. If the branch lengths are short, a colonization event is inferred, perhaps associated with recent fragmentation. To discriminate the type of movement leading to this pattern, go to step 21.
- YES - Go to step 16.

16. Is the species present in the intermediate geographical areas that were not sampled?

- YES - Go to step 18.
- NO - **Allopatric Fragmentation.** If inferred at a high clade level, additional confirmation occurs if the clades displaying restricted by at least partially nonoverlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps.

17. Are either of the following conditions satisfied?

- a. The  $D_n$  values for tip or some (but not all) interior clades are significantly small.
  - b. The  $D_n$  for one or more interior clades is/are significantly large.
  - c. The I-T  $D_n$  value is significantly large.
- NO - **Inconclusive Outcome.**
  - YES - Go to step 4.

18. Are the clades found in the different geographical locations separated by a branch length with a larger than average number of mutational steps.

- NO - **Geographical Sampling Scheme Inadequate to Discriminate Between Fragmentation, Range Expansion, and Isolation By Distance.**

- YES - **Geographical Sampling Scheme Inadequate to Discriminate Between Fragmentation and Isolation By Distance.**
19. Is the species present in the areas between the separated clades?
- NO – **Allopatric Fragmentation.** If inferred at a high clade level, additional confirmation occurs if the clades displaying restricted by at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps.
  - YES - Go to step 20.
20. Was the species sampled in the areas between the separated clades?
- NO – **Inadequate Geographical Sampling.**
  - YES – Go to step 2.
21. Are all of the following true?
- a. Is it biologically realistic that the organism could have undergone long-distance movement?
  - b. Are the nested haplotypes that mark a potential long-distance colonization event within a clade that shows evidence of population growth by other methods (such as mismatch distributions)?
  - c. At the level of the entire cladogram, does the clade *not* inferred to have produced long-distance colonization *not* show evidence of past population growth with other methods?
- YES – **Long-distance movement.**
  - NO – Insufficient evidence to discriminate between long-distance movements of the organism and the combined effects of gradual movement during a past range expansion and fragmentation. If the case against long-distance movement is compelling, then the inference is **past gradual range expansion followed by fragmentation.**