

JACQUELINE SIQUEIRA GLASENAPP

**VARIAÇÃO ALOENZIMÁTICA E ESTRUTURA GENÉTICA
POPULACIONAL DE *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE
(LEGUMINOSAE)**

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
2011

JACQUELINE SIQUEIRA GLASENAPP

**VARIAÇÃO ALOENZIMÁTICA E ESTRUTURA GENÉTICA
POPULACIONAL DE *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE
(LEGUMINOSAE)**

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: 22 de fevereiro de 2011.

Prof. Cosme Damião Cruz
(Coorientador)

Prof. Ernane Ronie Martins
(Coorientador)

Prof^a. Lourdes Silva de Figueiredo

Prof. Valterley Soares Rocha

Prof. Vicente Wagner Dias Casali
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Bolsa de Doutorado e apoio financeiro;

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPEMIG), pela Bolsa de Iniciação Científica e apoio financeiro;

Ao prof. Vicente Wagner Dias Casali pela orientação, amizade e compreensão;

Aos coorientadores Cosme Damião Cruz e Ernane Ronie Martins pelo auxílio e amizade;

Ao Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pelo apoio logístico e, especialmente às estudantes de agronomia Nathália de Sousa Pereira e Jordany Aparecida Esteves Rodrigues;

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), À Fazenda Água Limpa (FAL) da Universidade de Brasília (UnB), ao Instituto estadual de Florestas (IEF), especialmente aos diretores e funcionários das Unidades de Conservação.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Descrição da espécie.....	1
1.2 Uso medicinal.....	2
1.3 Ameaças à espécie.....	2
1.4 Estrutura genética populacional.....	3
1.5 Marcadores isoenzimáticos e estudos genéticos populacionais.....	4
1.6 Medidas de diversidade genética.....	5
2. Bibliografia.....	14
3. ARTIGO I: Isozyme variation in the natural population of <i>Stryphnodendron adstringens</i>	18
3.1 Abstract	29
3.2 Resumo	20
3.3 Introduction.....	21
3.4 Material and Methods.....	22
3.4.1 Sample collection.....	22
3.4.2 Isoenzyme extraction and electrophoresis.....	22
3.4.3 Genetic analysis.....	23
3.5 Results and discussion.....	26
3.5.1 Isozyme patterns between type of tissues.....	26
3.5.2 Polymorphic isozyme systems.....	26
3.5.2.1 Malate dehydrogenase.....	26
3.5.2.2 Phosphoglucose isomerase.....	28
3.5.2.3 Isocitrate dehydrogenase.....	29
3.5.2.4 Glutamate oxaloacetate transaminase.....	30
3.5.2.5 Esterase.....	30
3.5.2.6 Glucose-6-phosphate dehydrogenase.....	31
3.5.2.7 Alcohol dehydrogenase.....	32
3.5.2.8 Peroxidase.....	32
3.5.2.9 Glucose dehydrogenase.....	33
3.5.3 Monomorphic enzyme systems	34
3.5.4 Adjustment to the HWE proportions.....	35
3.6 Conclusion.....	37
3.7 Acknowledgements.....	38
3.8 References.....	38
4. ARTIGO II: Variabilidade aloenzimática e caracterização da diversidade genética de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (barbatimão) nas regiões sudeste e centro-oeste do Brasil.....	44
4.1 Resumo	45

4.2 Abstract	46
4.3 Introdução.....	47
4.4 Material e Métodos.....	48
4.4.1 Procedimentos e locais de amostragem.....	48
4.4.2 Extração aloenzimática e corrida eletroforética.....	50
4.4.3 Análise dos zimogramas.....	51
4.4.4 Análise estatística.....	52
4.5 Resultados e Discussão.....	52
4.5.1 Maturação dos frutos.....	52
4.5.2 Resolução dos padrões de bandas observados.....	53
4.5.3 Sistemas enzimáticos polimórficos.....	53
4.5.3.1 Esterase:	53
4.5.3.2 Malato desidrogenase.....	54
4.5.3.3 Fosfogluco isomerase.....	55
4.5.3.4 Álcool desidrogenase:	56
4.5.3.5 Xiquimato desidrogenase.....	56
4.5.3.6 Isocitrato desidrogenase.....	57
4.5.3.7 Glutamato oxaloacetato transaminase.....	58
4.5.4 Medidas de diversidade genética.....	59
4.5.5 Análise de agrupamento.....	62
4.6 Conclusões.....	64
4.7 Agradecimentos.....	65
4.8 Bibliografia.....	65
5. ARTIGO III: Comparação da variância genética quantitativa e da diversidade aloenzimática entre e dentro de populações de <i>Stryphnodendron adstringens</i> e descrição da variabilidade genética de <i>S. polyphyllum</i> e <i>S. rotundifolium</i>	70
5.1 Resumo	71
5.2 Abstract	73
5.3 Introdução.....	74
5.4 Material e Métodos.....	76
5.4.1 Procedimentos e locais de amostragem.....	76
5.4.2 Procedimentos de extração aloenzimática e eletroforese.....	78
5.4.3 Delineamento em blocos casualizados (DBC).....	79
5.4.4 Quantificação de fenóis totais.....	80
5.4.5 Análises estatísticas.....	81
5.5 Resultados e Discussão.....	84
5.5.1 Sistemas aloenzimáticos em <i>S. adstringens</i>	84
5.5.2 Sistemas aloenzimáticos observados nas espécies do gênero <i>Stryphnodendron</i>	85
5.5.3 Estimativas de diversidade genética.....	85
5.5.4 Análise de agrupamento.....	89
5.5.5 Variação genética quantitativa.....	90

5.6 Conclusões.....	92
5.7 Agradecimentos.....	94
5.8 Bibliografia.....	94
6. APÊNDICE: Entomofauna associada aos frutos de <i>S. adstringens</i>	102
6.1 Justificativa.....	102
6.2 Resultados e discussão.....	102
6.4 Conclusão.....	103
6.5 Agradecimentos.....	103

RESUMO

GLASENAPP, Jacqueline Siqueira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Variação aloenzimática e estrutura genética populacional de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (leguminosae).** Orientador: Vicente Wagner Dias Casali. Coorientadores: Cosme Damião Cruz e Ernane Ronie Martins.

O *S. adstringens* (barbatimão), árvore de pequeno porte, ocorre tipicamente no campo-cerrado e cerrado *stricto sensu*. É popularmente utilizado no tratamento de doenças como úlceras, inflamações, gastrite, dor de garganta, dentre outras. Em razão ao ainda incipiente conhecimento genético da espécie, este trabalho teve como objetivo caracterizar a variação genética em *S. adstringens* por meio da utilização de características moleculares e fenotípicas. Foram coletadas sementes em cinco mesorregiões brasileiras, sendo amostrados 627 indivíduos divididos em 16 populações localizadas nos Estados de Minas Gerais e Goiás. Os dados moleculares foram obtidos por eletroforese de isoenzimas em gel de amido. Foram testados 14 sistemas isoenzimáticos, e observados 10 locos polimórficos e 28 alelos. Os dados fenotípicos foram obtidos em delineamento em blocos casualizados, sendo realizadas cinco avaliações periódicas em cinco traços fenotípicos. A diversidade genética (H) na espécie foi 0,228, a proporção média de locos polimórficos (P) 68,75, o número médio de alelos por loco polimórfico (AP) foi 2,65 e, o número efetivo de alelos (A_e) igual a 1,29. O valor da medida de diferenciação genética G_{ST} indica que 92,3% da diversidade genética encontra-se dentro de populações e, 7,7% esta entre populações. Resultados do índice de fixação total ($F=0,003$), do índice de fixação dentro de populações ($f=-0,114$) e, da diferenciação genética entre ($\theta=0,105$) foram não significantes. Os valores genéticos entre populações diferiram significativamente, sendo a maior parte da variância genética entre médias famílias dentro de populações não significativa. As herdabilidades médias variaram entre 0,5488 e 0,9828 e, os valores Q_{ST} foram relativamente altos (0,5415 a 0,9761) quando comparados aos valores F_{ST} . A representatividade genética das amostras populacionais pôde ser considerada satisfatória, já que os tamanhos efetivos populacionais (N_e) estimados foram maiores que o número de indivíduos amostrados. Foram verificados valores superiores a um, em 94,3% das avaliações do número de migrantes por geração

(Nm) entre populações, mostrando que o fluxo gênico é suficiente para prevenir a diferenciação por deriva genética. Assim, pôde ser concluído que a diversidade genética de marcadores aloenzimáticos em *S. adstringens* é consideravelmente alta dentro de populações e baixa entre populações. O fluxo gênico parece suficiente para prevenir a diferenciação de marcadores neutros e, a seleção intensa o suficiente para superar o fluxo gênico e manter a diferenciação adaptativa no ambiente populacional. O estudo de características quantitativas pode fornecer informações complementares e ajudar a elucidar o padrão de variação genética entre e dentro de populações de *S. adstringens*. Como marcadores isoenzimáticos são seletivamente neutros, não refletem processos adaptativos. Na construção de bancos de germoplasma ou em programas de melhoramento e plantio, a escolha apropriada dos sítios de coleta pode ser tomada com base nas informações sobre o padrão de diferenciação genética e fenotípica.

ABSTRACT

GLASENAPP, Jacqueline Siqueira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february 2011. **Alloenzyme variation and population genetic structure of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (leguminosae).** Adviser: Vicente Wagner Dias Casali. Co-advisers: Cosme Damião Cruz e Ernane Ronie Martins.

The *S. adstringens* is a tree of Brazilian savanna. It has been used in traditional medicine to treat diseases such as ulcers, sores, gastritis and sore throat, among others. Because of the genetic unaware about that specie this work aims to characterizes the genetic variation on *S. adstringens* by means of molecular markers and phenotypic traits. Seeds of 627 individuals from 16 populations in five regions in two states of Brazil were collected. The molecular dates were acquired by means of the starch-gel electrophoresis technique. The total of 14 isozymes system was tested and ten loci and 28 alleles were observed. The phenotypic dates were acquired by means of the randomized common garden experiment. Five periodic evaluations on five phenotypic traits were made. The genetic diversity (H) was equal to 0.228, the percentage of polymorphic loci (P) was equal to 68.75, the mean number of alleles per polymorphic locus (AP) was equal to 2.65 and the effective number of alleles (A_e) was equal to 1.29. The coefficient of gene differentiation G_{ST} value indicates that 92.3 percent of genetic diversity is within of the population and 7.7 percent among populations. The results of the total index fixation ($F=0.003$), of the index fixation within populations ($f=-0.114$) and genetic differentiation among populations ($\theta=0.105$) were not significant. The results of the phenotypic traits among populations differ significantly, but the most of genetic variation within population was not significant. The heritabilities ranged from 0.5488 to 0.9828 and the Q_{ST} values were relatively highs (0.5415 to 0.9761) when compare with the results of F_{ST} . The genetic representation of population samples might be considered satisfactory because the estimates of effective population size (N_e) were greater than the number of the individual samples. In 94,3% percent of gene flow estimates from populations were observed values much greater than one, showing then the gene flow is enough to prevent the genetic drift differentiation. Therefore we can conclude that the genetic diversity of allozymic markers is quite high

within populations and low among populations. The gene flow is high enough for prevents the genetic divergence of allozymic markers among populations and the selection is strong enough to maintain the genetic divergence of adaptive traits among populations. The phenotypic traits study can provide complementary formations and help to elucidate the patterns of genetic variation within and among *S. adstringens* populations. The information about genetic and phenotypic differentiation for appropriate choose of sites of sampling may be used to collecting proceedings for germoplasma banks or improvement and planting programs.

1.INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Descrição da espécie

Stryphnodendron adstringens, conhecido popularmente como barbatimão, é classificado na divisão Angiospermae, classe Magnoliopsidae, ordem Fabales, família Leguminosae, sub-família Mimosoideae, gênero *Stryphnodendron*. Ocorre tipicamente no campo-cerrado e cerrado *stricto sensu*. É observado tanto em formações primárias como secundárias. Populações não perturbadas possuem grande potencial de regeneração. Tem nítida preferência por solos arenosos e de drenagem rápida. Sua distribuição abrange as seguintes Unidades da Federação: Pará, Tocantins, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e norte do Paraná (Felfili e Borges Filho 2004, Lorenzi 1992, Almeida *et al.* 1998, Pio Corrêa 1926).

A árvore tem altura entre 2 e 5 metros, caule e ramos tortuosos, casca rugosa, áspera e fissurada, folhas alternas, paripinadas, com 5 a 8 pares de pinas, folíolos alternos com 6 a 8 pares por pina, de forma arredondada a oval, flores com cerca de 6 mm de comprimento dispostas em inflorescências do tipo racimo de espiga, corola creme-esverdeada com pétalas livres. Ocorrem numerosos estames, pólen em políades, anteras com glândula apical que parece estar relacionada com o fraco odor da flor e, filetes com cerca do dobro do comprimento da corola. Ovário súpero, unilocular com muitos óvulos parietais (Felfili e Borges Filho 2004, Ortiz *et al.* 2003, Almeida *et al.* 1998, Lorenzi 1992, Pio Correa, 1926).

A espécie é perenifólia com intensa brotação e desenvolvimento de folhas novas no início do período chuvoso (outubro a abril). A floração coincide com o período seco (maio a setembro). A maturação dos frutos ocorre no final da estação seca (agosto/setembro), aumentando a probabilidade de germinação e crescimento de plântulas devido ao início da estação chuvosa (Felfili e Borges Filho 2004). Queimadas ocasionais afetam, de maneira acentuada, as atividades reprodutivas, especialmente a frutificação (Felfili *et al.* 1999).

1.2 *Uso medicinal*

O *S. adstringens* tem sido explorado tradicionalmente por suas propriedades medicinais e no aproveitamento de tanino. Os usos medicinais foram descobertos pelos povos indígenas que o denominaram *Iba timó*, significando “árvore que aperta”, ou seja, adstringente. A casca foi levada à Europa sob o nome de “casca brasileira adstringente” e estudada por Merrem em 1828 (Penna 1946).

Na medicina popular, é utilizado no tratamento de diversas doenças. A garrafada da casca do caule (macerada) combate úlceras, inflamações e hemorróidas (Barros, 1982). Em decocção a casca é anti-séptica sendo usada no tratamento da gastrite e dor de garganta (Hirschmann & Arias, 1990). A casca é, também, usada no combate de afecções escorbúticas, leucorréias, hérnias, diarreias, hemorragias, impigem e oftalmias (Almeida *et al.* 1998, Penna 1946).

A exata identidade dos princípios ativos de *S. adstringens* não é conhecida até o momento (Rebecca *et al.* 2003, Rebecca *et al.* 2002). Entretanto, os taninos têm sido apontados como prováveis responsáveis pelas propriedades medicinais, pois, exercem diversas atividades biológicas como anti-séptica, antimicrobiana, anti-hemorragica, antidiarréica, cicatrizante e antiinflamatória (Rebecca *et al.* 2003, Rebecca *et al.* 2002, Santos *et al.* 2002, Alves *et al.* 2000).

Em 1926, Pio Corrêa relatou que a casca do barbatimão pode conter até 50% de taninos, mas, geralmente, este valor não excede 28%. Segundo Rizzini & Mors (1976) e Panizza *et al.* (1988), a casca contém de 20 a 30% de matéria tanante. Teixeira *et al.* (1990) coletaram cascas de *S. adstringens* em 10 locais de MG e verificaram que o teor de taninos na casca variou de 10,5% a 27,4% entre as localidades. Ardisson *et al.* (2002) constataram 30,8% e 29,9% de polifenóis totais e taninos, respectivamente, em *S. adstringens*.

1.3 *Ameaças à espécie*

A necessidade de elaboração de políticas voltadas ao desenvolvimento de técnicas de manejo sustentado e programas de domesticação de *S. adstringens* já foi apontada em alguns trabalhos (Borges Filho e Felfili, 2003; Assunção e Felfili, 2004; Felfili e Borges Filho, 2004; Jacobson *et al.*, 2005).

A prática tradicional da extração da casca vem colocando a espécie sob ameaça de extinção. A coleta é desordenada sem nenhum critério de escolha do indivíduo quanto ao porte (Felfili, 2000; de Souza e Felfili, 2006). Em estudos de avaliação dos níveis de extrativismo da casca de *S. adstringens* no Distrito Federal, foram observados sinais de extrativismo desordenado em 41% dos indivíduos amostrados, independente do porte da planta (Borges Filho e Felfili, 2003). O Estado de Minas Gerais é o principal produtor nacional da casca de *S. adstringens* com pequena participação do Pará, Bahia e Goiás (Anuário Estatístico do Brasil - IBGE, 1992, 1993, 1994).

Em 1993, a produção nacional da casca foi 1.112 toneladas. Somente em Minas Gerais foram produzidas 1.008 toneladas, o que correspondeu a 90,65% da produção nacional (Anuário Estatístico do Brasil - IBGE, 1994). A produção vem decrescendo, em 2000 foram produzidas 12 toneladas o que correspondeu a 1,08% do que foi produzido em 1992 (Anuário Estatístico do Brasil - IBGE, 2002).

Associado ao problema do extrativismo indiscriminado de *S. adstringens* há, também, a perda de habitats naturais devido ao desmatamento. Como observado nos procedimentos de coleta deste trabalho os atuais fragmentos populacionais de *S. adstringens* são resultantes de extensas populações (contínuas) que anteriormente cobriam grande parte dos Estados de Minas Gerais e Goiás.

1.4 Estrutura genética populacional

De forma geral, a fragmentação populacional leva a estruturação genética no sentido que os fragmentos resultantes estão sujeitos a ação de diferentes regimes de interação entre forças evolutivas. Nos estudos da estrutura genética populacional, o padrão de distribuição dos genótipos, o grau de fixação gênica dentro de populações e a variância das frequências alélicas entre populações, são utilizados na inferência sobre a extensão das forças evolutivas atuantes.

Como os habitats naturais de *S. adstringens* estão sendo fragmentados pela intervenção humana, as populações que em algum tempo eram extensas e inter-conectadas tornaram-se desconectadas e localmente raras. Assim, a fragmentação torna crítica a migração (fluxo gênico) no restabelecimento e manutenção da diversidade genética de populações locais e, na contenção de efeitos como a depressão por endogamia. O fluxo

gênico é o principal componente da estrutura genética, pois determina a extensão na qual cada população local se comporta como unidade evolutiva independente. Se o fluxo gênico é consideravelmente alto entre populações locais, estas evoluem conjuntamente, se é baixo, cada população evolui quase independentemente (Slatkin, 1994).

1.5 *Marcadores isoenzimáticos e estudos genéticos populacionais*

Antes da década de 60, os estudos de diversidade genética vegetal envolviam essencialmente características quantitativas, normalmente controladas por muitos genes com influencia ambiental variada. A maioria das pesquisas era concentrada na coleta de sementes a partir de populações naturais e, posterior cultivo em casas de vegetação. Tais estudos são laboriosos assim como demorados, e as características examinadas frequentemente podem ser interpretadas em termos de adaptação ambiental. Como desvantagem os locos individuais não podem ser identificados e as medidas padrão de diversidade genética não podem ser estimadas.

Depois da década de 60, foram desenvolvidas técnicas bioquímicas e moleculares que permitiram a identificação de alelos e razoável número de locos. Atualmente muitas técnicas estão disponíveis, dentre as mais comuns destaca-se a eletroforese em gel de amido. A eletroforese permite identificar variação nos locos que codificam enzimas e, como são codominantes, os heterozigotos podem ser diretamente identificados permitindo estimativas de frequências alélicas (Berg & Hamrick 1997).

Estudos genéticos populacionais rotineiramente envolvem 10 a 30 locos aloenzimáticos por espécie de planta. Berg & Hamrick (1997) sugerem que a variabilidade genética populacional pode ser adequadamente estimada, avaliando-se 30 a 50 indivíduos e, 10 a 30 locos aloenzimáticos. A identificação de locos polimórficos é função do tamanho amostral populacional, e pequenas amostras podem subestimar o número de locos polimórficos. Os autores recomendam considerar como polimórfico qualquer loco que tenha pelo menos um alelo alternativo observado, desconsiderando sua frequência dentro da população ou espécie.

1.6 Medidas de diversidade genética

As frequências alélicas são o parâmetro genético básico, pois populações com diferentes frequências genotípicas podem ter frequências alélicas idênticas, além do mais, a evolução tem sido definida como a mudança nas frequências alélicas através do tempo (Mayr 1963). Nas populações em equilíbrio de Hardy & Weinberg há deficiência ou excesso de indivíduos heterozigotos, gerando correlações entre alelos. Estas correlações violam o pressuposto de independência entre eventos (amostragem binomial) e, podem ocorrer entre alelos dentro de indivíduos, dentro populações ou, entre populações.

A deficiência ou excesso de heterozigotos pode ser mensurado comparando-se a heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy & Weinberg (EHW) ($2pq$), denotada H_e , com a heterozigosidade observada H_o , que é a real proporção de heterozigotos na população. Se $H_e \neq H_o$, a população está em desequilíbrio de Hardy & Weinberg, o qual pode ser medido pelo índice de fixação f (Wright 1951):

$$f = \frac{H_e - H_o}{H_e} = 1 - \frac{H_o}{2pq} \quad \text{eq.1}$$

O índice de fixação f quantifica o desvio da heterozigosidade observada a partir da heterozigosidade esperada em determinada população. Quando há menos heterozigotos que o esperado, f é positivo indicando endogamia. O excesso de heterozigotos gera um valor f negativo.

Wright (1951) desenvolveu três estatísticas F (F_{ST} , F_{IT} , F_{IS}) que sumarizam a estrutura genética populacional e suas subpopulações. Estas estatísticas foram definidas para um loco com dois alelos em termos de correlações entre os gametas se unindo no zigoto. As estatísticas F são fundamentalmente medidas de fixação alélica em níveis de organização como indivíduos, subpopulações e populações (Berg & Hamrick 1997). A estatística F_{ST} mede a deriva genética, ou seja, a variância nas frequências alélicas entre subpopulações, sendo obtida por:

$$F_{ST} = \frac{\sigma_{\bar{p}}^2}{\bar{p}(1-\bar{p})}, \quad \text{eq. 2}$$

Onde $\bar{p}$ e $\sigma_{\bar{p}}^2$ são a frequência alélica média e a variância das frequências alélicas entre subpopulações, respectivamente. Como a variância é sempre maior que zero, F_{ST} também é maior que zero, significando que a heterozigosidade média esperada na população total é maior do que a média esperada nas subpopulações. A redução da heterozigosidade total observada em populações estruturadas em subpopulações com acasalamento aleatório é conhecido como efeito Wahlund.

Nei (1977) reformulou as estatísticas F visando alelos múltiplos sem utilizar o conceito de correlação, e redefiniu os índices de fixação em termos de heterozigosidades observadas e esperadas. Assim, H_O é a heterozigosidade observada e, H_S é a heterozigosidade esperada em determinada subpopulação:

$$H_O = 1 - \sum P_i, \quad \text{eq. 3.1}$$

Onde P_i é a frequência de homozigotos observados do i th alelo.

$$H_S = 1 - \sum p_i^2, \quad \text{eq. 3.2}$$

$\sum p_i^2$ é o somatório da frequência esperada de homozigotos do i th alelo. Assim:

$$F_{IS} = \frac{\bar{H}_S - H_O}{\bar{H}_S}, \quad -1 \leq F_{IS} \leq 1 \quad \text{eq. 3.3}$$

Sendo, F_{IS} é o desvio proporcional entre a heterozigosidade observada e média esperada em cada subpopulação. $\bar{H}_S$ é a heterozigosidade média esperada considerando-se todas as subpopulações. Se não há outro fator aparente que promova a deficiência de

heterozigotos, $F_{IS} > 0$ é frequentemente interpretado como medida de endogamia na população.

$$F_{IT} = \frac{H_T - \bar{H}_O}{H_T}, \quad -1 \leq F_{IT} \leq 1 \quad \text{eq. 3.4}$$

F_{IT} é o desvio proporcional entre a heterozigosidade média observada e esperada na população total (H_T).

$$F_{ST} = \frac{H_T - \bar{H}_S}{H_T}, \quad 0 \leq F_{IT} \leq 1 \quad \text{eq. 3.5}$$

F_{ST} é o desvio entre a heterozigosidade total esperada e a média esperada nas subpopulações. Se não há variância nas frequências alélicas entre subpopulações, então $F_{ST} = 0$ e F_{IT} se reduz a F_{IS} . Assim, se todas as subpopulações estão em EHW, então $F_{IS} = 0$ e F_{IT} é reduzido a F_{ST} . Utilizando as equações descritas abaixo (4.1 a 6.3), apresentadas no trabalho de Nei & Kumar (2000), com o intuito de ilustrar como as estatísticas F de Wright (1951) e Nei (1977) são relacionadas, serão considerados como exemplo dois alelos em um loco em determinada população. Os desvios a partir das proporções de EHW são medidos pelo parâmetro f (Wright 1951) e podem ser representados da seguinte forma:

$$x_{11} = (1 - f)x_1^2 + fx_1 \quad \text{eq. 4.1}$$

$$x_{12} = 2(1 - f)x_1x_2 \quad \text{eq. 4.2}$$

$$x_{22} = (1 - f)x_2^2 + fx_2 \quad \text{eq. 4.3}$$

Onde $2x_1x_2$ é a frequência esperada de heterozigotos e x_{12} é a frequência observada. A partir de 4.2 obtém-se índice de fixação f :

$$f = \frac{H_e - H_o}{H_e}, \quad \text{eq. 5}$$

Sendo H_e e H_o iguais às heterozigosidades esperadas e observadas dentro da subpopulação, respectivamente. Considerando uma população dividida em s subpopulações, nas quais ocorre EHW, onde x_k é a frequência do alelo A_1 na k -th subpopulação, as frequências genotípicas A_1A_1, A_1A_2, A_2A_2 são dadas por $x_k^2, 2x_k(1 - x_k), (1 - x_k)^2$, respectivamente. As frequências genotípicas médias na população total são:

$$X_{11} = \bar{x}^2 + \sigma^2, \quad \text{eq. 6.1}$$

$$X_{12} = 2\bar{x}(1 - \bar{x}) - 2\sigma^2, \quad \text{eq. 6.2}$$

$$X_{22} = (1 - \bar{x})^2 + \sigma^2, \quad \text{eq. 6.3}$$

Igualando-se as equações a 4.1 e 6.1 obtém-se a equação 7:

$$\sum_{k=1}^s \frac{(1-f)x_k^2 + fx_k}{s} = \bar{x}^2 + \sigma^2$$

$$\bar{x}^2 - F\bar{x}^2 + F\bar{x} = \bar{x}^2 + \sigma^2$$

$$\sigma^2 = F\bar{x} - F\bar{x}^2$$

$$\sigma^2 = F\bar{x}(1 - \bar{x}),$$

Assim,

$$F = \frac{\sigma^2}{\bar{x}(1-\bar{x})} = F_{ST} \quad \text{eq.7}$$

A seguir, pela análise do Quadro 1, pode ser observado que se a população é subdividida em muitas unidades reprodutivas em EHW, a frequência de heterozigotos dentro de populações ($\bar{H}_S$) tende a ser menor do que a esperada na população total (H_T). Diferenças nas frequências alélicas entre subpopulações (as quais geram F_{ST}) em EHW ($F_{IS} = 0$) podem levar a falsa impressão de algum grau de endogamia ($F_{IT} > 0$) na população total (efeito Wahlund).

Quadro 1. Esquema representando as frequências alélicas e genotípicas de 3 populações hipotéticas, em EHW.

		Frequência alélica		Frequência genotípica		
Populações	1	p_1	q_1	p_1^2	$2p_1q_1$	q_1^2
	2	p_2	q_2	p_2^2	$2p_2q_2$	q_2^2
	3	p_3	q_3	p_3^2	$2p_3q_3$	q_3^2
Média				$\bar{p}^2$	$2\bar{p}\bar{q}$	$\bar{q}^2$
		$\bar{p}$	$\bar{q}$	$\bar{p}^2$	$2\bar{p}\bar{q}$	$\bar{q}^2$

$2\bar{p}\bar{q}$ heterozigosidade média esperada dentro de subpopulações;

$2\bar{p}\bar{q}$ heterozigosidade média esperada para a população total.

Igualando as equações 2 e 3.5 e utilizando as expressões dadas no Quadro 1, é obtida a equação 8:

$$\frac{H_T - \bar{H}_S}{H_T} = \frac{\sigma^2}{\bar{p}\bar{q}}$$

$$H_T = 2\bar{p}\bar{q}$$

$$\bar{H}_S = \overline{2pq}$$

$$\frac{2\bar{p}\bar{q} - \overline{2pq}}{2\bar{p}\bar{q}} = \frac{\sigma^2}{\bar{p}\bar{q}}$$

$$2\sigma^2 = 2\bar{p}\bar{q} - \overline{2pq}$$

$$2\sigma^2 = H_T - \bar{H}_S$$

$$D_{ST} = H_T - \bar{H}_S$$

$$D_{ST} = 2\sigma^2, \quad \text{eq. 8}$$

Definido para alelos múltiplos F_{ST} de Nei é denotado G_{ST} , porém, a estatística de diversidade de Nei (G_{ST}) divide a heterozigosidade total esperada H_T em seus componentes dentro de subpopulações ($\bar{H}_S$) e entre subpopulações (D_{ST}). A estatística F de Wright-Nei, em contraste, divide F_{IT} em dois componentes, os quais são devidos a desvios locais a partir das expectativas de EHW e, a heterogeneidade nas frequências alélicas locais. Estes dois tipos de decomposição da diversidade genética total quando considerados juntos, fornecem informações complementares sobre as fontes e distribuição da variação genética em qualquer espécie (Berg & Hamrick 1997).

A diversidade genética total em determinado loco $H_T = 1 - \sum \bar{p}_i^2$, onde $\bar{p}$ é a frequência média do i th alelo na população total, é a soma da diversidade genética média esperada dentro de populações ($\bar{H}_S$) mais a diversidade genética entre populações (D_{ST}), assim:

$$H_T = \bar{H}_S + D_{ST}, \quad \text{eq. 9}$$

Esta equação é análoga a decomposição da variância total (ANOVA) em seus componentes dentro e entre populações. Nei (1973) introduziu a tão amplamente utilizada estatística G_{ST} como medida de diferenciação entre populações em relação à população total:

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_T}, \quad 0 \leq G_{ST} \leq 1 \quad \text{eq. 10}$$

G_{ST} é embasado somente nos valores esperados de heterozigotos, não sendo influenciado por desequilíbrio de Hardy & Weinberg. Calculado pelo método de Nei (1977) F_{ST} é sempre ≥ 0 , ou seja a heterozigosidade total esperada, H_T , é sempre maior (ou igual) a heterozigosidade média esperada dentro de subpopulações, $\bar{H}_S$.

As estatísticas F de Wright-Nei se aplicam a grandes tamanhos amostrais. Berg & Hamrick (1995) mostraram que tamanhos amostrais reduzidos ($N \cong 20$ por subpopulação) superestimam F_{ST} e, F_{IS} é reduzido passando de valores de positivos a negativos. Estes pesquisadores sugerem o tamanho amostral de mais do que 30 indivíduos por subpopulação visando adequação aos pressupostos da estatística F de Wright-Nei.

De forma geral, medidas de diversidade genética podem ser estimadas em três níveis: dentro de espécies, dentro de populações e entre populações. As medidas de diversidade genética dentro de espécies estimam a diversidade genética total presente na espécie. A diversidade genética dentro de populações é função da diversidade genética total dentro da espécie e da proporção da diversidade genética encontrada entre populações. Dentre as estatísticas populacionais comumente estimadas estão: a porcentagem de locos polimórficos (P), o número médio de alelos por loco (AP), o número efetivo de alelos por loco (A_e), o coeficiente de diferenciação genética G_{ST} , o índice de fixação de f e, o índice de diversidade genética (H).

A proporção de locos polimórficos (P) depende do número de locos pesquisados, quando poucos locos são avaliados este parâmetro não é muito informativo. A proporção de locos polimórficos também será, em parte, função do tamanho da amostra populacional, porque alelos com baixa frequência têm maior probabilidade de serem observados em grandes amostras populacionais.

O número médio de alelos por loco polimórfico (AP), também, é em parte função do tamanho amostral populacional. Quando o tamanho amostral aumenta alelos com baixa frequência podem ser detectados, o que aumenta o AP .

O número efetivo de alelos A_e quantifica o número de alelos e, a uniformidade das frequências alélicas em determinado loco. Mais precisamente A_e mensura a uniformidade dos alelos mais comuns, pois alelos raros contribuem pouco na soma.

$$A_e = \frac{1}{\sum p_i^2} = \frac{1}{1-H_e}, \quad 1 \leq A_e < \infty \quad \text{eq.11}$$

Valores médios A_e , considerando-se todas as populações avaliadas, quantificam a informação genética da espécie. A_e e H_e são positivamente correlacionados portanto, estas duas medidas exibem aspectos de diversidade genética similares.

A proporção esperada de locos heterozigotos (H) sumariza a variação genética no nível de alelos, contudo, quando calculado considerando todas as subpopulações e, então feita a média sobre todos os locos, é uma medida da variação genética na espécie. Esta é, provavelmente, a medida de diversidade genética mais utilizada em dados aloenzimáticos, pois resume a variação genética da população ou da espécie em uma única estatística.

Ao se descrever a variação genética de alguma espécie, várias populações devem ser avaliadas ao longo da faixa de ocorrência geográfica, em sítios amostrais localizados apropriadamente. Assim, considerando-se todas as populações amostradas, as médias dos parâmetros descritos anteriormente podem ser estimadas obtendo-se as medidas de diversidade genética da espécie. As medidas P , AP , e H estimadas no nível de espécie ignoram deficiências ou excessos locais de alelos e genótipos particulares e os valores obtidos são representativos da espécie ou pelo menos da faixa representada pela amostra (Berg & Hamrick 1997).

Cavalli-Sforza (1996) introduziu a idéia de que a heterogeneidade dos valores da diferenciação populacional (F_{ST}) através de locos reflete o envolvimento dos diferentes locos em um processo adaptativo. Apesar do contínuo debate sobre a possibilidade de efeitos diretos da seleção em locos isoenzimáticos (Lewontin, 1991), as isoenzimas têm sido consideradas seletivamente neutras na maioria dos estudos e representam características individuais (qualitativas). Características quantitativas, por outro lado, representam os efeitos aditivos e de interação entre muitos locos e são mais diretamente relacionadas ao valor adaptativo que marcadores moleculares, isto é, enquanto muitas características quantitativas são neutras algumas podem ser adaptativas. Para características com base aditiva que estão evoluindo de forma neutra Wright (1951) mostrou que a vacância genética dentro de populações é igual $\sigma_{g(w)}^2 = (1 - F_{ST})\sigma_{g(t)}^2$, onde $\sigma_{g(t)}^2$ é igual a variância genética que seria exibida se todos os indivíduos analisados fizessem parte de uma única população panmítica. Spitze (1993) isolou F_{ST} e reorganizou esta expressão de

forma a obter o grau de diferenciação populacional representado por características quantitativas (Q_{ST}),

$$Q_{ST} = \frac{\sigma_{g(b)}^2}{\sigma_{g(b)}^2 + 2\sigma_{g(w)}^2} \quad \text{eq. 12}$$

Na prática Q_{ST} é medido pela quantificação dos componentes da variância genética entre e dentro de populações por meio de delineamento experimental em casas de vegetação, onde todos os indivíduos procedentes de diferentes populações são avaliados em um mesmo ambiente. Diferenças fenotípicas entre populações podem ser atribuídas às diferenças genéticas entre as mesmas. A variação fenotípica dentro de população inclui ambos os componentes de variação genética e ambiental que podem ser decompostos por avaliar indivíduos dentro de famílias de meios irmãos. Estão o design experimental mais comum é a ANOVA aninhada com indivíduos dentro de famílias e famílias dentro de populações (Mckay & Latta, 2002).

2.BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, S.P., PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M., RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p.

ALVES, T.M. de ALMEIDA, SILVA, A.F., BRANDÃO, M., GRANDI, T.S.M., SMÂNIA E. de FÁTIMA A., SMÂNIA JÚNIOR, A., ZANI, C.L. 2000. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Memoriam Instituto Oswaldo Cruz*. 95(3): 367-373.

ARDISSON, L., GODOY, K.S., FERREIRA, L.A.M., STEHMANN, J.R. 2002. Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 12(1): 27-34.

ASSUNÇÃO, S.L. e FELFILI, J.M. 2004. Fitossociologia de um fragmento de cerrado *sensu stricto* na APA do Paranoá, DF, Brasil. *Acta Botânica Brasílica*, 18(4): 903-909.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. 2.ed. Rio de Janeiro: IBGE, v.52, p.558-563, 1992.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. 2.ed. Rio de Janeiro: IBGE, v.53, p.3-40:3-47, 1993.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. 2.ed. Rio de Janeiro: IBGE, v.54, p. 1-114:3-45, 1994.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. 2.ed. Rio de Janeiro: IBGE, v.13, p. 3-27:3-28, 2002.

- BARROS, M.A.G. 1982. Flora medicinal do Distrito Federal. *Brasil Florestal*, 12(50): 35-45.
- BERG, E.E. & HAMRICK, J.L. 1995. Fine-scale genetic structure of a turkey oak forest. *Evolution*, 49: 110-120.
- BERG, E.E. & HAMRICK, J.L. 1997. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Can. J. For. Res.* 27:415-424.
- BORGES FILHO, H.C. e FELFILI, M.J. 2003. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no Distrito Federal. *Revista Árvore*. 27(5): 735-745.
- CAVALLI-SFORZA L., 1996. Population structure and human evolution. *Proc. R. Soc. London*, Ser. B 164: 362-379.
- FELFILI, J.M. e BORGES FILHO, H.C. 2004. Extrativismo Racional da Casca de Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. Universidade de Brasília, Departamento de Engenharia Florestal. 32p.
- FELFILI J.M., da SILVA JUNIOR, M.C., DIAS, B.J., REZENDE, A.R. 1999. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado *sensu stricto* da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 22: 83-90
- FELFILI, J.M. 2000. Perda da Diversidade. In. UNESCO. Vegetação no Distrito Federal: tempo e espaço. Brasília. p. 33-34.
- LORENZI, H. 1992. Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: ed. *Plantarum*, p.189.
- HIRSCHMANN, G.S. & ARIAS, A.R. 1990. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick. 29: 159-172.

JACOBSON, T.K.B., GARCIA, J., da COSTA SANTOS, S., DUARTE, J.B., FARIAS, J.G., KLIEMANN, H.J. 2005. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 35(3): 163-169.

LEWONTIN, R.C. 1991. Electrophoresis in the development of evolutionary genetics: milestone or millstone? *Genetics*. 128: 657-662.

MAYR, E, 1963. Animal species and evolution. *Belknap Press*, Cambridge, Mass.

MCKAY, J.K. & LATTA, R.G. 2002. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *TRENDS in Ecology & evolution* 17:285-291.

NEI M. 1977. *F*-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41: 225-233.

NEI, M. & KUMAR, S. Molecular evolution and phylogenetics. *Oxford university Press*, p. 231-263, 2000.

ORTIZ, P.L., ARISTA, M., OLIVEIRA, P.E., TALAVERA, S. 2003. Patterns of flower and fruit production in *Stryphnodendron adstringens*, an andromonoecious legume tree of Central Brazil. *Plant Biology*. 5: 592-599.

PANIZZA, S., ROCHA, A.B., GECCHI, R., de SOUZA e SILVA, R.A.P. 1988. *Stryphnodendron barbadetiman* (Velloso) Martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. *Rev. Ciênc. Farm.* 10: 101-106.

PENNA, M. 1946. Dicionário brasileiro de plantas medicinais. 3 ed. Rio de Janeiro, *Kosmos*, 409p.

PIO CORRÊA, M. 1926. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, *Imprensa Oficial*, v.1. 1474 p.

REBECCA, M.A., ISHII-IWAMOTO, E.L., KELMER-BRACHT A.N., CAPARROZ-ASSEF, S.M., CUMAN, R.K.N., PAGADIGORRIA, C.L.S., de MELLO, J.C.P., BRACHT, A., BERSANI-AMADO, C.A. 2003. Effect of *Stripnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. *Toxicology Letters*, 143: 55-63.

REBECCA, M.A., ISHII-IWAMOTO, E.L., GRESPAN, R., CUMAN, R.K.N., CAPARROZ-ASSEF, S.M., de MELLO, J.C.P., BERSANI-AMADO, C.A. 2002. Toxicological studies on *Stripnodendron adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*. 83:101-104.

SANTOS, C.S., COSTA, W.F., RIBEIRO, J.P. GUIMARÃES, D.O., FERRI, P.H., FERREIRA, H.D. SERAPHIN, J.C. 2002. Tannin composition of barbatimão species. *Fitoterapia*. 73: 292-299.

SLATKIN, M. Gene flow and population structure. 1994. In: REAL, L.A. (ed.) *Ecological Genetics*. Princeton University Press, New Jersey, p.3-17.

SOUZA, C.D. e FELFILI, J.M. 2006. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*. 20(1): 135-142.

SPITZE, K., 1993. Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics*, 135: 367-374.

TEIXEIRA, M.L., SOARES, A.R., SCOLFORO, J.R.S. 1990. Variação do teor de tanino da casaca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em 10 locais de Minas Gerais. *Ciências e Prática*. Lavras. 14(2): 229-232.

WRIGHT, S. 1951. The general structure of populations. *Ann. Eugen.* 15:323-354.

3.ARTIGO I

Isozymic variation of the natural population of *Stryphnodendron adstringens* in the Parque Estadual do Rio Preto –MG/Brazil

Jacqueline Siqueira Glasenapp¹, Vicente Wagner Dias Casali¹, Ernane Ronie Martins², Cosme Damião Cruz³.

1. Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG

2. Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros – MG

3. Departamento de Biologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG

3.1 ABSTRACT - (Isozymic variation of the natural population of *Stryphnodendron adstringens* in the Parque Estadual do Rio Preto –MG/Brazil). The isoenzymes polymorphism technical in the evaluation of genetic diversity in natural populations requires previous knowledge of heritages. Leaves and fruits from 63 trees were sampled in the Rio Preto State Park (PERP) in order to begin an isozyme research in *S. adstringens*. The enzyme systems ADH, EST, ACP, PGM, PGI, GDH, G6PDH, GOT, IDH, LAP, MDH, PER and SKDH were assessed by means of starch-gel electrophoresis technique. The polymorphic systems PGI, IDH, MDH, GOT and ADH presented a dimeric quaternary structure, while EST and PER were monomeric. The adjustment to the HWE proportions was observed in the leaves, seeds and among generations in the *pgi-1*, *idh-1* and *mdh-2* loci, only in the seeds in *got-1*, and in the leaves in *per-1* and *per-2*. Excepting *mdh-1* and *pgi-2*, the isozyme patterns agreed with the quaternary structures commonly found in isoenzymes. The adjustment with expected genotype frequencies in HWE increases the likelihood of the hypothesis defined in this paper to be corrected.

Keywords – Medicinal plants, Hardy-Weinberg principle, quaternary structure, isozyme loci.

3.2 RESUMO - (Variação Isoenzimática na População Natural de *Stryphnodendron adstringens* do Parque Estadual do Rio Preto –MG/Brasil). A utilização do polimorfismo aloenzimático nas avaliações da diversidade genética de populações naturais requer que sua herança seja entendida a priori. Portanto, com o objetivo de iniciar uma investigação isoenzimática em *S. adstringens* foram amostradas folhas e frutos de 63 árvores no PE do Rio Preto. Foram avaliados os sistemas enzimáticos ADH, EST, ACP, PGM, PGI, GDH, G6PDH, GOT, IDH, LAP, MDH, PER e SKDH por meio da técnica de eletroforese em gel de amido. Os sistemas polimórficos PGI, IDH, MDH, GOT e ADH apresentaram estrutura quaternária dimérica, e os EST e PER monomérica. O ajuste às proporções de EHW foi verificado nas folhas, sementes e entre gerações nos locos *pgi-1*, *idh-1*, *mdh-2*, em *got-1* somente nas sementes e em *per-1* e *per-2* nas folhas. Com exceção de *mdh-1* e *pgi-2* os padrões aloenzimáticos observados concordaram com as estruturas quaternárias de ocorrência comum às isoenzimas. O ajustamento às proporções de EHW em locos individuais e entre gerações aumenta as chances das hipóteses aqui estabelecidas estarem corretas.

Palavras chave: Plantas medicinais, equilíbrio de Hardy- Weinberg, estrutura quaternária, locos isoenzimáticos.

3.3 Introduction

The *Stryphnodendron adstringens* is a tree of the Cerrado, commonly known as “barbatimão”. It is used in traditional medicine to treat diseases such as ulcers, sores, hemorrhoids (Barros 1982), gastritis, sore throat (Hirschmann & Arias 1990), leukorrhea, hernias, diarrhea, bleeding, ringworm and ophthalmia (Almeida *et al.* 1998, Penna 1946). Due to deforestation, indiscriminate land use and urban development, *S. adstringens* populations that used to cover an extensive area are now isolated in small fragments of land.

After the decade 1960 biochemical and molecular techniques were developed and introduced in genetic evaluations. One of these techniques is isoenzyme electrophoresis, which is widely used in studies of natural populations because it requires no previous knowledge about the genome and allows the observation of allele variation at the loci. Since isoenzyme loci are codominant, it is possible to identify the heterozygous genotypes and measure the allele frequencies, which is useful in genetic studies involving statistics derived from observed and expected allele and genotype frequencies.

Isoenzyme studies have been applied in several areas of genetics, including gene mapping, analyses of mating systems, introgression (Strauss, 1986) and quantification of genetic diversity in populations and species. Generally in population studies, estimates of genetic diversity are based on measurements of genotype frequencies of many isoenzyme loci, derived from the evaluation of samples from one or more populations. Population statistics which are frequently estimated include: the percentage of polymorphic loci, the effective number of alleles per locus, the genetic diversity index of Nei (1973) and Wright’s fixation index (1951).

The investigation of isoenzyme polymorphism in native forest species and their proper use in genetic evaluations depends of the knowledge of how enzyme variants are inherited. The present work aimed to do genetic research on *S. adstringens* to provide data elucidating the heritage patterns of isoenzyme loci, which will be useful for future evaluations of the genetic diversity of populations of this species.

3.4 Material and Methods

3.4.1 Sample collection

The population chosen for this study was from Parque Estadual do Rio Preto (PERP), located in the municipality of São Gonçalo do Rio Preto, 56 Km from Diamantina (MG). *S. adstringens* is very common, both inside and outside the park, occurring almost continuously between the municipalities of Olhos D'água and Diamantina.

The samples were composed of leaves and fruits, in the last maturation stages, from 63 adult trees of *S. adstringens*. There were five main collection points, at least 3 km apart from one another. The average number of sampled trees in each of these points was 12.6, and the average spacing between trees was 60 m. The fruits were packed in paper bags and the leaves were placed in liquid nitrogen until being delivered to the Laboratory of Vegetable Breeding of the UFV.

3.4.2 Isoenzyme extraction and electrophoresis

The isoenzyme polymorphism analyses were carried out by means of the starch-gel electrophoresis technique. The enzymes were extracted from leaves and seeds. Three seeds from each evaluated tree were examined. The proportion of 1 g of leaf tissue or one seed for each 3 mL of extracting solution number 1 recommended by Alfenas *et al.* (2006) was used. The gels were prepared with 12 g of sucrose and 60 g of starch per 500 mL of the gel buffer solution. The buffer systems suggested by Soltis *et al.* (1983) and Shaw and Prasad (1970) (described in Table 1, as A and B respectively) were used. The pre-run was performed at 15 mA for 30m for buffer A and 1h for buffer B. The run itself was carried out at 35 mA and lasted about 5h. The isoenzyme systems analyzed and the composition of the electrode/gel buffer systems are outlined in Table 1.

Table 1. Enzyme systems and composition of buffers used in the electrophoresis of leaves and seeds of *Stryphnodendron adstringens*.

Enzyme	Abbreviation	E.C.no.	Electrode/gel buffers*
Alcohol dehydrogenase	ADH	1.1.1.1	B
Esterase	EST	3.1.1.1	A
Acid Phosphatase	ACP	3.1.3.2	A
Phosphoglucumutase	PGM	5.4.2.2	A
Phosphoglucose isomerase	PGI	5.3.1.9	A
Glucose dehydrogenase	GDH	1.1.1.47	A
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PDH	1.1.1.49	A
Glutamate oxaloacetate transaminase	GOT	2.6.1.1	A
Isocitrate dehydrogenase	IDH	1.1.1.42	B
Leucine aminopeptidase	LAP	3.4.11.1	A
Malate dehydrogenase	MDH	1.1.1.37	B
Peroxidase	PER	1.11.1.7	A
Shikimate dehydrogenase	SKDH	1.1.1.25	B

* Electrode buffer/gel:

A - electrode (4.0 g.L⁻¹ NaOH, 18.55 g.L⁻¹ boric acid), pH 7.9/gel (dilute 40mL.L⁻¹ solution of the electrode, 1.84 g.L⁻¹ Tris, 0.69 g.L⁻¹ citric acid), pH 8.6.

B - electrode (Tris 16.35 g.L⁻¹, 9.04 g.L⁻¹ citric acid), pH 7.0/gel (dilute 66.7 mL.L⁻¹ solution of the electrode), pH 7.0.

3.4.3 Genetic analysis

According to HWE principles, the genotype frequencies remain constant along generations when the alleles in a population segregate in a Mendelian form, the loci are autosomal, the allele frequencies are the same in both sexes, all the genotypes are selectively equivalent, the reproduction is sexual, the mating is random, there is no mutation or migration and the population is infinitely large (Hartl & Clark 1989). Under these ideal conditions, like the genotype proportions the enzymic phenotypic proportions remain constant along the generations. Since isoenzymes are neutral, coodominant and its loci segregate in independently form (Mendelian proportions), statistical tests might make inferences about phenotypic proportions.

To explain this goal it can be considered, for example, a diploid organism from population under HWE where the alleles A_i and a_j occur, which codify for the polypeptides A_x and a_y , respectively. Under these conditions, the frequency of the allele A_i is equal to that of the polypeptide A_x , and can be calculated by the expression $f(A_i) = f(A_x) =$

$\sum_{i=1}^N (2A_x A_x + A_x a_y) / 2N$, where $2N$ is the total number of polypeptides. The probability that a sample of this population contains exactly n_x polypeptides of the type A_x follows the binomial distribution $p(n_x, n_y) = \frac{N!}{n_x! n_y!} (p)^{n_x} (q)^{n_y}$, where $p = f(A_x)$ and $q = f(a_y)$.

For the polypeptides A_x and a_y , the probability of the phenotypic arrangements is equal to that of the genotypic arrangements and follows the multinomial distribution based on the number of individuals of each phenotype $p(N_{xx}, N_{xy}, N_{yy}) = \frac{N!}{N_{xx}! N_{xy}! N_{yy}!} (p^2)^{N_{xx}} (2pq)^{N_{xy}} (q^2)^{N_{yy}}$, where N is the total number of individuals and N_{xx} , is the number of individual of the phenotype $A_x A_x$, and so on. The expected genotype frequencies under HWE are p^2 , $2pq$ and q^2 , which are equal to the expected phenotype frequencies $f(A_x A_x) = p^2$, $f(A_x a_y) = 2pq$ e $f(a_y a_y) = q^2$.

Due many enzymes, such as esterases, peroxidases, phosphatases and peptidases present development and environmental variation that mimic the Mendelian segregation (Conckle 1971b, Kelley & Adamns 1977) and, post-transcriptional modifications may occur resulting in secondary enzyme bands or gel residue artifacts which might be misunderstanding (Alfenas *et al.* 1998), for identify the isoenzymic heritage mode, previous controlled crossing should be performed or studies should be carried out on haploid tissues such as anthers. However, these experiments are somewhat difficult to perform in *S. adstringens* because it is a wild and alogamous species and its pollen are very tiny. Therefore to test if the patterns of band observed are genetic without carry out crossing or studies of haploid tissues, the phenotypic proportions of isozymes between generations were tested. Furthermore the isoenzymic quaternary structure has been studied by many researchers and, although variation in the pattern among species may occur, such variation seems to be small (Gottlieb 1982, Weeden & Wendel 1989, Brune *et al.* 1989).

In gels of *S. adstringens* in which activity was evident both in leaves (female parent) and seeds (progenies), the observed bands were analyzed to determine if the maternal gels segregated similarly to those apparent in their progenies (Fig.1) and, the allele frequencies were deduced for the patterns between leaves and seeds considered concurrent. Since the species is alogamous and the male parents are unknown, the individuals of the population themselves were regarded as the formers of the male gamete set (Cruz, 2005). Therefore, the male allele frequencies were considered equal to the maternal ones, assuming the Hardy & Weinberg Equilibrium (HWE).

The isoenzyme loci were identified with the same abbreviations used in the designation of each enzyme (for example, PGI), but with lowercase letters in italics followed by its ascending numerical order beginning from the slower migration locus (for example, *pgi-1*). The alleles in each locus were alphabetically ordered. The faster migration allele was identified by the letter *a*, while those of slower migration followed in order.

It is important to highlight that the statistical tests involving allele frequencies were carried out only for loci which presented simple band patterns of easy identification. The GENES software system for genetics and statistics (version 1.0.0) was used to test the hypothesis that the genotypic and phenotypic proportions are in HWE. The χ^2 test was performed to verify if the phenotype frequencies remain constant among generations, using the maternal allele frequencies (leaves) in the calculation of the progeny expected for the same sample size of the progeny observed (seeds). The Fisher's exact test was used to calculate the probabilities of the genotypic arrangements observed in leaves and seeds.

3.5 Results and Discussion

3.5.1 Isozyme patterns between types of tissues

Excepting the systems PGI, IDH, EST and SKDH, where the activity of the same loci in leaves and seeds was evident, differences were observed in the active regions and loci among types of tissues for the other systems. These results were expected, as zymograms achieved from extracts of seeds, seedlings and leaves of adult plants may be very different (Alfenas *et al.* 1998). Genes which control isozyme expression manifest in certain development stages and in specific organs and tissues, or under a certain stimulus (Ramírez *et al.* 1991).

3.5.2 Polymorphic isozyme systems

3.5.2.1 Malate dehydrogenase

MDH has been isolated from different resources, including archaea, eubacteria, fungi, plants and mammals. In *Sus scrofa*, *Thermus flavus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Euglena gracilis* and *Eucalyptus globulus*, MDH was verified as a dimeric structure (Musrati 1998). Brune *et al.* (2006) describes MDH as composed of 2 or 4 subunits. Two or more loci involved in the expression of these isoenzymes are usually observed. Four loci were verified in *Pinus attenuata* (Straus & Conckle 1986), two active regions (Adams & Joly 1980) were observed in *Pinus taeda*, three loci were evident in *Cucumis sativus* (Knerr & Staub 1992) and *Zea mays* (Goodman *et al.* 1979).

In *S. adstringens*, two regions of activity (Table 2) were apparent in the gels of the female parents and one was apparent in the progeny gels. The catodal region was principally observed in the mothers, and seems to be controlled by a locus (*mdh-1*) with three alleles. It exhibited a monomeric enzyme pattern (Fig.1), disagreeing with the usually

observed dimeric or tetrameric pattern. The anodal region was partially coincident between leaves and seeds and seems to be controlled by more than one locus, which hinders the interpretation of the band pattern. Enzymes controlled by more than one gene locus do not form zymograms with different active regions. Many of these enzymes are dimeric with ability to form hybrid molecules among loci, sometimes coinciding with others in relation to their position in the gel (Alfenas, *et al.* 1998). For statistical purposes, only the *mdh-4* locus was considered in this region, where the dimeric enzyme pattern was clearly and consistently observed both in leaves and seeds.

The *mdh-3* locus is fixed and overlaps the hybrid band of the *mdh-4* locus. The *mdh-2* locus also seems to be fixed, and the same pattern of a single band is observed in all individuals of the progenies (Fig.1 and 2). Two bands (dotted bands in Fig.2) are evident just above the *mdh-2* locus, which seem to result from the interaction of the *mdh-2* locus with the alleles *a* of the *mdh-3* and *mdh-4* loci, or from later modifications in the quaternary structure of the products of these alleles. The MDH interlocus dimerization has been observed in some species (Goodman, *et al.* 1980), and post-transcriptional modifications may occur with the addition of compounds such as sugars, lipids, chemical radicals, such as phosphate, among others, resulting in secondary enzyme bands or gel residue artifacts (Alfenas *et al.* 1998). As for the *mdh-5* locus (Fig.2), although there was conformity between maternal gels and their progenies, the pattern was not evident in all individuals (thus hindering the interpretation) and no plausible genetic hypothesis was verified.

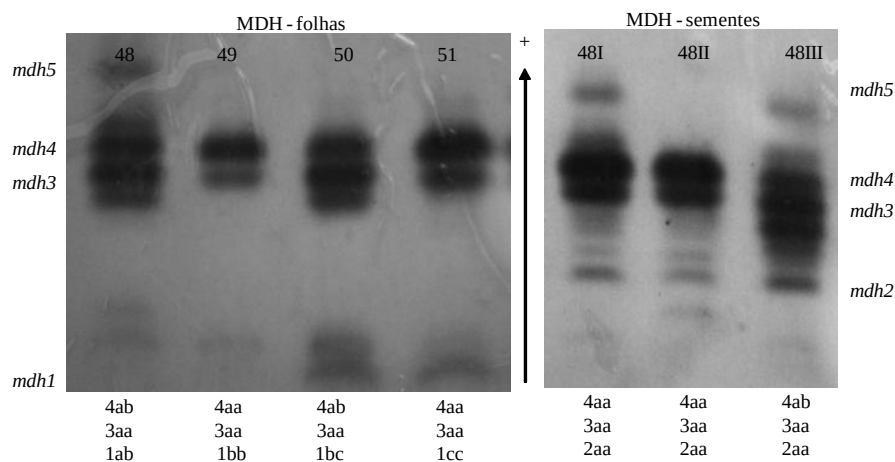


Figure 1. Patterns of MDH bands in the female parents 48 to 51 and in the progenies 48I, 48II and 48III of *Stryphnodendron adstringens*. Numbers and letters at the bottom refer to individual loci and genotypes, respectively.

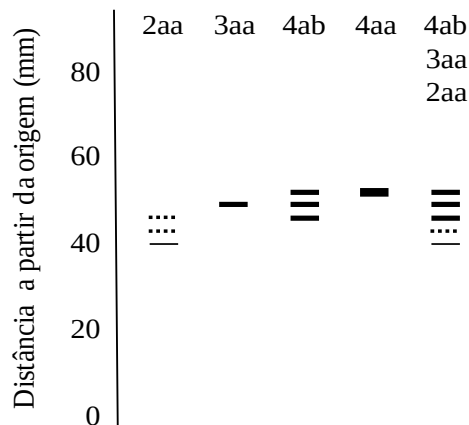


Figure 2. Diagrammatic representation of the patterns of bands of the enzyme MDH in *Stryphnodendron adstringens*. Numbers and letters at the top refer to individual loci and genotypes, respectively.

3.5.2.2 Phosphoglucose isomerase

Both in leaves and seeds, two coincident active regions were observed in the PGI gels, which seemed to be controlled by a locus and two alleles each (Table 2). Two active regions, each with one locus, were also evident in *Pinus taeda* (Adams & Joly 1980) and *Spondias tuberosa* (De Sousa 2000). Due to the formation of hybrid bands typical to heterozygous individuals, the *pgi-1* locus was considered dimeric (Fig. 3). This observation agrees with Brune *et al.* (2006) and many other studies on organisms such as fungi, bacteria, plants and animals, including human beings, which mention the quaternary structure of this enzyme as formed by two polypeptide chains (Tekamp-Olson *et al.* 1988, Noltmann 1972, Hizukuri *et al.* 1975, Cini *et al.* 1988, Sun *et al.* 1990). The anodal (*pgi-2*) locus presented band pattern peculiar to monomeric enzymes, and, although the monomeric pattern has already been observed in microorganisms such as *Archaeoglobus fulgidus* and *Methanosarcina mazei* (Hansen *et al.* 2005), as already mentioned, PGI is generally dimeric. The adjustment to the HWE proportions in the *pgi-2* locus was not measured, since the heterozygotes for this locus were observed only in three individuals in the progenies.

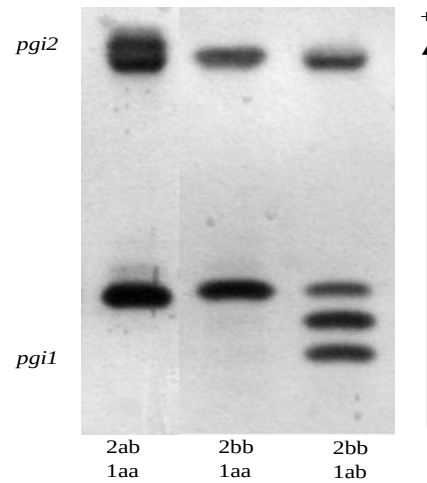


Figure 3: Patterns of PGI bands in *Stryphnodendron adstringens*. Numbers and letters at the bottom refer to individual loci and genotypes, respectively.

3.5.2.3 Isocitrate dehydrogenase

In leaves and seeds in IDH gels, it was observed an activity zone apparently controlled by a locus (*idh-1*) with three alleles (Table 2). The dimeric pattern was visible between the products of the alleles *ac* and *bc*, and monomeric, among *ab* (Fig. 4). Homozygotes were not observed for the allele *c* in any type of tissue. Well-studied in fungi and animals, the enzyme IDH is usually dimeric or oligomeric (Brune *et al.* 2006), and the dimeric structure is confirmed in plants such as *Spondias tuberosa* (De Souza 2000), *Cucumis sativus* (Watanabe *et al.* 2007) and cherry-tree (Granger *et al.* 1992). Although the pattern among the products of the alleles *ab* is seemingly monomeric, considering the evident formation of hybrid bands among the products of the alleles *ac* and *bc*, it is possible that heterodimers among *ab* have not been observed because these two alleles (*a* and *b*) presented very close migration. If so, the heterozygotes would appear in the gel as a thick and intensely stained band, as was the case.

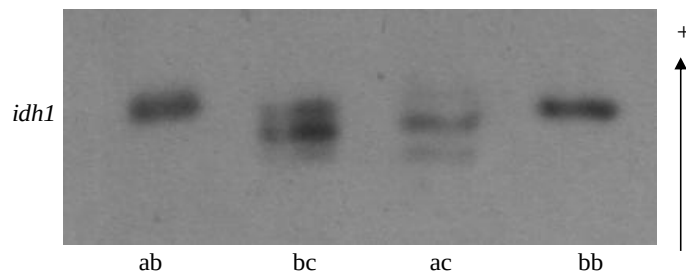


Figure 4: Patterns of IDH bands in *Stryphnodendron adstringens*. Lower case letters at the bottom refer to individual genotypes.

3.5.2.4 Glutamate oxaloacetate transaminase

Two active regions were apparent in the progeny gels and one active region was apparent in the gels of the female parents. The anodal region presented a pattern of two fixed bands and was evident both in mothers and in progenies. The catodal region was observed only in the progenies (Fig. 5) and presented a locus (*got-1*) with two alleles and dimeric band pattern. The GOT isoenzymes are known for their dimeric pattern in plants (Kephart 1990). As well as in *S. adstringens*, GOT was also dimeric in loblolly pine (Adams & Joly, 1980), cherry-tree (Granger *et al.* 1992) and *Oryza sativa* (Yagi *et al.* 1993). In the genetic control of this enzyme in *S. adstringens*, at least three loci seem to be involved (Table 2), three loci (Strauss and Conkle 1986) were observed in knobcone pine, and two, in loblolly pine (Adams & Joly 1980) and cherry-tree (Granger *et al.* 1992).

3.5.2.5 Esterase

Three active regions (Table 2) were apparent in the EST gels and, although the number of loci and alleles is the same for leaves and seeds, the band pattern was not appropriately solved in all the individuals to allow the statistical analysis. In each anodal and intermediate region, a monomeric pattern was observed with one locus and two alleles, in the catodal region, two fixed loci were verified (Fig. 5). Esterase is one of the most

polymorphic enzyme systems in plants (Weeden & Wendel 1990) and the most investigated in rice (Endo & Morishima 1983). Generally, the monomeric or dimeric variants of these enzymes are found in plants (Brune *et al.* 2006).

Table 2: Active regions, number of loci, number of alleles per locus, quaternary structures observed in *Stryphnodendron adstringens* and quaternary structures recorded in literature.

Enzyme	Active regions	Number of loci	Number of alleles per locus	Quaternary structure observed	Quaternary structure (Brune <i>et al.</i> 2006)
MDH	2	5	1-2	dimeric/ monomeric	dimeric/tetrameric
PGI	2	2	2	dimeric/monomeric	dimeric
IDH	1	1	3	dimeric	dimeric/oligomeric
GOT	2	3	1-2	dimeric	dimeric
EST	3	4	1-2	monomeric	monomeric/dimeric
PER	3	3	1-2	monomeric	monomeric

3.5.2.6 Glucose-6-phosphate dehydrogenase

In the maternal G6PDH gels, achromatic polymorphic bands without coherent pattern in the distribution were observed. In the progeny gels, a polymorphic region was evident where some individuals presented patterns of triplex bands, and others presented patterns of duplex bands (Fig. 5). Brune *et al.* (2006) describes G6PDH as dimeric, but monomeric isoenzyme were also observed in *Coriandrum sativum* (Demir *et al.* 2004). In *Zea mays* (Valenti *et al.* 1984) and cherry-tree (Granger *et al.* 1992), a dimeric quaternary structure was verified, and in *Pisum sativum* (Fickenscher & Scheibe 1986), tetrameric. No plausible genetic hypothesis was established for the patterns of bands observed. There may be locus overlapping, or the variation observed may not be of genetic origin, since zymograms may not follow the genetic patterns expected due to post-translational mechanisms.

3.5.2.7 Alcohol dehydrogenase

Achromatic bands with no detectable pattern of distribution were observed in the gels of the female parents. In the progeny gels, one active region was observed with a fixed pattern of triplex bands (Fig. 5). The bands varied in color intensity and slower migration bands generally presented higher intensity. Thus, the pattern of triplex bands observed in all the individuals of the progenies does not seem to be due to the association of hybrid bands in heterozygous individuals. The color intensity and thickness of the bands formed depend on the frequency in which the different forms of enzyme are found. Statistically, the dimers that constitute the quaternary structure of the functional enzyme are formed in the proportions of 1:2:1 (Alfenas *et al.* 1998). Therefore, the color of the intermediate band in a dimeric isozyme is more intense and thick due to its higher enzyme concentration, which was not observed in the ADH gels. Only four individuals were polymorphic with variation in the slower migration band, presenting additional triplex pattern in the catodal direction. Thus, five consecutive bands are observed (Fig. 5). The higher color intensity observed in the slower migration band can be ascribed to the higher enzyme production or the overlap of alleles from different loci. It seems more likely that there is an allele overlap and that the quaternary structure of this enzyme is dimeric in *S. adstringens*, since the four heterozygote individuals observed formed typical hybrid bands (Fig. 5). According to Brune *et al.* (2006), the ADH isoenzyme are dimeric or tetrameric. A dimeric quaternary structure was observed in *Vicia faba* (Leblova & El Ahmad 1989), *Zea mays* (Lai *et al.* 1982), *Oryza sativa* (Tong & Lin 1988) and *Glycine max* (Tihanyi *et al.* 1989).

3.5.2.8 Peroxidase

Three active regions were observed in the maternal gels, and the anodal and catodal regions were also apparent in the progeny gels. In the progenies, the pattern of bands of the anodal region agreed with the mother trees, but the comparison between female parents and progenies was not possible due to the poor resolution for most individuals of the progenies. In the catodal region, one fixed band was verified in the maternal gels, but variation in five

individuals was observed in the progeny and these individuals presented a second slower migration band (Fig. 5) besides the band observed in the mothers. In each anodal and maternal intermediate region, the monomeric pattern with one locus (*per-1* and *per-2*) and two alleles was evident, in accordance with Brune *et al.* (2006), who mention the enzyme peroxidase as monomeric (Table 2). Excepting the cherry-tree, where a dimeric quaternary structure was observed (Granger *et al.* 1992), monomers were also observed in *Cucumis sativus*, in the leaves of *Roystonea regia* (Watanabe *et al.* 2007) and *Camellia sinensis* (Kvaratskhelia *et al.* 1997), in *Allium sativum* (Marzouki *et al.* 2005) and in the seeds of *Sorghum bicolor* (Dicko *et al.* 2006).

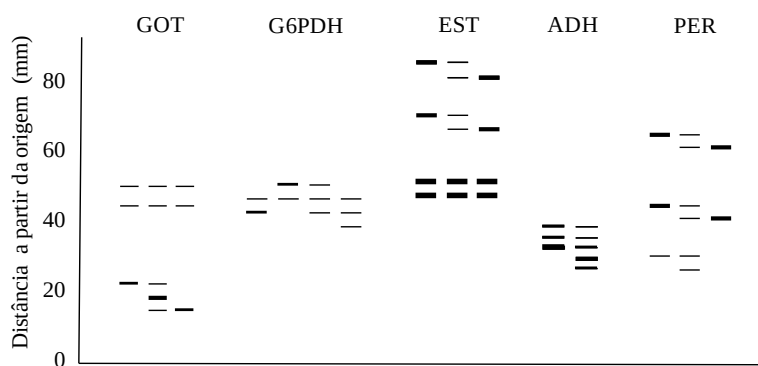


Figure 5. Diagrammatic representation of the activity regions and polymorphic patterns of bands in *Stryphnodendron adstringens*. Capital letters refer to the abbreviations of the names of the enzymes.

3.5.2.9 Glucose dehydrogenase

Two active regions in the maternal gels were observed in GDH. The anodal region presented achromatic bands with no detectable pattern of distribution. The catodal region was different in the two bands, but the pattern could not be assessed due to poor gel resolution. In the progeny, one active region with a fixed pattern of five consecutive bands was observed, in a way that the third and the last bands presented much higher color intensity in comparison with the others (Fig. 6).

3.5.3 Monomorphic enzyme systems

The enzyme leucine aminopeptidase (LAP) was found only in the progenies and presented one active region made of a single band (Fig.6). In phosphoglucose mutase (PGM), three active regions were evident in the progeny gels, in the anodal and catodal regions one single band was apparent in the intermédiaire region and a triplex pattern was observed with an intensely stained slower migration band (Fig.6). In the maternal gels, two active regions were observed and they were coincident with the catodal region and intermédiaire region apparent in the progenies. In the latter, only the slower migration band was evident. In shikimate dehydrogenase (SKDH), both in the maternal gels and in those of the progenies, a single active region represented by a single band was observed (Fig. 6). In acid phosphatase (ACP), it was difficult to interpret both the band patterns and the number of active regions in the gels revealed for both tissues. Apparently, there are two active regions, and the anodal region presents the pattern of a single band, while the catodal region presents the pattern of five consecutive bands. The first, intermédiaire and last bands are more intensely stained than the others (Fig. 6).

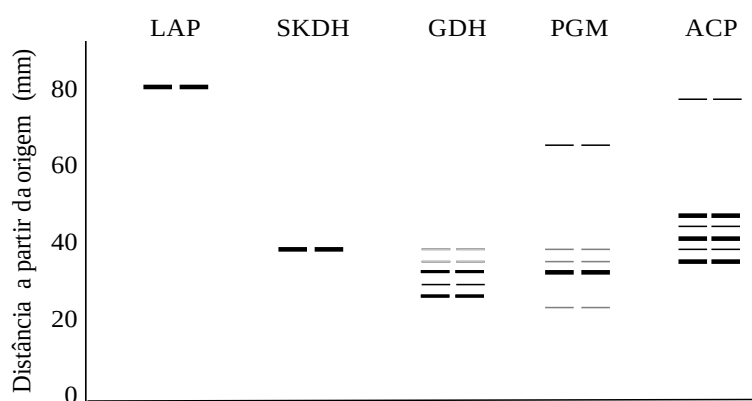


Figure 6. Diagrammatic representation of the activity regions and monomorphic patterns of bands in *Stryphnodendron adstringens*. Capital letters refer to the abbreviations of the names of the enzymes.

3.5.4 Adjustment to the HWE proportions

Surprisingly, the tests of adjustment to the HWE proportions, Fisher's and χ^2 tests, were non-significant for all the isozyme systems analyzed in the different types of tissues and among generations, respectively (Tables 3 and 4). However, it must be considered that in HWE tests, as in any other statistical test, the inability to reject the null hypothesis does not necessarily indicate its validity. It is possible that genotype frequencies in a population in which there is no random mating are distributed in such a way that they mimic the multinomial distribution (Li 1988). It is also possible that factors which cause deviations from the HWE expectations lead genotype frequencies to opposite directions, with a non-significant final result between the numbers of observed and expected genotypes (Workman 1969, Cavalli-Sforza & Bodmer 1971). Therefore, little can be done in relation to non-significant results, other than comparing them to the significant ones. Significant deviations, on the other hand, definitely indicate that one or more of the HWE conditions are not assured. Thus, it is necessary to be careful with the conclusion related to non-significant results of HWE, because they may lead to the error of the Type II (Lessios 1992). Excepting the *mdh-1* and *pgi-2* loci, the band patterns observed in *S. adstringens* agree with the quaternary structures which usually occur to isoenzymes (Table 2).

The allele frequencies are different between generations due to genetic drift or selection. Genetic drift especially affects small populations, and the genetic heterogeneity can be explained by selection when it is related to environmental variables (Jain & Bradshaw 1996, Wu *et al.* 1975). In *S. adstringens* it must be considered that the ripe fruits are widely predated by several types of insects, and few or no seeds are left in each pod. Therefore, there is a selective environmental factor and it is not known if it is directional. However, since the fruits were in the last maturation stage, the seeds used in the estimates of the allele frequencies of the progeny had not been submitted to the selective pressure, which may have led to non-significant results. Therefore, the maternal genotype frequencies may really be being represented in balance in the progenies, as expected. However, it may be postulated that these results could be different if ripe seeds that resisted to selective pressure had been analyzed.

Table 3: Fisher's exact and χ^2 tests for the adjustment of the genotypes observed in *Stryphnodendron adstringens* to the proportions expected under EHW.

Locus	Tissue	aa	ab	bb	P(N _{Aa} /n _A)	P(acum)	χ^2	P(χ^2)
<i>Got-1</i>	S	150	19	2	0.13452	0.16295ns	2.2361	0.13482ns
<i>*Idh-1</i>	F	16	21	9	0.20855	0.76259ns	0.1962	0.65778ns
<i>*Idh-1</i>	S	59	72	25	0.12180	0.73701ns	0.1488	0.69964ns
<i>Mdh-2</i>	F	57	7	0	0.83626	1.0 ns	0.2219	0.63757ns
<i>Mdh-2</i>	S	160	22	2	0.17049	0.21783ns	1.4745	0.22463ns
<i>Pgi-1</i>	F	53	8	1	0.28643	0.32527ns	1.0450	0.30666ns
<i>Pgi-1</i>	S	147	35	2	0.30173	1.0 ns	0.0027	0.95868ns
<i>Per-1</i>	F	12	25	25	0.09180	0.28566ns	1.5178	0.21795ns
<i>Per-2</i>	F	3	22	35	0.28392	1.0 ns	0.0370	0.84739ns

Plant tissues used in the allozyme analyses: F – leaves, S – seeds.

Levels of significance: ns = non-significant, $\alpha = 5\%$.

P(N_{Aa}/n_A): conditional probability, P(acum): accumulated probability

*simplified model that considers only two alleles (*a* most frequent allele, *b* allele representing the others).

Table 4: χ^2 test for the adjustment of allozyme loci of *Stryphnodendron adstringens* to the EHW proportions among generations.

Locus	Observed						Allele frequency			χ^2	P
	aa	ab	bb	ac	bc	cc	a	b	c		
<i>Pgi-1</i>	147	35	2	-	-	-	.9194	.0806	-	3.2011a	.2018ns
<i>Mdh-2</i>	163	22	2	-	-	-	.9435	.0565	-	3.6908a	.1580ns
<i>Idh-1</i>	18	67	57	8	6	0	.3587	.5761	.0652	3.2565b	.6605ns

Degrees of freedom: a=2, b=5.

Levels of significance: ns = non- significant, $\alpha = 5\%$.

3.6 Conclusion

In these populations the observed adjustments of the HWE proportions between generations might mean that the collected seeds came from random mating. In this manner the loci segregation is independent and the maternal phenotype frequencies are being represented in their progenies as expected, thus the isozymic structure hypotheses established here have highest probability to be correct and therefore might be used in future genetic studies of isoenzymes of *S. adstringens* genetic structure. Moreover generally the band patterns observed in *S. adstringens* agreed with the quaternary structures which usually occur to isoenzymes.

3.7 Acknowledgements

To the Research Support Foundation of Minas Gerais State (FAPEMIG) and the National Council of the Development of Science and Technology (CNPq) for financial support. To the Institute State Forest (IEF), and to the Institute of Agronomy Science (ICA) from Federal University of Minas Gerais (UFMG).

3.8 References

ALFENAS, A.C. e BRUNE, W. 1998. Eletroforese em gel de amido. *In* Eletroforese de aloenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos (A.C. Alfenas, ed.). Ed. UFV, Viçosa, p.60-63.

ALFENAS, A.C., DUSI, A., ZERBINI JÚNIOR, F.M., ROBINSON, I.P., MICALES, J.A., de OLIVEIRA, J.R., DIAS, L.A.S., SCORTICHINI, M., PEREIRA, M.C.B., BONDE, R.B., de ALONSO, S.K., JUNGHANS, T.G. e BRUNE, W. (*in memoriam*) 2006. Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos. 2 ed, Ed. UFV, Viçosa.

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

ADAMS, W.T. e JOLY, E.J. 1980. Genetics of allozyme variants in loblolly pine. *The Journal of Heredity* 71:33-40.

- BARROS, M.A.G. 1982. Flora medicinal do Distrito Federal. Brasil Florestal 12(50):35-45.
- BERG, E.E. & HAMRICK, J.L. 1997. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. Can. J. For. Res. 27:215-424.
- BRUNE, W., ALFENAS, A.C. e JUNGHANS, T.G. 2006. Identificações específicas de enzimas em géis. In Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos (A.C. Alfenas, ed). Ed. UFV, Viçosa, p. 202-328.
- CAVALLI-SFORZA, L.L. & BODMER, W.F. 1971. The genetics of human populations. Freeman & Co., San Francisco.
- CINI, J.K., COOK, P.F., GRACY, R.W. 1988. Molecular basis for the isozymes of bovine glucose-6-phosphate isomerase. Arch. Biochem. Biophys. 263: 96-106.
- CONKLE, M.T. 1971b. Isozyme specificity during germination and early growth of knobcone pine. Forest Sci 17:494-498.
- CRUZ, C.D. 2005. Princípios de genética quantitativa. Ed. UFV, Viçosa.
- DEMIR, H., BEYDEMIR, S., CIFTCI, M. & KUFREVIOGLU, O.I. 2004. Purification and properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase from coriander (*Coriandrum sativum*) leaves. J. Food Biochem. 28:155-168.
- DICKO, M.H., GRUPPEN, H., HILHORST, R., VORAGEN, A.G. & VAN BERKEL, W.J. 2006. Biochemical characterization of the major Sorghum grain Peroxidase. FEBS J. 273:2293-2307. Pubmed: 16650004.
- FICKENSCHER, K. & SCHEIBE, R. 1986. Purification and properties of the cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase from pea leaves. Arch. Biochem. Biophys. 247:393-402.

- GOODMAN, M.M., STUBER, C.W., NEWTON, K.J. & WESSINGER, H.H. 1980. Linkage relationships of 19 enzyme loci in maize. *Genetics* 96:697-710.
- GRANGER, A.R., CLARKE, G.R. & JACSON, J.F. 1993. Sweet cherry identification by leaf isozyme polymorphism. *Theor. Appl. Genet* 86:458-464.
- HANSEN, T., SCHLICHTING, B., FELGENDREHER, M. & SCHONHEIT, P., J. 2005. Cupin-type phosphoglucose isomerases (Cupin-PGIs) constitute a novel metal-dependent PGI family representing a convergent line of PGI evolution. *Bacteriol.* 187:1621-1631.
- HARTL, D.L. & CLARK, A.G. 1989. Principles of population genetics. 2^o ed., Sianuer Associates Publishing, Sunderland.
- HIRSCHMANN, G.S. & ARIAS, A.R. 1990. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 29:159-172.
- HIZUKURI, S., TAKEDA, Y. & NIKUNI, Z. 1975. Glucose-6-phosphate isomerase from peas. *Methods Enzymol.* 41b:388-392.
- JAIN, S.K. & BRDSHAW, A.D. 1996. Evolutionary divergence among adjacent population. I. The evidence and its theoretical analysis. *Heredity* 21:407-441.
- KELLEY, W.A. & ADAMS, R.P. 1977. Seasonal variation of isozymes in *Juniperus scopulorum*: systematic significance. *Am. J. Bot.* 64:1092-1096.
- KENERR, L.D. & STAUB, J.E. 1992. Inheritance and linkage relationships of isozyme loci in cucumber (*Cucumis sativus*). *Theor. Appl. Genet.* 84:217-224.
- KEPHART S.R. 1990. Starch-gel electrophoresis of plant isozymes a comparative analysis of techniques. *Am J. Bot.* 77:693-712.

- KVARATSKHELIA, M., WINKEL, C. & THORNELEY, R.N. 1997. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiol.* 114:1237-1245.
- LAI, Y.K., CHANDLEE, J.M., SCANDALIOS, J.G. 1982. Purification and characterization of three non-allelic alcohol dehydrogenase isoenzymes in maize. *Biochim. Biophys. Acta* 706:9-18.
- LEBLOVA, S. & EL AHMAD, M. 1989. Characterization of alcohol dehydrogenase isolated from germinating bean (*Vicia faba*) seeds. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 54:2519-2527.
- LESSIOS, H.A. 1992. Testing eletrophoretic data for agreement with Hardy-Weinberg expectations. *Marine Biology.* 112:517-523.
- LI, C.C. 1988. Pseudo-random mating populations. In celebration of the 80th anniversary of the Hardy-Weinberg law. *Genetics Austin, Tex.* 119:731-737.
- MARZOUKI, S.M., LIMAM, F., SMAALI, M.I., ULBER, R. & MARZOUKI, M.N. 2005. A new thermostable peroxidase from garlic *Allium sativum*: purification, biochemical properties, immobilization, and use in H₂O₂ detection in milk. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 127: 201-214.
- MUSRATI R.A., KOLLÁROVÁ M., MERNIK N. & MIKULÁSOVÁ D. 1998. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *Gen Physiol Biophys.* 17(3):193-210.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70:3321-3323.
- NOLTMANN, E.A. 1972. Aldose-ketose isomerases. *In The Enzymes* (P.D. Boyer, ed.). 3 ed. 6: 271-354.

RAMIREZ, H., CALDERON, A. & ROCCA, W. 1991. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. W. Rocca & L. mroginski, eds.). *In Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. CIAT, Cali, p.825-856.

ROBINSON, I.P. 2006. Aloenzimas na genética de populações de plantas. *In Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos*. (A.C. Alfenas, ed). Ed. UFV, Viçosa, p. 329-380.

SHAW, C.R. & PRASAD, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochem. Gent.* 4:297-320.

SOLTIS, D.E., HAUFLER, C.H., DARROW, D.C., GASTONY, G.J. 1983. Starch gel electrophoresis of fern: a compilation of grind buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *American Ferns Journal*, v.73, n.1, p.9-27.

STRAUSS, S.H. & CONCLE, M.T. 1986. Segregation, linkage, and diversity of isoenzyme in knobcone pine. *Theoretical and Applied Genetics* 72:483-493.

SUN, A.Q., YUKSEL, K., JACOBSON, T.M., GRACY, R.W. 1990. Isolation and characterization of human glucose-6-phosphate isomerase isoforms containing two different size subunits. *Arch. Biochem. Biophys.* 283:120-129.

TEKAMP-OLSON, P., NAJARIAN, R., BURKE, R.L. 1988. The isolation, characterization and nucleotide sequence of the phosphoglucisomerase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 73:153-161.

TIHANYI, K., TALBOT, B., BRZEZINSKI, R., THIRION, J.P. 1989. Purification and characterization of alcohol dehydrogenase from soybean. *Phytochemistry* 28:1335-1338.

TONG, W.F. & LIN, S.W. 1988. Purification and biochemical properties of rice alcohol dehydrogenase. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 29:245-253.

- VALENTI, V., STANGHELLINI, M.A., PUPILLO, P. 1984. Glucose 6-phosphate dehydrogenase isozymes of maize leaves. *Plant Physiol.* 75:521-526.
- WATANABE, L., NASCIMENTO, A.S., ZAMORANO, L.S., SHNYROV, V.L., POLIKARPOV, I. 2007. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of royal palm tree (*Roystonea regia*) Peroxidase. *Acta Crystallogr. Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63:780-783.
- WEEDEN, N.F. & WENDEL, J.F. 1990. Genetics of plant isozymes. *In* *Isozymes in plant biology* (D.E. Soltis & P.S. SOLTIS, eds.). Chapman and Hall, London, p.46-72.
- WORKMAN, P.L. 1969. The analysis of simple genetic polymorphism. *Hum. Biol.* 41:97-114.
- WRIGHT, S. 1951. The general structure of populations. *Ann. Eugen.* 15:323-354.
- WU, L., BRADSHAW, A.D., THURMAN, D.A. 1975. The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants. III. The rapid evolution of copper tolerance in *Agrostis stolonifera*. *Heredity* 34:165-187.
- YAGI, T., SAKO, M., MORIUTI, S., SHOUNAKA, M., MASAKI, K., YAMAMOTO, S. 1993. Purification and characterization of aspartate aminotransferase isoenzymes from rice bran. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57:2074-2080.

4. Artigo II

Variabilidade aloenzimática e caracterização da diversidade genética de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil

Jacqueline Siqueira Glasenapp¹, Vicente Wagner dias Casali¹, Cosme Damião Cruz² Ernane Ronie Martins³ e Priscila Barros Barbosa¹.

1. Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG

2. Departamento de Biologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG

3. Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros – MG

4.1 RESUMO - (Variabilidade aloenzimática e caracterização da diversidade genética de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil). *S. adstringens*, árvore típica do Cerrado, é conhecida por suas propriedades medicinais e tanantes devidas às altas concentrações de compostos fenólicos. Em razão ao ainda incipiente conhecimento genético da espécie, este trabalho teve como objetivo caracterizar a variação genética em *S. adstringens* por meio da utilização de marcadores isoenzimáticos. Foram coletadas sementes em cinco mesorregiões brasileiras, sendo amostrados 627 indivíduos divididos em 16 populações localizadas nos Estados de Minas Gerais e Goiás. Foram testados 14 sistemas isoenzimáticos, destes sete foram polimórficos com o total de 10 locos. A diversidade genética (H) na espécie foi 0,228, a proporção média de locos polimórficos (P) 68,75, o número médio de alelos por loco polimórfico (AP) foi 2,65 e o número efetivo de alelos (A_e) igual a 1,29. O coeficiente de endogamia total foi negativo (-0,114) indicando excesso não significativo de heterozigotos e acasalamento aleatório dentro de populações. O valor da medida de diferenciação genética G_{ST} indica que 92,3% da diversidade genética encontra-se dentro de populações e, 7,7% esta entre populações. Na análise de agrupamento (UPGMA) foram observados dois grupos, o primeiro formado pela população do PE do Rio Preto (MG) e outro formado pelas demais populações. Excluindo a população do PE do Rio Preto das análises, as medidas de diversidade das 15 populações restantes são $H=0,226$, $G_{ST}=0,026$ e $F=-0,122$. Assim, 64% do valor total de G_{ST} observado é devido à variação encontrada entre a PE do Rio Preto e as demais populações. Os valores H e P verificados em *S. adstringens* são consideravelmente altos, sendo compatíveis aos constatados em árvores tropicais comumente distribuídas. Por outro lado, a medida de diferenciação genética G_{ST} (0,077) foi relativamente baixa sendo menor que as encontrados em árvores tropicais nativas e pinheiros de zonas temperadas. Devido à semelhança entre populações avaliadas, o fluxo gênico deve ser alto o suficiente para prevenir a diferenciação, pelo menos em nível local, ou os efeitos de deriva genética (fragmentação), os quais requerem longo intervalo de tempo, ainda não se tornaram evidentes.

Palavras chave: Locos aloenzimáticos, diversidade genética, diferenciação genética, plantas medicinais.

4.2 ABSTRACT – (Alloenzyme variability and characterization of the genetic diversity of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in the southeast and center-west regions of Brazil). The *S. adstringens* is a tree of Brazilian savanna, it is known because its tannin and medicinal effects which are due the phenolic compounds concentration. Because of the genetic unaware about that specie this work aims to characterizes the genetic variation on *S. adstringens* by means isoenzymatic markers. Seeds of 627 individuals from 16 populations in five regions in two states of Brazil were collected. The total of 14 isozymes systems were tested being 7 polymorphic with 10 loci. The genetic diversity (H) was equal to 0.228, the percentage of polymorphic loci (P) was equal to 68.75, the mean number of alleles per polymorphic locus (AP) was equal to 2.65 and the effective number of alleles (A_e) was equal to 1.29. The inbreeding coefficient was negative (-0.114) indicating not significant heterozygous excess and random mating within populations. The coefficient of gene differentiation G_{ST} value indicates that 92.3 percent of genetic diversity is within population and 7.7 percent among populations. According to the UPGMA clustering method, the population of the PE Rio Preto is very different from the others. Excluding the PN Rio Preto population, the genetic diversity measures from the other 15 populations were $H=0.226$, $G_{ST} = 0.026$, and $F=-0.122$. Therefore, 64% of among population genetic diversity was due the variation from PE Rio Preto population. The P and H value in *S. adstringens* were high and are consistent with values of the tropical trees widespread. For the other hand, the coefficient of gene differentiation $G_{ST} = 0.077$ is lower than values of the native tropical trees and temperate pines. The very low levels of genetic diversity means that gene flow may be quite high among populations to prevent genetic differentiation, at least in the local level, or because it require long period the genetic drift effects still not evident.

Key word: Alloenzymatic loci, genetic diversity, genetic differentiation, medicinal plants.

4.3 Introdução

O *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae), árvore do Cerrado conhecida popularmente como “barbatimão”, tem ampla distribuição geográfica. Ocorre, principalmente, no cerrado típico, campo-sujo e cerradão, desde o Pará, Planalto Central, Minas Gerais, até São Paulo (Felfili *et al.* 1999). A casca do barbatimão é conhecida por suas propriedades medicinais e tanantes, as quais são devidas a altas concentrações de compostos fenólicos (Panizza *et al.* 1988, Melo *et al.* 1996a, Melo *et al.* 1996a, Teixeira *et al.* 1990). Atualmente, o desmatamento vem reduzindo drasticamente as áreas cobertas por Cerrado e, conseqüentemente, por *S. adstringens*. Além disso, a prática tradicional da extração da casca é feita sem nenhum critério, muitas vezes, causando a morte dos indivíduos

Muitos pesquisadores têm sugerido que o entendimento da variação genética é pré-requisito crucial na tomada de decisões quanto a estratégias de conservação e manejo de árvores tropicais nativas. Porém, até o momento somente pequena parte da diversidade genética de árvores tropicais tem sido investigada de forma extensiva. (Bawa 1976, Gilbert 1980, Whitmore 1980, Hamrick 1983, Namkoong 1986, Bawa & Ashton 1991). Como a estrutura populacional de uma espécie é composta por um número variado de populações locais, a estrutura genética deve ser caracterizada não somente em termos de cada população, mas também, em relação às diferenças entre populações. A utilização de técnicas isoenzimáticas pode aumentar grandemente o entendimento sobre a organização genética de espécies tropicais. Os dados eletroforéticos podem ser obtidos a partir de praticamente qualquer espécie sem conhecimento prévio do genoma (Alfenas *et al.*, 2006), portanto são ideais na caracterização da estrutura genética de populações naturais de plantas tropicais. Assim, diante da necessidade do estabelecimento de políticas voltadas ao manejo e conservação e, do incipiente conhecimento de sua estrutura genética populacional, este trabalho teve como objetivo caracterizar a variação genética em *S. adstringens* por meio da utilização de marcadores isoenzimáticos.

4.4 Material e Métodos

4.4.1 *Procedimentos e locais de amostragem*

As coletas foram realizadas nos meses setembro a novembro de 2009 e abrangeram cinco mesorregiões (IBGE) brasileiras, a primeira no estado de Goiás e, as outras no Estado de Minas Gerais. Foi amostrado o total de 627 indivíduos divididos em 16 populações, 15 em Minas Gerais e uma em Goiás (Tabela 1). As amostras consistiram de cinco frutos maduros por indivíduo (planta), e foram obtidas por meio de transectos realizados no meio da mata, na maioria das vezes a pé, ou quando possível, de carro. Foi observado o espaçamento médio de 60 m entre indivíduos. Os frutos foram embalados em sacos de papel, devidamente etiquetados, e assim mantidos até a chegada ao Laboratório de Melhoramento de Hortaliças da UFV. Como todas as populações foram acessadas de carro foram observadas ao longo do percurso as condições da mata nativa.

Na Mesorregião do Jequitinhonha, as populações do Parque Estadual (PE) do Biribiri, Parque Estadual do Rio Preto e Parque Nacional (PN) das Sempre Vivas foram amostradas na região de Diamantina. Esta região possui solos rasos, arenosos, pedregosos, ácidos e clima ameno. A vegetação encontra-se bem conservada, provavelmente devido ao fato de os solos não serem propícios a agropecuária (IBGE, 1997). Na microrregião de Capelinha foram amostradas as populações de Turmalina, Carbonita e Poço D'anta. Esta microrregião encontra-se extremamente desmatada e possui extensas plantações de eucalipto. Com exceção de Poço D'anta, propriedade particular com vegetação bem preservada, as coletas foram realizadas na margem das rodovias, em áreas pertencentes ao DNIT (Departamento Nacional de Infra-Estrutura de Transportes) ou, ao DER/MG (Departamento de Estradas de Rodagem de Minas Gerais).

Na Mesorregião Norte de Minas foram amostradas as populações de Pirapora, Brasília de Minas, Serra Nova e Montes Claros. Na região de Brasília de Minas foram observadas extensas áreas, recentemente desmatadas, onde havia grandes populações de Barbatimão, segundo informação de nativos. A coleta foi realizada na vegetação natural pertencente à pista de pouso do município. A mesorregião Norte Mineira apresenta

características físicas muito semelhantes à parte da região Nordeste do Brasil. O clima é semi-árido com temperaturas elevadas, as chuvas são concentradas em poucos meses do ano, intercaladas por períodos longos de seca (Costa *et al.* 2010).

Na Mesorregião do Distrito Federal as coletas foram procedidas na Fazenda Água Limpa (FAL), pertencente à Universidade de Brasília (UnB), inserida na Área de Proteção Ambiental - APA das Bacias do Gama e Cabeça do Veado. No percurso entre Patos de Minas e o Distrito Federal (BR 040) a vegetação típica do Cerrado não foi observada se não em poucos locais, na maioria das vezes nas áreas do DNIT às margens da rodovia, quando não desmatadas pelos produtores e utilizadas em plantios.

Na Mesorregião do Alto Paranaíba, na microrregião de Patos de Minas, foi amostrada a população Patos de Minas. A vegetação típica é o “cerradão” e, também, encontra-se em grande parte confinado às áreas de domínio das estradas. O clima é caracterizado como tropical, com verão quente e úmido e inverno seco com temperaturas amenas (MELLO, 2008).

Na Mesorregião Central foi amostrada a população de São Gonçalo do Rio das Pedras, pertencente à microrregião Conceição do Mato Dentro situada na região central da Serra do Espinhaço. São Gonçalo do Rio das Pedras possui vegetação típica de Cerrado de altitude e encontra-se bem preservada (IBGE 2008).

Tabela 1. Regiões, altitude e clima das populações de *S. adstringens* amostradas (11/09).

População	Região	Altitude (m)	Clima*
PE Biribiri	Jequitinhonha	1.173	Altitude
PE Rio Preto	Jequitinhonha	869	Estacional
PN Sempre Vivas	Jequitinhonha	1.305	Semi-úmido
Riacho da Porta	Jequitinhonha	816	Semi-úmido a semi-árido
Turmalina	Jequitinhonha	782	Semi-úmido a semi-árido
Carbonita	Jequitinhonha	890	Sub-tropical úmido e sub-úmido
Poço D'anta	Jequitinhonha	786	Semi-úmido a semi-árido
Araçuaí	Jequitinhonha	792	Semi-árido
Pirapora	Norte de Minas	877	Semi-árido
Brasília de Minas	Norte de Minas	904	Semi-árido
Montes Claros	Norte de Minas	849	Semi-árido
Coração de Jesus	Norte de Minas	867	Semi-árido
Serra Nova	Norte de Minas	963	Semi-árido
S. G. Rio das Pedras	Central	1.061	Altitude
Patos de Minas	Alto Paranaíba	834	Altitude
FAL (GO)	Distrito Federal	1.086	Semi-úmido

PN=Parque Nacional, PE=Parque Estadual, *Tropical

4.4.2 Extração aloenzimática e corrida eletroforética

Os dados isoenzimáticos foram obtidos por meio da técnica de eletroforese em gel de amido, em plântulas crescidas de sementes germinadas em câmara de crescimento por três dias. Com o intuito de causar o rompimento ou abrasão do tegumento da semente e torná-lo permeável de modo a permitir a germinação, três sementes de cada indivíduo amostrado foram escarificadas por método mecânico, utilizando-se lixa para unhas. Na extração isoenzimática uma plântula de cada indivíduo foi macerada em almofariz e, a proporção de 1 g do macerado de cada plântula foi adicionado a cada 3 mL da solução extratora nº 1 recomendada por Alfenas *et al.* (2006). Os géis foram preparados com 12 g de sacarose e 60 g de amido por 500 mL de solução-tampão do gel. Foram utilizados os sistemas tampão sugeridos por Soltis *et al.* (1983) e por Shaw e Prasad (1970), descritos na Tabela 2 como A e B, respectivamente. A pré-corrida foi conduzida a 15 mA e durou 30 min. com o tampão A e 1h com o tampão B. A corrida propriamente dita foi realizada a 35 mA e durou cerca de 5h. Os sistemas aloenzimáticos analisados e a composição dos sistemas tampão eletrodo/gel estão esboçados na Tabela 2.

Tabela 2. Sistemas enzimáticos e composição dos tampões utilizados nas corridas eletroforéticas de plântulas de *Stryphnodendron adstringens*.

Enzima	Abreviação	E.C.no.	Tampões eletrodo/gel*
Álcool desidrogenase	ADH	1.1.1.1	B
Esterase	EST	3.1.1.1	A
Fosfatase ácida	ACP	3.1.3.2	A
Fosfoglucomutase	PGM	5.4.2.2	A
Fosfogluco isomerase	PGI	5.3.1.9	A
Glicerato-2-desidrogenase	G2D	1.1.1.29	A
Glucose desidrogenase	GDH	1.1.1.47	A
Glucose-6-fosfato desidrogenase	G6PDH	1.1.1.49	A
Glutamato oxaloacetato transaminase	GOT	2.6.1.1	A
Isocitrato desidrogenase	IDH	1.1.1.42	B
Lucina aminopeptidase	LAP	3.4.11.1	A
Malato desidrogenase	MDH	1.1.1.37	B
Peroxidase	PER	1.11.1.7	A
Xiquimato desidrogenase	SKDH	1.1.1.25	B

* Tampões eletrodo/gel:

A – eletrodo: 4,0 g.L⁻¹ NaOH, 18,55 g.L⁻¹ ácido bórico, pH 8,6 / gel: diluir 40mL.L⁻¹ solução do eletrodo, 1,84 g.L⁻¹ Tris, 0,69 g.L⁻¹ ácido cítrico, pH 7,8.

B – eletrodo: Tris 16,35 g.L⁻¹, 9,04 g.L⁻¹ ácido cítrico, pH 7,0 / gel: diluir 66,7 mL.L⁻¹ solução do eletrodo, pH 7,0.

4.4.3 Análise dos zimogramas

Na análise dos zimogramas os locos aloenzimáticos foram identificados com as mesmas abreviações utilizadas na designação de cada enzima (ex. MDH), porém com letras minúsculas e itálicas, seguidas por ordenação numérica crescente a partir do loco de migração mais lenta (ex. *mdh-1*). Os alelos em cada loco foram ordenados alfabeticamente, sendo o alelo de migração mais rápida identificado com a letra *a* e os de migração mais lenta seguindo a ordem.

4.4.4 *Análise estatística*

Seguindo orientações de Berg & Hamrick (1997) em cada população os locos que mostraram variação em pelo menos um indivíduo foram considerados polimórficos. A variação genética populacional foi mensurada pela proporção de locos polimórficos (P), pelo número médio de alelos por loco polimórfico (AP), pelo número efetivo de alelos (A_e) por loco, pela diversidade genética (H) e pelo índice de fixação (F). Quanto a população total (considerando todas as populações como uma só) foram estimadas as médias destes parâmetros e o coeficiente de diferenciação genética G_{ST} de Nei (1973). A análise de agrupamento foi procedida por meio da técnica UPGMA sendo utilizada a matriz de diversidade genética F_{ST} . Nas análises estatísticas foram utilizados os aplicativos computacionais em genética e estatística GENES (versão 1.0.0) e Fstat (versão 2.9.3.2).

4.5 Resultados e Discussão

4.5.1 *Madureza dos frutos*

Durante as coletas não foi constatado nenhum padrão cronológico na maturação dos frutos entre populações. Ocorreram muitas vezes na mesma região, populações onde os frutos estavam completamente maduros, caídos, encobertos pela vegetação, assim como populações onde ainda podiam-se encontrar alguns frutos verdes nas árvores.

4.5.2 Resolução dos padrões de bandas

Os sistemas enzimáticos PGM, G2D, G6PDH, GDH, PER e ACP não foram suficientemente resolvidos e/ou não foi possível formular hipótese genética plausível quanto ao padrão de bandas observado. O sistema enzimático LAP foi monomórfico sendo evidente uma única banda nos 627 indivíduos analisados. Os sistemas EST, MDH, PGI, ADH, SKDH, IDH e GOT foram polimórficos e bem resolvidos, possibilitando a estimativa das medidas de diversidade genética.

4.5.3 Sistemas enzimáticos polimórficos

4.5.3.1 Esterase:

Nos géis EST foram aparentes três regiões de atividade (Tabela 3). Em cada região anodal e intermediária foi observado padrão monomérico com um loco e três alelos (*est-3* e *est-4*). Na região catodal foram verificados dois locos (*est-1* e *est-2*) com dois alelos cada (Fig. 1). Esterase é um dos sistemas enzimáticos mais polimórficos em plantas (Weeden & Wendel 1990) sendo as variantes destas enzimas encontradas, geralmente, monoméricas ou diméricas (Brune *et al.* 2006).

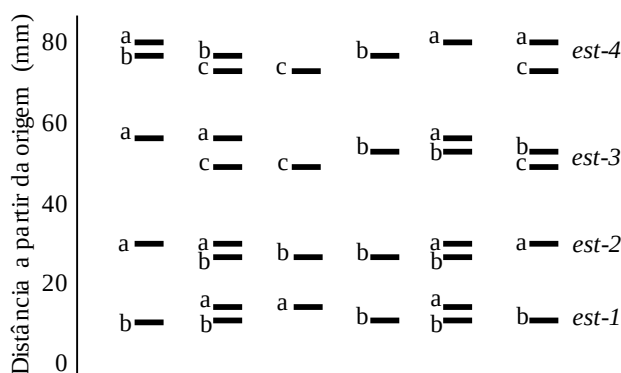


Figura 1: Representação diagramática dos padrões de bandas da enzima EST em *Stryphnodendron adstringens*. Letras minúsculas representam alelos que compoem genótipos.

Tabela 3: Regiões de atividade, número de locos, número de alelos por loco, estruturas quaternárias observadas em *Stryphnodendron adstringens* e, estruturas quaternárias registradas na bibliografia consultada.

Enzima	Regiões de atividade	Nº. de locos	Nº. de alelos por loco	Estrutura quaternária observada	Estrutura quaternária registrada*
MDH	3	5	1-3	dimérica	dimérica/tetramérica
PGI	2	2	1-2	dimérica	dimérica
IDH	1	1	5	dimérica	dimérica/oligomérica
GOT	2	3	1-3	dimérica	dimérica
EST	3	4	2-3	monomérica	monomérica/dimérica
ADH	1	-	2	dimérica	dimérica/tetramérica
SKDH	1	1	3	monomérica	-

*Brune *et al.* 2006.

4.5.3.2 Malato desidrogenase:

Nos géis MDH foram evidentes três regiões de atividade (Tabela 3). Apesar das regiões catodal e anodal serem controladas por um loco cada, estes não foram analisados devido à má resolução do padrão de bandas. A região intermediária é constituída por três locos, dois monomórficos (*mdh-2* e *mdh-3*) e, um polimórfico (*mdh-4*). Sendo assim, somente o loco *mdh-4*, onde foi observado o padrão de enzima dimérica e três alelos, foi considerado nas análises estatísticas (Fig. 2). Brune *et al.* (2006) descrevem MDH como composta por 2 ou 4 subunidades sendo, comumente, observados dois ou mais locos envolvidos na expressão destas isoenzimas (Tabela 3).

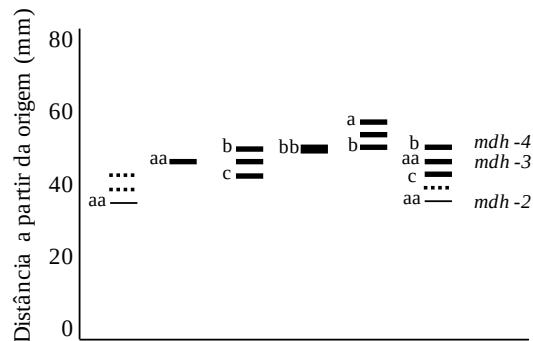


Figura 2: Representação diagramática dos padrões de bandas da enzima MDH em *Stryphnodendron adstringens*. Letras minúsculas representam alelos que compoem genótipos.

4.5.3.3 Fosfogluco isomerase:

Foram observadas duas regiões de atividade nos géis PGI controladas por um loco e dois alelos cada (Tabela 3). O Loco *pgi-2* foi polimórfico e teve padrão de bandas monomérico. No loco *pgi-1* foi observada estrutura quaternária dimérica e dois alelos (Fig. 3). Apesar do padrão monomérico já ter sido constatado em microorganismos como *Archaeoglobus fulgidus* e *Methanosarcina mazei* (Hansen *et al.* 2005), PGI é normalmente dimérica (Brune *et al.* 2006), portanto, as estimativas de diversidade genética só foram mensuradas quanto ao loco *pgi-1*.

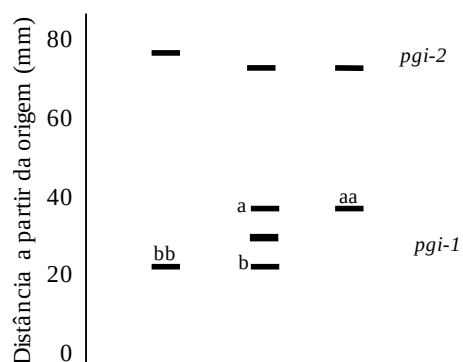


Figura 3: Representação diagramática do padrão de bandas da enzima PGI em *Stryphnodendron adstringens*. Letras minúsculas representam alelos que compoem genótipos.

4.5.3.4 Álcool desidrogenase:

Nos géis ADH foi verificada uma região de atividade com padrão complexo de três bandas fixadas (Tabela 3). Provavelmente há sobreposição de locos na região, pois, o padrão de bandas triplex observado não é devido à associação de bandas híbridas em indivíduos heterozigotos. A intensidade de cor e a espessura das bandas formadas dependem da frequência em que são encontradas as diferentes formas da enzima, a coloração da banda intermediária em uma isoenzima dimérica é mais intensa e espessa devido à maior concentração enzimática da mesma (Alfenas *et al.* 2006), o que não foi observado nos géis ADH. Considerando somente a banda de migração mais lenta foi verificado um loco (*adh-1*) e dois alelos (Fig. 4).

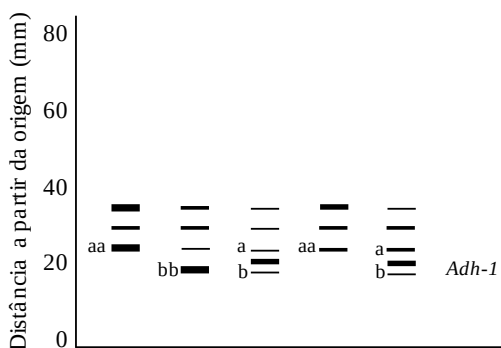


Figura 4: Representação diagramática do padrão de bandas da enzima ADH em *Stryphnodendron adstringens*. Letras minúsculas representam alelos que compoem genótipos.

4.5.3.5 Xiquimato desidrogenase:

Nos géis SKDH foi observada uma única região de atividade representada por um loco, três alelos e estrutura quaternária monomérica (Fig. 5) (Tabela 3). O alelo de migração mais rápida (*a*) foi exclusivo da população de São Gonçalo do Rio das Pedras. Nos poucos organismos em que esta isoenzima foi estudada foram constatadas estruturas quaternárias monoméricas e diméricas. Em *Escherichia coli* foram observados estes dois tipos estruturais (Chaudhuri & Coggins 1985, Maclean *et al.* 2000).

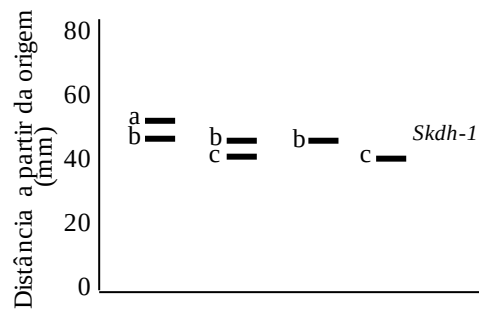


Figura 5: Representação diagramática dos padrões de bandas da enzima SKDH em *Stryphnodendron adstringens*. Letras minúsculas representam alelos que compoem genótipos.

4.5.3.6 Isocitrato desidrogenase:

Nos géis IDH foi observada uma zona de atividade controlada por um loco (*idh-1*) e 5 alelos (Tabela 3). Foi visível o padrão dimérico entre os produtos de todos os alelos exceto entre *bc* e *cd*, provavelmente devido ao fato de que as distâncias de migração entre estes alelos foram muito próximas, fazendo com que os heterozigotos aparecessem no gel como uma única banda, espessa e intensamente corada (Fig. 6). IDH é muito estudada em fungos e animais sendo normalmente dimérica ou oligomérica (Brune *et al.* 2006).

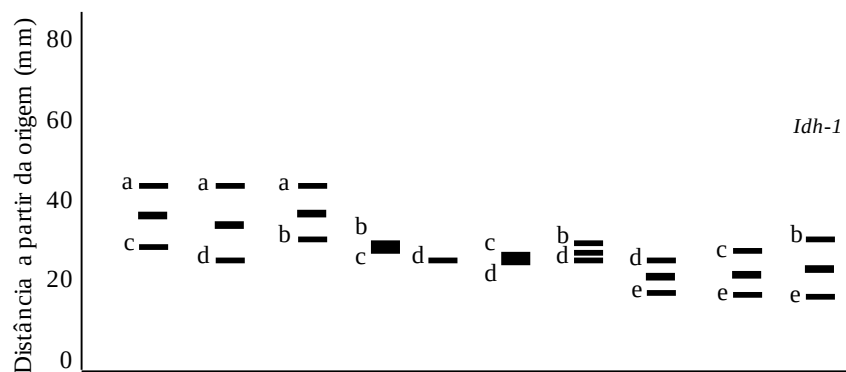


Figura 6: Representação diagramática dos padrões de bandas heterozigoto da enzima IDH em *Stryphnodendron adstringens*. Letras minúsculas representam alelos que compoem genótipos.

4.5.3.7 Glutamato oxaloacetato transaminase:

GOT teve duas zonas de atividade (Tabela 3), a região anodal mostrou o padrão de duas bandas fixadas. Na região catodal foi evidente um loco (*got-1*), dois alelos e padrão de bandas dimérica (Fig. 7). As isoenzimas GOT têm padrão dimérico reconhecido em plantas (Kephart 1990).

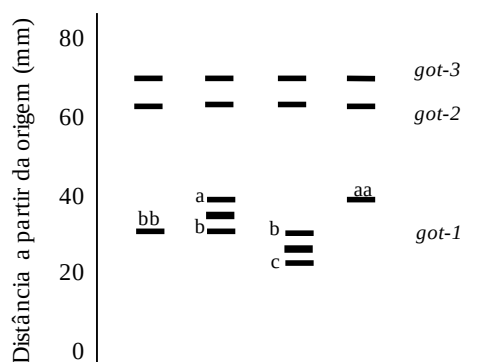


Figura 7: Representação diagramática do padrão de bandas da enzima GOT em *Stryphnodendron adstringens*. Letras minúsculas representam alelos que compoem genótipos.

4.5.4 Medidas de diversidade genética

Os valores dos parâmetros de diversidade genética mensurados em cada população são representados na Tabela 4. A proporção de locos polimórficos (P) variou entre 60% e 80%. O número médio de alelos por loco polimórfico (AP) foi maior na população de Brasília de Minas (3,00) e menor em Poço D'anta (2,37). Foi verificado excesso de heterozigotos (F negativo) em todas as populações variando entre -0,16 no P.N. das Sempre Vivas a -0,229 na população de Riacho da Porta. Como pode ser observado nas populações do PE do Rio Preto e Coração de Jesus, A_e e H são positivamente correlacionados. O índice de diversidade genética (H) e o número efetivo de alelos (A_e) variaram de 0,1820 e 1,22 na população de Coração de Jesus e, 0,2698 a 1,40 no PE do Rio Preto, respectivamente. O número efetivo de alelos A_e mede o número de alelos e a uniformidade das frequências alélicas em um loco. Mais precisamente A_e mede a uniformidade dos alelos mais comuns, pois alelos raros contribuem pouco na soma (Berg & Hamrick 1997).

Tabela 4. Parâmetros genéticos estimados nas 16 populações amostradas de *S. adstringens*.

População	n	H	P	AP	A_e	F
São G. do Rio das Pedras	40	0,2491	80	2,87	1,33	-0,145
Carbonita	41	0,2100	60	2,83	1,26	-0,091
Serra Nova	34	0,2306	60	2,67	1,30	-0,123
Patos de Minas	22	0,2134	60	2,50	1,27	-0,039
FAL	62	0,2656	80	2,62	1,36	-0,106
P.N. das Sempre Vivas	34	0,2167	60	2,67	1,28	-0,016
Brasília de Minas	33	0,2135	60	3,00	1,27	-0,126
Riacho da Porta	37	0,2209	70	2,71	1,28	-0,229
Araçuaí	31	0,2292	60	2,67	1,30	-0,126
Coração de Jesus	42	0,1820	70	2,57	1,22	-0,133
Turmalina	32	0,2262	80	2,50	1,29	-0,031
P. E. do Biribiri	37	0,2554	80	2,62	1,34	-0,136
Pirapora	42	0,1973	70	2,71	1,24	-0,166
Montes Claros	44	0,1913	60	2,67	1,24	-0,199
Poço D'anta	33	0,2398	80	2,37	1,30	-0,169
P.E. do Rio Preto	63	0,2698	70	2,43	1,40	-0,019

Os valores médios dos parâmetros de diversidade genética calculados para população total (agrupando as 16 populações) são medidas de informação genética na espécie (Tabela 5). Assim, a diversidade genética média de *S. adstringens* (H) foi 0,228, a proporção média de locos polimórficos (P) foi 68,75, o número médio de alelos por loco polimórfico (AP) foi 2,65 e o número efetivo de alelos (A_e) igual a 1,29. Valores médios de A_e tipicamente encontram-se entre 1,1 e 1,4 embora valores mais altos possam ser observados em espécies altamente polimórficas (Berg & Hamrick 1997). O coeficiente de endogamia total foi negativo (-0,114) indicando excesso não significativo de heterozigotos e acasalamento aleatório dentro de populações. A medida de diferenciação genética G_{ST} indica que 92,3% da diversidade genética encontra-se dentro de populações, enquanto 7,7% estão entre populações.

Tabela 5. Valores médios dos parâmetros de diversidade genética estimados para *S. adstringens*.

	H	P	AP	A_e	F	G_{ST}
	0,226	68,75	2,65	1,29	-0,114	0,077
CV (%)	11,30	12,87	6,11	3,63		

De modo geral espécies mais amplamente distribuídas mostram mais variação genética que localmente distribuídas. Os valores de variação genética de árvores tropicais nativas são consistentes com os valores verificados em plantas de todos os tipos, incluindo tropicais de todos os tipos (Tabela 6) (Hamrick *et al.*, 1979, Hamrick *et al.*, 1981, Hamrick & Godt, 1989). Em 1992, Loveless verificou que espécies de árvores tropicais regionalmente distribuídas (ao longo de determinada faixa geográfica ou em grande parte do continente) tiveram $P=36$ e $H=0,204$, enquanto espécies nativas (amostradas a partir de indivíduos em seu habitat natural) tiveram $P=39$ e $H=0,129$ (Tabela 6). Hamrick e Murawski (1991) compararam níveis de variação genética entre espécies de árvores tropicais raramente e comumente distribuídas no Panamá. Os valores de $P=42,1$ e $H=0,142$ em espécies de árvores tropicais raramente distribuídas foram significativamente menores, do que em espécies comumente distribuídas $P=60,9$ e $H=0,211$.

Tabela 6. Variação genética em árvores e espécies tropicais incluindo herbáceas e plantas de todos os tipos.

Espécies	H	P	G_{ST}
Árvores tropicais nativas	0,129	39	0,109
Árvores tropicais regionais	0,204	36	
Árvores tropicais raramente distribuídas	0,142	42,1	
Árvores tropicais comumente distribuídas	0,211	60,9	
Plantas tropicais de todos os tipos	0,109	32,7	
Plantas de todos os tipos	0,113	34,2	

Fonte: Loveless, 1992.

Os valores H (0,228) e P (68,7) verificados em *S. adstringens* são consideravelmente altos e compatíveis com os encontrados em árvores tropicais regionais e comumente distribuídas (Tabela 6). Por outro lado, o valor de G_{ST} (0,077) verificado foi relativamente baixo sendo menor que o de árvores tropicais nativas, porém, maior que o de pinheiros de zonas temperadas, os quais possuem populações grandes e contínuas. Em geral populações de plantas altamente subdivididas têm valores G_{ST} de 0,20 ou mais, enquanto pinheiros de zonas temperadas, os quais possuem populações grandes e contínuas, tendem a ter valores G_{ST} de 0,05 ou menos (Loveless & Hamrick, 1984, Hamrick & Godt, 1989).

Hamrick & Murawski (1990) sugerem que a unidade reprodutiva das espécies de árvores tropicais de ocorrência comum é 25 a 50 ha. Em espécies raras e amplamente dispersas é necessária área muito maior, de modo a incluir indivíduos que compartilham o mesmo conjunto gênico e preservar a integridade do polinizador e populações de dispersores de sementes dos quais tais táxons dependem (Gilbert 1980, Howe 1989, Bawa & Ashton 1991).

Schoen & Brown (1991) demonstraram que espécies com alta variação interpopulacional nas frequências alélicas (alto G_{ST}) também são mais prováveis de ter considerável heterogeneidade nos valores P e H . Assim espécies autógamas, as quais geralmente possuem altos valores G_{ST} , tipicamente possuem baixos níveis de diversidade genética na maioria de suas populações com poucas tendo valores elevados de P e H . Populações de espécies alógamas, geralmente com baixos valores G_{ST} , têm menos variação em seus valores P e H entre populações.

4.5.5 Análise de agrupamento

Na figura 8, pelo método de agrupamento UPGMA, podem ser observados dois grupos, o primeiro formado pela população do PE do Rio Preto, o segundo formado pelas demais populações. Se excluía a população do PE do Rio Preto das análises, as medidas de diversidade das 15 populações restantes são $H=0,226$, $G_{ST}=0,026$ e $F=-0,122$. Os parâmetros H (0,226) e F (-0,114), estimados para as 16 populações, praticamente não mudam, enquanto G_{ST} é drasticamente reduzido de 0,077 para 0,026. Assim, 64% do valor total de G_{ST} em *S. adstringens* são devidos à variação entre a população do PE do Rio Preto e as demais populações. A diferenciação da população do PE do Rio Preto se deve essencialmente aos locos *pgi-1* e *idh-1*, no loco *pgi-1* o alelo mais frequente foi o alelo *pgi-1a* (Figura 3), ao contrário das outras populações onde o alelo mais frequente foi *pgi-1b*. No loco *idh-1* não foram observados indivíduos portadores dos alelos *idh-1d* e *idh-1e* (Figura 6), sendo os mesmos observados em indivíduos de todas as outras populações.

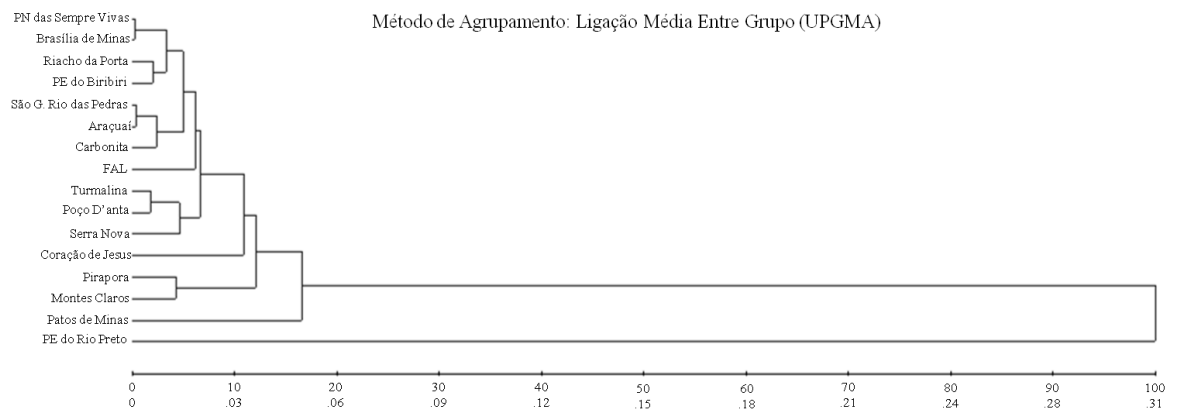


Figura 8: Dendrograma UPGMA obtido por meio da matriz de diversidade genética (F_{ST}) entre pares de populações de *S. adstringens*. A primeira linha no eixo das abscissas corresponde aos valores percentuais em relação a dissimilaridade do último nível de fusão (0.31).

De acordo com o resultado obtido pelo método de agrupamento (Fig.8), as populações de *S. adstringens* são muito semelhantes entre si. Dentro do segundo grupo, considerando o corte a apenas 10% de dissimilaridade são formados quatro subgrupos: o primeiro composto pela população de Patos de Minas, o segundo pelas populações de Montes Claros e Pirapora, o terceiro por Coração de Jesus, e o quarto e ultimo subgrupo, composto pelas demais populações.

4.6 Conclusões

O valor G_{ST} em *S. adstringens* é consideravelmente menor quando excluída a população do PE do Rio Preto (0,026). Assim, os mesmos processos evolutivos parecem atuar em todas as populações de *S. adstringens*, de modo a torná-las consideravelmente semelhantes, com exceção PE do Rio Preto.

As medidas de diversidade genética em *S. adstringens* são consistentes com as observadas em árvores tropicais com as mesmas características de distribuição. Porém, quando excluída a população Rio Preto o valor G_{ST} é menor que o encontrado em pinheiros de zonas temperadas que possuem grandes populações contínuas e, caracteristicamente baixos valores G_{ST} . Assim pode ser concluído que a diversidade genética de *S. adstringens* é relativamente alta dentro de populações e relativamente baixa entre populações e, que o fluxo gênico é alto o suficiente para prevenir a diferenciação, pelo menos em nível local.

É de grande importância a preservação das áreas públicas às margens das rodovias, pois em muitas regiões são a única fonte de germoplasma das espécies do Cerrado. Faz-se necessária a fiscalização e intervenção governamental de modo que estas áreas não sejam desmatadas como observado no Estado de Goiás.

Na construção de bancos de germoplasma ou em programas de plantio de *S. adstringens*, a escolha apropriada dos sítios de coleta pode ser tomada com base nas informações sobre o padrão de diferenciação genética. Na coleta do germoplasma seria ideal a amostragem de pelo menos uma população em cada um dos grupos formados (Figura 8), com atenção especial á população do PE do Rio Preto, devido á acentuada diferenciação genética.

O bom entendimento da estrutura e comportamento reprodutivo destas populações (ainda muito incipiente) é de extrema importância na interpretação dos processos evolutivos locais, pois os padrões de distribuição da variação genética estão correlacionados ao sistema reprodutivo e à distribuição das sementes. Além do mais, estas informações poderiam contribuir no entendimento dos fatores que levaram a maior diferenciação da população do PE do Rio Preto.

4.7 Agradecimentos

A Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e pelas bolsas de Doutorado e Iniciação Científica. Ao Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pelo apoio logístico, ao laboratorista Francisco Glicério Ribeiro, ao Instituto Estadual de Florestas (IEF).

4.8 Bibliografia

ALFENAS, A.C., DUSI, A., ZERBINI JÚNIOR, F.M., ROBINSON, I.P., MICALES, J.A., de OLIVEIRA, J.R., DIAS, L.A.S., SCORTICHINI, M, PEREIRA, M.C.B., BONDE, R.B., de ALONSO, S.K., JUNGHANS, T.G. e BRUNE, W. (*in memoriam*) 2006. Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos. 2 ed, Ed. UFV, Viçosa.

COSTA, D.S.M., RUAS, K.F., PEREIRA, A.M. 2010. As potencialidades da região semiárida do norte de Minas Gerais: Análise do Centro de Estudos de Convivência com o Semiárido. Departamento de Geociências, Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes). Anais XVI Encontro Nacional de Geógrafos, 2010, Porto Alegre – RS.

BAWA, K.S & ASHTON, P.S. 1991. Conservation of rare trees in tropical rain forests: a genetic perspective. Pp. 62-71. In: Falk, d. and Holsinger, k. (Eds). *Biology of Rare Plants: Implications for Conservation and Management*. Oxford University Press, London.

BAWA, K.S 1976. Breeding of tropical hardwoods: an evaluation of underline bases, current status and feature prospects. pp-43-59. In Burley, J. and Styles, B.T. (Eds). Tropical Trees: Variation, Breeding and Conservation. Academic Press, London.

BERG, E.E. & HAMRICK, J.L. 1997. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. Can. J. For. Res. 27:415-424.

BRUNE, W., ALFENAS, A.C., JUNGHANS, T.G. 2006. Identificações específicas de enzimas em géis. In Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos (A.C. Alfenas, ed). Ed. UFV, Viçosa, p. 202-328.

CHAUDHURI, S. & COGGINS, J.R. 1985. The purification of shikimate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Biochem. J. 226, 217-223.

FELFILI, J. M., JUNIOR, M.C.S., DIAS, B. J., RESENDE, A. V. 1999. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado sensu stricto da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. Revista Brasileira de Botânica. v. 22, n. 1,p. 83-90.

FELFILI, J.M. e BORGES FILHO, H.C. 2004. Extrativismo Racional da Casca de Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. Universidade de Brasília, Departamento de Engenharia Florestal. 32p.

GILBERT, L.E. 1980. Food web organization and the conservation of neotropical diversity. Pp. 11-33. In. Soulé, M.E. and Wilcox, B.A. (Eds). Conservation Biology: An Evolutionary Ecological Perspective. Sinauer Associates. Inc. Sunderland, M.A.

HAMRICK, J.L., LINHART, Y.B. and MITTON, J.B. 1979. Relationships between life history characteristics and eletrophoretically detectable genetic variation in plants. Ann. Rev. Ecol. Syst. 10:173-200.

HAMRICK, J.L., MITTON, J.B. and LINHART, Y.B. 1981. Levels of genetic variation in trees: influence life history characteristics. Pp. 35-41. In: Conkle, M.T. (Ed). Isozymes of

North American Forests Trees and Forest Insects. USDA Forest Serv., Pac. Southwest Forest and Range Exp. Sta., Berkeley, CA, Gen. Tech. Rep. PSW-48.

HAMRICK, J.L. 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. Pp.335-348. In: Schonewald-Cox, C.M., Chambers, S.M., MacBryde, B. and Thomas, L. (Eds). Genetic and Conservation. Benjamin Cummings. Menlo Park, CA.

HAMRICK, J. L. and GODT M. J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. pp 43-63 In Brown, A. H. D., M. T. Clegg, A. L. Kahler and B. S. Weir (eds), Plant Population Genetics, Breeding and Germplasm Resources. Sinauer, Sunderland, Mass.

HAMRICK, J.L. & MURAWSKI, D.A. 1990. The breeding structure of tropical tree populations. *Plant Species Biology*. 5:157-165.

HAMRICK, J.L. & MURAWSKI, D.A. 1991. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon neotropical tree species. *Jour. Tropical Ecology*. 7:395-399.

HANSEN, T., SCHLICHTING, B., FELGENDREHER, M., SCHONHEIT, P., J. 2005. Cupin-type phosphoglucose isomerases (Cupin-PGIs) constitute a novel metal-dependent PGI family representing a convergent line of PGI evolution. *Bacteriol*. 187:1621-1631.

HOWE, H.F. 1989. Scatter and clump dispersal and seeding demography: hypothesis and implications. *Oecologia*. 79:417-426.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diagnóstico ambiental da bacia do Rio Jequitinhonha: diretrizes gerais para a ordenação territorial. Salvador 1997, IBGE.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Divisão Territorial do Brasil e Limites Territoriais (2008). www.ibge.gov.br.

KEPHART S.R. 1990. Starch-gel electrophoresis of plant isozymes a comparative analysis of techniques. *Am J. Bot*. 77:693-712.

LOVELESS, M.D. & HAMRICK, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant population. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95.

LOVELESS, M.D. 1992. Isozyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization. *New Forests.* 6:67-94.

MACLEAN J., CAMPBELL S.A., POLLOCK K., CHACKREWARTHY S., COGGINS, J.R., LAPHORN, A.J. 2000. Crystallization and preliminary X-ray analysis of shikimate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr. Sect. D* 56, 512-515.

MELLO, J.C.P., PETEREIT F., NAHRSTEDT, A., 1996a. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry.* 41: 807-813.

MELLO, A.O., 2008. Patos de Minas, meu bem querer. 3. ed. Patos de Minas: Edição Prefeitura. Municipal/SEMED, 2008.

NAMKOONG, G. 1986. Genetic and forests of the future. *Unasylva.* 38:2-18.

NEI M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70:3321-3323.

PANIZZA, S., ROCHA, A.B., GRECCHI, R., SILVA R.A.P., de S., 1988. *Stryphnodendron barbatiman* (Veloze) Martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. *Revista de Ciência Farmacêutica* 10: 101-106.

SCHOEN, D.J. & BROWN, A.H.D. 1991. Intraspecific variation in population gene diversity and effective population size correlates with the mating system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 4494-4497.

SHAW, C.R. & PRASAD, R. 1970, Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochem. Gent.* 4:297-320.

SOLTIS, D.E., HAUFLER, C.H., DARROW, D.C., GASTONY, G.J. 1983. Starch gel electrophoresis of fern: a compilation of grind buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *American Ferns Journal*, v.73, n.1, p.9-27.

TEIXEIRA, M.L., SOARES, A.R., SCOLFORO, J.R.S., 1990. Variação do teor de tanino da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringes* (Mart. Coville)] em 10 locais de Minas Gerais. *Ciência e Prática Lavras*. 14: 229-232

TELLES, M.P.C., COELHO, A.S.G., CHAVES, L.J., FELIZOLA, J.A.D., VALVA F.D. 2003. Genetic diversity and population structure of *Eugenia dysenterica* DC. (“cagaita”-Myrtaceae) in Central Brazil: Spatial analysis and implications for conservation and management. *Conservation Genetics*. 4: 685-695.

WEEDEN, N.F. & WENDEL, J.F. 1990. Genetics of plant isozymes. *In* *Isozymes in plant biology* (D.E. Soltis & P.S. SOLTIS, eds.). Chapman and Hall, London, p.46-72.

WHITMORE, T.C. 1980. The conservation of tropical rain forest. Pp. 303-318. In: Soulé, M.E. and Wilcox. B.A. (Eds). *Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.

5.ARTIGO III

Comparação da variância genética quantitativa e da diversidade aloenzimática entre e dentro de populações de *Stryphnodendron adstringens* e descrição da variabilidade genética de *S. polyphyllum* e *S. rotundifolium*

Jacqueline Siqueira Glasenapp¹, Cosme Damião Cruz², Vicente Wagner dias Casali¹, Ernane Ronie Martins³, e Priscila Barros Barbosa¹.

1. Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG

2. Departamento de Biologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG

3. Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros – MG

5.1 RESUMO: Os modelos fenotípicos neutros combinam marcadores moleculares e medidas quantitativas e têm sido utilizados na inferência da variação de características importantes ecologicamente. O estudo teve como objetivo principal a avaliação da diversidade genética de *S. adstringens* por meio de marcadores aloenzimáticos e características fenotípicas adaptativas. Foram amostrados 684 indivíduos do gênero *Stryphnodendron*, sendo 627 indivíduos de *S. adstringens* divididos em 16 populações no estado de Minas Gerais e Goiás. Com o intuito de comparar padrões aloenzimáticos entre táxons comumente utilizados com a mesma finalidade, foram amostrados 24 indivíduos de *S. polyphyllum* e, 33 indivíduos de *S. rotundifolium*. Os dados isoenzimáticos foram obtidos por eletroforese em gel de amido e, os fenotípicos em delineamento em blocos casualizados. Foram observados 10 locos polimórficos e 28 alelos. Em ambas as espécies *S. rotundifolium* e *S. polyphyllum*, o padrão dos locos aloenzimáticos foi idêntico ao verificado em *S. adstringens*. O valor médio de diversidade genética ($H=0,228$) em *S. adstringens* foi compatível com o constatado em árvores tropicais com os mesmos padrões de distribuição geográfica. Resultados do índice de fixação total ($F=0,003$), do índice de fixação dentro de populações ($f=-0,114$) e, da diferenciação genética entre ($\theta=0,105$) foram não significantes. Em *S. rotundifolium* a heterozigosidade média (H) foi 0,284, o índice de fixação (f) negativo (-0,066). Em *S. polyphyllum* foi constatado índice de fixação $f=0,081$ e, $H=0,324$. Valores fenotípicos entre populações de *S. adstringens* diferiram significativamente, sendo a maior parte da variância genética entre médias famílias dentro de populações não significativa. As herdabilidades médias variaram entre 0,5488 e 0,9828 e, os valores Q_{ST} foram relativamente altos (0,5415 a 0,9761) quando comparados aos valores F_{ST} . Assim, pode ser concluído que a diversidade genética de marcadores aloenzimáticos em *S. adstringens* é consideravelmente alta dentro de populações e baixa entre populações. O fluxo gênico parece suficiente para prevenir a diferenciação de marcadores neutros e, a seleção intensa o suficiente para superar o fluxo gênico e manter a diferenciação adaptativa no ambiente populacional. A divergência genética adaptativa em *S. adstringens* não pode ser apropriadamente descrita por meio de características qualitativas. O estudo de características quantitativas pode fornecer informações complementares e ajudar a elucidar o padrão de variação genética entre e dentro de populações de *S. adstringens*. Como marcadores isoenzimáticos são seletivamente neutros não refletem processos adaptativos. Na construção de bancos de

germoplasma ou em programas de melhoramento, a escolha apropriada dos sítios de coleta pode ser tomada com base nas informações sobre o padrão de diferenciação genética e fenotípica.

Palavras-chave: estrutura genética de locos alenzimaticos, estrutura genética de características fenotípicas, Cerrado, plantas medicinais.

5.2 ABSTRACT: The neutral models of phenotypic evolution connect molecular markers and quantitative and provide a method for assaying levels of genetic variation in traits ecologically important. The aim of this study was assay the genetic diversity of *Stryphnodendron adstringens* by means of allozyme markers and adaptive phenotypic traits. Therefore *S. adstringens* 627 individuals from 16 populations on the states of Minas Gerais and Goiás were collected. With the intent of compare species ordinary used for the same purpose were collected 24 individuals of *S. polyphyllum* and 33 of *S. rotundifolium*. The alloenzyme polymorphism analyses were carried out by means of the starch-gel electrophoresis technique and phenotypic analyses by means of the randomized common garden experiment. Ten loci and 28 alleles were observed. The pattern of allozymic loci were the same on the three species. The genetic diversity of *S. adstringens* ($H=0.228$) was compatible with which from tropical trees with the same geographic distribution. For *S. adstringens* the results of index fixation ($F=0.003$), of index fixation within populations ($f=-0.114$) and genetic differentiation between populations ($\Theta=0.105$) were not significant. For *S. rotundifolium* the value of genetic diversity (H) was 0,284 and the fixation index (f) was -0.066. For *S. polyphyllum* $H=0.324$ and $f=0.081$ were found. The results of phenotypic traits between populations differ significantly. But the most of genetic variation within population were not significant. The heritabilities ranged from 0.5488 to 0.9828 and the Q_{ST} values were relatively highs (0.5415 to 0.9761) when compare with the results of F_{ST} . Therefore can be conclude that the genetic diversity of allozymic markers is quite high within populations and low between populations. Perhaps, the gene flow is high enough for prevents the genetic divergence of allozymic markers between populations and the selection strong enough for maintain the genetic divergence of adaptive traits between populations. The genetic divergence for *S. adstringens* not can be describe adequately only with neutral markers. The phenotypic traits study can provide complementary formations and help to elucidate the patterns of genetic variation within and between *S. adstringens* populations. The information about genetic and phenotypic differentiation for appropriate choose of sites of sampling may be used to collecting proceedings for germoplasma banks or improvement programs.

Key word: genetic structure of allozymic loci, genetic structure of phenotypic traits, cerrado, medicinal plants.

5.3 Introdução

A maioria das espécies é subdividida em populações locais que podem tornar-se estruturadas e geneticamente distintas por deriva genética, mutação e ou seleção divergente, também podem ter esta diversificação reduzida por migração e/ou seleção uniforme. Dentre os marcadores utilizados na análise da estrutura genética de espécies, as isoenzimas têm se destacado e fornecido um método para avaliar a variação genética em populações de árvores tropicais e, mensurar processos populacionais de importância ecológica, conservacionista e de manejo florestal (Lovelles, 1992). O estudo da divergência fenotípica entre populações fornece outra forma de avaliar a diversidade genética de populações naturais, entretanto poucos trabalhos têm comparado a variação de traços quantitativos entre populações sob a expectativa da evolução fenotípica neutra. Os modelos fenotípicos neutros combinam marcadores moleculares e medidas quantitativas e podem ser utilizados na inferência da variação de características importantes ecologicamente. Estes métodos associam o modelo neutro de Kimura (1968) e a estatística F_{ST} de Wright (1951) e permitem a estimação das herdabilidades e da proporção da variância genética aditiva total que é devida às diferenças entre populações (Q_{ST}), fornecendo promissora análise da variação adaptativa em algumas espécies (McKay & Latta, 2002). O modelo de Kimura é estabelecido como hipótese de nulidade e, tem sido destacado em estudos de evolução fenotípica por avaliar se os padrões observados na variação de características quantitativas seriam prováveis na ausência de seleção natural. Assim, a variação adaptativa é testada contra a hipótese nula de que a variação é seletivamente neutra. A estatística F_{ST} de Wright (1951) forneceu o modo de quantificar a variação genética que ocorre entre populações por meio da variação alélica, e mostrou que a divisão da variância genética de características quantitativas, dentro e entre populações, está relacionada à divisão da variância alélica. Portanto, a magnitude da divergência entre características quantitativas e moleculares pode ser usada na inferência do grau de adaptação local.

O gênero *Stryphnodendron* tem distribuição neotropical com limites norte na Nicarágua e, sul no Estado do Paraná no Brasil. Dos 36 táxons, aproximadamente 50% são

exclusivos do território brasileiro (Scalon & Souza, 2006). O centro de diversidade é geograficamente localizado na Amazônia Brasileira e nas formações da Caatinga e Cerrado (Guinet & Caccavari, 1992).

O *S. adstringens* (barbatimão), árvore de pequeno porte, ocorre tipicamente no campo-cerrado e cerrado *stricto sensu*, em formações primárias e secundárias. Sua distribuição abrange os estados do Pará, Tocantins, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e norte do Paraná (Felfili e Borges Filho 2004, Lorenzi 1992, Almeida *et al.* 1998, Pio Corrêa 1926). Devido às suas propriedades medicinais é utilizado no tratamento de doenças como úlceras, inflamações e hemorróidas (Barros, 1982). A casca é anti-séptica e usada nos problemas de gastrite, dor de garganta (Hirschmann & Arias, 1990), afecções escorbúticas, leucorréias, hérnias, diarreias, hemorragias, impigem e oftalmias (Almeida *et al.* 1998, Penna 1946). O *S. polyphyllum* tem porte arbóreo, também é conhecido como barbatimão e popularmente utilizados no tratamento das mesmas enfermidades que *S. adstringens* (Santos *et al.* 2002). Tem ocorrência típica nas matas da Serra da Mantiqueira, estado do Rio de Janeiro (Occhioni, 1990), mas, também há registros nos cerrados do Brasil central (Lopes *et al.* 2005). O *S. rotundifolium* constitui táxon arbustivo com altura entre 4-7 m, ocorre nos campos e cerrados do Brasil central (Occhioni, 1990). Da casca é feito o xarope ou garrafada, utilizada em infecções e feridas e em banhos de assento.

Estas três espécies do gênero *Stryphnodendron* têm sido exploradas tradicionalmente por suas propriedades medicinais e no aproveitamento de tanino, contudo o *S. adstringens* é a mais utilizada (Lopes *et al.*, 2005, Silva e Lemos, 2005, Santos *et al.* 2002). Em 2009, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) concedeu o primeiro registro para um medicamento elaborado a partir de uma planta do cerrado. A pomada Fitoscar (composto de *Stryphnodendron adstringens*), é um produto da Apsen Farmacêutica de São Paulo, tem efeitos cicatrizante, anti-inflamatório e antimicrobiano.

Atualmente, a prática tradicional da extração da casca para fins comerciais, associada ao desmatamento, vem colocando estas espécies, especialmente *S. adstringens*, em situação de ameaça de extinção (Felfili, 2000, de Souza e Felfili, 2006). Sendo que a necessidade de elaboração de políticas voltadas ao desenvolvimento de técnicas de manejo e domesticação de *S. adstringens* já foi salientada por alguns pesquisadores (Borges Filho e Felfili, 2003, Assunção e Felfili, 2004, Felfili e Borges Filho, 2004, Jacobson *et al.*, 2005).

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo da diversidade genética de *S. adstringens*, visando quantificar a divergência genética e adaptativa populacional por meio da comparação estatística entre marcadores bioquímicos e traços quantitativos, a fim de fornecer informações que possam subsidiar planos de conservação, manejo e melhoramento. Adicionalmente, foram avaliadas mais duas espécies do gênero (*S. polyphyllum* e *S. rotundifolium*) com o intuito de comparar os padrões genéticos observados.

5.4 Material e Métodos

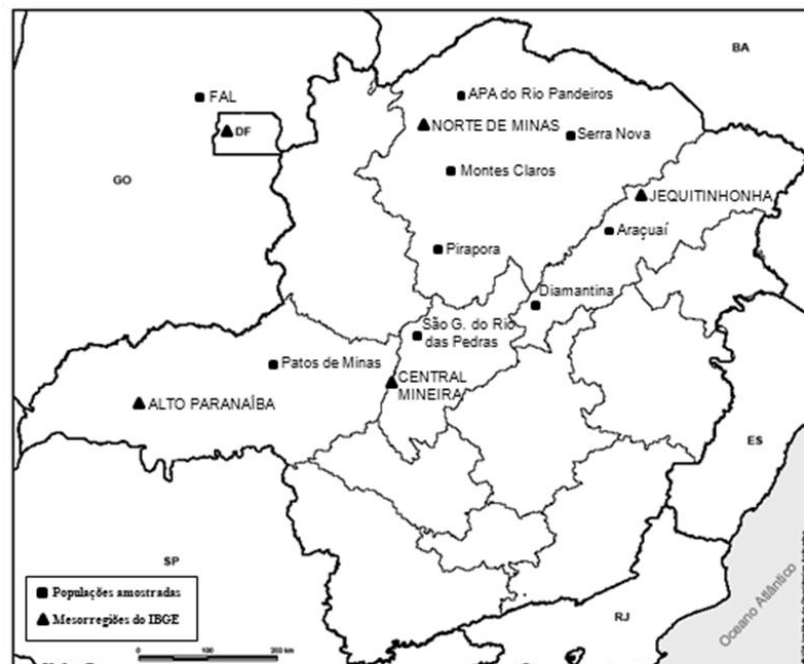
5.4.1 Procedimentos e locais de amostragem

As coletas foram procedidas nos meses setembro a outubro de 2009 e abrangeram 5 mesorregiões (IBGE) brasileiras nos estados de Goiás e Minas Gerais (Mapa 1). Foram amostrados 684 indivíduos do gênero *Stryphnodendron* sendo 627 indivíduos *S. adstringens* divididos em 16 populações, 15 no estado de Minas Gerais e uma no de Goiás. Objetivando a identificação e comparação dos padrões aloenzimáticos entre táxons comumente utilizados no tratamento das mesmas enfermidades, foram amostrados 24 indivíduos da espécie *S. polyphyllum* no Parque Nacional (PN) Grande Sertão Veredas e, 33 indivíduos de *S. rotundifolium* na APA (Área de Proteção Ambiental) do Rio Pandeiros (Tabela 1).

As amostras consistiram de cinco frutos maduros por indivíduo, sendo que em 3 a 6 plantas, dependendo da disponibilidade dentro da população, foram coletadas sementes de forma extensiva objetivando o experimento em blocos casualizados em casa de vegetação. As amostras foram obtidas por meio de transectos realizados no meio da mata, na maioria das vezes a pé, ou de carro. Os frutos foram embalados em sacos de papel, devidamente etiquetados, e assim mantidos até a chegada ao Laboratório de Melhoramento de Hortaliças

da UFV. Foram amostrados em média 38 indivíduos por população, sendo observado o espaçamento médio de 60 m entre indivíduos.

As distâncias geográficas de populações entre mesorregiões foram: 559 km entre FAL (DF) e Serra Nova (Norte de Minas), 337 km entre FAL e Patos de Minas (Alto Paranaíba) e, 520 km entre FAL e PE do Biribiri (Vale do Jequitinhonha). A menor distância entre populações dentro de mesorregiões foi 29 Km entre Poço D'anta e Turmalina.



Mapa 1: Mesorregiões (IBGE) abrangidas nas coletas e, distribuição geográfica de algumas das populações de *Stryphnodendron* amostradas nos Estados de Minas Gerais e Goiás.

Tabela 1. Regiões, altitude, temperatura e pluviosidade nos locais de amostragem das populações de *Stryphnodendron* (11/09).

População	Região	Altitude (m)	Temperatura* (°C)	Pluviosidade* (mm)
PE Biribiri	Jequitinhonha	1.173	18,1	1.404,7
PE Rio Preto	Jequitinhonha	869	18,1	1.404,7
PN Sempre Vivas	Jequitinhonha	1.305	20,0	1.400,0
Riacho da Porta	Jequitinhonha	816	22,0	1.300,0
Turmalina	Jequitinhonha	782	21,9	1.028,5
Carbonita	Jequitinhonha	890	21,0	1.049,0
Poço D'anta	Jequitinhonha	786	21,9	1.028,5
Araçuaí	Jequitinhonha	792	24,4	841,2
Pirapora	Norte de Minas	877	24,9	1.200,0
Brasília de Minas	Norte de Minas	904	22,6	1.438,0
Montes Claros	Norte de Minas	849	22,4	1.082,0
Coração de Jesus	Norte de Minas	867	22,4	1.082,0
Serra Nova	Norte de Minas	963	24,0	827,7
S. G. Rio das Pedras	Central	1.061	19,4	1.269,0
Patos de Minas	Alto Paranaíba	834	21,1	1.474,4
FAL (GO)	Distrito Federal	1.086	19,8	1.552,0
APA Rio Pandeiros	Norte de Minas	718	23,6	1.156,1
PN Grande S. Veredas	Norte de Minas	870	24,1	1.030,6

*Temperaturas e pluviosidades médias anuais,

Fontes: Instituto de Geociências Aplicadas – IGA e Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, (www.cidadesnet.com).

PE=Parque Estadual, PN=Parque Nacional, APA=Área de Proteção Ambiental, FAL=Fazenda Água Limpa – Universidade Federal de Brasília (UnB).

5.4.2 Procedimentos de extração aloenzimática e eletroforese

Os dados aloenzimáticos foram obtidos por meio da técnica de eletroforese em gel de amido, em plântulas crescidas de sementes germinadas em câmara de crescimento por três dias. Com o intuito de causar o rompimento ou abrasão do tegumento da semente e torná-lo permeável de modo a permitir a germinação, as sementes foram escarificada por método mecânico, utilizando-se lixa de unha comum. Na extração isoenzimática uma plântula originada de cada indivíduo (árvore) amostrado foi macerada em almofariz e, a proporção de 1 g do macerado de cada plântula foi adicionado a cada 3 mL da solução extratora nº 1 recomendada por Alfenas *et al.* (2006). Os géis foram preparados com 3% de sacarose e 12% de amido de milho por 100 ml de solução-tampão do gel. Foram utilizados

os sistemas tampão sugeridos por Soltis *et al.* (1983) e por Shaw e Prasad (1970) descritos na Tabela 2. A pré-corrida foi conduzida a 15 mA tendo duração de 30m utilizando o sistema tampão I e, 1h utilizando o sistema tampão II. A corrida foi realizada a 35 mA e durou cerca de 5h. Os sistemas isoenzimáticos analisados com o sistema tampão I foram: esterase (EC 3.1.1.1, EST), fosfatase ácida (EC 3.1.3.2, ACP), fosfoglucomutase (EC 5.4.2.2, PGM), fosfogluco isomerase (EC 5.3.1.9, PGI), glucose desidrogenase (EC 1.1.1.47, GDH) glucose-6-fosfato desidrogenase, (EC 1.1.1.49, G6PDH) glutamato oxaloacetato transaminase (EC 2.6.1.1, GOT), leucina aminopeptidase (EC 3.4.11.1, LAP), peroxidase (EC 1.11.1.7, PER). Os sistemas isoenzimáticos analisados com o sistema tampão II foram: alcool desidrogenase (EC 1.1.1.1), isocitrato desidrogenase (EC 1.1.1.42, IDH), malato desidrogenase (EC 1.1.1.37, MDH), xiquimato desidrogenase (EC 1.1.1.25, SKDH).

Tabela 2: Composição dos tampões utilizados na eletroforese de plântulas de *S. adstringens*.

Tampões	Eletrodo	Gel
I	4,0 g.L ⁻¹ NaOH, 18,55 g.L ⁻¹ ácido bórico (pH 8,6)	40 mL.L ⁻¹ solução do eletrodo, 1,84 g.L ⁻¹ Tris, 0,69 g.L ⁻¹ ácido cítrico (pH 7,8)
II	Tris 16,35 g.L ⁻¹ , 9,04 g.L ⁻¹ ácido cítrico (pH 7,0)	66,7 mL.L ⁻¹ solução do eletrodo (pH 7,0)

I- Soltis *et al.* (1983), II- Shaw e Prasad (1970)

5.4.3 Delineamento em blocos casualizados (DBC)

Os dados fenotípicos foram obtidos por delineamento em blocos casualizados com três repetições. Cada bloco foi constituído por três famílias de cada uma das seguintes populações de *S. adstringens*: PE do Rio Preto, Serra Nova, Turmalina, Araçuaí, PN das Sempre Vivas, Riacho da Porta, FAL, Carbonita, Coração de Jesus e PE do Biribiri. Também foram incluídas nos blocos as populações da APA do Rio Pandeiros (*S. rotundifolium*) e PN Grande Sertão Veredas (*S. polyphyllum*). Cada família foi representada por 3 a 6 indivíduos de um mesmo progenitor materno (famílias de meios-irmãos).

Inicialmente, no mês de fevereiro de 2010, as sementes foram escarificadas por método mecânico e germinadas em câmara de crescimento por três dias, cerca de seis

sementes germinadas de cada indivíduo foram transferidas para vasos de 3L com mistura de 75% de terra e 25% de areia. As avaliações fenotípicas foram realizadas em cinco épocas (junho, julho, agosto, setembro, outubro de 2010) em características associadas ao vigor vegetativo como altura, número de nós e número de folhas e diâmetro. Uma única avaliação de fenóis totais, característica diretamente associada ao valor adaptativo, foi procedida no mês de dezembro de 2010.

5.4.4 Quantificação de fenóis totais

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme metodologias descritas por Andrade *et al.* (2007) e Sousa *et al.* (2007), com algumas modificações. Devido à alta mortalidade durante o experimento (DBC) não foi possível a quantificação de fenóis totais em todas as populações. Em cada um dos três blocos foram coletadas folhas de *Stryphnodendron* de indivíduos provenientes das seguintes populações: PE do Rio Preto, Serra Nova, Turmalina, Araçuaí, Riacho da Porta, FAL, PE do Biribiri, APA do Rio Pandeiros e PN Grande Sertão Veredas. As folhas foram secas em estufa a 45°C por quatro dias e, posteriormente foram maceradas (pulverizadas) em almofariz com o auxílio de pequenas quantidades de nitrogênio líquido. Cada 0,1g de amostra pulverizada foram transferidos para balão volumétrico de 20 mL completando-se o volume com água e em seguida levando ao banho Maria por 30 min. Após o aquecimento o extrato foi resfriado e filtrado com auxílio de papel filtro quantitativo e bomba de vácuo. Uma alíquota de 5 mL do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 25 mL completando-se o volume com água. Posteriormente, 1 mL desta última diluição foi colocada em triplicata em tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 7,5 mL de água, 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu misturando-se por agitação. Após três minutos à adição do reagente, foi adicionada solução de carbonato de sódio 15%. Cada tubo de ensaio foi novamente agitado e deixado em repouso por 30 min. A absorbância foi determinada a 760 nm no espectrofotômetro. O teste branco foi realizado, utilizando-se água destilada em substituição ao extrato aquoso.

No preparo da curva de calibração foram solubilizados 50,0 mg de ácido tânico em 100 mL de água. Desta solução foram pipetadas alíquotas de 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9, e 1,1 mL e, transferidas em triplicata á tubos de ensaios. A cada tubo acrescentou-se água, reagente Folin-Ciocalteu e solução de carbonato de sódio 15%. As soluções depois de homogeneizadas foram deixadas em repouso por 30 min., a absorbância foi determinada a 760 nm.

5.4.5 Análises estatísticas

Seguindo orientações de Berg & Hamrick (1997) em cada população os locos que mostraram variação em pelo menos um indivíduo foram considerados polimórficos. Os desvios das frequências alélicas a partir das condições de EHW foram verificados por meio do teste exato de Fisher, conforme proposto por Haldane (1954). A análise de variância das frequências alélicas foi realizada por meio da partição da variância total das frequências alélicas em componentes relacionados às subdivisões hierárquicas dos genes. Assim foram obtidos os valores não visados ($\theta=F_{ST}$, $F=F_{IT}$, e $f=F_{IS}$) das estatísticas F de Wright (1951), de acordo com o modelo proposto por Weir & Cockerham (1984). A estimativa heterozigosidade esperada (H) de Nei 1977 foi procedida e alternativamente a análise de variância, os mesmos parâmetros de diversidade genética (θ , F , e f) foram obtidos por meio da técnica de reamostragem “jackknifing”. Intervalos de confiança (IC) ao nível de 95% foram estabelecidos por 1000 reamostragens “bootstrapping” sobre locos. O coeficiente de endogamia dentro de populações (f), também, foi calculado usando a expressão $f = 1 - \frac{H_o}{H}$, onde a heterozigosidade esperada é dada por $H = 1 - \sum p_i^2$, e p_i é a frequência do i -ésimo alelo na população (NEI, 1973). Os testes de significância para este parâmetro (f) foram procedidos utilizando-se o método proposto por Li e Horvitz (1953). Estes pesquisadores reformularam o teste χ^2 em termos da estatística f como $x^2 = f^2 N(a - 1)$, com graus de liberdade $df = \frac{a(a-1)}{2}$, onde N é igual ao número de indivíduos amostrados e, a o número de alelos. Cada loco em cada população foi testado separadamente sendo os valores χ^2 e os graus de liberdade somados sobre todos os locos, obtendo-se desta forma o valor total χ^2 do coeficiente médio f . O tamanho efetivo populacional (N_e) foi obtido por meio da equação

$\hat{N}e = N/(1 + \hat{f})$, sugerida por Vencovsky (1997) para o caso de uma única população com ausência de estruturação genética, com N sendo o número de indivíduos amostrados (sementes). As características fenotípicas avaliadas em casa de vegetação foram analisadas por ANOVA hierarquizada, sendo mensuradas as herdabilidades e as variâncias genéticas entre e dentro de populações. A análise de agrupamento das espécies de *Stryphnodendron* em relação aos marcadores aloenzimáticos foi realizada pela técnica UPGMA utilizando a matriz de diversidade genética (G_{ST}) entre populações. A quantidade média de fluxo gênico, ou número de migrantes por geração (Nm), foi obtida de maneira indireta por meio de modelo matemático de equilíbrio entre fluxo gênico e deriva genética, empregando-se o método de Crow e Aoki (1984) com $F_{ST} = 1/(4\alpha Nm + 1)$, onde $\alpha = [n/(n - 1)]^2$ e n é o número de subpopulações.

As comparações entre característica qualitativas (marcadores) e quantitativas (fenotípicas) foram procedidas por meio da utilização da estatística Q_{ST} . Em características com base genética aditiva que estão evoluindo de forma neutra a variância genética dentro de populações foi definida por Wright (1951) como $\sigma_{g(w)}^2 = (1 - F_{ST})\sigma_T^2$ e, a variância genética entre populações $\sigma_{g(b)}^2 = 2F_{ST} \cdot \sigma_T^2$, onde σ_T^2 é a variância genética total que seria exibida se todos os indivíduos fizessem parte de uma população panmítica. A partir das equações de Wright (1951), Spitze (1993) formulou o análogo quantitativo de F_{ST} como $Q_{ST} = \sigma_{gb}^2/(\sigma_{gb}^2 + 2\sigma_{gw}^2)$. Assim como F_{ST} , Q_{ST} mede a diversidade genética entre populações, porém Q_{ST} quantifica a proporção da variância genética aditiva total que é devida às diferenças entre populações, enquanto F_{ST} diz respeito à proporção da variância genética total que é devida às diferenças nas frequências alélicas entre populações.

Valores Q_{ST} de traços aditivos neutros são iguais a valores F_{ST} de locos neutros. Estimativas de Q_{ST} significativamente diferentes de F_{ST} são rejeitadas sob a hipótese de neutralidade do traço e refletem a influência da seleção natural. Quando, por exemplo, duas populações são adaptadas a habitats diferentes, há expectativa de que os valores Q_{ST} dos traços envolvidos na adaptação sejam maiores que F_{ST} . Se ambas as populações estão sob seleção estabilizadora em relação ao mesmo fenótipo espera-se que Q_{ST} seja menor que F_{ST} . Valores Q_{ST} iguais a F_{ST} significam que o traço (ou traços) avaliado não está sob influência da seleção natural, apresentando as mesmas taxas de diferenciação esperadas por deriva genética. A estatística Q_{ST} constitui teste de diferenciação adaptativa e deve ser utilizada em traços que confirmam valor adaptativo (McKay & Latta, 2002). Assim, os traços

escolhidos nas avaliações fenotípicas foram características associadas ao vigor vegetativo, ou diretamente associadas ao valor adaptativo, como no caso dos fenóis totais.

Os compostos fenólicos têm função adaptativa e estão entre as mais difundidas classes de metabólitos secundários. Pigmentam flores, agem na proteção contra pragas e doenças, atuam como alelopáticos, são componentes estruturais e funcionais da matéria orgânica do solo, apresentam atividades anti-sépticas, desinfetantes e anestésicas (Barbosa, 1994, Siqueira *et al.*, 1991). Já as características ligadas ao vigor vegetativo como número de nós, diâmetro, altura, dentro outras, podem estar associadas a diferentes estratégias adaptativas quando amostradas em escala espacial adequada, em diferentes ambientes. Isso se deve ao fato de que os organismos têm uma quantidade limitada de tempo e energia disponíveis, de modo que cada resposta ontogênica, cada estratégia, representa a alocação ou, partição desse tempo e energia. A forma de alocação de energia de um dado organismo para fins reprodutivos, competitivos ou em mecanismos de controle a herbívora são características ecológicas de importância evolucionária (Cody 1966 – seguindo MacArthur, unpublished). Os padrões na utilização dos recursos são causados pelas limitações do meio físico e biótico e, pelo balanço entre diferentes objetivos que não podem ser atingidos ao mesmo tempo. Por exemplo, se a disponibilidade de água e luz forem fatores limitantes, raízes mais profundas podem obter mais água e, ramos mais altos permitem a obtenção de mais luz. Entretanto, estas estratégias adaptativas imobilizariam recursos que, por exemplo, poderiam ser utilizados para crescimento de folhas. Assim, o balanço entre objetivos contraditórios, possivelmente, fez com que as espécies tenham evoluído de modo a sobreviverem e competirem com sucesso (Pillar, 1994, Harper 1967). Cody (1996) define como três as características ecológicas mais importantes: 1) taxa intrínseca de aumento natural, ou energia alocada na produção de sementes e ramos reprodutivos; 2) contribuição para habilidade competitiva, ou seja, energia gasta, por exemplo, na produção de folhas mais altas que as de seus vizinhos com pecíolos mais longos, estames mais altos, raízes que crescem mais e rápido que a de seus vizinhos; 3) mecanismos de controle a herbivoria, significando a energia gasta produzindo estruturas impalatáveis, defensivos químicos, pelos urticantes, etc..

É conveniente esclarecer que a medida Q_{ST} requer que componente de variância genética considerado, seja a variância aditiva (σ_A^2). Entretanto, no presente estudo a medida Q_{ST} foi obtida a partir da variância genotípica (σ_G^2) e considerada no lugar do verdadeiro

Q_{ST} (obtido a partir da variância aditiva), devido ao fato de o componente ambiental em todos os traços ter sido pequeno e as herdabilidades no sentido amplo, muito altas (Volis *et al.*, 2005).

As análises estatísticas foram procedidas por meio dos aplicativos computacionais em genética e estatística GENES (versão 1.0.0) e, Fstat (versão 2.9.3.2).

5.5 Resultados e Discussão

5.5.1 Sistemas aloenzimáticos em *S. adstringens*

Nas análises estatísticas foram utilizados os resultados dos sistemas EST, MDH, PGI, ADH, SKDH, IDH e GOT. Os sistemas enzimáticos PGM, G2D, G6PDH, GDH, PER, e ACP não foram suficientemente resolvidos e/ou não foi possível formular hipótese genética plausível quanto ao padrão de bandas observado. O sistema isoenzimático LAP foi monomórfico sendo evidente uma única banda nos géis de todos os indivíduos. Os locos aloenzimáticos foram identificados com as mesmas abreviações utilizadas na designação de cada enzima (ex. MDH), porém com letras minúsculas e itálicas, seguidas por ordenação numérica crescente a partir do loco de migração mais lenta (ex. *mdh-1*). Os alelos em cada loco foram ordenados alfabeticamente, sendo o alelo de migração mais rápida identificado com a letra *a* e os de migração mais lenta seguindo a ordem. Ao todo foram observados 10 locos polimórficos e o total de 28 alelos (Tabela 3).

Tabela 3. Locos e alelos observados nas análises eletroforéticas das 16 populações amostradas de *S. adstringens*.

Loco	<i>est-1</i>	<i>est-2</i>	<i>est-3</i>	<i>est-4</i>	<i>got-1</i>	<i>pgi-1</i>	<i>mdh-4</i>	<i>idh-1</i>	<i>adh-1</i>	<i>skdh-1</i>
n° de alelos	2	2	3	3	3	2	3	5	2	3

5.5.2 Sistemas aloenzimáticos observados nas espécies do gênero *Stryphnodendron*

Em ambas as espécies *S. rotundifolium* e *S. polyphyllum*, o padrão de bandas dos locos aloenzimáticos observados foi idêntico ao verificado em *S. adstringens* (Tabela 4). Os locos *got-1*, *mdh-4* e *adh-1* foram fixados em *S. rotundifolium* (Bonito de Minas). Em *S. polyphyllum* somente o loco *adh-1* foi fixado.

5.5.3 Estimativas de diversidade genética

Dos 160 testes de EHW (16 populações e 10 locos) em *S. adstringens*, apenas 17 mostraram desvios significativos ($P \leq 0,05$). O valor médio do parâmetro de diversidade genética ($H=0,228$) foi compatível com o constatado em árvores tropicais com distribuição geográfica classificada como regionais e, comumente distribuídas (Loveless & Hamrick, 1984). De modo geral, espécies amplamente distribuídas têm maior proporção de diversidade (H) genética que espécies geograficamente limitadas (Hamrick *et. al* 1992). O índice de fixação total foi negativo (-0,114) indicando excesso não significativo de heterozigotos.

Em *S. rotundifolium* (APA do Rio Pandeiros) a heterozigosidade média esperada (H) foi 0,284 e, o coeficiente de endogamia (f) não significativo (-0,066). O tamanho efetivo amostral ($N_e=35,35$) foi maior que o número de indivíduos amostrados (33), sendo assim, considerado satisfatório. Foram verificados desvios significativos nos locos *est-2* e *est-3*. Em *S. polyphyllum* (PN Grande Sertão Veredas) foi constatado coeficiente de endogamia (f) não significativo (0,081) e, H foi 0,324. O tamanho efetivo amostral ($N_e=22,20$) foi menor que o número de indivíduos amostrados (24), assim a representatividade da amostra em relação a população natural não pode ser considerada

como satisfatória. Não foram verificados desvios significativos a partir das proporções de equilíbrio em nenhum loco.

De forma geral os resultados da ANOVA das frequências alélicas foram compatíveis com os resultados obtidos pela técnica de reamostragem numérica. Os intervalos de confiança (IC) ao nível de 95%, obtidos por 1000 reamostragens bootstrapping sobre locos, indicam estruturação genética quanto os locos *est-4* e *pgi-1* em todos os parâmetros avaliados (Tabela 4), sendo as estimativas de estruturação no loco *pgi-1* substancialmente mais elevada que as demais. No loco *got-1* foi observada deficiência significativa de heterozigotos dentro de populações. Os locos *mdh-4* e *skh-1* foram diferenciados entre populações (θ), porém em *skh-1*, como no loco *adh-1*, foi constatada deficiência significativa de heterozigotos (f) dentro de populações. Somente no loco *est-4* foi evidente excesso de heterozigotos. Em relação à população total não foram observados desvios significativos quanto aos parâmetros F , θ e f .

Tabela 4. Resultados da análise de variância das frequências alélicas (Weir & Cockerham 1984) e da técnica de reamostragem “Jackknifing” incluindo estimativas de fixação alélica total (F), divergência alélica entre populações e, fixação dentro de populações (f).

Locos	ANOVA			Jackknifing		
	F	θ	f	F	θ	f
<i>est-1</i>	-0,012	0,048	-0,063	-0,015	0,069	-0,087
<i>est-2</i>	0,002	0,094	-0,101	0,011	0,112	-0,112
<i>est-3</i>	-0,06	0,046	-0,111	-0,058	0,048	-0,111
<i>est-4</i>	-0,208*	0,023*	-0,236*	-0,208*	0,023*	-0,237*
<i>got-1</i>	0,197	0,034	0,169*	0,203	0,035	0,174*
<i>pgi-1</i>	0,631*	0,625*	0,017*	1,008*	1,006*	0,013*
<i>mdh-4</i>	-0,008	0,030*	-0,039	-0,009	0,029*	-0,040
<i>idh-1</i>	0,027	0,1	-0,082	0,037	0,108	-0,082
<i>adh-1</i>	0,118	0,062	0,06*	0,098	0,066	0,038*
<i>skdh-1</i>	0,122	0,023*	0,101*	0,165	0,034	0,135*
Total	0,003	0,105	-0,114	-0,010	0,098	-0,121

IC: F (-0,124 a 0,228), θ (0,033 a 0,264), f (-0,180 a -0,026).

No estudo de cinco populações naturais de *S. adstringens* por meio da aplicação marcadores microssatélites, Branco *et al.* (2010), verificaram o valor de divergência genética entre populações ($\theta=0,0145$) próximo aos obtidos por meio de marcadores

isoenzimáticos ($\theta=0,105$ e $0,098$) neste estudo (Tabela 4). A concordância entre as medidas θ em relação aos diferentes marcadores tem explicação no fato de que, locos microssatélites, por serem altamente polimórficos, têm valores G_{ST} (ou θ) geralmente pequenos (Nei & Kumar, 2000). A discrepância entre os valores de heterozigosidade média esperada ($H=0,7139$) para locos microssatélites (Branco *et al.*, 2009) em relação a esperada para isoenzimas ($H=0,228$), pode ser explicada pelo fato de que quanto maior o número de alelos em um loco maior a heterozigosidade esperada, sendo máxima quando há equivalência nas frequências alélicas. No estudo de Branco *et al.* (2009), o número de alelos por loco polimórfico variou entre 4 e 9, e a proporção de locos polimórficos (P) foi 100%, enquanto em *S. adstringens* o número de alelos nos locos isoenzimáticos variou entre 2 a 5 (Tabela 3) e, a proporção de locos polimórficos entre 60% e 90% (resultados não apresentados).

Os coeficiente de endogamia total e intrapopulacional obtidos por isoenzimas ($F=0,003$ e $f=-0,114$) foram consideravelmente menores que os obtidos por microssatélites ($F=0,3623$ e $f=0,3529$) (Branco *et al.*, 2009). Nos locos isoenzimáticos foi verificado excesso não significativo de heterozigotos ($f=-0,114$) dentro de populações, os locos microssatélites apontaram deficiência significativa de heterozigotos ($f=0,3529$).

O valor de diferenciação genética devido às variâncias nas frequências alélicas entre populações ($\theta=0,105$) em *S. adstringens*, foi menor que os observados em árvores nativas do Cerrado como a palma (*Euterpe edulis*) ($\theta=0,12$) (Gaiotto *et al.* 2003), o araticunzeiro (*Annona crassiflora*) ($\theta=0,127$) (Telles *et al.* 2003) e, a cagaita (*Eugenia dysenterica*) ($\theta=0,154$) (Telles *et al.* 2003). De modo geral, populações de plantas altamente subdivididas têm altos valores de diferenciação genética populacional (0,20 ou mais), enquanto populações grandes e contínuas como, pinheiros de zonas temperadas, tendem a ter valores de diferenciação 0,05 ou menos (Loveless & Hamrick, 1984, Hamrick & Godt, 1989).

Estimativas do coeficiente de endogamia intrapopulacional (f) conforme proposto por Wright (1951), não foram diferir significativamente das expectativas de equilíbrio indicando que há panmixia na maioria das populações, exceto no PE do Biribiri e Montes Claros, onde foi observado excesso significativo de heterozigotos (Tabela 5). A sobredominância ou vantagem seletiva do heterozigoto tem sido uma explicação frequente para a manutenção da variação genética em populações naturais (Alvarez-Buylla *et al.*,

1996b). Entretanto, ainda há considerável deficiência no entendimento dos processos que levam ao excesso de heterozigotos (Gemmell & Slate, 2006, Stoeckel *et al.* 2006). De qualquer forma, como polimorfismo isoenzimático é seletivamente neutro (Kimura, 1968), ou fracamente ligado ao valor adaptativo, a seleção de locos isoenzimáticos é relativamente rara (Endler, 1986). Por outro lado, a fecundação ao acaso em populações com pequeno tamanho efetivo, onde as frequências alélicas entre machos e fêmeas diferem ao acaso, pode agir como um mecanismo de acúmulo de heterozigotos. Isto é, a deriva genética pode tornar o cruzamento entre indivíduos portando diferentes alelos mais frequente. Quando duas populações com frequências alélicas divergentes são incluídas em uma mesma amostra, verifica-se que a frequência observada de genótipos heterozigotos é mais alta que a frequência esperada. Este desvio corresponde ao “efeito Wahlund” (Wahlund, 1928) e pôde ser observado em populações naturais de *Araucaria angustifolia* onde as frequências alélicas nos gametas femininos e no pólen diferem significativamente na mesma população, resultando um excesso de genótipos heterozigotos observados nos embriões (Souza *et al.*, 2003).

A representatividade das amostras populacionais de *S. adstringens* pôde ser considerada satisfatória, já que os tamanhos efetivos populacionais (N_e) estimados em todas as populações foram maiores que o número de indivíduos amostrados (Tabela 5). A estimativa N_e conforme proposta por Vencovsky (1997) mede a representatividade de uma amostra de indivíduos ou sementes. De modo geral, as estimativas do número de migrantes por geração (N_m) indicaram que o fluxo gênico (>1) é suficiente para prevenir a diferenciação das frequências alélicas por deriva genética entre todas as populações, exceto PE do Rio Preto que teve todos os valores de fluxo gênico inferiores a um (0,1 a 0,16), indicando quantidades reduzidas de migrantes por geração e deriva genética.

A pesar dos tamanhos populacionais reduzidos, as populações de *S. adstringens* mantêm altos níveis de variabilidade genética onde seria esperado algum impacto devido ao intenso desmatamento e fragmentação. Feyissa *et al.* (2007) verificaram no estudo de *Hagenia abyssinica*, que a despeito do recente distúrbio antrópico as estimativas de diversidade genética são típicas as esperadas em árvores tropicais, isso por que o tempo entre o distúrbio ambiental inicial e o tempo atual é curto se comparado a longevidade e, ao tempo de geração das espécies arbóreas tropicais.

Tabela 5. Coeficientes de endogamia populacionais (f) com testes de significância (χ^2) conforme proposto por Li e Horvitz (1953) e, tamanhos efetivos amostrais (N_e) estimados nas 16 populações de *S. adstringens*.

População	f	χ^2	p	N_e
São G. do Rio das Pedras	-0,1575	35,94	0,0724	46,78
Carbonita	-0,1034	23,24	0,1415	45,10
Serra Nova	-0,1384	10,47	0,7893	38,77
Patos de Minas	-0,0644	1,55	0,9998	22,89
FAL	-0,1151	23,22	0,3231	69,35
P.N. das Sempre Vivas	-0,0313	13,58	0,5574	35,35
Brasília de Minas	-0,1414	18,35	0,6269	37,17
Riacho da Porta	-0,2416	19,88	0,3394	47,99
Araçuaí	-0,1433	8,483	0,9392	35,47
Coração de Jesus	-0,1449	10,12	0,8118	48,44
Turmalina	-0,0472	25,71	0,0799	33,03
P. E. do Biribiri	-0,1492	35,60*	0,0118	42,82
Pirapora	-0,1776	12,16	0,9104	50,36
Montes Claros	-0,2105	27,72*	0,0234	54,93
Poço D'anta	-0,1839	16,48	0,3508	39,71
P.E. do Rio Preto	-0,0275	20,69	0,1099	64,22

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

5.5..4 Análise de agrupamento

Em *Stryphnodendron*, pelo método hierárquico de agrupamento UPGMA tendo como ponto de corte 5,09% de dissimilaridade entre populações, foram formados três grupos, o primeiro constituído pela população de *S. adstringens* do PE do Rio Preto, o segundo pelas populações da APA do Rio Pandeiros (*S. rotundifolium*) e do PN Grande Sertão Veredas (*S. polyphyllum*) e, o terceiro pelas demais populações de *S. adstringens* (Fig. 1). A população do PE do Rio Preto foi mais diferenciada em relação às outras populações de *S. adstringens* do que as das outras espécies do gênero (*S. rotundifolium* e *S. polyphyllum*). Tal diferenciação é devida essencialmente ao fato de o alelo mais frequente (0,881) no loco *pgi-1* ter sido o oposto ao observado nas outras populações, onde a frequência do alelo alternativo variou entre 0,8235 a 1.0.

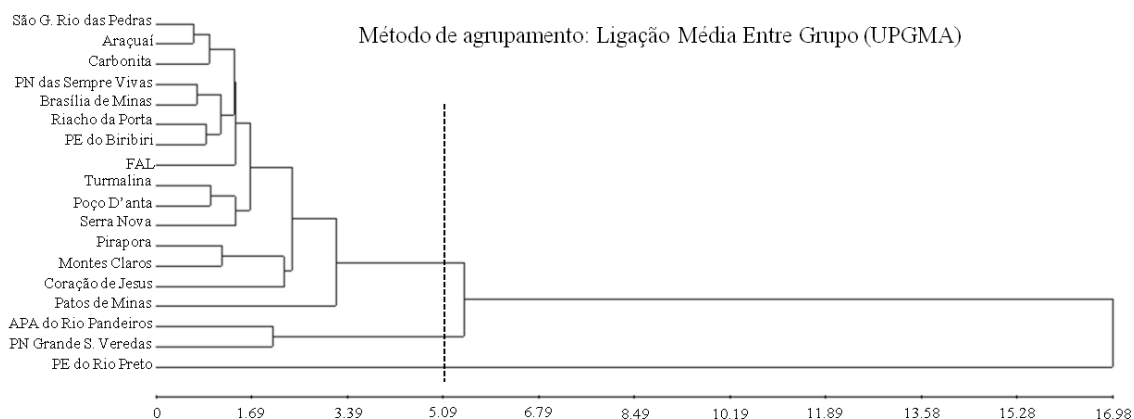


Figura 1: Dendrograma UPGMA obtido por meio da matriz de diversidade genética entre pares de populações *Stryphnodendron*. A primeira linha no eixo das abscissas corresponde aos valores percentuais (G_{ST}) em relação a dissimilaridade entre populações.

5.5.5 Variação genética quantitativa

Valores de variância genética entre populações diferiram significativamente em cada característica avaliada, exceto diâmetro. As diferenças entre as populações se tornaram mais evidentes ao longo do tempo com tendência de aumento na variância genética, exceto em relação ao número de folhas que tendeu a redução (Tabela 5). A maior parte da variância genética entre médias de famílias dentro de populações foi não significativa, exceto na população do PE do Biribiri onde 57,14% dos testes foram significativos ($p \leq 0,5$). Dentre as características avaliadas os fenóis totais merecem destaque por ser diretamente ligados ao valor adaptativo, funcionando principalmente, como mecanismo de prevenção à herbivoria. Assim, excluindo a população de Araçuaí, onde a média de fenóis destacou-se (1.0416 $\mu\text{g/L}$), a média de fenóis totais nas populações de *S. adstringens* variou entre 0,0820 $\mu\text{g/L}$ em Turmalina a 0,1338 $\mu\text{g/L}$ em Riacho da Porta e, apresentou o maior valor de herdabilidade dentre os traços avaliados (Tabela 6). Em *S. rotundifolium* a quantidade a média de fenóis foi 0,0975 $\mu\text{g/L}$, em *S. polyphyllum* foi 0,1414 $\mu\text{g/L}$.

As herdabilidades médias variaram entre 0,5488 em diâmetro, a 0,9828 em fenóis totais (Tabela 6). Os valores Q_{ST} foram relativamente altos (0,5415 a 0,9761) quando comparados aos valores F_{ST} (0,105 e 0,098), indicando que diferentes ótimos fenotípicos são selecionados nas populações. Em *S. adstringens*, com exceção PE do Rio Preto, 94,3%

das avaliações do número de migrantes por geração (Nm) entre populações foi superior a um, mostrando que o fluxo gênico é suficiente para prevenir a diferenciação por deriva genética entre populações. Contudo devido às discrepâncias entre os valores F_{ST} e Q_{ST} , o número de migrantes por geração não parece ser suficiente para prevenir diferenças populacionais em características ligadas ao valor adaptativo. Diferenças adaptativas podem ocorrer a despeito de considerável fluxo gênico, e a seleção forte pode, rapidamente, remover a carga genética imposta pelos migrantes, mantendo as diferenças entre populações McKay & Latta (2002). Quanto a população do PE do Rio Preto, o número médio de migrantes por geração foi (Nm) igual a 0,13, sendo inferior a 1 em todas as comparações com as demais populações, indicando que nos locos avaliados o fluxo gênico não é suficiente para prevenir a diferenciação das frequências alélicas por deriva genética.

McKay & Latta (2002) reuniram dados de espécies nas quais foi possível comparar estatisticamente Q_{ST} e F_{ST} . Em 24 das 29 espécies avaliadas a média Q_{ST} de traços foi maior que a média F_{ST} de locos marcadores. A minoria exibiu $Q_{ST} < F_{ST}$ significando que a seleção age em direção ao mesmo ótimo fenotípico em todas as populações. Estes estudos empíricos revelam pouca evidência de que a diferenciação de marcadores moleculares neutros prediz a divergência populacional tão bem quanto traços quantitativos. Em *Scabiosa columbaria* (0,154 e 0,730) e *S. canescens* (0,041 a 0,217), os valores Q_{ST} foram similares ou ligeiramente mais altos que F_{ST} , indicando que os traços não são mais fortemente influenciados pela seleção, variando ao longo da faixa de ocorrência das espécies, do que o são por deriva genética (Waldmann & Andersson, 1998).

Tabela 5. Variâncias genéticas das características quantitativas estimadas em seis épocas entre médias das populações de *Stryphnodendron adstringens* amostradas.

Época	Altura	N. nós	N. folhas	Diâmetro	Fenóis totais
Junho	0,2502*	0,8809*	0,0 _{n.s.}	0,006 _{n.s.}	
Julho	0,1772*	0,9342*	2,3911*	0,0 _{n.s.}	
Agosto	0,2681*	1,1092*	2,2737*	0,0141*	
Setembro	0,5158*	1,1111*	2,2209*	0,0096 _{n.s.}	
Outubro	0,6084*	7,8220*	1,7434*	0,0942*	
Dezembro					0,2449*

Nível de significância: n.s.=não-significante, *=significante, $\alpha = 5\%$

Tabela 6. Herdabilidades no sentido amplo (h^2) e proporção da variância genética total que é devida às diferenças (Q_{ST}) nas características fenotípicas avaliadas entre populações de *Stryphnodendron adstringens*.

Época	Altura		N. nós		N. folhas		Diâmetro		Fenóis Totais	
	h^2	Q_{ST}	h^2	Q_{ST}	h^2	Q_{ST}	h^2	Q_{ST}	h^2	Q_{ST}
Junho	0,7277	0,4654	0,7061	1,0	0,0	0,0	0,4102	0,5769		
Julho	0,6449	0,4149	0,8290	1,0	0,7387	1,0	0,0	0,0		
Agosto	0,6804	0,7441	0,8822	0,9392	0,7244	0,9762	0,6035	1,0		
Setembro	0,6105	0,4889	0,8628	0,6847	0,6663	0,6419	0,5046	0,4102		
Novembro	0,7135	0,5940	0,9082	0,9450	0,7179	0,8111	0,6770	0,7837		
Dezembro									0,9828	0,9761
Média	0,6754	0,5415	0,8377	0,9129	0,7118	0,8573	0,5488	0,6927		

5.6 Conclusões

O índice de fixação total não significativo (-0,114) dentro de populações de *S. adstringens* indica acasalamento aleatório e, que forças evolutivas como deriva e migração estão em equilíbrio nestas populações.

As medidas de diversidade genética de locos aloenzimáticos são consistentes com as observadas em árvores tropicais com as mesmas características de distribuição geográfica. O valor F_{ST} é próximo ao encontrado em pinheiros de zonas temperadas que possuem populações grandes e contínuas. Assim, é possível concluir que a diversidade genética de marcadores aloenzimáticos em *S. adstringens* é consideravelmente alta dentro de populações e consideravelmente baixa entre populações. Sendo o fluxo gênico alto o suficiente para prevenir a diferenciação, pelo menos em nível local.

Em oposição aos resultados qualitativos (marcadores aloenzimáticos) não significativos, resultados relativos às características quantitativas diferiram significativamente entre populações, indicando adaptação a ambientes específicos. Assim, a quantidade de fluxo gênico entre as populações de *S. adstringens* pode ser alta o suficiente

de modo a impedir a diferenciação de marcadores neutros e, a seleção no ambiente populacional intensa o suficiente para superar o fluxo gênico e manter a diferenciação adaptativa.

A divergência genética adaptativa em *S. adstringens* não parece ser apropriadamente descrita por meio de características qualitativas. O estudo de características quantitativas pode fornecer informações complementares e ajudar a elucidar o padrão de variação genética entre e dentro de populações de *S. adstringens*. Como marcadores isoenzimáticos são seletivamente neutros não refletem processos adaptativos.

Em *S. adstringens*, na construção de bancos de germoplasma ou em programas de plantio e melhoramento, a escolha apropriada dos sítios de coleta pode ser tomada com base nas informações sobre o padrão de diferenciação genética molecular e fenotípica. Programas de melhoramento genéticos voltados à produção de fenóis totais e taninos seriam beneficiados pela alta variabilidade genética a ser explorada. Amostragens populacionais deveriam considerar especialmente as populações do PE do Rio Preto, devido às diferenças aloenzimáticas e, Araçuaí devido à pronunciada produção de fenóis totais.

4.7 Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPEMIG), pelo apoio financeiro e pelas bolsas de Doutorado e Iniciação Científica. Ao Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pelo apoio logístico, ao laboratorista Francisco Glicério Ribeiro, ao Instituto Estadual de Florestas (IEF).

5.8 Bibliografia

ALFENAS, A.C., DUSI, A., ZERBINI JÚNIOR, F.M., ROBINSON, I.P., MICALES, J.A., de OLIVEIRA, J.R., DIAS, L.A.S., SCORTICHINI, M, PEREIRA, M.C.B., BONDE, R.B., de ALONSO, S.K., JUNGHANS, T.G., e BRUNE, W. (*in memoriam*) 2006. Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos. 2 ed, Ed. UFV, Viçosa.

ALMEIDA, S.P., PROENÇA, C.E.B., SANO, S.M., RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p.

ALVAREZ-BUYLLA, E.R., GARCIA-BARRIOS, R., LARA-MORENO, C., MARTÍNEZ-RAMOS, M. 1996B. Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain Forest tree species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27: 387-421.

ANDRADE, C.A., COSTA, C.K., BORÁ, K., MIGUEL, M.D., MIGUEL, O.G., KERBER, V.A. 2007. Determinação do conteúdo e avaliação da atividade anti-oxidante de *Acacia*

podalyriifolia. A. Conn. ex. Leguminosae-mimosoideae. Revista Brasileira de Farmacognosia, 17:231-235.

ASSUNÇÃO, S.L. e FELFILI, J.M. 2004. Fitossociologia de um fragmento de cerrado *sensu stricto* na APA do Paranoá, DF, Brasil. *Acta Botânica Brasílica*, 18(4): 903-909.

BARBOSA, L.C.A. Química orgânica: uma introdução para as ciências agrárias. Viçosa: UFV, 1994. 30p. (Mimeografado).

BARROS, M.A.G. 1982. Flora medicinal do Distrito Federal. *Brasil Florestal*, 12 (50): 35-45.

BERG, E.E. & HAMRICK, J.L. 1997. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Can. J. For. Res.* 27:415-424.

BORGES FILHO, H.C. e FELFILI, M.J. 2003. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no Distrito Federal. *Revista Árvore*. 27(5): 735-745.

BRANCO, E.A., ZIMBACK, L., LIMA, A.B., MORI, E.S., AOKI, H. Estrutura genética de populações de *Stryphnodendron adstringens* (MART.). 4º Seminário de Iniciação Científica do Instituto florestal, 24 de junho de 2010. IF Sér. Reg., São Paulo, (43): 29-35, 2009.

CODY, M. L. 1974. Optimization in Ecology. *Science* 183: 1156-1164.

CROW, J.F. & AOKI, K. 1984. Group selection for polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6073-6077.

ENDLER, J.A. 1986. Natural Selection in the wild. *Monographs in Population Biology* 21. Princeton, NJ: Princeton University Press.

FELFILI, J.M. e BORGES FILHO, H.C. 2004. Extrativismo Racional da Casca de Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. Universidade de Brasília, Departamento de Engenharia Florestal. 32p.

FELFILI, J.M. 2000. Perda da Diversidade. In. UNESCO. Vegetação no Distrito Federal: tempo e espaço. Brasília. p. 33-34.

FEYISSA, T. NYBOM, H., BARTISH, IV., WELANDER, M. 2007. Analysis of genetic diversity in the endangered tropical tree species *Hagenia abyssinica* using ISSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 54: 947-958.

GAIOTTO, F.A., GRATAPAGLIA, D., VENCovsky, R. 2003. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). Journal of Heredity, 94(5):399-406.

GEMMELL, N.J., SLATE, J. 2006. Heterozygote advantage for fecundity. PloS ONE 1: e125. doi:10.1371/journal.pone.0000125.

GUINET, P.H. & CACCAVARI, M.A. Pollen morphology of the genus *Stryphnodendron* (Leguminosae, Mimosoideae) in relation to its taxonomy. *Grana*, v.31, p.101-112, 1992.

HAMRICK, J.L., BLANTON, H.M., HAMRICK, K.J. 1989. The genetic structure of geographically marginal populations of ponderosa pine. Am. J. Bot. 76:1559-1568.

HAMRICK, J. L. and GODT M. J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. pp 43-63 In Brown, A. H. D., M. T. Clegg, A. L. Kahler and B. S. Weir (eds), Plant Population Genetics, Breeding and Germplasm Resources. Sinauer, Sunderland, Mass.

HAMRICK, J.L., GODT, M.J.W., SHERMAN-BROYLES, S. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in wood plant species. New Forest, 6:95-124.

HARPER, J.L. 1967. A Darwinian Approach to Plant Ecology. *Journal of Ecology*, 55(2): 247-270.

HIRSCHMANN, G.S. & ARIAS, A.R. 1990. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, 29: 159-172.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Divisão Territorial do Brasil e Limites Territoriais (2008). www.ibge.gov.br.

JACOBSON, T.K.B., GARCIA, J., da COSTA SANTOS, S., DUARTE, J.B., FARIAS, J.G., KLIEMANN, H.J. 2005. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 35(3): 163-169.

KIMURA, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217:624–626.

LI, C.C e HORVITZ, D.G. 1953 Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *Am. J. Hum. Genet.*, 5:107-117.

LOPES, G.C., SANCHES, A.C.C., NAKAMURA, C.V., DIAS FILHO, B.P., HERNANDES, L., MELLO, J.C.P. 2005. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wound in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 265-272.

LORENZI, H. 1992. Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: ed. Plantarum, p.189.

LOVELESS, M.D. & HAMRICK, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant population. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95.

LOVELESS, M.D. 1992. Isozyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization. *New Forests*. 6:67-94.

MCKAY, J.K. & LATTA, R.G. 2002. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *TRENDS in Ecology & evolution* 17:285-291.

NEI, M & KUMAR, S. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, 2000, p. 231-264.

NEI M. 1977. *F*-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41: 225-233.

OCCHIONI, E.M. de LAMARE. 1990. Considerações taxonômicas no gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae – Mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. *Acta Botânica Brasílica*. 4:153-158.

PENNA, M. *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*. 3 ed. Rio de Janeiro, Kosmos, 1946. 409 p.

PILLAR, V.D. 1994. Estratégias adaptativas e padrões de variação da vegetação. UFRGS, Departamento de Botânica, UFRGS. Disponível em <http://ecoqua.ecologia.ufrgs.br>.

PIO CORRÊA, M. 1926. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro, Imprensa Oficial, v.1. 1474p.

SANTOS, C.S., COSTA, W.F., RIBEIRO, J.P. GUIMARÃES, D.O., FERRI, P.H., FERREIRA, H.D. SERAPHIN, J.C. 2002. Tannin composition of barbatimão species. *Fitoterapia*. 73: 292-299.

SCALON, V.R. e SOUZA, V.C. Revisão Taxonômica do gênero *Stryphnodendron* [Mart. (Leguminosae, Mimosidae)]. In. 57º Congresso Nacional de Botânica, Gramado, 6 a 10 de novembro, 2006.

SOUSA, V. A., ROBINSON, I. P., HATTEMER, H. H. 2004. Variation and Population Structure at Enzyme Gene Loci in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Silvae Genetica* 53(1): 12-19.

SHAW, C.R. & PRASAD, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochem. Gent.* 4:297-320.

SILVA, S.M. e LEMOS, J.C. 2005. Plantas medicinais de uso da população do assentamento de reforma agrária Ezequias dos Reis, Município Araguari-MG. Disponível em: <http://www.simposioreformaagraria.propp.ufu.br/trabalhos/grupo2/1.doc>.

SIQUEIRA, J.O., NAIR, M.G, HAMMESRSCHIMIDT, R., SAFIR, G.R. 1991. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10:63-121.

SOLTIS, D.E., HAUFLER, C.H., DARROW, D.C., GASTONY, G.J. 1983. Starch gel electrophoresis of fern: a compilation of grind buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *American Ferns Journal*, v.73, n.1, p.9-27.

SOUZA, C.M., SILVA, H.R., VIEIRA-JR, G.M., AYRES, M.C., COSTA, C.L.S., ARAÚJO, D.S. 2007. Fenóis totais e atividade anti-oxidante de 5 plantas medicinais. *Qumica Nova*, 30: 351-355.

de SOUZA, C.D. e FELFILI, J.M. 2006. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*. 20(1): 135-142.

SPITZE, K., 1993. Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics*, 135: 367-374.

STOECKEL, S., GRANGE, J., FERNÁNDEZ-MANJARRES, J.F., BILGER, I., FRASCARIA-LACOSTE, N., MARIETTE, S. 2006. Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal forest tree species *Prunus avium* L. *Molecular Ecology* 15: 2109–2118.

TELLES, M.P.C., VALVA, F., BANDEIRA, L.F., COELHO, A.S.G. 2003. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. – Annonaceae) no Estado de Goiás. *Revista Brasil. Bot.* 26: 123-129.

TELLES, M.P.C., COELHO, A.S.G., CHAVES, L.J., DINIZ-FILHO, J.A.F., VALVA, F. 2003. Genetic diversity and population structure of *Eugenia dysenterica* DC. (“cagaita” – Myrtaceae) in Central Brazil: Spatial analysis and implications for conservation and management. *Conservation Genetics*, 4: 685-605.

VENCOVSKY, R. 1997. Biometrical approaches for molecular markers: estimation of effective population size. In International Workshop on Agricultural Biotechnology, 1997. Proceedings. ESALQ-USP, Piracicaba, Cook College – New Jersey Agricultural Experiment Station, The State University of New Jersey, Rutgers.

VOLIS, S., YAKUBOV, B., SHULGINA, I., WARD, D., MENDLIGER, S. 2005. Distinguishing adaptive from nonadaptive genetic differentiation: comparison of Q_{ST} and F_{ST} at two spatial scales. *Heredity* 95: 466-475.

WALDMANN, P. & ANDERSSON, S. 1998. Comparison of quantitative genetic variation and allozyme diversity within and between populations of *Scabiosa canescens* e *S. columbaria*. *Heredity*, 81:79-86.

WAHLUND, S. 1928. Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas*, 11:65-106.

WIER, B.S. & COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358-1370.

WRIGHT, S. 1951. The general structure of populations. *Ann. Eugen.* 15:323-354.

6. APÊNDICE

Entomofauna Associada aos Frutos de *S. adstringens*

6.1 Justificativa

Durante as coletas foi observada variada entomofauna associada aos frutos de *S. adstringens*. Como não verificamos registros anteriores sobre quais animais estão associados às vagens e, como estes organismos interagem com a planta, animais frequentemente encontrados durante os procedimentos de coleta, foram separados em morfo-espécies, conservados em álcool 70%, e enviados ao Departamento de Entomologia da UFV onde foram identificados.

6.3 Resultados e Discussão

Dentre os insetos associados às vagens de *S. adstringens* foram identificadas cinco Ordens: Coleoptera, Dermaptera, Hymenoptera, Isoptera e Lepidoptera. Dentre os Coleoptera, foram observadas cinco morfo-espécies, de quatro Famílias: Bostrichidae: Lyctinae, Mordellidae, Nitidulidae: Carpophilinae, Nitidulidae: Nitidulinae, Staphylinidae. Foi encontrada uma morfo-espécie de Dermaptera: Forficulina: Labiidae, uma morfo-espécie de Hymenoptera: Formicidae, uma morfo-espécie de Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae e duas morfo-espécies de Lepidoptera na fase larval, entretanto, sua identificação não foi possível, visto a dificuldade de identificação de imaturos holometábolos. As larvas serão encaminhadas á especialistas visando identificação e posterior publicação.

Besouros da Família Bostrichidae são comumente broqueadores de madeira seca e se alimentam de substâncias de reserva, como amido e açúcares. Os besouros da Família Mordellidae estão associados, quase sempre, às flores, e se alimentam de néctar. Dentre os Nitidulidae encontram-se insetos associados a flores alimentando-se de pólen, enquanto

outras espécies podem atacar sementes. Os Staphylinídeos são besouros encontrados em grande variedade de habitats, mas estão comumente associados a ninhos de cupins, como inquilinos, ou em flores, onde caçam suas presas. Os Dermaptera são em sua maioria predadores, entretanto, habitualmente se nutrem de pólen. A maioria das espécies de formigas (Hymenoptera) neotropicais é generalista e, podem ser de hábito herbívoro, carnívoro ou detritívoro. Devido às várias posições que podem ocupar na cadeia trófica, seus efeitos sobre o ecossistema podem ser variados. Os cupins (Isoptera) encontrados são insetos construtores de ninhos arborícolas, e utilizam as plantas de barbatimão como sítio de nidificação e possivelmente, como alternativa alimentar.

6.4 Conclusão

A realização deste estudo contribuiu com o conhecimento da entomofauna em *S. adstringens*, entretanto, estudos mais detalhados das espécies associadas ao barbatimão e, de seus hábitos, podem fornecer informações importantes ao entendimento das relações ecológicas que envolvem estes organismos.

6.5 Agradecimentos

Ao Laboratório de Taxonomia e Sistemática dos Insetos (UFV), especialmente aos estudantes Priscila Barros Barbosa (Bolsita FAPEMIG/UFV) e Veríssimo Gibran Mendes de Sá (Doutorando CAPES/UFV). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPEMIG), pelo apoio financeiro e pelas bolsas de Doutorado (CNPQ) e Iniciação Científica (FAPEMIG).