

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDOS GENÉTICOS DE POPULAÇÕES DE *ERIOTECA*
GRACILIPES E *E. PUBESCENS* (BOMBACACEAE) EM UMA
ÁREA DE CERRADO DE UBERLÂNDIA - MG**

RODRIGO LEMES MARTINS

Monografia apresentada à Coordenação do curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Dezembro de 1999

*à eterna luta
entre a organização da energia e a
entropia...*

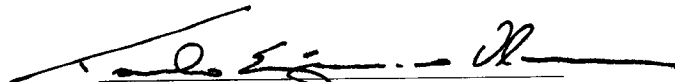
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDOS GENÉTICOS DE POPULAÇÕES DE *ERIOTECA GRACILIPES* E *E. PUBESCENS*
(BOMBACACEAE) EM UMA ÁREA DE CERRADO DE UBERLÂNDIA - MG

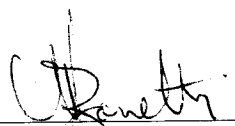
Rodrigo Lemes Martins

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 22/12/1999

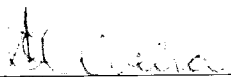
NOTA 100



Prof. Dr. Paulo Eugênio A. M. de Oliveira
Orientador



Prof.ª Dr.ª Ana Maria Bonetti
Co-Orientadora



Prof.ª MSc. Rosana de Cássia Oliveira
Co-Orientadora

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO EXAMINADORA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Uberlândia, 22 de Dezembro de 1999

AGRADECIMENTOS

Este trabalho, aconteceu em dois planos distintos que para efeito de resultado final não poderão ser tratados separadamente.

O primeiro plano é o plano profissional, onde as pessoas que se envolveram me ajudaram na realização de uma ou outra etapa do aprendizado.

O segundo plano é no plano pessoal, do meu “EU”, uma vez que este é resultado de tudo aquilo que me influenciou, me fazendo o que sou hoje, pensando como penso e escrevendo como escrevo.

Dessa forma, esses agradecimentos são dirigidos á:

À AQUELE que nos deu a vida e que, de todas as formas, é nosso referencial de busca, tão próximo que, às vezes, nos esquecemos de lembrar.

Aos culpados de tudo isso que sou, que me fazem caminhar como se essa estrada tortuosa fosse algo nobre simplesmente pelo fato de refletir suas aspirações e valores, de amor ao próximo e fé no poder pessoal de ajudar a humanidade em sua evolução. Me refiro aos meus pais (Ladair & Arlene), irmãos (Leonardo e Diôgo) e namorada (a Fá, que me acompanhou nesses últimos 4 anos, 4 meses e 7 dias).

Neste meu caminho, muitos mais pegaram em minha mão e me conduziram mesmo que por alguns passos, então, como esquecer das primeiras pescarias com meu Avô, as primeiras histórias de viagens assombradas de minha Avó.

Mais adiante contei com a constante vigília daquela que como uma mãe me assistiu correr por esse caminho, minha eterna Tutora Ana Maria Bonetti.

Também tive o apoio de um Padrinho que me ajudou a abrir as portas da estrada da Ciência, Prof. Dr. Kleber Del-Claro.

Como característica pessoal, sempre me espelho em pessoas para seguir e até mesmo tentar ficar parecido quando estiver mais a frente na Caminhada. Essas, tem uma função especial de servir como modelo, o que é muita responsabilidade. São e serão peças muito importantes em minha personalidade e formação, refiro-me ao Prof. Dr. Ignácio Machado Brito e Prof. Dr. Paulo Eugênio A. M. de Oliveira.

Outros tantos, serão eternamente tratados como pessoas de bem e nos meus discursos serão lembrados com reverencia (Prof. Kerr, Prof. Lemos, Prof. Malcon, Prof. Glein, Prof. Adriano, Tec. Anselmo).

Agradeço também aos amigos de caminhada, que me ajudaram a levantar depois de cada tropeço, dentre esses os que estiveram mais próximos, sempre me apoiando e às vezes caindo junto, os companheiros do PET que lutaram comigo durante quatro anos. Aos DeMolays, ao Martir Jacques DeMolay e à filosofia dessa Ordem que sempre foram meu Norte.

Para a consolidação deste trabalho, jamais esquecerei àqueles que me apoiaram e puxaram minha orelha na medida certa, Rosana de Cássia Oliveira e Soraya Matos de Vasconcelos (aquele empurrão final, foi crucial), Cícero Donizete Pereira, Dulce Rocha, Marli Ranal, Ivan Schiavini e mais uma lista de pessoas que já foram mencionadas anteriormente.

E finalmente, ao suporte financeiro de meu Pai e da CAPES, que garantiram a qualidade de minha formação acadêmica. À última, peço que continue a contribuir para a formação de jovens, para que no futuro não possa mencionar que sou resultado do Extinto Programa Especial de Treinamento de cidadãos- PET.

RESUMO

Estudos de variabilidade genética de populações tiveram um avanço significativo com o incremento de técnicas de Biologia molecular. Essas técnicas, tem servido para se estimar vários parâmetros úteis ao estudo da biologia floral e conservação de espécies. A técnica de RAPD se mostra eficiente pela sua alta capacidade de detecção de sítios polimórficos. O objetivo deste trabalho é otimizar os protocolos de extração e amplificação por RAPD para plantas de *Eriotheca gracilipes* e *E. pubescens* e estimar a variabilidade genética intra e interespecífica de populações dessas espécies. O estudo foi realizado em duas populações adjacentes e internas à Reserva Particular do Patrimônio Natural do Clube Caça e Pesca Itororó. Para os dados de biologia molecular foram utilizados os protocolos de extração e amplificação usualmente utilizado pelo Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia. As modificações foram no emprego de PVP-40 e Proteinase K, no protocolo de extração, além do uso de BSA e acréscimo na quantidade de $MgCl_2$, no protocolo de amplificação. Os estudos de campo foram feitos somente em *E. gracilipes*. Nesta etapa foram realizados cruzamentos e autopolinizações controladas para estudo da biologia reprodutiva. A produção de sementes, foi comparada entre os indivíduos pelo ANOVA e entre os tratamentos pelo teste “Mamm-Whitney-U”. As modificações no protocolo, procurou sanar a alta quantidade de polifenóis e polissacarídeos das plantas. Os polifenóis são agentes oxidantes que influenciam na qualidade do DNA, são abundantes em espécies não

cultiváveis, uma vez que são úteis para defesa e eliminação de plantas competidoras. Os polissacarídeos são encontrados em grande quantidade em plantas de Cerrado pois, apesar da alta produção, não são convertidos em energia para síntese de tecidos vegetais devido a pobreza do solo. Os dados de campo sugerem que *E. gracilipes* seja uma espécie autoincompatível e a estatística utilizada para comparação da produção de frutos não apontaram diferença significativa. A análise do padrão de bandas foi feita com a utilização de 6 “primers” que apresentaram uma grande variabilidade dentro do grupo de *E. gracilipes* e pequena variabilidade dentro da população de *E. pubescens*, com a formação de 3 grupos de mesmo genótipo. A presença de baixa variabilidade em *E. pubescens*, foi discutida como resultado de um processo de reprodução por apomixia adventícia que produziria populações clonais. *E. gracilipes* apresentou o dobro de variabilidade encontrada em *E. pubescens* o que é justificado pelo sistema xenogâmico das plantas, evidenciado pelos estudos de Campo. As populações das duas espécies envolvidas no estudo, apresentaram uma diferença superior a 50%. Os protocolos foram otimizados e as técnicas de RAPD se mostraram eficientes no estudo da variabilidade de populações de plantas do Cerrado juntamente com os dados de Campo da biologia reprodutiva das espécies.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
2.1. Área de estudo.....	6
2.2. A amostra.....	9
2.3. Experimentos de Laboratório.....	9
2.4. Extração de DNA.....	10
2.5. Quantificação e Qualificação do DNA.....	11
2.6. RAPD – DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso	12
2.7. Separação e Visualização dos Produtos Amplificados.....	13
2.8. Análise dos Dados.....	13
2.9. Experimentos de campo.....	14
3. RESULTADOS.....	16
3.1. Otimização do Protocolo.....	16
3.2. Análise das bandas polimórficas.....	18
3.3. Cruzamentos Controlados de Campo.....	20
4. DISCUSSÕES.....	24
4.1. Otimização do Protocolo.....	23
4.2. Dados Moleculares.....	26
5. CONCLUSÃO.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

LISTA DE FIGURAS

- 1 – Área onde foi realizado o estudo. (☐) Área dos indivíduos usados nos estudos de DNA e cruzamentos de Campo. Os indivíduos usados no experimento de divergência genética por RAPD foram amostrados a partir do Bairro City Uberlândia, terminando no CCPIU. (✱) Área restante dos indivíduos utilizados nos cruzamentos de Campo.....8
- 2 – Padrão de bandas por RAPD obtido com o “primer” OPM11. Os indivíduos de 1 a 10 corresponde a *E. pubescens* e de 11 a 20 a *E. gracilipes*. M – marcador de peso molecular. A seta indica banda polimórfica para *E. gracilipes*.....18
- 3 – Padrão de bandas por RAPD obtido com o “primer” OPC06. Os indivíduos de 1 a 10 corresponde a *E. pubescens* e de 11 a 20 a *E. gracilipes*. A seta indica bandas polimórficas para *E. pubescens*.....19
- 4 – Dendrograma das distâncias genéticas entre indivíduos das espécies de *Eriotheca gracilipes* e *E. pubescens* com base em 33 posições de bandas obtidas por 6 “primers”.....20

LISTA DE TABELAS

- 1 – Resultado das polinizações controladas efetuadas em flores de *E. gracilipes*, índice de autoincompatibilidade obtido a partir destes resultados.....21

1. INTRODUÇÃO

Níveis de endogamia e fluxo gênico são temas freqüentes nos trabalhos relativos à Ecologia e conservação de espécies vegetais. Estes trabalhos têm sido realizados por estudiosos de Biologia reprodutiva de plantas por meio de técnicas de cruzamentos controlados e métodos indiretos para estimar a paternidade (KAGEYAMA 1987; ANDRADE 1995; ASHMAN 1998). Porém, com o advento de técnicas de biologia molecular como RAPD, RFLP, Microssatélites e outras, tem-se determinado, de maneira mais direta, a estrutura genética de uma espécie e o modo pelo qual a variabilidade genética

se distribui dentro da população (KEARNS e INOUE 1993). O entendimento dessa estrutura permite a utilização apropriada e conservação dos recursos genéticos florestais (KAGEYAMA 1987; CHASE *et al.* 1996).

A estrutura genética é influenciada por vários fatores, dentre eles o tamanho efetivo da população, a distribuição geográfica, modo de reprodução, modo de dispersão de sementes, riqueza da comunidade vegetal, além da taxa de emigração e história da população (KAGEYAMA 1987). Neste contexto, a biologia molecular pode retratar a variabilidade, servindo como importante diagnóstico para a discussão quanto às pressões evolutivas sofridas por uma população em função de seu ambiente.

Dentre as áreas tropicais em franco processo de degradação está o Cerrado ou Savana Neotropical, que ocorre na região Central do Brasil em áreas de chuvas sazonais, solos pobres e queimadas periódicas. Abrange uma extensa área que corresponde a 22% (2,0 milhões de km²) (HENRIQUES 1993; BORALI 1996) do território brasileiro onde, apesar da riqueza em espécies vegetais, a biodiversidade ainda é pouco conhecida (ALHO e MARTINS 1995).

Estudos sobre o Cerrado têm evidenciado que a mesma diversidade de espécies vegetais, polinizadores e vetores encontrados em comunidades florestais, pode ser observada em comunidades de plantas lenhosas de Cerrado (OLIVEIRA *et al.* 1992). O número de espécies xenógamas

obrigatórias (84%) se mostra superior a de algumas florestas tropicais. Esses dados sugerem a existência de grande número de estratégias de reprodução e de interações interespecíficas, bem como uma grande heterogeneidade na estrutura gênica dessas comunidades (OLIVEIRA 1994). Essa intrincada rede de relações entre as espécies e o meio faz com que mudanças na densidade das plantas ou do polinizador ocasione efeitos críticos na fertilização e sucesso reprodutivo das plantas (JANZEN 1980; JAMES 1998).

Entretanto, 59% das espécies de Cerrado apresentam capacidade de multiplicação vegetativa (HENRIQUES 1993) ou sistemas de reprodução apomíticos que contrastam com a predominância da xenogamia obrigatória entre as plantas do Cerrado; um exemplo, são os sistemas encontrados por OLIVEIRA *et al.* (1992) para espécies de *Eriotheca*: *Eriotheca pubescens* (MART. e ZUCC.) SCHOTT e ENDL. e *E. gracilipes* (K.SCH.) ROBYNS (Bombacaceae), que são comuns em extensas áreas do Cerrado (ARAÚJO, n. p.; HENRIQUES 1993; CABRAL 1995; OLIVEIRA 1997). Ambas possuem a mesma dinâmica de floração e a estrutura das flores é similar, com pequenas variações no tamanho das peças florais. São polinizadas por abelhas grandes, principalmente do gênero *Centris* e *Xylocopa*, com eventuais visitas de outros insetos. Segundo OLIVEIRA *et al.* (1992), *E. gracilipes* é uma espécie auto-incompatível, enquanto *E. pubescens* é uma espécie auto compatível, que

apresenta formação de embriões adventícios no saco embrionário. Esse processo, citado por KOLTUNOW (1993) como Apomixia adventícia, foi sugerido para *E. pubescens* por OLIVEIRA *et al.* (1992), com base em evidências de poliembrionia nas sementes. Porém, o estudo não confirma claramente a ocorrência de apomixia, sendo que as observações embriológicas não estabeleceram a origem assexuada dos embriões observados.

A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tem se mostrado uma importante ferramenta para análise de relações de paternidade e avaliação de populações clonais (GRATTAPAGLIA *et al.* 1995). Esta técnica se baseia na utilização de “primers” curtos de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação do DNA pela técnica do PCR, gerando grandes quantidades de segmentos que variam entre indivíduos, mostrando o grau de polimorfismo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA 1998).

O estudo comparativo da variabilidade genética de espécies congênicas serve como parâmetro para examinar a influência da biologia reprodutiva das espécies sobre a estrutura genética das populações. Tal comparação permite a análise das variações taxonômicas e relações filogenéticas entre as espécies de *Eriotheca*, além da padronização das técnicas de biologia molecular e sua utilização direta no estudo da ecologia dessas plantas.

Este trabalho tem por objetivo testar metodologias de extração de DNA e RAPD e otimizar protocolos adequados ao estudo da variabilidade genética intra e interespecífica de *Eriotheca gracilipes* e *E. pubescens*, discutindo os resultados obtidos para esclarecer os mecanismos reprodutivos das espécies. A expectativa é que o trabalho possa levar a padronização de um protocolo para a utilização das técnica de PCR – RAPD com espécies de Cerrado.

Além disso o trabalho buscará, por meio de estudos de campo, obter maiores informações e experiência em relação a biologia reprodutiva destas espécies, confirmando ou não resultados anteriores já publicados e comparando-os com os dados moleculares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estudo de Campo

O estudo foi realizado durante o período de Março de 1999 a Dezembro de 1999, no município de Uberlândia (18°30' - 19°30' S; 47°50' W) (ROSA *et al.* 1991), Estado de Minas Gerais. Este município situa-se no domínio dos planaltos e chapadas da Bacia Sedimentar do Paraná, sobre a Formação Serra Geral, ocupando uma área de 4.040 Km² (TOMAZZOLI 1990; BORALI 1996; RABELO 1997).

O clima na região é tropical chuvoso com inverno frio e seco e verão quente e chuvoso, caracterizando o tipo de clima Aw, segundo a classificação de Köppen (BORALI 1996). O inverno (Junho a Agosto) apresenta uma temperatura média mensal de 18,8°C e pluviosidade variando de 20 a 50mm, enquanto o verão (Dezembro a Fevereiro) apresenta temperaturas médias mensais de 23,5°C com índice pluviométrico em torno de 812,5 mm (ROSA *et al.* 1991; BORALI 1996). O tipo de solo, geralmente encontrado, é o Latossolo Roxo, álico ou distrófico, Latossolo Vermelho-amarelo e Gley Húmico (EMBRAPA 1982 *apud* CABRAL 1995; BORALI 1996).

A região se encontra sob o domínio do Cerrado, que se caracteriza por uma vegetação xeromórfica formada, basicamente, de árvores tortuosas, arbustos e gramíneas em diferentes proporções que formam gradientes fitofisionômicos (RIBEIRO *et al.* 1983; ALHO e MARTINS 1995).

Eriotheca gracilipes é uma espécie muito comum no Cerrado de Uberlândia (CABRAL 1995; OLIVEIRA 1997), ocorrendo em 70% das áreas amostradas e *E. pubescens* é mais rara ocorrendo em apenas 15% dos levantamentos (ARAÚJO, n. p.).

Os indivíduos estudados estão localizados em populações de áreas vizinhas e internas à Reserva Particular do Patrimônio Natural Caça e Pesca Itororó, propriedade do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU) (Figura 1).

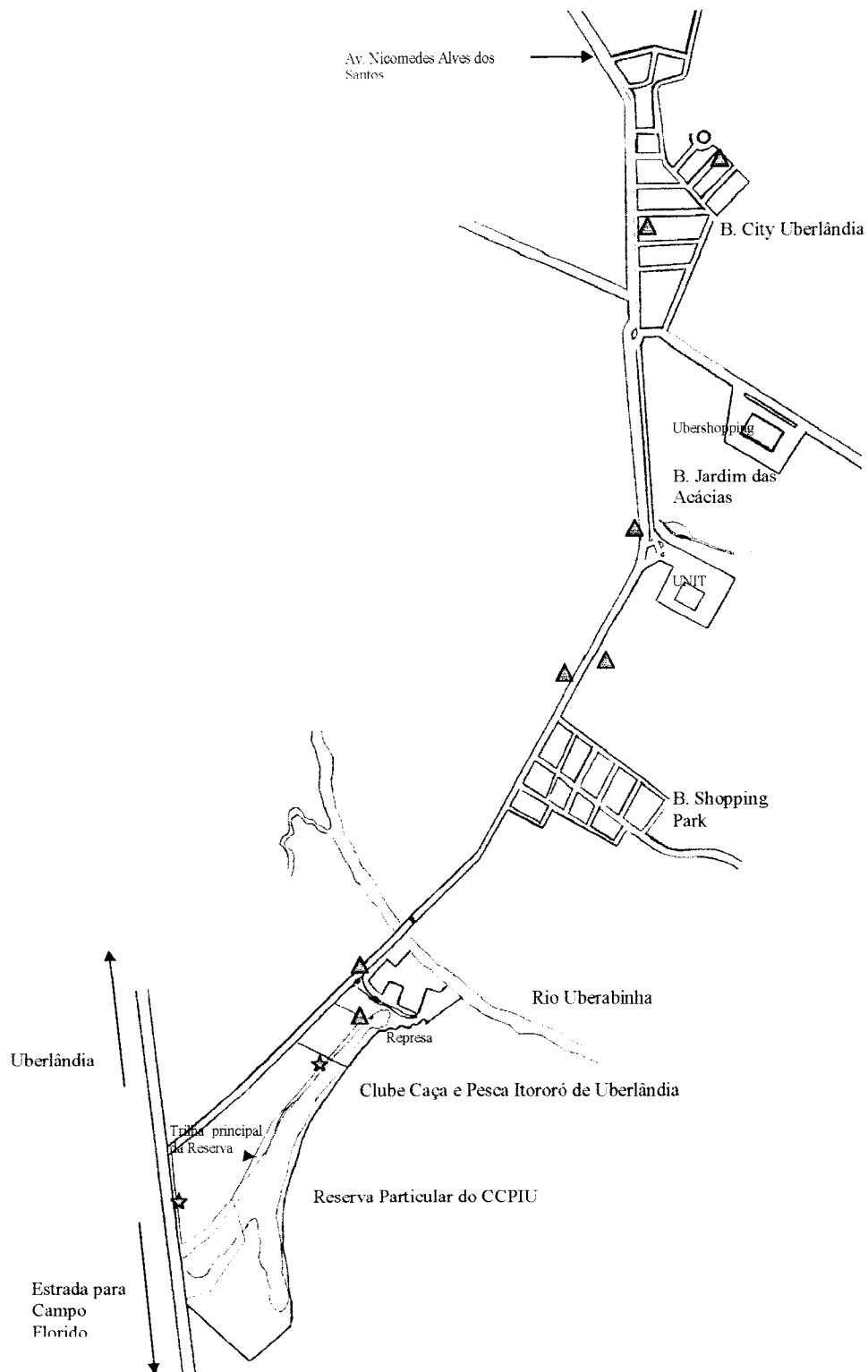


Figura -1: Área onde foi realizado o estudo. (▲) Área dos indivíduos usados nos estudos de DNA e cruzamentos de Campo. Os indivíduos usados no experimento de divergência genética por RAPD foram amostrados a partir do Bairro City Uberlândia, terminando no CCPIU. (*) Área restante dos indivíduos utilizados nos cruzamentos de Campo.

A Reserva possui uma área de 127ha e encontra-se atravessada por uma Vereda que margeia o Córrego do Lajeado, onde ocorre manchas de Mata Mesófila e ainda o gradiente Campo sujo e Cerrado (sentido estrito).

Em função do desenvolvimento da pecuária, a área sofreu perturbações até o final década de 80, porém mesmo com a constante ameaça do fogo, a vegetação natural tem se reconstituído e apresenta grande diversidade de espécies comparando-se com outras áreas de Cerrado (sentido restrito) (CABRAL 1995; OLIVEIRA 1997).

2.2. A amostra

A amostra para o estudo do DNA, constituiu-se de 10 indivíduos de cada espécie que foram previamente marcados com etiquetas metálicas numeradas. A localização de cada planta foi definida por coordenadas obtidas com o auxílio de um GPS – Garmin II-Plus. Os exemplares estudados tiveram as folhas jovens coletadas e armazenadas em freezer a -70°C .

2.3. Experimentos de Laboratório

Os experimentos de Biologia Molecular foram realizados no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia no período de Março a Dezembro de 1999.

2.4. Extração de DNA

Das folhas armazenadas à -70°C , após lavagem com detergente e água, foram utilizados 400mg para extração do DNA. A extração seguiu o protocolo relatado por PEREIRA (1999) que utilizou o mesmo para a extração do DNA de *Ananas* (Bromeliaceae) em condições de infra-estrutura semelhante a do trabalho em questão com modificações baseadas em WEISING (1995) e FERREIRA e GRATAPAGLIA (1998). Macerou-se 400mg de folha em nitrogênio líquido, que foram transferidos para um microtubo de 2ml, onde foram adicionados 1,5 ml de Tampão de extração (Polivinilpirolidone-40M 2%; NaCl 1,4M; Tris HCl pH8,0 100mM; EDTA 20mM; CTAB 2% e β -Mercaptoetanol a 0,2%), em seguida incubado em banho-maria à 65°C por uma hora e, posteriormente, centrifugado por 15 minutos à 9.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo onde foram adicionados 10 μl de Proteinase K (10mg/ml), incubando-se o extrato vegetal à 45°C por 60min. Em seguida, adicionou-se 10 μl de RNase (10mg/ml) para incubação por 30 minutos, à 37°C . Os tubos com o extrato vegetal foram, então, a partir daí, completados com Clorofórmio - Álcool isoamílico (24:1) e centrifugados à 10.000rpm durante 13 minutos. O sobrenadante foi retirado e repetiu-se a limpeza com Clorofórmio - Álcool isoamílico. Ao DNA, em solução no sobrenadante, adicionou-se 2/3 do volume da solução em Isopropanol absoluto PA e 1/10 do

volume da solução em Acetato de Sódio 3M. Os tubos foram mantidos “overnight” a 4°C e, em seguida, centrifugados a 10.000 rpm por 30 minutos; o DNA (“pellet”) foi lavado com etanol 70% e em seguida, separado do Etanol pelo processo de secagem em estufa a 37°C e ressuspenso em 200µl de Tris-EDTA (TE).

2.5. Quantificação e Qualificação do DNA

Inicialmente, foi feita a aplicação de 10 µl de DNA estoque em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio. Neste teste, foi verificado a presença e a qualidade do DNA, observando-se a integridade do mesmo e a ocorrência de contaminantes.

A quantificação do DNA foi feita por espectrofotometria utilizando-se um espectrofotômetro Hitachi U-2000. Uma alíquota de 10µl de amostra de DNA estoque foi diluída 100 vezes em água ultrapura e a quantificação foi feita pela absorbância a 260nm. As concentrações de DNA acusadas pelo espectrofotômetro foram calculadas pela seguinte fórmula:

$$[\text{DNA}] = \text{ABS}(260) \times 50 \times \text{Fator de Diluição}$$

Após a quantificação e a confirmação da qualidade do DNA, este foi aliquotado em amostras de trabalho à 10ng/µl (PEREIRA 1999).

2.6. RAPD – DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso

De 16 “primers” testados selecionou-se seis que ofereceram um melhor padrão de bandas polimórficas em dois DNAs inicialmente analisados. Todos os “primers” utilizados foram fabricados pela OPERON Technologies Inc., sendo todos oligonucleotídeos com 10 bases e de seqüências arbitrárias.

O volume total de cada reação foi de 18 μ l. Cada reação continha: 1,8 μ l de tampão da *Taq* 10x (Tris HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM – 1x), 1,8 μ l de dNTPs 10mM (100 μ M de: dGTP, dCTP, dATP e dTTP), 2,7 μ l de MgCl₂ 10mM (1,3mM), 10 pmol de “primer”, U de *Taq* DNA Polimerase, 10ng de DNA genômico (ausente no controle negativo, feito para cada bateria de reações), 1 μ l de albumina soro bovina purificada (BSA - 10mg/ μ l) e água ultrapura para completar o volume de 18 μ l. Sobre cada reação adicionou-se uma gota de óleo mineral, para evitar a evaporação no termociclador. Antes de serem levadas ao termociclador cada reação foi submetida a um pulso rápido de 4.000rpm para homogeneização das reações.

Para cada bateria de reações fez-se um controle negativo com todos os compostos da reação, exceto o DNA, para verificar se os produtos amplificados das reações apresentavam DNA genômico resultante de contaminações ou artefatos do “primer”.

As reações foram amplificadas em Termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-100, por 3 ciclos de 94°C/1min, 35°C/1min e 72°C/1min; 34 ciclos de 94°C/10s, 40°C/20s e 72°C/2min.

2.7. Separação e Visualização dos Produtos Amplificados

Os produtos das ampliações foram separados em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Borato- EDTA (TBE) 0,5X.

Para a eletroforese, adicionou-se em cada amostra 1/5 do seu volume de tampão de carregamento (azul de bromofenol 3,61M, Xileno Cianol 4,64M, Sacarose 1,17M e EDTA 0,1M pH8,0). A eletroforese foi conduzida a 0,23 V/ml por 2 horas. Os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotografados em VDS Image System – Pharmacia, usando filtro laranja, tempo de exposição de 4,00 a 5,00 segundos, contraste de 0 a 6 e 0,45 de fator de correção da câmera.

2.8. Análise dos Dados

O padrão de bandas de cada reação, foi analisado por meio da contagem do número de bandas presentes em cada gel. As bandas pouco visíveis não foram incluídas.

O padrão diferencial de bandas foi utilizado para descrever a diferença genética inter e intraespecífica por meio de uma matriz binária baseado na presença (1) e ausência(0) de bandas reproduzíveis.

A matriz foi gerada pelo programa STATISTICA 4,5 (1993) e utilizada para o cálculo das distâncias genéticas e análise de agrupamento. As distâncias genéticas foram calculadas pelo método de Porcentagem de Desacordo, segundo a fórmula: N'_{AB}/N_T , onde N'_{AB} é o número total de bandas polimórficas entre os genótipos comparados e N_T é o número total de bandas.

A análise de grupos ou “clusters” foi feita através do método não ponderado de agrupamento aos pares, utilizando-se médias aritméticas (UPGMA – Unweighted pair-group method using arithmetic average), que agrupa indivíduos de acordo com a similaridade. Inicialmente, os indivíduos mais similares são agrupados e, assim, sucessivamente, até os indivíduos ou grupos, mais distantes.

2.9. Experimentos de campo

Os estudos de campo sobre a biologia reprodutiva das espécies envolveu cruzamentos controlados. Estes foram feitos no período de Maio a Agosto, quando *E. gracilipes* e *E. pubescens* florescem, na região de Uberlândia. Para

tal, foram marcadas novas plantas totalizando uma amostra final de 22 indivíduos de *E. gracilipes* e 20 de *E. pubescens*, incluindo as envolvidas no estudo do DNA.

Os botões florais utilizados nos tratamentos, foram mantidos isolados de visitantes (abelhas *Xilocopa frontalis*) polinizados por meio de ensacamento, para o controle dos cruzamentos (KEARNS e INOUE 1993). As polinizações cruzadas aconteceram entre indivíduos distantes mais de 2,5m, pois este é o valor máximo da distância de caules resultantes de crescimento vegetativo encontrado por HENRIQUES (1993) em espécies de Cerrado. O mesmo autor registrou a presença de processo semelhante em *Eriotheca pubescens*, com indivíduos com caules vegetativos distantes até 1,5m. Os frutos, resultantes dos tratamentos, foram coletados e o número de sementes produzidas por autopolinização e por polinização cruzada foram comparados por meio do teste de “Mann-Whitney - U” para dados não paramétricos (SOKAL e ROHLF 1981). Para comparação entre o número de sementes resultantes de tratamentos que foram produzidos em cada planta, foi utilizado o teste estatístico ANOVA.

3. RESULTADOS

3.1. Otimização do Protocolo

Inicialmente, o protocolo de PEREIRA (1999) foi testado para as espécies *Vochysia tucanorum*, *Ananas* sp, *Eriotheca gracilipes* e *Cabralia canjerana*. Neste teste, apenas o DNA de *E. gracilipes* não foi extraído. Para tanto, acrescentou-se as etapas de limpeza com ~50µl (1/10 do volume do tubo) de uma solução 10% de CTAB e 1.4M de NaCl entre os passos de limpeza com Clorofórmio - Álcool isoamílico (24:1), seguindo sugestões de FERREIRA e GRATAPAGLIA (1998).

Estes passos não foram suficientes para limpar a amostra que se manteve viscosa e com coloração parda durante todo o processo de extração. A análise da qualidade das bandas em gel de agarose 1,0% dessa espécie revelou uma quantidade variável de DNA e visualmente contaminada por outras substâncias de coloração parda.

A alta quantidade de proteínas foi sanada com a utilização de Proteinase K (10mg/ml) com posterior incubação do extrato vegetal à 45°C por 60min antes do acréscimo de 10µl de RNase (10mg/ml). O uso da Proteinase K diminuiu a viscosidade da amostra, porém ainda foi possível verificar a presença de contaminantes, principalmente nas amostras de *E. gracilipes*.

O padrão de bandas das amplificações iniciais foi comprometido, com amplificações ausentes, muito fracas e de caráter irreprodutível, não sendo mantido a qualidade das amplificações ao longo de testes sucessivos. Para tanto, utilizou-se no protocolo de extração o Polyvinylpyrrolidone-40M, que já se mostrou eficiente na extração do DNA de plantas, sendo útil na eliminação dos contaminantes (n. p. D.M.S.ROCHA).

O uso do mesmo não resultou em uma melhora visível no resultado da extração do DNA de *E. gracilipes*, porém *E. pubescens* apresentou quantidades de DNA bastante homogêneas quando comparadas as bandas dos indivíduos da mesma espécie, em gel de 1,0%.

Após o acréscimo do PVP-40 no protocolo de extração do DNA, manteve-se a baixa qualidade das amplificações ao longo de testes sucessivos. Baseado nestes resultados, foi acrescentado BSA (1µl à 10mg/µl em cada reação) e aumentada a quantidade de MgCl₂ (de 2 para 2,7 mM).

3.2. Análise das bandas polimórficas

A análise do padrão de bandas amplificadas obtidas com os seis “primers” apresentou 33 posições de bandas passíveis de análise, dentre estas, 45,45% foram bandas polimórficas interespecíficas e 30,30% bandas polimórficas intra-específicas. Das últimas, oito bandas (24,24%) demonstraram polimorfismo para *E. gracilipes* (exemplo na Figura 2) e duas (6,06%) para *E. pubescens* que apareceram em um único “primer”-OPC06 (Figura 3).

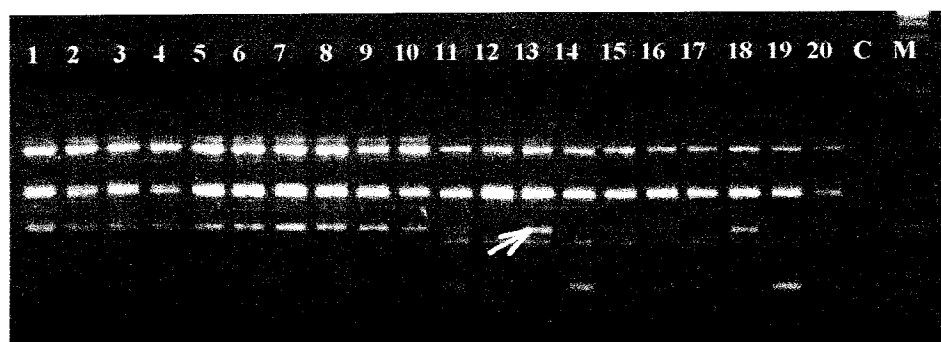


Figura – 2: Padrão de bandas por RAPD obtido com o “primer” OPM11. Os indivíduos de 1 a 10 corresponde a *E. pubescens* e de 11 a 20 a *E. gracilipes*. M – marcador de peso molecular. A seta indica banda polimórfica para *E. gracilipes*.

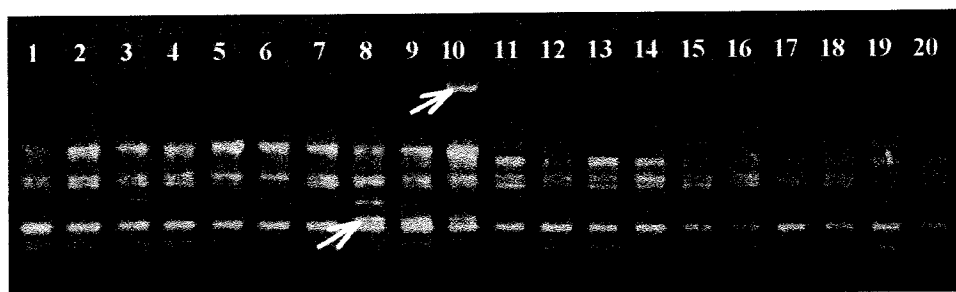


Figura – 3: Padrão de bandas por RAPD obtido com o “primer” OPC06. Os indivíduos de 1 a 10 corresponde a *E. pubescens* e de 11 a 20 a *E. gracilipes*. A seta indica bandas polimórficas para *E. pubescens*.

A análise estatística da porcentagem de desacordo, pelo Método não ponderado de agrupamento aos pares, forneceu o dendrograma apresentado na Figura 4, que mostra a existência de dois grupos contendo indivíduos clonais (Porcentagem de desacordo = 0) dentro da população de *E. pubescens*. Já *E. gracilipes*, não apresentou nenhum indivíduo com o mesmo padrão de bandas.

Os indivíduos de *E. pubescens* foram relacionados formando grupos que acompanharam a seqüência de coletas de indivíduos no transecto, onde está distribuída a população (Figura 1). Quanto à *E. gracilipes*, os agrupamentos não evidenciaram relação espacial clara, entre os indivíduos (Figura 4).

Quanto à relação entre as espécies analisadas, as mesmas apresentam divergência genética máxima de 0,575 o que resultou na formação de dois grupos com segregação distinta (Figura 4). A população de *E. pubescens*, que forma o primeiro grupo, apresenta divergência genética máxima entre os indivíduos de 0,0575, enquanto que na população de *E. gracilipes* a divergência genética máxima entre os indivíduos foi de 0,12.

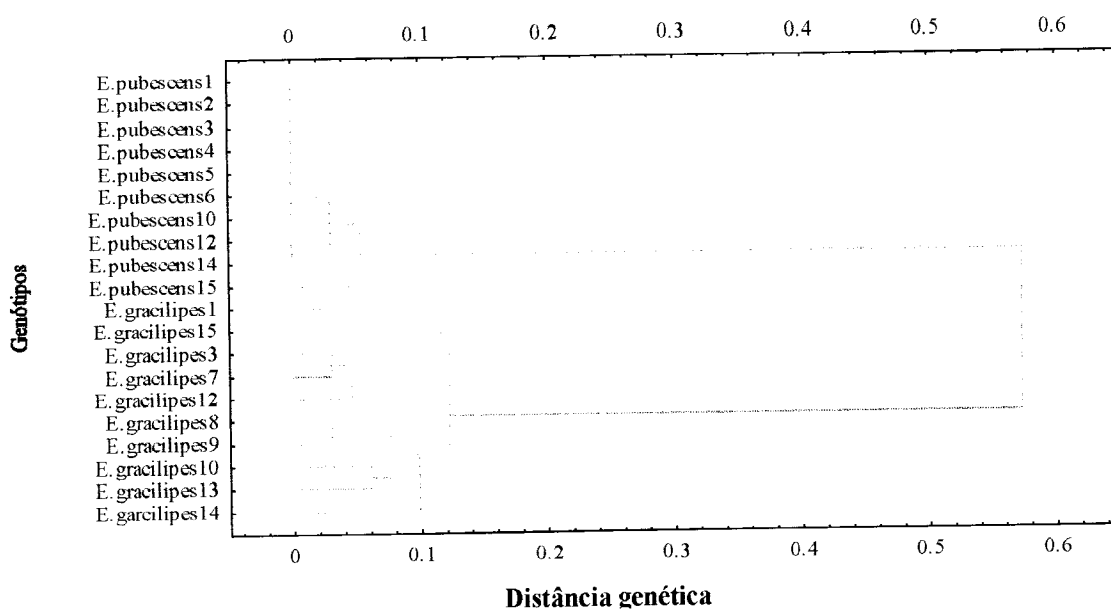


Figura – 4: Dendrograma das distâncias genéticas entre indivíduos das espécies de *Eriotheca gracilipes* e *E. pubescens* com base em 33 posições de bandas obtidas por 6 “primers”.

3.3. Cruzamentos Controlados de Campo

Os cruzamentos se deram durante o período de 19 de maio à 17 de julho de 1999, estando este intervalo compreendido entre os período de floração das

espécies estudadas. A população de *E. gracilipes* iniciou sua floração no início de maio e findou em meados do mês de agosto enquanto *E. pubescens* apresentou um período muito curto de floração que durou de junho à agosto com a maioria dos indivíduos iniciando a floração no final de julho.

Além da curta floração de *E. pubescens*, foi encontrado nos indivíduos da população estudada um alto índice de botões abortados devido à predação por larvas. Tal predação e o pequeno intervalo entre o início e o fim da floração da população de *E. pubescens*, não permitiu que os cruzamentos controlados fossem realizados nessa espécie.

Em *E. gracilipes*, porém, foram realizados todos os cruzamentos e a análise do sistema de reprodução confirmou que a planta é basicamente auto-incompatível (tabela 1), mesmo produzindo alguns frutos resultantes de autopolinização.

Tabela1: Resultados das polinizações controladas efetuadas em flores de *E. gracilipes*, índice de autoincompatibilidade obtido a partir destes resultados.

Tratamentos	Flores (n)	Frutos (n)	Sucesso (%)
CONTROLE (Polinização natural)	108	13	12,037
AUTOPOLINIZAÇÃO	100	3	3,000
POLINIZAÇÃO CRUZADA	98	16	16,326
Total	313	32	31,167

ISI* = 0,184

*Índice de autoincompatibilidade (% de frutos autopolinizados / % de frutos de polinização cruzada). 0,25 seria o limite para plantas autoincompatíveis (BULLOCK, 1985).

Para os cruzamentos, foram utilizados 12 indivíduos de *E. gracilipes*, dos quais apenas 6 estiveram presentes na amostra utilizada para o estudo do DNA. Sete indivíduos produziram frutos resultantes de polinizações controladas. A média de frutos por tratamento foi de 0,128 (S=0,139).

A comparação entre o número de sementes produzidas pelos frutos de cada indivíduo, pelo ANOVA, evidenciou não haver variação significativa no número de sementes produzidas entre cada indivíduo (F=0,1177; 3,10).

No experimento, a média de sementes produzidas foi, na autopolinização, de 6 sementes/ fruto (S=3,873) e na polinização cruzada, 15,818 sementes/fruto (S=10,404). Segundo o teste “Mann-Whitney -U” para dados não paramétricos não há diferença significativa entre as duas médias (U= 27; $\alpha = 28$ a 0,05).

4. DISCUSSÕES

4.1. Otimização do protocolo

A qualidade do DNA extraído é o que irá garantir uma boa amplificação, uma vez que substâncias indesejadas podem promover a inibição da reação de PCR e até mesmo, degradação parcial ou total do DNA (WEISING *et al.* 1995; FERREIRA e GRATTAPAGLIA 1998). Essa degradação, mesmo que pequena, diminui a reprodutibilidade do teste, uma vez que variações na quantidade do DNA podem promover o enfraquecimento e desaparecimento do sinal de bandas no gel, tornando o resultado caótico (WILLIAMS *et al.* 1993).

Vários procedimentos são descritos para a extração do DNA de tecidos vegetais, cada um com modificações particulares para cada organismo visando resolver problemas específicos (PARKER *et al.* 1998).

Os protocolos de extração se baseiam na destruição mecânica de membranas e paredes celulares, na ação de detergentes para solubilização de membranas lipoproteicas e no uso de proteinases e nucleases que atuam quimicamente em seus respectivos substratos. A extração de componentes orgânicos ocorre através do uso do fenol e do clorofórmio como solventes, o que facilita a separação em centrífuga de lipídios, de proteínas e da maioria dos polissacarídeos, que ficam retidos na fase orgânica inferior (FERREIRA e GRATTAPAGLIA 1998; PARKER *et al.* 1998).

Geralmente, as plantas produzem metabólitos secundários que interferem na extração (WEISING *et al.* 1995). Após a centrifugação, alguns polissacarídeos, assim como compostos fenólicos ainda podem ser encontrados na fase líquida junto com DNA.

Segundo WEISING *et al.* (1995), a alta viscosidade de uma amostra é um indicativo da presença de polissacarídeos, assim como a coloração parda geralmente é resultado da oxidação de polifenóis em compostos quinônicos, os quais são poderosos agentes oxidantes do DNA e de proteínas.

Para evitar isso, fez-se necessário o uso de polyvinylpyrrolidone (PVP) como agente antioxidante (FERREIRA e GRATTAPAGLIA 1998). JOHN (1992 *apud* WEISING *et al.* 1995) foi o primeiro a utilizar o PVP no protocolo de extração de DNA, usou especificamente para Bombacaceae, Malvaceae, Moraceae, que possuem alta quantidade de polifenóis.

Como evidenciado nos resultados, o aumento da concentração de PVP não trouxe melhora na qualidade da extração. Possivelmente, o clorofórmio não atuou efetivamente na dissolução de polifenóis, pois após a centrifugação e o tratamento da fase aquosa (com NaCl e álcool), nota-se a precipitação do DNA juntamente com substâncias de coloração parda. Mesmo as subsequentes fases de retirada do NaCl com álcool, não evitavam a presença de contaminantes.

É conhecida a eficiência do método de extração para *Eucalyptus* (BARIL *et al.* 1997; GAIOTTO *et al.* 1997), *Dicentrarchus* (CACCONI *et al.* 1997), *Pinus* (KNOTT *et al.* 1997), *Manihot esculenta* (GRATTAPAGLIA *et al.* 1995), *Pterodon* (ROCHA e MACDOWELL 1997), além de outras citações de FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1998) com relação à *Brassica*, *Citrus*, milho, arroz e dendê. Geralmente os trabalhos nesta área, estão relacionados a espécies cultiváveis que são selecionadas artificialmente para que a quantidade de taninos, quinonas e polifenóis seja reduzida.

Dentre as espécies citadas, apenas *Pterodon* é uma planta de Cerrado. É possível especular que estas plantas, devido à deficiência de minerais e matéria orgânica do solo, não conseguem nutrientes para o seu crescimento. Porém, a abundância de energia solar e água garante uma alta produção de açúcares (polissacarídeos) e gorduras que acabariam sendo acumuladas nos tecidos (ALHO e MARTINS 1995). Outro aspecto é a quantidade e importância de substâncias de defesa nos tecidos de plantas de ambientes restritivos e com alta diversidade de insetos, pois esse fator diminuiria perdas pela herbivoria (JANZEN 1980). Acúmulo destes produtos nos tecidos explicariam as dificuldades de extração encontradas em *Eriotheca*.

Apesar da contaminação da solução de trabalho, a amplificação de fragmentos pôde ser realizada eficientemente com o uso do BSA, promovendo a estabilização da *Taq*, que poderia estar sendo influenciada por íons resultantes da oxidação dos polifenóis (FERREIRA e GRATTAPAGLIA 1998). O magnésio foi utilizado apenas para aumentar a intensidade de bandas podendo melhorar a visualização do produto amplificado (WILLIAMS 1993).

4.2. Dados moleculares

A utilização de marcadores moleculares em plantas tem sido uma ferramenta muito útil para estudar a estrutura gênica de uma comunidade

vegetal (SCHNABEL *et al.* 1998). Estudos de diversidade e paternidade tiveram um avanço significativo após a descoberta e utilização destas técnicas (CHASE *et al.* 1996, DOWEASHLEY 1996; NASON *et al.* 1996) que permitiram comparações de indivíduos e definições das porções genômicas associadas à diferenças adaptativas específicas (CACCONI *et al.* 1997; PEREIRA 1999). Dentre as técnicas, o RAPD se mostra eficiente em estudos de variabilidade devido ao alto poder de detecção de polimorfismo.

Nas espécies envolvidas neste estudo, a porcentagem de desacordo entre as espécies foi de 0,575. FERREIRA (1999) com 12 “primers”, encontrou uma porcentagem de desacordo entre duas espécies de *Ananas* (0,24) que foi inferior à encontrada entre as próprias variedades de *Ananas comosus*. O mesmo autor sugere um estudo da viabilidade de híbridos de *Ananas anassoides* e *Ananas nanus* para comprovação da classificação atual. Desta maneira, o percentual de desacordo entre as espécies de *Eriotheca* foi relativamente alto e consistente com as diferenças morfológicas e cromossômicas que caracterizaram as espécies (ROBYNS 1963; OLIVEIRA *et al.* 1992).

Estudos com RAPD com maior número de “primers” ou a utilização de “primers” longos poderia confirmar os dados obtidos para as espécies de *Eriotheca* estudadas, assim como a similaridade com outras espécies

congenéricas. OLIVEIRA *et al.* (1992) sugerem a possibilidade de *E. pubescens* ter uma ligação estreita com *E. gracilipes*, podendo ser a primeira, uma forma hexaploide da segunda. OLIVEIRA *et al.* (1992) ainda relatam vários casos de poliploidia em plantas de Cerrado, assim como a associação desta variação com a evolução e com a quebra no sistema de incompatibilidade das espécies afetadas.

Há limitações quanto à comparação entre índices de similaridade de espécies estudadas por protocolos diferentes. Porém, o uso de espécies congenéricas, sob os mesmos números de variáveis, pode evidenciar claramente o efeito da biologia reprodutiva na estrutura genética das populações de cada espécie. A população de *E. pubescens*, apresentou divergência genética máxima entre os indivíduos de 0,0575, corroborando a hipótese da existência de uma baixa variabilidade gênica devida a apomixia, como discutido por OLIVEIRA *et al.* (1992).

Na população de *E. gracilipes* a divergência genética máxima entre os indivíduos é de 0,12, dobro dos índices mostrados para *E. pubescens*. Esse resultado evidencia a existência de uma variabilidade gênica maior nesta espécie, explicada pelos dados de campo, que indicam que esta espécie é predominantemente xenógama.

Estudos sobre outras espécies de Bombacaceae têm mostrado sistemas reprodutivos variados, com espécies marcadamente xenogâmicas (GIBBS e BIANCHI 1993; GRIBEL *et al.* 1999) e outras inclusive apomíticas (BAKER 1960; DUNCAN 1970). O que se pode esperar é que a variabilidade gênica seja maior entre indivíduos de espécies xenogâmicas do que entre os indivíduos de espécies apomíticas.

O dendrograma obtido para os indivíduos da população de *E. pubescens* (Figura 4) permitiu que se identificasse dois potenciais grupos clonais e um indivíduo diferenciado (*E. pubescens* 15), num total de 3 genótipos apenas. Mesmo assim foi grande a similaridade entre os genótipos encontrados (0,0575 de divergência máxima).

A autogamia poderia explicar estes valores de similaridade obtidos para *E. pubescens*. Porém, dados de OLIVEIRA *et al.* (1992) já sustentavam a hipótese da existência de populações clonais em *E. pubescens*, resultante da formação de frutos com embriões adventícios. KOLTUNOW (1993) menciona que a apomixia é típica em espécies poliplóides (como *Dichantium p. ex.*), pelo excesso de cópias de determinado alelo mutante, que dispara a formação de embriões adventícios. Esse fato pode contribuir para o entendimento da origem da apomixia em *E. pubescens*. Apomixia adventícia é citada para

outras espécies de Bombacaceae e parece estar também associada à poliploidia (BAKER 1960; DUNCAN 1970).

Os dados do presente estudo sugerem que os possíveis grupos clonais em *E. pubescens* estejam dispostos em áreas bem definidas ao longo do transecto (Figura 1 e 4). Em *E. pubescens*, entre o grupo dos indivíduos 12 e 14 e o indivíduo 15, encontrou-se divergência máxima de 0,0575, embora os indivíduos 14 e 15 estão dispostos aproximadamente 3m, em campo. Estes resultados contraditórios podem ser devidos a variabilidade normal da espécie. Mas pode também, ser resultado de mutações ou alterações cromossômicas que não obrigatoriamente irão provocar modificações a nível de tecido reprodutivo. Essas alterações somáticas (mosaicismo), não são herdáveis e, portanto, não contribuem para o aumento de variabilidade genética da população, porém, são comuns em plantas (RICHARDS 1986, ROCHA e MACDOWELL 1997).

As vantagens da manutenção de um genótipo bem adaptado é clara em um ambiente estável o que justifica também a reprodução vegetativa (FORD 1980, ROCHA e MACDOWELL 1997). Apesar da vantagem dessa estratégia, a manutenção de uma percentagem de reprodução sexual, mesmo esporádica, garante a existência da variabilidade genética que assegure a sobrevivência da espécie em períodos instáveis, o que é verificado em gramíneas, segundo

KNOX (1967) e RICHARDS (1986). O primeiro, em seu estudo com *Dichanthium*, mencionou a apomixia como um evento que ocorre apenas em organismos tetraplóides e é regulado pelo fotoperíodo. Esse fato demonstra a vantagem de tal reprodução para a manutenção de indivíduos polimórficos dentro das populações clonais e a influência de fatores abióticos neste processo. Tal influência também foi mencionada por ROCHA e MACDOWELL (1997) para populações de *Pterodon pubescens*. *P. pubescens*, a sucupira branca. Esta espécie, comum no cerrado que apresenta populações clonais (talvez por multiplicação vegetativa) e sexuadas, conforme indicado pelo RAPD. Esta apomixia facultativa poderia ser uma forma de multiplicar genótipos favoráveis em condições ambientais adversas (ROCHA e MACDOWELL 1997).

Quanto ao sistema reprodutivo de *E. gracilipes*, os dados de campo corroboraram os resultados obtidos por OLIVEIRA et al. (1992), exceto pela presença de sementes resultantes de autopolinização. Porém, esta produção de sementes por autopolinização esteve limitada a alguns indivíduos da população (*E. gracilipes* 10 e *E. gracilipes* 15) que não foram analisados nos estudos moleculares. A viabilidade e vigor destas sementes também não pôde ser testados.

5. CONCLUSÃO

- Os protocolos estabelecido na metodologia deste trabalho permitiu, após alguns ajustes, uma eficiente extração e amplificação do DNA de espécies de *Erioteca*.

- Com o uso de apenas seis “primers”, foi possível evidenciar o dobro de variabilidade gênica dentro da espécie de *E. gracilipes*, quando comparado com *E. pubescens*.

- A população de *E. pubescens* apresentou a formação de prováveis grupos clonais dispostos de forma bem definida ao longo do transecto de

coleta em campo. Tais resultados corroboram a idéia de que a espécie é apomítica.

- Resultados de polinizações controladas no campo e os dados moleculares confirmam a predominância da xenogamia e maior variabilidade gênica em *E. gracilipes*.

- A técnica de RAPD se mostrou de grande valia para estudos de biologia reprodutiva e estrutura gênica de populações de plantas do cerrado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, H.A.(1995) **Distância, Fecundidade e Estrutura Genética de populações de *Styrax ferrugineus* (Styracaceae) e *Vochysia cinnamomea* (Vochysiaceae)**. Monografia de Bacharelado do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, 31p.
- ALHO,C.J.R. e MARTINS,E.S.(1995) **De Grão em Grão o Cerrado Perde o Espaço**. Brasília - DF, WWF, Pro-Cer: 1-17.
- ASHMAN, T-L.(1998) Is relative pollen production or removal a good predictor of relative male fitness? an experimentel exploration with a wild strawberry (*Fragaria virginiana*, Rosaceae). **American Journal of Botany** **85** (8):1166-1171.
- BAKER, H.G. (1960) Apomixis and polyembryony in *Pachira oleaginea* (Bombacaceae). **Amer.J.Bot.** **47**: 296-302.

- BARBOSA, M.M. (1998) Quantificação e controle da qualidade do DNA genômico *In*. MILACH, S. (org.) **Marcadores Moléculares em Plantas**. Porto Alegre - RS, Gráfica da UFRGS: 99-106.
- BARIL, C. P.; VERHAEGEN, D.; VIGNERON, P.; BOUVET, J.M. and KREMER, A. (1997) Structure of the specific combining ability between two species of *Eucalyptus*. I.RAPD data. **Theor Appl Genet** **94**: 796-803.
- BORALI, M. P. (1996) **A Reserva Particular do Patrimônio Natural Caça e Pesca Itororó – Uberlândia – MG**. Monografia de Bacharelado do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, 52p.
- BULLOCK, S.H. (1985) Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest. **Biotropica** **17**: 287-301.
- CABRAL, V.A.R. (1995) **Levantamento fitossociológico das espécies arbóreas de Cerrado (sentido restrito) do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia –MG**. Monografia de Bacharelado do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, 43p.
- CACCONE, A.; ALLEGRUCCI, C.; FORTUNATO, C. and SBORDONI, V. (1997) Genetic differentiation within the European Sea Bass (*D. labrax*) as revealed by RAPD – PCR. **Journal of Heredity** **88**: 316-324.
- CHASE, M., KESSELL, R. and BAWA, K. (1996) Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany** **83** (1): 51-57.
- DOW, B.D. and ASHLEY, M.V. (1996) Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. **Molecular Ecology** **5**: 615-627.
- DUNCAN, E.J. (1970) Ovule and embryo ontogenesis in *Bombacopsis glabra* (Pasq.) A. Robyns. **Ann. Bot** **34**: 671-676.

- FERREIRA, M. E. e GRATTAPAGLIA, D. (1998) **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares**. 3ed., Brasília - DF, EMBRAPA-CENARGEN, 220p.
- FORD, E. B. (1980) **Genética e adaptação**. São Paulo, EPU, 69p.
- GAIOTTO, F.A.; BRAMUCCI, D. and GRATTAPAGLIA (1997) Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theor Appl Genet** **95**: 842-849.
- GIBBS, P.E., and BIANCHI, M. (1993) Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta** **106**: 64-71.
- GRATTAPAGLIA, D.; SILVA, C.C. and NASSAR, N.M.A. (1995) Strict maternal inheritance of RAPD fingerprints confirms apomixis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Canadian Journal of Plant Science** **76**: 379-382.
- GRIBEL, R.; GIBBS P.E. and QUEIROZ, A.L. (1999) Flowering phenology and pollination biology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Amazonia. **Journal of Tropical Ecology** **15**: 247-263.
- HENRIQUES, R.P.B. (1993) **Organização da estrutura das comunidades vegetais de Cerrado em um gradiente topográfico no Brasil Central**. Tese de Doutorado em Ecologia, Inst. de Biol. da Universidade de Campinas, 99p.
- JAMES, T., VEGE, S.; ALDRICH, P. and HAMRICH, J.L. (1998) Mating Systems of three Tropical Dry Forest tree Species. **Biotropica** **30** (4): 587-594.
- JANZEN, D.H.(1980) **Ecologia Vegetal nos Trópicos**. São Paulo, Editora Pedagógica Universitária, 79p.

- JOHN, M.E. (1992) An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. **Nucl. Acids Res.** **20**: 2381
- KAGEYAMA, P.Y.(1987) Genetic structure of tropical tree species of Brazil. *In*: International Workshop, Bangi, Malásia. **Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants**: 375-387.
- KEARNS, C. A. and INOUE, D.W. (1993) **Tecnicas for Pollination Biologists**. Colorado, Niwot, University Press of Colorado: 217-230.
- KNOTT, S.A.; NEALE, D.B.; SEWELL, M.M. and HALEY, C.S. (1997) Multiple marker mapping of quantitative trait loci in an outbred pedigree of loblolly pine. **Theor Appl Genet** **94**: 810-820.
- KNOX, R. B. (1967) Apomixis: Seasonal and Population Differences in a Grass. **Science** **157**: 325-326.
- KOLTUNOW, A.M. (1993) Apomixis: Embryo Sacs and Embryos Formed without Meiosis or Fertilization in Ovules. **The Plant Cell** **5**: 1425 – 1437.
- NASON, D.; HERRE, E. A. and HAMRICK, J. L. (1996) Paternity analysis of breeding structure of strangler fig populations: evidence for substantial long-distance wasp dispersal. **Journal of Biogeography** **23**: 501-512.
- OLIVEIRA, E.L.(1997) **Composição florística, fitossociológica e levantamento de sistema sexual de uma área de cerrado em Uberlândia -MG**. Monografia de Bacharelado do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, 62p.
- OLIVEIRA, P.E.A.M.; BARBOSA, A.A. and TALAVERA,S.(1992) Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the brazilian Cerrados. **Pl.Syst. Evol.** **179**: 207-219.

- OLIVEIRA, P.E.A.M. (1994) Aspectos da Reprodução de Plantas de Cerrado e Conservação. **Bol.Herb. Ezechias Paulo Heringer** 1:34-45.
- PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C. and FUERST, P.A. (1998) What Molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology** 79 (2): 361-383.
- PEREIRA, C.D. (1999) **Estudos genéticos em Abacaxizeiro (*Ananas comosus*, L)**. Tese de Mestrado em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 68p.
- RABELO, L.F.G.(1997) **Interação abelha-planta na Reserva Ecológica do Clube Caça e Pesca Itororó (Uberlândia – MG), com ênfase em Apidae**. Monografia de bacharelado do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, 29p.
- RIBEIRO, J.F., SANO, S.M., MACEDO, J. e SILVA, J.A. (1983) Os principais Tipos Fitofisionômicos da região dos Cerrados. **Boletim de Pesquisa** 21: 5-21.
- RICHARDS, A.J. (1986) **Plant breeding systems**. London, George Allen & Unwin (Publishers)Ltd. . 383-402.
- ROBYNS, A. (1963) Essai de monographie du genre *Bombax* s.L. (Bombacaceae). **Bull. Jard. Bot. Etat Brux.** 33: 1-315.
- ROCHA, D. M. S. e MACDOWELL, S. (1997) Identificação de clones de *Pterodon pubescens* Benth. (leguminosae, Papilionoidae) através de utilização da técnica da RAPD. In. LEITE, L. L. e SAITO, C.H. (org.) **Contribuição ao conhecimento ecológico do Cerrado: Trabalhos selecionados do 3^o Congresso de Ecologia do Brasil**. Brasília -DF, Depto. Ecologia/UnB: 309-315.
- ROSA, R.L.; LIMA, S.C. e ASSUNÇÃO, W.L. (1991) Abordagem preliminar das condições climáticas de Uberlândia (MG). **Sociedade & Natureza** 3 (5 e 6): 91-108.

-
- SCHNABEL, A.; NASON, J.D. and HAMRICK, J.L. (1989) Understanding the population genetic structure of *Gleditsia triacanthos* L.: seed dispersal and variation in female reproductiv success. **Molecular Ecology** 7: 819-832.
- SOKAL, R. R. and ROHLF, F. J. (1981) **Biometry**. New York, W. H. Freeman and Company: 433-435
- TOMAZZOLI, E.R.(1990) A evolução geológica do Brasil Central. **Sociedade & Natureza** 2 (3): 11-29.
- WEISING, K., NYBOM, H., WOLFF, K. and MEYER, W. (1995) **DNA Fingerprinting in Plants and Fungi**. Boca Raton, CRC Press. 43-50.
- WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI J.A. and TINGEY, S.V. (1993) Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. **Methods in Enzymology** 218: 705 – 741.