



**ISAIAS EMÍLIO PAULINO DO CARMO**

**VARIAÇÃO HAPLOTÍPICA DO DNA  
CLOROPLASTIDIAL DE *Eremanthus*  
*erythropappus* MacLeish E  
*Eremanthus incanus* Less (Less.)**

**LAVRAS – MG**

**2013**

**ISAÍAS EMÍLIO PAULINO DO CARMO**

**VARIAÇÃO HAPLOTÍPICA DO DNA CLOROPLASTIDIAL DE  
*Eremanthus erythropappus* Macleish E *Eremanthus incanus* Less (Less.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Manejo Ambiental, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora  
Dra. Dulcinéia de Carvalho

**LAVRAS – MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Carmo, Isaías Emílio Paulino do.

Varição haplotípica do DNA cloroplastidial de *Eremanthus erythropappus* Macleish e *Eremanthus incanus* Less (Less.) / Isaías Emílio Paulino do Carmo. – Lavras : UFLA, 2013.

91 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Dulcinéia de Carvalho.

Bibliografia.

1. Filogenia. 2. Diversidade genética. 3. Genealogia. 4. Analysis of Molecular Variance - Amova. 5. Filogeografia. 6. Análise RFLP.  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD –583.550415

**ISAÍAS EMÍLIO PAULINO DO CARMO**

**VARIAÇÃO HAPLOTÍPICA DO DNA CLOROPLASTIDIAL DE  
*Eremanthus erythropappus* Macleish E *Eremanthus incanus* Less (Less.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Manejo Ambiental, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de Julho de 2013.

Dr. Allan de Freitas Magalhães      UFLA

Dr. Fábio de Almeida Vieira      UFRN

Dra. Dulcinéia de Carvalho  
Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2013**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, que me apoiou, da melhor maneira que pode, e me deu as bases necessárias para chegar até aqui. Agradeço muito, de coração a Elizete Paulino do Carmo, Nely Aparecida Paulino, Nilza Paulino, Maria Stela Paulino (*in memorian*), José Tercio Paulino (*in memorian*) e Terezinha Paulino. Obrigado a todos por tudo.

Agradeço também a meus irmãos Isabela e Isaac pelo simples fato de serem meus irmãos.

A professora Dulcinéia de Carvalho pela oportunidade, confiança e pelo exemplo de vida. E a mim mesmo pois se não tenho a menor dúvida de que a melhor coisa que fiz no mestrado foi ter escolhido a melhor orientadora que eu conheço na UFLA.

Aos amigos do Laboratório: Murilo, Moskovis (Edu), Rute, Joema, Joelma, Natália e a toda a equipe, em especial aos companheiros Jaque e Sheila, além de Bila (vulgo Allan) pelo companheirismo e amizade sincera.

Obrigado a todos os amigos mestrado pela amizade e risadas.

Agradeço aos professores do Departamento de Ciências Florestais – DCF pela atenção e todo o conhecimento repassado e por sempre me deixarem entrar atrasado nas aulas.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Florestais – DCF, especialmente aqueles que trabalham no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, pela dedicação, bem como a CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus grandes amigos brejeiros, Ney, Danilão, Edmar, Fabiônico, Rogério, Péricles, Potássio, Balbino e outros, companheiros na pobreza, nos dias de alegria ou de provas e ru fechado.

Aos amigos do Lemaf, kalanguinho, Chapolim, Thiza e outros pela ajuda nas coletas e amizade.

Aos amigos e companheiros que sempre me apoiaram em tudo, Magrelo, Zaca, Gadernal, meu grande irmão Cisão, Xande, Dainho, Sidney, meu amigo Wagner (*in memoriam*).

A minha Misuzinha, Joanna, companheira e meu grande amor. Obrigado pela eterna paciência e amor.

E em especial a Luninha, minha linda princesinha (*commingsoon*). E para todos vocês que passaram pela minha vida:

“You can't always get what you want,  
You can't always get what you want.  
You can't always get what you want  
But if you try sometimes, yeah  
You just might find you get what you need!”  
Roolling Stones

## RESUMO

As espécies *Eremanthus erythropappus* e *Eremanthus incanus* são popularmente conhecidas como candeia, ocorrendo predominantemente em áreas montanhosas em Minas Gerais. *E. erythropappus* é utilizada para a confecção de moirões e produção de óleo essencial, cujo o princípio ativo é o alfa-bisabolol e *E. incanus* apenas para a produção de moirões. Ambas são de grande importância ecológica, econômica e social em Minas Gerais, sendo nos últimos anos explorada por meio de técnicas de manejo florestal. A utilização de parâmetros ecológicos e critérios econômicos somados ao conhecimento de aspectos genéticos são fundamentais para o delineamento de estratégias de conservação. O autor desse trabalho objetivou o estudo da diversidade haplotípica e estrutura genética utilizando DNA cloroplastidial. Foram coletadas amostras foliares de 141 indivíduos em 10 populações naturais de *E. erythropappus* e de 25 indivíduos em quatro populações naturais de *E. incanus*. As amostras foram analisadas a partir de 15 primers universais para cloroplasto e nove enzimas de restrição. Apenas uma combinação primer/enzima (SFM/HinfI) revelou polimorfismo, sendo identificado três diferentes haplótipos. O haplótipo 1 foi considerado ancestral dos demais, com frequência rara. A frequência do haplótipo 3 foi de 95,2% nas populações de *E. erythropappus* e a do haplótipo 2 foi de 90%, em *E. incanus*. As populações de *E. erythropappus* apresentam-se estruturadas, diferenciando-se geneticamente em relação às áreas de ocorrência, ou seja as populações localizadas no norte foram geneticamente diferentes das localizadas no centro-sul do estado. Para *E. incanus* não foi observada estruturação genética. As diversidades estimadas e observadas foram baixas,  $H_S = 0,174$  e  $0,220$ ;  $H_T = 0,167$  e  $0,210$ , para *E. erythropappus* e *E. incanus*, respectivamente. Em ambas as espécies, observaram-se valores nulos e negativos para a diferenciação genética ( $G_{ST}$  e  $N_{ST}$ ). Para *E. erythropappus* recomenda-se a preservação das populações de Medina e Francisco Sá ao norte e na região Centro-Sul, a população de Lavras. Para *E. incanus* dever ser priorizada conservação das populações de Francisco Sá, ao norte, e as populações de Lavras e São Tomé das Letras na região Centro-Sul do estado.

Palavras-chave: cpDNA. Filogeografia. Índices de diferenciação. Análise RFLP.

## ABSTRACT

The species *Eremanthus erythropappus* and *Eremanthus incanus* are popularly known as candeia, occurring predominantly in mountainous areas in Minas Gerais. *E. erythropappus* is used for making fence posts and essential oil production, whose active ingredient is alpha-bisabolol, and *E. incanus* only for the production of fencepost. Both are very important ecological, economic and social development in Minas Gerais, and in recent years it has been explored through forest management techniques. The use of ecological parameters and economic criteria added to the knowledge of genetic parameters are fundamental to the design of strategies for its conservation. This work aims to study the haplotypic diversity and genetic structure using chloroplast DNA. Leaf samples were collected from 141 individuals in 10 natural populations of *E. erythropappus* and from 25 individuals in four natural populations of *E. incanus*. The samples were analyzed using 15 universal primers for chloroplast and nine restriction enzymes. Only 1 combination primer/enzyme (SFM/HinfI) showed polymorphism, and then three different haplotypes were identified. The haplotype 1 was considered the ancestor, with rare frequency. The frequency of haplotype 3 was 95.2% in the populations of *E. erythropappus* and haplotype 2 showed frequency of 90% in the populations of *E. incanus*. *E. erythropappus* populations presented structured and with evident genetic differentiation among the analyzed areas of occurrence, that is the populations located in the north were genetically different from those located in the south-center of the state. *E. incanus* genetic structure was not observed, neither genetic structure. The estimated and observed diversities were very low,  $H_S = 0,174$  e  $0,220$ ;  $H_T = 0,167$  e  $0,210$ , for *E. erythropappus* e *E. incanus*, respectively. In addition, for both species, null and negative values for genetic differentiation ( $G_{ST}$  and  $N_{ST}$ ) were observed. For *E. erythropappus* the preservation of the Medina and Francisco Sá (North) and Lavras populations (Central-South) is recommended. For *E. incanus* should be prioritized the conservation of Francisco Sá (North), and the populations of Lavras and São Tomé das Letras in the South region of the state.

Keywords: cpDNA. Phylogeography. Differentiation indices. RFLP analysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Área de ocorrência da candeia em Minas Gerais .....	27
Figura 2	Localização geográfica das populações <i>Eremanthus erythropappus</i> e <i>E. incanus</i> em Minas Gerais (Brasil).....	35
Figura 3	Variação em fragmentos de cpDNA amplificados com o primer SFM e digerido com a enzima de restrição Hinf I em amostras de indivíduos <i>Eremanthus erythropappus</i> .....	44
Figura 4	Minimum Spanning Network construída para os três haplótipos obtidos em <i>Eremanthus erythropappus</i> e <i>E. incanus</i> ...	44
Figura 5	Distribuição geográfica das populações e frequência haplotípica de cpDNA em <i>Eremanthus erythropappus</i> .....	49
Figura 6	Contribuição para a diversidade total (CT) de cada população de <i>Eremanthus erythropappus</i> para haplótipos cloroplastidiais.....	50
Figura 7	Distribuição geográfica das populações e frequência haplotípica de cpDNA em <i>Eremanthus incanus</i> .....	54
Figura 8	Contribuição para a diversidade total (CT) de cada população de <i>Eremanthus incanus</i> para haplótipos cloroplastidiais.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Índices de diversidade genética encontrados para <i>Eremanthus erythropappus</i> e <i>E. incanus</i> .....	18
Tabela 2	Lista de espécies do gênero <i>Eremanthus</i> .....	25
Tabela 3	Populações amostradas de <i>Eremanthus erythropappus</i> e <i>E. incanus</i> , em Minas Gerais, Brasil.....	34
Tabela 4	Nome e sequência dos <i>primer</i> universais de cpDNA, status de amplificação, e polimorfismo observado nas amostras avaliadas.....	37
Tabela 5	Análise da distribuição haplotípica das populações de <i>Eremanthus erythropappus</i> de acordo com a combinação primer/enzima (SFM/HinfI) .....	48
Tabela 6	Análise hierárquica da variância molecular de quatro populações de <i>Eremanthus erythropappus</i> .....	53
Tabela 7	Análise da distribuição haplotípica das populações de <i>Eremanthus incanus</i> de acordo com a combinação primer/enzima (SFM/HinfI) .....	56
Tabela 8	Análise hierárquica da variância molecular de quatro populações de <i>Eremanthus incanus</i> .....	57
Tabela 9	Análise da estrutura genética das populações de <i>Eremanthus erythropappus</i> e <i>E. incanus</i> .....	58
Tabela 10	Análise hierárquica da variância molecular de 13 populações de <i>E. erythropappus</i> e <i>E. incanus</i> .....	63

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
2.1	Conservação genética de espécies arbóreas.....	13
2.2	DNA cloroplastidial .....	19
2.2.1	Métodos para a análise do DNA cloroplastidial.....	21
2.3	Gênero <i>Eremanthus</i> .....	23
2.3.1	<i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) Mac Leish.....	28
2.3.2	<i>Eremanthus incanus</i> (Less.) Less.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	33
3.1	Locais de coleta e amostragem das populações.....	33
3.2	Extração do DNA genômico.....	35
3.3	Amplificação dos fragmentos de DNA via PCR.....	36
3.4	Análise RFLP .....	39
3.5	Identificação de haplótipos, índices de diversidade e estrutura genética .....	40
3.6	Minimum Spanning Network .....	42
3.7	Contribuição genética.....	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1	<i>Eremanthus erythropappus</i> .....	46
4.2	<i>Eremanthus incanus</i> .....	53
4.3	<i>Eremanthus erythropappus</i> e <i>E. incanus</i> .....	57
5	CONCLUSÕES.....	67
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
	REFERÊNCIAS .....	71
	ANEXOS .....	91

## 1 INTRODUÇÃO

*Eremanthus erythropappus* (DC.). Mac Leish e *Eremanthus incanus* Less, são espécies arbóreas pertencentes à família Asteraceae, conhecidas popularmente como candeia. Ambas são utilizadas para a produção de moirões, sendo a madeira muito valorizada devido à sua alta durabilidade natural. Além disso, a madeira de *E. erythropappus*, espécie florestal de múltiplos usos, considerada também como uma espécie arbórea medicinal, é muito utilizada para a produção de óleo essencial e o  $\alpha$ -bisabolol, utilizados pelas indústrias cosmética e farmacêutica (cremes, bronzeadores, protetores solares, veículo para medicamentos, além de uso na profilaxia e cuidados da pele de bebês e adultos, entre outros). Por outro lado, *E. incanus* não apresenta potencial para produção de óleo.

Até o ano de 2000, apesar do alto potencial econômico, a exploração de madeira nativa de candeia foi realizada de maneira predatória, sem aplicar técnicas de manejo florestal e com baixa remuneração para os produtores rurais. Para contrapor à clandestinidade usual no corte da espécie, foi proposto no ano de 2000 o projeto intitulado “Manejo Sustentável da Candeia” pela Universidade Federal de Lavras, visando à geração de conhecimento e tecnologia para as espécies de candeia, de forma a possibilitar o uso sustentável dessas espécies pelos produtores rurais, valorizando os produtos obtidos da candeia e regulamentando o setor produtivo. Informações referentes sobre a estrutura, dinâmica de crescimento, aspectos econômicos da produção e silvicultura foram disponibilizadas com os resultados do projeto, o que resultou na sustentabilidade dos sistemas de manejo e ecologia da candeia, em diversos locais de sua ocorrência em Minas Gerais (SCOLFORO; OLIVEIRA; DAVIDE, 2012). Os dados gerados pelo projeto auxiliaram o Instituto Estadual de Florestas (IEF) lançar a Portaria 01 de 5 de janeiro de 2007 que dispõe sobre as normas para a

realização do manejo da candeia em Minas Gerais (MINAS GERAIS, 2007). Posteriormente, foi institucionalizada a Resolução de nº 1804, publicada em fevereiro de 2013, trazendo novos termos de referência para o manejo sustentável da candeia, nativa e para os plantios das espécies (MINAS GERAIS, 2013).

Para consolidar o sistema de manejo sustentável proposto para a candeia, a equipe do Laboratório de e Conservação Genética de Espécies Arbóreas, do Departamento de Ciências Florestais da UFLA, desenvolveu alguns estudos ecológicos e genéticos. Estes estudos levaram ao conhecimento da fenologia e biologia reprodutiva (ARRIEL, 2009; VIEIRA; FAJARDO; CARVALHO, 2012), diversidade genética de populações de candeia (ARRIEL, 2009; ESTOPA et al., 2006; MOURA, 2005; SILVA et al., 2007). Entre os resultados obtidos algumas unidades evolutivas significativas foram determinadas (PÁDUA, 2011), o que realmente faz com que a conservação de áreas de ocorrência da candeia e seu manejo florestal possam realmente ser consolidados.

Entretanto, ainda faltam informações sobre a contribuição das populações para a diversidade genética total e sobre os aspectos filogeográficos da candeia. Esses aspectos são importantes para o esclarecimento de padrões de dispersão histórica das sementes, rotas de recolonização, de distribuição da diversidade genética e locais de refúgios da espécie. Dessa forma, o presente trabalho, consistiu no estudo da estrutura e da diversidade haplotípica de populações de candeia, *E. erythropappus* e *E. incanus*, em Minas Gerais, a partir da análise do DNA cloroplastidial. Sendo que os objetivos específicos são:

- a) Indicar áreas prioritárias para a conservação das espécies;
- b) Verificar se há diferenciação haplotípica entre as regiões amostradas.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Conservação genética de espécies arbóreas**

A conservação genética de populações naturais tem como objetivo a manutenção da diversidade genética, de modo que essas populações persistam devido a alterações que possam ocorrer no ambiente. A viabilidade de uma população pode ser afetada pela diminuição de sua variabilidade genética e, como consequência pode acarretar aumento do nível de endogamia, na erosão do potencial evolutivo de uma espécie e na extinção local de populações (CRNOKRAK; ROFF, 1999; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002; FREITAS et al., 2006; QUÉMÉRÉ et al., 2010). O conhecimento sobre a diversidade genética de uma espécie é fundamental para inferências e previsões sobre os níveis de endogamia, depressão gênica, fluxo gênico e seleção natural, parâmetros essenciais para o entendimento dos processos mantenedores da variabilidade genética (AGUILAR et al., 2008; TORO; CABALLERO, 2005; WRIGHT, 1978).

Informações sobre a diversidade genética e sistema reprodutivo, que é o elo genético entre as gerações, são imprescindíveis para o delineamento de estratégias para a conservação, melhoramento genético e a exploração florestal sustentada de espécies arbóreas (KAGEYAMA et al., 2003; RAJORA; PLUHAR, 2003). O sistema reprodutivo determina, em parte, a estrutura genética das populações e, a diversidade genética promove a matéria-prima para adaptação, evolução e sobrevivência de indivíduos e das espécies principalmente frente às mudanças ambientais e, reduções na diversidade genética podem predispor as espécies às doenças, reduzir a produtividade e limitar o melhoramento genético. Em se tratando de espécies arbóreas a diversidade

genética se torna ainda mais importante quando se considera a longevidade das mesmas (RAJORA; PLUHAR, 2003).

Além da importância de se manter as populações de espécies arbóreas com altos níveis de variabilidade genética, deve-se considerar a fragilidade dos biomas tropicais, principalmente os de altitude, que segundo Brown e Kappelle (2001), por ocuparem superfícies menores, podem estar sujeitos a um maior risco de extinção. Face à vulnerabilidade local aliada à elevada diversidade biológica presente nestes locais, a análise da variabilidade genética juntamente ao estudo de parâmetros ecológicos e critérios econômicos tornam-se fundamentais para auxiliar a definição de estratégias de manejo e conservação dessas populações naturais (AGUILAR et al., 2008; AVISE; HAMRICK, 1996; KAGEYAMA, 2000; KAGEYAMA; GANDARA, 1993; SOUZA; LOVATO, 2010). Por exemplo, o conhecimento da diversidade genética pode ser aplicado em atividades relacionadas à definição do tamanho e localização de reservas (BRANDÃO, 2012; DUARTE, 2011; PÁDUA, 2011), manejo adequado das espécies (AZEVEDO et al., 2007; DEGEN et al., 2006; LACERDA; NIMMO; SEBBENN, 2013; LEMES et al., 2007; SEBBEN et al., 2000), identificação e diferenciação de táxons (CADDAH et al., 2013; CAVALLARI et al., 2010) e coletas de sementes para plantio de espécies nativas (FERREIRA et al., 2012; GONELA et al., 2013; TARAZI et al., 2013).

A caracterização da variabilidade genética pode ser feita a partir de medidas de diversidade genética intrapopulacional e interpopulacional, que poderão ser estimadas a partir de dados de marcadores moleculares (CAVALLARI-NETO, 2004; GE et al., 2005; ZAGHLOUL et al., 2006). Dessa forma, os marcadores moleculares se apresentam como sendo a principal ferramenta para descrever os padrões da variabilidade genética de uma população natural (SEBBENN, 2001).

Alguns parâmetros, como a porcentagem de locos polimórficos (P), número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e índice de fixação (f) têm sido usados na caracterização da variabilidade genética intrapopulacional (BERG; HAMRICK, 1997). Além desses, destaca-se o de diversidade de Nei (NEI, 1973), que consiste na probabilidade de que dois alelos amostrados sejam diferentes.

A utilização de medidas de divergência relacionadas aos parâmetros de Nei, como  $D_{ST}$  e  $G_{ST}$ , que são medidas de diferenciação absoluta e relativa, foram propostas por Pons et al. (1998). A contribuição de uma dada população para a diversidade total – diversidade de Nei, riqueza alélica ou qualquer outro parâmetro apropriado – pode ser medida como a diferença entre a diversidade total de todas as populações menos a diversidade total de todas as populações com exceção da população em questão. Esta contribuição à diversidade pode ser dividida em dois componentes, um relacionado à diversidade da população (CS) e outra a sua divergência das populações remanescentes (CD).

Estes dois componentes da contribuição ilustram como uma população em particular apresenta valor para a conservação em comparação com outras remanescentes. Algumas contribuições à diversidade total ou  $\beta$  podem ser negativas, seja porque a diversidade da população está abaixo da média ou porque não há muita divergência entre as populações. Os parâmetros estimados podem ser comparados com a localização geográfica e a possível história das populações para determinar o que influenciou a diversidade e a divergência genética das populações.

Segundo Wright (1943), a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações está associada à dinâmica de movimentação dos alelos nas populações, a qual está condicionada ao sistema reprodutivo da espécie, ao

modo de cruzamento e síndromes de dispersão do pólen e das sementes, bem como à dinâmica dos agentes dispersores e polinizadores.

A riqueza alélica ou diversidade genética corresponde ao número de alelos por loco e é altamente dependente do tamanho efetivo populacional (LEBERG, 1992; NEI; MARUYAMA; CHAKRABORTY, 1975).

Estudos sobre a variabilidade genética das candeias, *E. erythropappus* e *E. incanus*, utilizando DNA nuclear, mostram que a maior parte da diversidade genética encontra-se dentro das populações. Os valores de diversidade genética são considerados altos para ambas as espécies (Tabela 1). A maior parte dos trabalhos genéticos com as espécies em estudo relata uma alta diversidade genética dentro das populações analisadas (ARRIEL, 2009; BARREIRA, 2005; BARREIRA et al., 2006; ESTOPA et al., 2006; FREITAS; LEMOS; LOVATO, 2008; MOURA, 2005; PÁDUA, 2011) (Tabela 1). Estes altos valores de diversidade genética podem ser atribuídos a alta taxa de cruzamento multiloco (BARREIRA et al., 2006; CARVALHO et al., 2012), sendo que a espécie apresenta predominantemente fecundação cruzada e sistema de auto incompatibilidade.

Entretanto, para indicar áreas prioritárias para a conservação genética, deve-se ainda analisar a filogeografia da espécie, a qual associa a abordagem filogenética à biogeografia, revelando barreiras históricas entre populações e espécies, ou ainda áreas com alta diversidade genética e endemismo. Essa abordagem é importante para a elucidação dos padrões geográficos de distribuição da diversidade genética. Essas informações quando utilizadas adequadamente no desenvolvimento das políticas de conservação da candeia poderá efetivamente garantir conservação das espécies.

A filogeografia aborda princípios e processos que determinam as distribuições geográficas das linhagens genealógicas, especialmente no nível

intra-específico (AVISE et al., 1987) e enfatiza os aspectos históricos da distribuição espacial das linhagens contemporâneas (AVISE, 2000).

Os estudos filogeográficos podem contribuir para o esclarecimento de importantes questões como a definição das áreas a serem conservadas de maneira a incorporar a maior quantidade de diversidade genética visando à manutenção do potencial evolutivo de uma espécie ou população.

Tabela 1 Índices de diversidade genética encontrados para *Eremanthus erythropappus* e *E. incanus*

Locais	Np	Ni	P(%)	A	Ae	I	He	Marcador	Referência
<i>E. erythropappus</i>									
Lavras	1	60	93,3	1,94	1,61	0,53	0,36	ISSR	Arriel (2009)
Baependi, Carrancas, Francisco Sá, Morro do Pilar, São Tomé das Letras, Delfim Moreira, Ingaí, Luminárias, Santa Rita do Sapucaí, Diamantina.	10	20	78,6	1,79	1,53	0,44	0,30	ISSR	Pádua (2011)*
Airuoca, São Tomé das Letras	3	75	92,3			0,47	0,31	RAPD	Estopa et al. (2006)*
Baependi, Carrancas	5	150	100	2,1	2,0		0,48	Isoenzima	Moura (2005)*
Lavras e Morro do Pilar	-	-	91,5	1,91	1,51	0,35		RAPD	Moura (2005)*
Baependi	1	230	76,9	2,57	1,93		0,48	Isoenzima	Barreira et al. (2006)
Morro do Pilar	4	160	83,8			0,44		RAPD	Freitas, Lemos e Lovato (2008)
<i>E. incanus</i>									
Lavras	1	60	85,71	1,86	1,58	0,5	0,34	ISSR	Arriel (2009)

\*Os valores descritos são médios para as populações amostradas. I: Índice de Shannon; Np: número de populações; Ni: número de indivíduos; P(%): porcentagem de locos polimórficos; A: número médio de alelos por locos; Ae: número efetivo de alelos por locos; He: Heterozigosidade média esperada.

## 2.2 DNA cloroplastidial

Devido à sua natureza haplotípica e evolução clonal, o DNA cloroplastidial (cpDNA) em plantas é fonte de marcadores originais, muito útil na filogenia, estudos sobre o padrão de distribuição das espécies e em genética de populações.

Os cloroplastos possuem genoma próprio e, em geral, o cromossomo está na forma linear (BENDICH, 2004; LILLY et al., 2001; OLDENBURG; BENDICH, 2004), circular (LILLY et al., 2001; PALMER, 1992) ou mais complexas. As moléculas são formadas por monômeros, dímeros, trímeros ou multímeros de até 900 kilobases (kb) (LILLY et al., 2001). Na maioria das plantas superiores, o cpDNA é constituído por 120-180 x 10<sup>3</sup> (kb), concentrando-se na faixa entre 140-160 sendo dezenas de vezes maior que o DNA mitocondrial. Além disso, o cpDNA não segue as regras da genética descrita por Mendel (ARIAS; INFAME-MALACHIAS, 2001; MALIGA, 2004).

A estrutura do DNA cloroplastidial, normalmente para maioria das espécies, consiste em um par de regiões repetidas invertidas (IR), denominadas IRA e IRB. Essas são separadas por uma região de cópias únicas, sendo uma delas mais longa (LSC) e a outra menor (SSC) (PALMER, 1992). A região LSC é menos conservada que o resto do genoma do cloroplasto, sendo assim mais indicada para a realização de estudos taxonômicos (WEISING; GARDNER, 1999). Estas características conservativas do cpDNA sugerem que qualquer mudança em estrutura, arranjo ou conteúdo do genoma pode ter implicações filogenéticas significativas.

De acordo com Arias e Infame-Malachias (2001) as alterações de tamanho nesse genoma são devidas a dois fatores principais: quantidade de sequências repetidas e alterações na complexidade da sequência (expansão ou contração de duplicações invertidas, que muitas vezes vão dos genes para as

subunidades ribossômicas). O genoma cloroplastidial é extremamente conservado em tamanho, estrutura, conteúdo gênico e ordem linear dos genes entre espécies aparentadas e mesmo entre espécies filogeneticamente distantes, pois o cpDNA não sofre recombinação e apresenta baixa taxa de mutação (PALMER; STEIN, 1986). A taxa de evolução do cpDNA é lenta, seja em termos de substituição de bases bem como de rearranjos estruturais, o que torna esta molécula extremamente interessante para estudar padrões de diferenciação genética entre populações e entre regiões. Com isso, há um crescente interesse na utilização do cpDNA em estudos de genética de populações em plantas, e devido à conservação dos arranjos dos genes no cpDNA, é possível o desenho de vários primers de cloroplasto “consensuais” ou “universais”, o que facilita estudos filogenéticos e de genética de populações (AZEVEDO et al., 2007; DEMESURE; SODZI; PETIT, 1995).

Outra característica interessante é o modo de herança dessa organela. Enquanto o genoma mitocondrial, com raras exceções, é herdado maternalmente, o cloroplasto pode ser herdado biparentalmente e paternalmente em algumas angiospermas já estudadas (ARIAS; INFAME-MALACHIAS, 2001). No entanto, de maneira geral, no caso de angiospermas, o cpDNA possui herança uni parental e maternal, devido a uma variedade de mecanismos que evitam a recombinação entre o cpDNA materno e paterno.

Geralmente, os plastídios dos grãos de pólen são impedidos de penetrar na oosfera, mas há exceções. No caso das gimnospermas, o cpDNA do grão de pólen penetra na oosfera, mas é retido, resultando na herança materna (NAGATA et al., 1999). Segundo Birky (2001), os processos relacionados com a prevalência da herança uniparental ainda não estão esclarecidos.

Destaca-se ainda a característica poliploide da molécula, onde uma única célula vegetal pode apresentar até 10.000 cópias do cpDNA (PALMER; STEIN, 1986). Além disso, outra característica importante para a filogenia é o fato de

que a estrutura genética dos marcadores de cpDNA é dependente do fluxo gênico via dispersão de sementes, diferentemente da estrutura genética dos marcadores nucleares, a qual é determinada pelo fluxo gênico via dispersão de sementes e pólen (PETIT; KREMER; WAGNER, 1993). Por exemplo, a estrutura genética espacial do cpDNA de espécies de clima temperado foi interpretada como consequência das mudanças climáticas durante o Pleistoceno (KING; FERRIS, 1998; SOLTIS; GITZENDANNER, 1999). Acredita-se que, na América do Sul, a área ocupada pela floresta tropical úmida retraiu entre 10.000 e 20.000 anos atrás em decorrência das mudanças climáticas. De acordo com esta hipótese, populações de tamanho reduzido (refúgios) foram isoladas por florestas secas (GRANVILLE, 1988; PRANCE, 1973, 1982). Assim, as populações, antes contínuas, sofreram uma redução no tamanho e, provavelmente, foram submetidas ao isolamento genético. Para estas espécies, a perda de diversidade genética dentro das populações e o aumento na estrutura genética espacial são, então, esperados (efeito bottleneck) (NEI; MARUYAMA; CHAKRABORTY, 1975).

### **2.2.1 Métodos para a análise do DNA cloroplastidial**

A distribuição e a diversidade genética atual das espécies de plantas seriam então resultado de eventos climáticos como o período de glaciação no Pleistoceno (ABBOTT; BROCHMANN, 2003; COMES; KADEREIT, 1998; HEWITT, 2000; NEWTON et al., 1999). As mudanças ocorridas no período contribuíram para a formação da atual distribuição espacial das espécies, por meio de processos de extinção, colonização, dispersão e isolamento (ABBOTT; COMES, 2004; NEWTON et al., 1999; WIDMER; LEXER, 2001).

Os métodos para a análise do DNA do cloroplasto se baseiam no uso da reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e do polimorfismo do

comprimento de restrição do fragmento (PCR-RFLP) (ou CAPS, amplificação da sequência polimórfica clivada) que utiliza primers universais (DEMASURE; SODZI; PETIT, 1995; DUMOLIN-LAPEGUE; PEMONGE; PETIT, 1997; TABERLET et al., 1991) para amplificação das sequências específicas do cpDNA, seguida da clivagem por enzimas de restrição.

Atualmente, técnicas de sequenciamento automático de fragmentos de DNA, também passaram a ser usadas em análises de filogeografia (COLLEVATTI et al., 2012a, 2012b, 2012c; COLLEVATTI; RABELO; VIEIRA, 2009; GARCIA et al., 2011; NOVAES et al., 2010; RAMOS; LEMOS-FILHO; LOVATO, 2009; RIBEIRO et al., 2011; TURCHETTO-ZOLETA et al., 2012). Essas técnicas produzem leituras confiáveis dos polimorfismos nos fragmentos de cpDNA. No entanto, essa análise requerer cuidados especiais quanto à qualidade do DNA extraído, ajustes precisos da PCR, protocolos de purificação dos produtos da reação, além de seleção da combinação primer/enzima que revela maior polimorfismo (SHAW et al., 2007; VIEIRA et al., 2010).

As informações obtidas pelas técnicas acima podem ser analisadas pelo método estatístico minimum spanning network (MSN) (EXCOFFIER; SMOUSE, 1994), que consiste em uma estatística de agrupamento dos haplótipos baseada na teoria da coalescência. O mesmo tem sido utilizado em estudos filogeográficos para estimar a evolução alélica dentro de populações e espécies (CRANDALL; TEMPLETON, 1993). O método MSN tem sido utilizado como alternativa à parcimônia de Wagner (Wagner parsimony) por fornecer melhores conexões entre os haplótipos (EXCOFFIER; SMOUSE, 1994). Os nós dos agrupamentos representam os haplótipos, enquanto que a distância entre eles é proporcional ao número de mutações.

Diversos algoritmos têm sido usados para a análise da diversidade de haplótipos, diferenciação populacional, fluxo gênico e estrutura espacial, entre

os quais se destacam a análise de variância molecular (AMOVA), a avaliação da riqueza alélica, a contribuição de cada população para a diversidade total e para a riqueza alélica total, os testes de Mantel e as distâncias de dispersão. No entanto, para a construção de inferências sobre os eventos históricos que conduziram aos padrões de distribuição geográficos contemporâneos, esses dados estatísticos devem ser associados a informações geográficas, ambientais e ecológicas (STEHLIK, 2002; TRIBSCH; SCHÖNSWETTER; STUESSY, 2002).

Em função da taxa lenta de evolução e do padrão de herança, o polimorfismo do cpDNA é uma ferramenta poderosa para entender os padrões de diferenciação entre populações de plantas. Essas propriedades tornam o marcador extremamente interessante para estudar padrões de diferenciação genética entre populações e entre regiões, e tem sido utilizado para inferir sobre eventos históricos como possíveis rotas de recolonização (AVISE, 2009).

As informações sobre a variação genética dentro e entre populações somadas aquelas obtidas a partir de cpDNA sobre as linhagens genealógicas acrescentam uma perspectiva temporal, permitindo inferir sobre a distribuição geográfica e histórica da variação genética, podem ser utilizadas na determinação de centros de diversidade das espécies, sendo então muito úteis na tomada de decisão quanto à escolha de populações ou áreas prioritárias à conservação (CRANDALL et al., 2000).

### **2.3 Gênero *Eremanthus***

A candeia pertence à família Asteraceae (= Compositae), ao gênero *Eremanthus* (tribo Vernoniae, subtribo Lychnophorinae), o qual compreende 22 espécies (Tabela 2) (LOEUILLE, 2012; LOEUILLE; LOPES; PIRANI, 2012).

As espécies deste gênero apresentam-se como árvores, arvoretas, e raramente, são arbustos. Possuem folhas alternas, sésseis a pecioladas, com limbo inteiro, descolorido, de margem não revoluta e sem bainha foliar. Os capítulos são frequentemente agregados num receptáculo secundário formando uma inflorescência de segunda ordem, chamada sincefalia ou capítulo secundário. Cada capítulo contém de uma a onze flores, com a coloração da corola variando de roxa a alva. Os frutos, cípselas, apresentam um *pappus* persistente a caduco com duas a cinco séries de cerdas estramíneas, às vezes alvas ou avermelhadas (LOEUILLE, 2011; MACLEISH, 1987).

Carvalho (1994) observa que as candeias ocorrem na América do Sul, sendo encontradas no nordeste da Argentina, norte e leste do Paraguai e no Brasil. No entanto, estudos recentes sugerem que somente *E. matto grossensis* e *E. rondoniense* ocorrem na Bolívia, fora do Brasil (LOEUILLE, 2012). Além disso, estudos filogenéticos desenvolvidos por Loeuille (2011) concluíram que o gênero *Eremanthus* é monofilético, confirmando assim a hipótese de MacLeish (1987) sobre a circunscrição do gênero *Vanillosmopsis* e excluindo do *Paralychnophora*.

Tabela 2 Lista de espécies do gênero *Eremanthus*

Espécies de candeia	
1	<i>Eremanthus arboreus</i> (Gardner) MacLeish
2	<i>Eremanthus argenteus</i> MacLeish & H. Schumach.
3	<i>Eremanthus auriculatus</i> MacLeish & H. Schumach.
4	<i>Eremanthus brasiliensis</i> (Gardner) MacLeish
5	<i>Eremanthus brevifolius</i> Loeuille
6	<i>Eremanthus capitatus</i> (Spreng.) MacLeish
7	<i>Eremanthus cinctus</i> Baker
8	<i>Eremanthus crotonoides</i> Sch. Bip.
9	<i>Eremanthus elaeagnus</i> Sch. Bip.
10	<i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish
11	<i>Eremanthus glomerulatus</i> Less.
12	<i>Eremanthus goyazensis</i> Sch. Bip.
13	<i>Eremanthus hatschbachii</i> H. Rob.
14	<i>Eremanthus incanus</i> Less.
15	<i>Eremanthus leucodendron</i> Mattf.
16	<i>Eremanthus mattogrossensis</i> Kuntze
17	<i>Eremanthus mollis</i> Sch. Bip.
18	<i>Eremanthus pabstii</i> G.M. Barroso
19	<i>Eremanthus polycephalus</i> (DC.) MacLeish
20	<i>Eremanthus rondoniense</i> MacLeish & H. Schumach.
21	<i>Eremanthus uniflorus</i> MacLeish & H. Schumach.
22	<i>Eremanthus veadeiroensis</i> H. Rob.

Fonte: Loeuille (2012) e Loeuille, Lopes e Pirani (2012).

As espécies de candeia são endêmicas do Brasil, presente nos cerrados e campos rupestres do sudeste do Planalto Central Brasileiro (Mata Atlântica) de

400 a 2.200 metros, ocorrendo nos estados da região sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo de Rio de Janeiro) e centro-oeste, no estado de Goiás e no Distrito Federal. Particularmente, *E. incanus* ocorre no nordeste (Bahia) e sudeste (Minas Gerais) do Brasil, nos domínios do Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica (LOEUILLE, 2012; MACLEISH, 1987). Segundo Pedralli, Teixeira e Nunes (1997), a candeia ainda pode ocorrer na Bahia, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Para este estudo foram utilizadas as espécies *Eremanthus erythropappus* e *Eremanthus incanus*. Essas espécies são as de maior ocorrência no estado de Minas Gerais, distribuindo-se na forma de uma ampla faixa do nordeste ao sul do estado e segue em sentido oeste (Figura 1).

Em Minas Gerais, a área de ocorrência da candeia abrange 457 municípios, o que corresponde a 34,38% do estado (CAMOLESI, 2007) (Figura 1). Além disso, Pádua (2011) confirma a presença da espécie mais ao centro da região norte do estado, no município de Francisco Sá (16° 28' 25, 68000" S e 43° 24' 43, 2602" W).

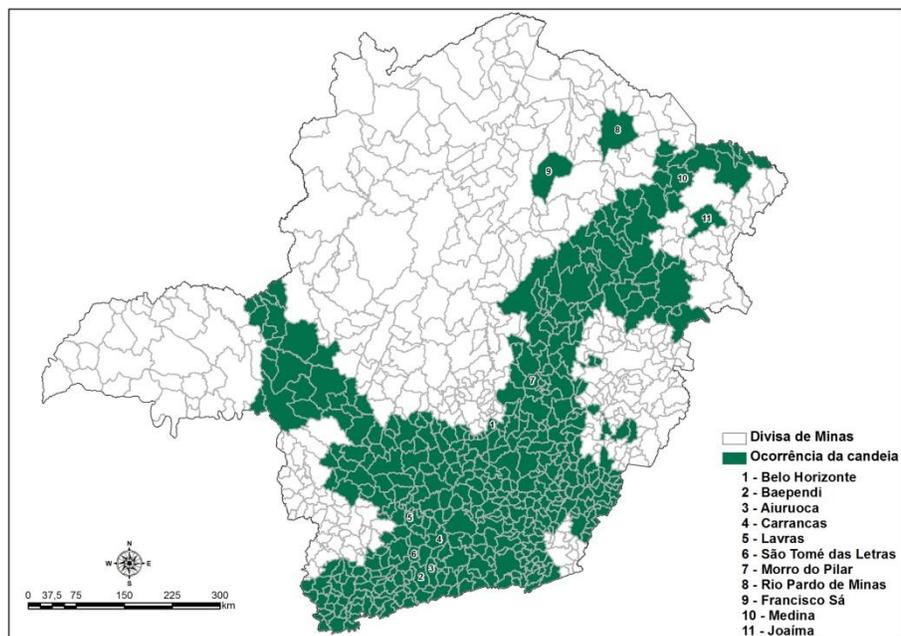


Figura 1 Área de ocorrência da candeia em Minas Gerais

Fonte: Mapa gerado a partir dos resultados desse trabalho e mapa publicado por Andrade (2009).

O clima das regiões de Minas Gerais, onde se desenvolve as candeias no estado de Minas Gerais é mesotérmico úmido do tipo Cwb, tropical de altitude, com verões suaves, segundo a classificação de Köppen. A temperatura do mês mais quente dependendo da altitude do local considerado varia de 22 °C a 30 °C, a temperatura média anual varia entre 18 °C e 20 °C, e a média anual de precipitação pluviométrica entre 1.400 e 1.550 mm. Os meses mais chuvosos correspondem a novembro, dezembro, janeiro e fevereiro, e as menores precipitações ocorrem em junho, julho e agosto (INSTITUTO MINEIRO DE GESTÃO DAS ÁGUAS - IGAM, 2009).

A abrangência da espécie corresponde, predominantemente, a locais montanhosos, com solos variando de arenosos a pedregosos, em geral, pouco

férteis e com acidez elevada (SCOLFORO; OLIVEIRA; DAVIDE, 2012). No entanto essas características não são empecilhos para o seu desenvolvimento, sendo comum encontrar grandes candeais em locais onde dificilmente haveria o desenvolvimento de qualquer outra espécie arbórea ou cultura agrícola (ARAÚJO, 1944; CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS - CETEC, 1994, 1996; LORENZI, 1992; PÉREZ, 2001; PÉREZ et al., 2004; RIZZINI, 1979; SILVA, 2001).

### **2.3.1 *Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish**

É uma espécie florestal de múltiplos usos, entre eles considerada uma planta medicinal (ROSAL, 2004). Sua madeira é utilizada predominantemente como moirão de cerca, em decorrência de sua alta durabilidade e, também na extração de óleo essencial, cujo princípio ativo é o  $\alpha$ -bisabolol (SCOLFORO; OLIVEIRA; DAVIDE, 2012). O  $\alpha$ -bisabolol é empregado na fabricação de medicamentos e cosméticos como cremes, bronzeadores, protetores solares, veículo para medicamentos, além de uso na profilaxia e cuidados da pele de bebês e adultos, entre outros (ANDRADE, 2009; SCOLFORO; OLIVEIRA; DAVIDE, 2012).

*Eremanthus erythropappus* é uma precursora de campo, típica de encaves entre a mata e os campos abertos (cerrado, campos rupestres e campos de altitude). A espécie é exigente de luz, com sementes pequenas e abundantes e ciclo de vida relativamente longo. Assim, em função dessas características, *E. erythropappus* apresenta grande capacidade de disseminação, se desenvolvendo rapidamente em campos abertos, formando povoamentos mais ou menos puros, os candeiais. Além disso, dentro da floresta, quando ocorre alguma perturbação, a candeia também se dissemina rapidamente, pois, segundo Carvalho (1994) e Corrêa (1961), trata-se de uma espécie heliófila e, portanto, a entrada de luz a

beneficia. A espécie é fotoblástica positiva, sendo que o recrutamento via banco de sementes ocorre, principalmente, nas camadas de 0-10 cm do solo, na presença de serrapilheira e plena luz (PEDRALLI; TEIXEIRA; NUNES, 1997; SCOLFORO et al., 2008).

As flores são hermafroditas e se apresentam em inflorescências de cor púrpura nas extremidades dos ramos (ARAÚJO, 1944). As características das folhas e de inflorescência facilitam a identificação da espécie que mesmo à distância se destaca nas paisagens de morros de Minas Gerais. A inflorescência se apresenta na forma de capítulo, contendo três a quatro flores, os quais são agrupados numa sincefalia hemisférica (DUTRA et al., 2010). Suas flores de coloração púrpura apresentam grandes quantidades de pólen viável e néctar, atrativos às abelhas, principalmente às das espécies *Apis mellifera* e *Trigona* sp (VIEIRA; FAJARDO; CARVALHO, 2009).

A floração da candeia começa quando a planta atinge os dois anos de idade e, embora a época de floração varie com o local e a idade, ela ocorre na época seca, de maio a agosto (SCOLFORO et al., 2002). A época de florescimento é de julho a setembro, período seco e frio do ano, sendo o desenvolvimento de botões florais observados a partir de março (CETEC, 1994; SCOLFORO et al., 2002). Segundo Pedralli (1997), a frutificação e dispersão ocorrem no período de elevação da temperatura, de agosto a setembro e estende-se aos meses de outubro e novembro, quando ocorre o início do período das chuvas (CÂNDIDO, 1991; CHAVES, 1994). O pico de frutificação ocorre entre os meses de setembro e outubro. A dispersão das sementes ocorre entre os meses de agosto e outubro (MACLEISCH, 1987; SCOLFORO et al., 2002).

Os eventos fenológicos da floração e posterior frutificação estão intimamente relacionados às condições ambientais, principalmente à umidade. Nos anos mais secos, esses eventos ocorrem mais tarde do que em anos de maior precipitação. As condições ambientais também influenciam na época de

amadurecimento das sementes, sendo essa uma característica individual da planta.

As espécies do gênero *Eremanthus* possuem características que determinam síndrome de dispersão anemocórica, na qual ocorre a secagem natural das sementes ainda na árvore e posterior dispersão vento. A unidade de dispersão da candeia é um aquênio cilíndrico, de cor escura, com aproximadamente 2,0 mm de comprimento, sendo que cada fruto contém apenas uma semente (CHAVES; RAMALHO, 1996). Além disso, características das sementes de candeia, como tamanho reduzido e síndrome de dispersão anemocórica, são comuns em espécies que apresentam sementes ortodoxas.

De acordo com Pádua (2011), as candeias apresentam, naturalmente, alta capacidade de regeneração e colonização de novas áreas em função da produção abundante de sementes viáveis e pela eficiente dispersão anemocórica.

### **2.3.2 *Eremanthus incanus* (Less.) Less.**

*Eremanthus incanus* (Less.) Less, também conhecida como candeia, é uma espécie arbórea que, quando adulta possui altura média entre 5 e 7 m, variando de 2 a 10 m. A média dos diâmetros está entre 10 e 12 cm, com exemplares que podem atingir até 20 ou 25 cm. Possui tronco marrom-cinza, casca grossa e poucos galhos. Sua utilização é basicamente para produção de moirões, já que a produtividade do óleo  $\alpha$ -bisabolol é pequena e de baixa qualidade (SCOLFORO et al., 2008; SCOLFORO; OLIVEIRA; DAVIDE, 2012).

A ocorrência natural desta espécie compreende áreas montano-campestres nos estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e, de maneira abundante, em Minas Gerais, formando amplos agregados nos cerrados e campos de altitude (ARAÚJO, 1944). Segundo Scolforo, Oliveira e Davide

(2012) a espécie é comum em Minas Gerais e na Bahia, ocorrendo entre 550 e 1100m de altitude, no cerrado, na floresta secundária ou na caatinga.

As folhas são coriáceas, com pecíolos de 4 mm a 17 mm de comprimento e limbo com comprimento de 5,5 cm a 14 cm e largura de 2 cm a 6 cm. A forma da folha varia de elíptica a oval, com base aguda e ápice tendendo ao obtuso, cujas margens são inteiras. Apresenta inflorescência cimosa composta por 8 a 50 glomérulos, com 5 mm a 15 mm de altura, 7 mm a 15 mm de diâmetro e forma tendendo à esférica, com 30 a 100 flores subsésseis em cada glomérulo. Os involúculos são cilíndricos, com 2,4 mm a 5 mm de altura e 0,3 mm a 1,5 mm de diâmetro. Os verticilos externos possuem forma triangular, com 1,7 mm a 3 mm de comprimento, 0,1 mm a 0,5 mm de largura e os ápices tendem à forma obtusa (MACLEISH, 1987).

Os verticilos internos são estreitos, com 2,6 mm a 4 mm de comprimento e 0,3 mm a 0,6 mm de largura. Os ápices são pontiagudos, as margens são inteiras, a superfície abaxial tem cor de palha com ápice roxo. Apresentam, ainda, corolas de púrpuro-pálidas a brancas, com 4,2 mm a 6,6 mm de altura, com lóbulos pontiagudos. Apresenta, ainda, corolas púrpuro-pálidas a alvas, com 4,2 a 6,6 mm de altura e lóbulos pontiagudos. As cúpulas cilíndricas possuem de 2,2 a 2,6 mm de altura, são glandulares, pubescentes e têm de 15 a 20 costas, com nectário apresentando altura entre 0,15 a 0,25 mm de altura e um pappus decíduo com três a quatro séries de cerdas, variando de estramíneo a avermelhado. A floração e a produção de frutos ocorrem de julho a outubro (MACLEISH, 1987).

Os aquênios cilíndricos possuem de 2,2 mm a 2,6 mm de altura, são glandulares, sedosos e finos e têm de 15 a 20 nervuras, com nectário apresentando altura entre 0,15 mm a 0,25 mm de altura e 3 a 4 séries de papo (tufo), variando de branco-opaco a roxo; são decíduos, tardios, duros e têm pelos eriçados (MACLEISH, 1987).

As fases fenológicas de *E. incanus* seguem um padrão similar as de *E. erythropapus*. A floração embora varie com o local e a idade, ocorre, na época seca, de maio a agosto (SCOLFORO et al., 2002); a frutificação variando de agosto a outubro e, ocasionalmente (PEDRALLI, 1997), estendendo-se até novembro (CÂNDIDO, 1991; CHAVES, 1994), e o pico de dispersão de sementes em setembro (SCOLFORO et al., 2002).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Locais de coleta e amostragem das populações

A amostragem foi realizada em três regiões do Estado de Minas Gerais de acordo com a faixa de distribuição das candeias (Tabela 3). As áreas amostradas foram escolhidas visando captar a maior variação geográfica possível dentro da faixa de ocorrência das espécies (Figura 1 e 2).

Foram coletadas amostras foliares de 141 indivíduos em 10 populações naturais de *Eremanthus erythropappus* e de 25 indivíduos em quatro populações naturais de *E. incanus* (Tabela 3). Os indivíduos amostrados encontravam-se distanciados de, pelo menos, 50 m entre si. Neste estudo parte das amostras de DNA utilizadas foram utilizadas também nos estudos desenvolvidos por Moura (2005); populações Morro do Pilar (MP), Lavras (LV), Carrancas (CA) e duas populações em Baependi (BA), e Estopa et al. (2006) – populações São Tomé das Letras (ST) e duas populações em Aiuruoca (AI).

As primeiras amostras foliares coletadas foram mantidas em gelo e em seguida armazenadas a -80 °C até o momento da extração do DNA. As coletas posteriores foram armazenadas em sacos plásticos contendo sílica gel.

Tabela 3 Populações amostradas de *Eremanthus erythropappus* e *E. incanus*, em Minas Gerais, Brasil

População	Código	Coord. Geo. (Lat./Long.)	Região	Tamanho amostral
<i>E. erythropappus</i>				
Medina	AD	16°30' S; 41°53' W	Norte	15
Francisco Sá	FS	16°28' S; 43°29' W	Norte	12
Joaíma	JO	16°38' S; 41°01' W	Norte	6
Rio Pardo de Minas	RP	15°38' S; 42°43' W	Norte	3
Morro do Pilar	MP	19°12' S; 43°23' W	Central	15
Airuoca	AI	21°58' S; 44°59' W	Sul	15
Baependi	BA	21°57' S; 44°53' W	Sul	30
Carrancas	CA	21°28' S; 44°38' W	Sul	15
Lavras	LV	21°14' S; 45°00' W	Sul	15
<i>E. incanus</i>				
Francisco Sá	FS	16°28' S; 43°29' W	Norte	4
Rio Pardo de Minas	RP	15°38' S; 42°43' W	Norte	6
Lavras	LV	21°14' S; 45°00' W	Sul	15
São Tomé das Letras	ST	21°43' S; 44°60' W	Sul	15

\*Coord. Geo. = Coordenadas Geográficas.

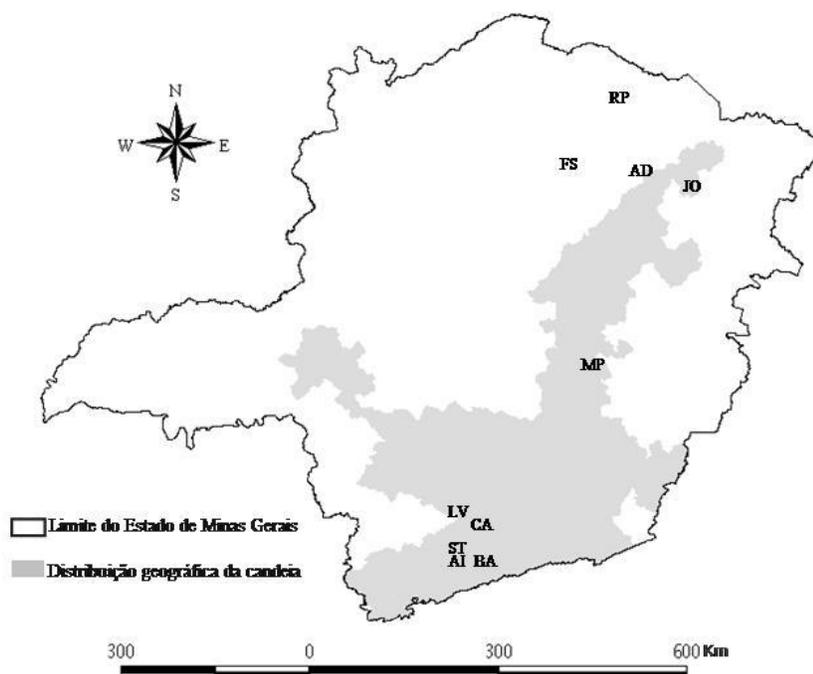


Figura 2 Localização geográfica das populações *Eremanthus erythropappus* e *E. incanus* em Minas Gerais (Brasil)

Nota: AD = Medina, AI = Aiuruoca, BA = Baependi, CA = Carrancas, FS = Francisco Sá, JO = Joáima, LV = Lavras, MP = Morro do Pilar, ST = São Tomé das Letras, RP = Rio Pardo de Minas.

### 3.2 Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico total foram utilizados o método do CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), com modificações para amostras congeladas; e o método proposto por Mogg e Bond (2003) para as amostras desidratadas. A concentração de DNA extraído pelo método CTAB de cada amostra foi quantificada em fluorímetro Hoeffler DQ200. O DNA de todas as amostras foi diluído a 10 ng/ $\mu$ L e posteriormente, rediluído para 1 ng/ $\mu$ L.

Em paralelo, a concentração de DNA de cada amostra extraída pelo método proposto por Mogg e Bond (2003) foi quantificada via eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo, utilizando-se com padrões DNAs de concentração conhecidas ( $\lambda$ DNA). O gel foi fotografado em luz UV, e os fragmentos das amostras foram comparados com as dos padrões do  $\lambda$ DNA. O DNA de cada amostra foi diluído para 1 ng/ l.

### **3.3 Amplifica o dos fragmentos de DNA via PCR**

Neste trabalho foram testados 15 primers universais para cloroplasto: HA, SG, 20-12, BF (HAMILTON, 1999), QS, SR, TC, FV, VL (DUMOLIN-LAPEGUE; PEMONGE; PETIT, 1997), CD, DT, CS, SF<sub>M</sub>, ST (DEMASURE; SODZI; PETIT, 1995) e TF (TABERLET et al., 1991). As sequências dos primers são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 Nome e sequência dos *primer* universais de cpDNA, status de amplificação, e polimorfismo observado nas amostras avaliadas

Nome	Primer F	Primer R	Posição em Tabaco (pb)	Tamanho (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Tempo de e longamento (min)	Nº de ciclos	Referência (data)
HA	trnH (GUG)	psbA	64-558	495	53	0,5	35	Hamilton (1999)
SG	trnS (GCU)	trnG (UCC)	8691-9531	844	52	1	40	Hamilton (1999)
20-12	rpl 20	5'-rps 12	71355-72238	884	53	0,5	30	Hamilton (1999)
BF	psbB	psbF	76299-77151	853	53	0,5	30	Hamilton (1999)
QS	trnQ	trnS	7418-8720	1030	47/58	3	30	Dumolin-Lapégue, Pemonge e Petit (1997)
SR	trnS	trnR	8690-10503	1814	47/58	3	30	Dumolin-Lapégue, Pemonge e Petit (1997)
TC	trnT	psbC	33180-36415	3236	52,5	4	30	Dumolin-Lapégue, Pemonge e Petit (1997)
FV	trnF	trnV	50280-53790	3511	57,5	4	30	Dumolin-Lapégue, Pemonge e Petit (1997)
VL	trnV	rbcL	53771-57620	3850	57,5	4	30	Dumolin-Lapégue, Pemonge e Petit (1997)

“Tabela 4, conclusão”

Nome	Primer F	Primer R	Posição em Tabaco (pb)	Tamanho (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Tempo de e longamento (min)	Nº de ciclos	Referência (data)
CD	trnC	trnD	28841-32007	3167	58	4	30	Demesure, Sodzi e Petit (1995)
DT	trnD	trnT	31988-33200	1213	54,5	2	30	Demesure, Sodzi e Petit (1995)
CS	psbC	trnS	35551-37161	1611	57	2	30	Demesure, Sodzi e Petit (1995)
Sf <sub>M</sub>	trnS	trnf <sub>M</sub>	37142-38395	1254	62	2	30	Demesure, Sodzi e Petit (1995)
ST	trnS	trnT	47180-48565	1386	57,5	2	30	Demesure, Sodzi e Petit (1995)
TF	trnF	trnF	48546-50299	1754	57,5	2	30	Taberlet et al. (1991)
HK	trnH	trnK	14-1844	1831	43/48	4	30	Demesure, Sodzi e Petit (1995)
K2Q	trnK	trnQ	4372-7446	3075	47,5	3	30	Dumolin-Lapégue, Pemonge e Petit (1997)

As ampliações foram feitas em volume total de 25  $\mu$ L contendo cerca de 3 ng de DNA total; 10 mM de Tris pH 8,0; 50 mM de KCl; 2,5  $\mu$ g de BSA; 200  $\mu$ M de dNTP (cada); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 2 U de Taq Polimerase e 0,2  $\mu$ M de primer (cada). O ciclo de amplificação utilizado foi o seguinte: desnaturação inicial de 5 minutos a 96 °C; 35 ciclos de 45 segundos a 96 °C, 1 minuto a 53 °C e 30 segundos a 72 °C; e uma extensão final de 7 minutos a 72 °C.

No entanto, para os primers HA, 20-12 e BF a quantidade de dNTP foi reduzida para 100  $\mu$ M (cada), sendo que para os mesmos o ciclo de amplificação utilizado foi de desnaturação inicial de 4 minutos a 94 °C; 30 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 56 °C e 3 minutos a 72 °C; e uma extensão final de 7 minutos a 72 °C.

### **3.4 Análise RFLP**

Para as análises foram testadas nove enzimas de restrição: HinfI, HindIII, HaeIII, MseI, TaqI, AluI, EcoRI, RsaI e BamHI. Do volume total dos produtos da PCR, foram utilizados 5  $\mu$ L para a digestão: com duração de 1 hora à temperatura e concentração da enzima recomendados pelo fabricante (Gibco-BRL) em volume final de 10  $\mu$ L. Os produtos da digestão foram separados via eletroforese em gel de agarose 3% com brometo de etídeo (5 mg/mL) em tampão TBE (Tris-Ácido Bórico-EDTA) 1X, por duas horas a 60 V, e o gel foi fotografado sob luz UV.

Para auxiliar na escolha das combinações primer/enzima a serem utilizadas em todos os indivíduos foi feito um screening com oito indivíduos, de diferentes populações. Como não foi observado polimorfismo todas as combinações primer/enzima foram testadas em todos os indivíduos. A reprodutibilidade de todos os PCR e das combinações de produto PCR/enzima foram avaliadas por meio da replicação de cada reação.

### 3.5 Identificação de haplótipos, índices de diversidade e estrutura genética

A identificação dos haplótipos foi feita através da combinação dos padrões de bandas observadas em cada um dos pares de primer/enzima. Portanto, indivíduos apresentando mesmo padrão de bandas foram designados como sendo um mesmo haplótipo. Desta forma, puderam-se obter as frequências dos haplótipos por população e região, bem como a matriz de distância entre haplótipos.

A caracterização da diversidade genética foi feita para o conjunto das espécies, para cada espécie em separado e, para regiões dentro de espécies. Em *Eremanthus incanus* as populações foram agrupadas em região: Norte (EIN) e Sul (EIS). Para *E. erythropappus*, por haver somente uma coleta na região central, as populações foram agrupadas, também, em duas regiões: Norte (EEN) e Centro-sul (EECS).

Para as estimativas de alelos ordenados foram dados pesos para cada haplótipo correspondente à sua distância genética, ou seja, haplótipos que se diferenciaram por apenas um loco polimórfico receberam peso igual a um (01), e haplótipos que apresentaram diferenças em seis locos receberam peso seis (06). Para verificação de estrutura geográfica, foram testadas as hipóteses de índices de diferenciação ( $G_{ST}$  e  $N_{ST}$ ) iguais à zero.

A partir dos dados de frequência haplotípica e matriz de distância entre haplótipos foram calculados a diversidade genética total ( $H_T$  e  $V_T$ ), diversidade genética intrapopulacional ( $H_S$  e  $V_S$ ) e índices de diferenciação ( $G_{ST}$  e  $N_{ST}$ ); para alelos não-ordenados e ordenados, respectivamente, com o uso do programa HAPLONST (PONS; PETIT, 1996). Para calcular as medidas de diversidade e de diferenciação genética [diversidade média intrapopulacional ( $H_S$ ); diversidade total ( $H_T$ ); e a razão  $G_{ST} = (H_T - H_S) / H_S$  (coeficiente de diferenciação)] foram usadas as frequências dos haplótipos bem como as distâncias entre eles (número

de fragmentos de restrição diferentes) de acordo com o método de Petit et al. (2002) e Pons e Petit (1996). Os cálculos foram feitos através do programa HAPLODIV (PONS; PETIT, 1996), disponível em <http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software>. Na análise, foram apenas consideradas as populações com pelo menos três indivíduos amostrados. As medidas de diversidade, bem como os erros padrão de cada uma, podem ser calculadas tendo em conta a distância entre os haplótipos (no caso de  $v$ ) ou ignorando a distância genética (no caso de  $h$ ). O parâmetro de diversidade  $v$  é definido da seguinte forma:  $v = \sum \pi_{ij} \chi_i \chi_j$ , onde  $\pi_{ij}$  representa a distância entre os haplótipos  $i$  e  $j$ , e  $\chi_i$  e  $\chi_j$  são as respectivas frequências observadas. Quando todas as distâncias  $\pi_{ij}$  são iguais a 1,  $v$  torna-se idêntico à clássica medida de diversidade  $h$  (probabilidade de dois haplótipos serem diferentes quando tirados ao acaso de uma mesma população). Os coeficientes de diferenciação resultantes são designados de  $N_{ST}$  (quando baseado em  $v$ ) e de  $G_{ST}$  (quando baseado em  $h$ ), e podem ser diretamente comparados (BURBAN et al., 1999).

Informações sobre divergência haplotípica foram incorporadas em uma análise de variância, derivada de uma matriz de distâncias quadradas entre todos os pares de haplótipos. Esta análise de variância molecular (AMOVA) produz estimativas de componentes de variância e análogos à estatística  $F$ , designada como estatística  $\Phi$ , refletindo a correlação da diversidade haplotípica em diferentes níveis de subdivisão hierárquica (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992). A estrutura genética foi obtida pelo programa ARLEQUIN 3.11 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2007).

O padrão de isolamento por distância foi testado pelo teste de Mantel (com 1000 permutações) entre a matriz de distância geográfica e diferenciação genética ( $F_{ST}$ ), dada pelo programa ARLEQUIN 3.11, usando o programa TFGA (MILLER, 1997).

### 3.6 Minimum Spanning Network

As relações genealógicas entre os haplótipos foram obtidas a partir de uma rede de extensão mínima (*Minimum Spanning Network*) gerada pelo programa ARLEQUIN 3.11 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2007). Esta estatística de agrupamento é baseada na teoria de coalescência e tem sido utilizada em alternativa à parcimônia de Wagner (*Wagner parsimony*) por fornecer melhores conexões entre haplótipos (EXCOFFIER; SMOUSE, 1994). Os haplótipos de DNA são relacionados por mutação e arranjados em uma rede. Os nós da rede representam os haplótipos, enquanto que a distância entre eles é proporcional ao número de mutações. Pode-se, então, usar o número de mutações ao longo da rede como uma medida de divergência evolucionária entre quaisquer dois haplótipos (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992).

### 3.7 Contribuição genética

A contribuição de cada população para a diversidade total e contribuição para a riqueza alélica total (CrT) foi estimada de acordo com Petit, El Mousadik e Pons (1998), usando o programa CONTRIB (PETIT; EL MOUSADIK; PONS, 1998). Esta contribuição é explicada em dois componentes: um devido à diversidade da população (CS) e o outro devido a sua diferenciação das populações remanescentes (CD).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 15 primers universais de cpDNA testados, seis possibilitaram a amplificação de produtos via PCR. Sendo assim, das 36 combinações de primer/enzima possíveis, em 20 ocorreu a digestão dos fragmentos de DNA. No entanto, em uma combinação primer/enzima (SFM/HinfI) foi possível detectar polimorfismo. Esta combinação revelou um sítio de restrição e duas mutações (inserção/deleção), permitindo a identificação de três haplótipos para as espécies estudadas (Figura 3). Cavers, Navarro e Lowe (2003a) usando os primers universais descritos em Demasure, Sodzi e Petit (1995), Dumolin-Lapegue, Pemonge e Petit (1997) e Hamilton (1999), abrangendo assim, aqueles utilizados neste trabalho, selecionaram seis combinações primer/enzima que revelaram polimorfismo para *Cedrela odorata*. Caron et al. (2000) testaram 16 pares com 13 enzimas de restrição, encontrando polimorfismo para 21 combinações em *Dicorynia guianensis*. Dutech, Maggia e Joly (2003) testaram 16 pares e selecionaram cinco combinações, com uma enzima cada, que apresentaram polimorfismo para *Vouacapoua americana*. Dos 17 primers testados para *Araucaria angustifolia*, 11 primers que apresentaram polimorfismo foram selecionados (SCHLÖGL; SOUZA; NODARI, 2007). Cloutier et al. (2005) testaram 16 primers e quatro enzimas de restrição para *Carapa guianensis*, selecionando cinco combinações polimórficas.

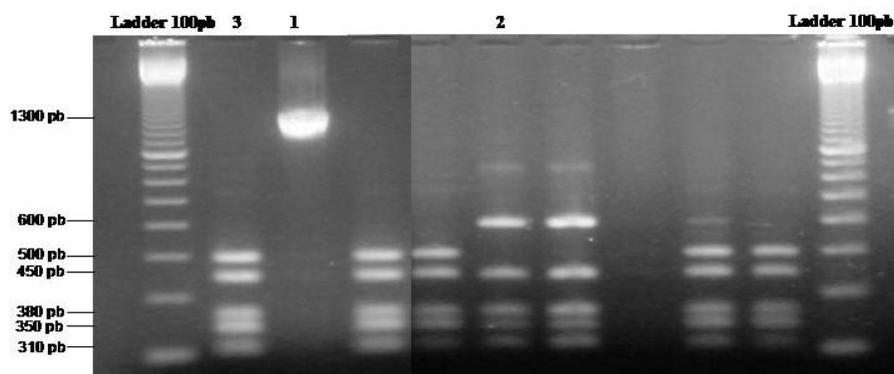


Figura 3 Variação em fragmentos de cpDNA amplificados com o *primer* SFM e digerido com a enzima de restrição Hinf I em amostras de indivíduos *Eremanthus erythropappus*

Nota: Os números indicam os haplótipos.

De acordo com a árvore (Figura 4) obtida pelo método Minimum Spanning Network, observa-se que o haplótipo 1 é ancestral dos outros dois, haplótipos dois e três. Esses estão distantes geneticamente do haplótipo 1 por cinco mutações acumuladas e divergem em apenas um *indel* (deleção) entre si e em um sítio entre o haplótipo 1. O haplótipo 1 aparece em baixa frequência em ambas as espécies (1,6% em *E. erythropapus* e 2,5% em *E. incanus*).

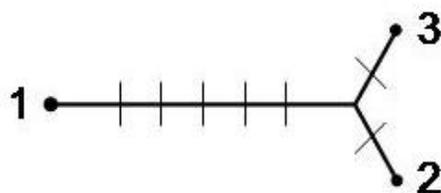


Figura 4 Minimum Spanning Network construída para os três haplótipos obtidos em *Eremanthus erythropappus* e *E. incanus*

Nota: Os traços observados referem-se ao número de mutações observadas entre os haplótipos.

Apesar do crescente número de estudos feitos a partir de análises de cpDNA para espécies nativas no Brasil, trabalhos utilizando a mesma metodologia empregada aqui são incipientes e entre estes, citam-se os trabalhos realizados com *Araucaria angustifolia*, no qual foram identificados 12 haplótipos (SCHLÖGL; SOUZA; NODARI, 2007); *Carapa guianensis*, na qual se registrou seis haplótipos (CLOUTIER et al., 2005); *Cedrela odorata*, estudada por Cavers, Navarro e Lowe (2003a), onde cinco haplótipos foram observados em 29 populações. Em outro estudo com *C. odorata*, os mesmos autores observaram somente dois haplótipos em 10 populações (CAVERS; NAVARRO; LOWE, 2003b); Em *Dicorynia guianensis* nove haplótipos foram observados (CARON et al., 2000) e em *Vouacapoua americana* seis haplótipos (DUTECH; MAGGIA; JOLY, 2003). Portanto, nota-se a metodologia utilizada aqui e pelos autores acima citados detecta um número variável de haplótipos de acordo com a espécie estudada.

A mesma metodologia utilizada aqui com as espécies congêneres *E. erythropappus* e *E. incanus* foi empregada em estudos de filogeografia comparada com *Quercus affinis* e *Q. laurina* por González-Rodríguez et al. (2004) em que seis haplótipos foram observados. Kelleher et al. (2004), estudando 126 indivíduos em 24 populações de *Quercus petrea* e *Q. rubra* encontraram dois haplótipos. No entanto, Petit et al. (1997), estudando 447 árvores de *Quercus petrea* e *Q. rubra* em uma área de aproximadamente 60000 Km<sup>2</sup>, observaram seis haplótipos, sendo dois identificados como extremamente raros, cada um pertencendo a apenas um indivíduo cada. Jimenez et al. (2004), analisando um total de 2313 indivíduos de *Quercus*, em que *Q. ilex* (1118 árvores em 121 populações), *Q. suber* (859 árvores em 90 populações) e *Q. coccifera* (401 árvores em 46 populações) observaram 81 haplótipos nas três espécies evidenciando uma complexa história evolutiva. Petit et al. (2002) em 2613 populações *Quercus* sp observaram 33 haplótipos.

Portanto, mesmo em espécies congêneres, observa-se que o número de haplótipos é variável e que alguns trabalhos relataram um baixo número de polimorfismo de cpDNA e outros um elevado número de haplótipos.

#### **4.1 *Eremanthus erythropappus***

A maior parte das populações analisadas são monomórficas, isto é, compostas por apenas o haplótipo 3. Este haplótipo foi observado em alta frequência (95,2%) nas populações analisadas (Figura 5). Os haplótipos 1 e 2 apresentaram, respectivamente, 1,6 e 3,2% de frequência. O haplótipo 2 foi encontrado somente em três das quatro populações da região norte do estado de Minas Gerais, RP, FS e JO. O haplótipo 1 foi encontrado apenas em um indivíduo das populações LV e AD, localizados, respectivamente, nas regiões sul e norte do Estado (Tabela 5).

Foram encontrados padrões haplotípicos distintos entre as populações da região centro-sul, na qual foi observado somente o haplótipo 3, com exceção à população de Lavras (LV) que apresentou um único indivíduo com o haplótipo 1, e as populações da região norte, as quais apresentaram, exclusivamente, o haplótipo 2 (Tabela 5). O haplótipo 1 também foi observado na população de Medina (AD) na região norte. Dessa forma, o haplótipo 1 está presente na espécie *E. erythropappus* em baixa frequência, pois foi observado em apenas dois indivíduos dentre os 126 analisados. O haplótipo 3, presente em 95,2% dos indivíduos analisados, estava ausente em um indivíduo da população de Medina (AD) e Rio Pardo de Minas (RP), em dois da população de Francisco Sá (FS), na região norte e também em um indivíduo da população de Lavras (LV), região centro-sul.

No que diz respeito à contribuição genética de cada população em *E. erythropappus* (Figura 6), as populações que contribuíram positivamente para a

diversidade e em maior grau foram, respectivamente RP, JO e FS (região norte), devido a presença dos haplótipos 2 e 3.

Tabela 5 Análise da distribuição haplotípica das populações de *Eremanthus erythropappus* de acordo com a combinação primer/enzima (SFM/HinfI)

Região	População	Haplótipo 1	Haplótipo 2	Haplótipo 3	Tamanho amostral
N	Medina (AD)	1	0	14	15
N	Francisco Sá (FS)	0	2	10	12
N	Joáima (JO)	0	1	5	6
N	Rio Pardo de Minas (RP)	0	1	2	3
		1 (3%)	4 (11%)	31(86%)	36
CS	Morro do Pilar (MP)	0	0	15	15
CS	Airuoca (AI)	0	0	15	15
CS	Carrancas (CA)	0	0	15	15
CS	Baependi (BM + BR)	0	0	30	30
CS	Lavras (LA)	1	0	14	15
		1 (1%)	0 (0%)	89 (99%)	90
Total		2 (1,6%)	4 (3,2%)	120 (95,2%)	126

N= Região Norte; CS = Região Centro-Sul.

A população AD, também localizada na região norte, apresentou contribuição negativa devido ao fato de ter sido observado o haplótipo 1 em vez do haplótipo 2. A população RP apresentou maior contribuição por apresentar os haplótipos 3 e 2 na proporção de 2:1, diferente da proporção de 5:1 observada nas populações JO e FS.

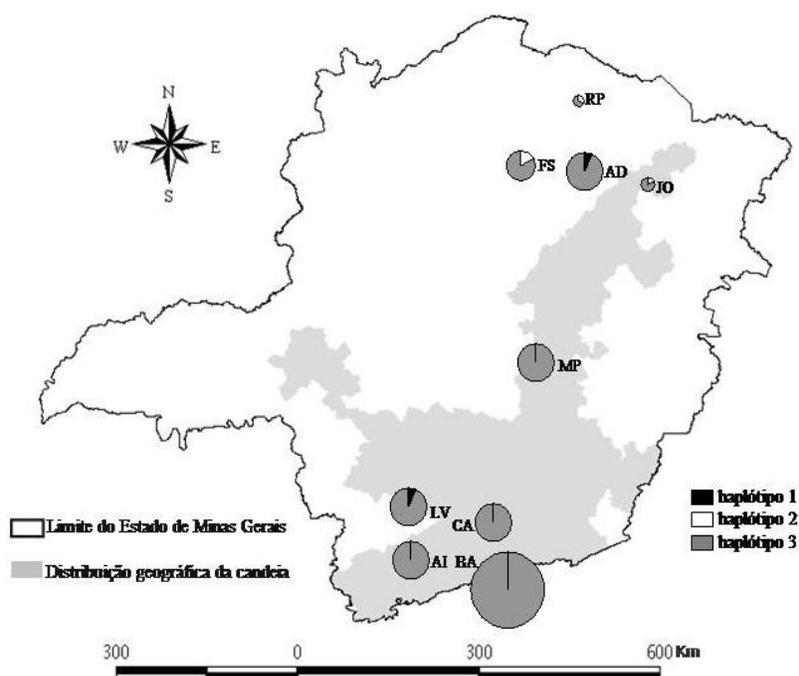


Figura 5 Distribuição geográfica das populações e frequência haplotípica de cpDNA em *Eremanthus erythropappus*

Todas as populações apresentaram baixa contribuição para a diferenciação entre as populações, provavelmente devido ao restrito número de haplótipos encontrados, em especial as localizadas na região norte. Nas populações da região centro-sul, foi observado um padrão inverso, com contribuição negativa para a diversidade e positiva para a diferenciação, isto

porque nestas populações foi observado somente o haplótipo 3, com exceção à população LV que apresentou um único indivíduo de haplótipo 1.

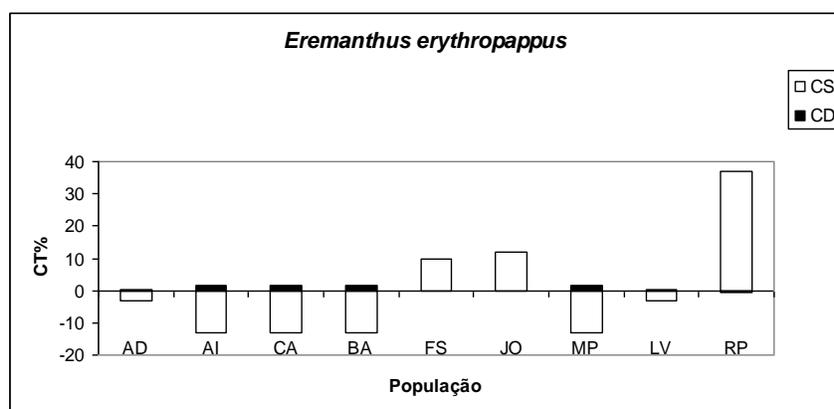


Figura 6 Contribuição para a diversidade total (CT) de cada população de *Eremanthus erythropappus* para haplótipos cloroplastidiais

Nota: Barras brancas e barras pretas representam, respectivamente, a contribuição (CS) e a diferenciação (CD) de cada população para a diversidade.

Todos os trabalhos com *Eremanthus erythropappus* utilizando marcador nuclear relatam que a espécie possui alta variabilidade genética e que a maior parte da sua variabilidade está contida dentro das populações e que ocorre uma baixa diferenciação genética entre as mesmas (ARRIEL, 2009; BARREIRA et al., 2006; CARVALHO et al., 2012; ESTOPA, 2003; ESTOPA et al., 2006; FREITAS; LEMOS; LOVATO, 2008; MOURA, 2005), com exceção do trabalho de Pádua (2011) onde as populações apresentaram uma maior diferenciação genética. Os dados resultantes da análise do cpDNA das espécies de candeia estão mais de acordo com os dados de Pádua (2011), ou seja, uma baixa variabilidade intrapopulacional.

A descontinuidade genética observada no presente trabalho reflete um baixo nível de fluxo gênico, o que conseqüentemente gera isolamento entre as

populações. Além disso, o fluxo gênico entre as populações é dependente da distância geográfica e da presença de barreiras geográficas no caso de marcadores do DNA cloroplástidial. No caso de marcadores nucleares, eventos recentes de fragmentação de habitats ou de manejo florestal podem ter influência significativa nos padrões alélicos da candeia.

Portanto, a descontinuidade observada pode ser explicada pela presença de barreiras geográficas, que podem limitar a dispersão das sementes de candeia, sem contar com o efeito dos padrões de massa de ar ao longo da área de distribuição da candeia, pois, os padrões de direcionamento e intensidade do vento interferem diretamente na dispersão de sementes das espécies de candeia.

A partir do estudo de Pádua (2011) e do conhecimento geomorfológico das áreas de estudo é admissível supor que a descontinuidade observada entre a população de Lavras e as populações de Carrancas, Aiuruoca e Baependi, pode ser causada pela presença de um complexo de serras: serra do Campestre e da Estância (município de Itumirim), serras de Fortaleza e de Luminárias (município de Ingaí e Luminárias), serra de Carrancas e pela serra de São Tomé (municípios de Carrancas e São Tomé das Letras respectivamente). As populações do sul de Minas, LV, CA, AI e BA, estão separadas da população de Morro do Pilar (MP) através da Serra do Espinhaço. E por último a população do Morro do Pilar está separada por um complexo de diversos conjuntos de serras, por exemplo, a Serra do Ouro e a Serra do Gavião (próximo ao município de Diamantina) e as pequenas cadeias montanhosas como, por exemplo, Serra das Almas, Serra dos Poções (na região de Francisco Sá).

Um candeial consiste em manchas formadas quase que exclusivamente por candeia ocupando, de maneira geral, locais montanhosos, com solos variando de arenosos a pedregosos, em geral, pouco férteis e com acidez elevada (ARAÚJO, 1944; SCOLFORO; OLIVEIRA; DAVIDE, 2012). Esse tipo de ocupação de hábitat pelas candeias pode levar a uma estruturação genética

espacial em resposta à restrita dispersão de sementes e pólen das espécies, habitat de distribuição e seleção micro ambiental (LOISELLE et al., 1995).

Os resultados da AMOVA (Tabela 6) mostraram subestruturação, onde a maior parte da variação genética se localiza dentro das populações (86%), e que há influência das regiões onde as populações estão localizadas (12%). A diferenciação entre populações das regiões centro-sul e norte se dá pelo fato de não ter sido observado o haplótipo 2 nas populações da região centro-sul. Este resultado foi confirmado pelo teste de Mantel feito entre os pares de populações que indicou correlação positiva e significativa ( $r = 0,33$ ,  $p = 0,04$ ) entre distância geográfica e distância genética.

Outros estudos importantes referem-se ao conhecimento da estruturação genética espacial populacional, pois podem orientar práticas de coleta de sementes para fins de conservação ou melhoramento genético. Dados referentes à distribuição da estrutura genética espacial são bastante diversos, por exemplo, variando de 3 a 87 m para *E. erythropappus*, de acordo com Arriel (2009) e Moura (2005) respectivamente. Ressalta-se, entretanto, que nos trabalhos desse gênero também ocorre uma variação quanto à metodologia de amostragem, o que tem influência direta nos parâmetros estruturais obtidos. Por exemplo, no estudo de Arriel (2009), a amostragem foi realizada ao longo de seis parcelas contínuas de 10x10 m. Moura (2005) realizou uma amostragem aleatória a partir de indivíduos distantes pelo menos 50 m entre si.

Dados desse gênero são escassos para *E. incanus*, sendo o valor de 7 m encontrado por Arriel (2009). Isto mostra claramente que não existe um padrão de estruturação genética para as espécies estudadas, e que a estrutura genética espacial é resultante de outros processos além dos genéticos, se os candeais são formações primárias ou resultantes de sucessão secundária, como histórico de perturbação das áreas de sua ocorrência entre outros.

Tabela 6 Análise hierárquica da variância molecular de quatro populações de *Eremanthus erythropappus*

Nível hierárquico	GL	Soma de quadrados	% de variação
Entre regiões	1	0,372	12,40
Entre populações (mesma região)	7	0,372	1,51
Dentro de populações	117	5,033	86,09

GL: Graus de liberdade.

† Significância calculada usando 1000 permutações.

#### 4.2 *Eremanthus incanus*

Nas populações de *E. incanus* houve uma predominância do haplótipo 2 (90%), com os haplótipos 1 (2,5%) e 3 (7,5%) apresentando baixa frequência (Figura 7). O haplótipo 1 apresentou-se raro nas populações analisadas, sendo somente observado em um indivíduo da população de São Tomé das Letras (ST). Dessa forma, o mesmo apresenta alta probabilidade de ser extinto nesta população.

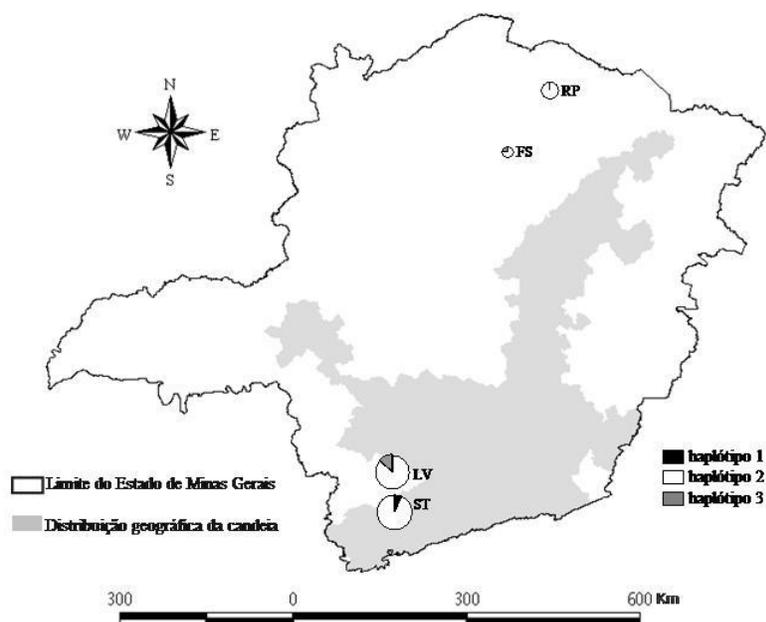


Figura 7 Distribuição geográfica das populações e frequência haplotípica de cpDNA em *Eremanthus incanus*

As populações FS e LV contribuíram positivamente para a diversidade (Figura 8), no entanto a contribuição desta última foi muito próxima a zero (0,05%). Arriel (2010) encontrou alta diversidade genética para populações de *E. incanus* em Lavras a partir do polimorfismo do DNA nuclear.

A população FS, localizada na região norte, foi a que mais contribuiu para a diversidade total, devido a presença dos haplótipos 2 e 3. A população RP apresentou apenas o haplótipo 2. O inverso foi observado com relação à contribuição para a diferenciação; na região sul, onde a população LV apresentou contribuição baixa, mas positiva para a diversidade e, conseqüentemente, negativa para a diferenciação. Diferentemente, a população ST, apresentou contribuição baixa, mas positiva para a diferenciação e negativa para a diversidade. As duas populações apresentam o mesmo tamanho amostral

(15 indivíduos) e o haplótipo 2 como mais frequente, contudo na população LV foram observados dois indivíduos com o haplótipo 3 e na população ST foi observado um indivíduo com haplótipo 1. Portanto, esse indivíduo diferente na população ST, de haplótipo 1, proporcionou maior contribuição para a diversidade. Além disso, observa-se que a ausência do haplótipo 3 nas populações da região norte pode ser devido ao pequeno tamanho amostral (10 indivíduos) (Tabela 7). Conseqüentemente, a conservação da espécie seria indicada para as áreas de Francisco Sá ao Norte e Lavras e São Tomé das Letras na região Sul.

No geral, a contribuição para a diferenciação foi baixa provavelmente devido ao restrito número de haplótipos, que foi somente três.

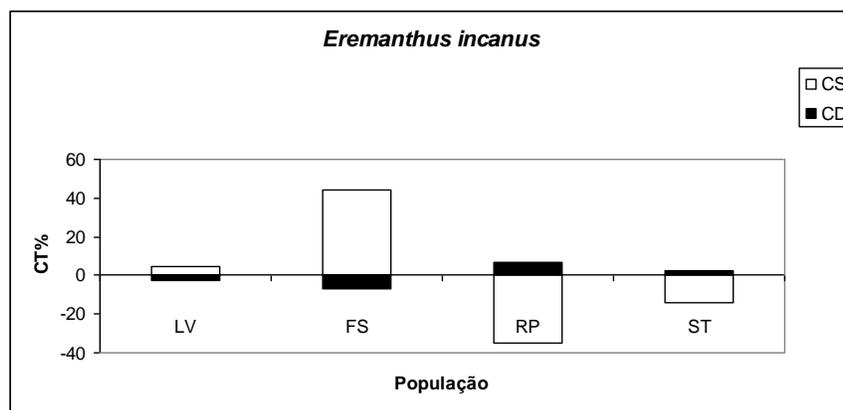


Figura 8 Contribuição para a diversidade total (CT) de cada população de *Eremanthus incanus* para haplótipos cloroplastidiais

Nota: Barras brancas e barras pretas representam, respectivamente, a contribuição (CS) e a diferenciação (CD) de cada população para a diversidade.

Tabela 7 Análise da distribuição haplotípica das populações de *Eremanthus incanus* de acordo com a combinação primer/enzima (SFM/HinfI)

Região	População	Haplótipo	Haplótipo	Haplótipo	Tamanho amostral
		1	2	3	
N	Francisco Sá (FS)	0	3	1	4
N	Rio Pardo de Minas (RP)	0	6	0	6
		0 (0%)	9 (90%)	1 (10%)	10
S	Lavras (LV)	0	13	2	15
S	São Tomé das Letras (ST)	1	14	0	15
		1 (3,3%)	27 (90%)	2 (6,7%)	30
Total		1 (2,5%)	36 (90%)	3 (7,5%)	40

N= Região norte; S= Região sul

Uma observação importante foi que as populações com menores tamanhos amostrais, seis e quatro indivíduos em Rio Pardo de Minas (RP) e Francisco Sá (FS), respectivamente, localizadas na região norte, foram as que apresentaram maiores valores de contribuição para a diversidade genética, de forma negativa ou positiva.

Segundo os resultados da AMOVA (tabela 8), foi evidente a ausência de subestruturação, com uma maior variação genética dentro de populações chegando a 97,7% e apenas 3,3% da variação devido às diferenças dentro de populações entre regiões. Esses valores podem ser devidos ao fato da presença de apenas um indivíduo com haplótipo 1 na população de ST (região sul), já que para as demais populações de *E. Incanus* foram observados somente os haplótipos 2 e 3. Este resultado foi confirmado pelo teste de Mantel que indicou correlação negativa, mas não significativa ( $r = -0,36$   $p = 0,91$ ) entre as populações.

Tabela 8 Análise hierárquica da variância molecular de quatro populações de *Eremanthus incanus*

Nível hierárquico	GL	Soma de quadrados	% de variação
Entre regiões	1	0,008	0,0
Entre populações (mesma região)	2	0,250	3,3
Dentro de populações	36	3,417	97,7

GL: Graus de liberdade.

† Significância calculada usando 1000 permutações.

### 4.3 *Eremanthus erythropappus* e *E. incanus*

Devido à predominância de apenas um haplótipo em todas as populações de ambas as espécies, as diversidades estimadas observadas foram muito baixas para ambos os alelos não-ordenados e ordenados (Tabela 9).

Tabela 9 Análise da estrutura genética das populações de *Eremanthus erythropappus* e *E. incanus*

<b>Parâmetros de diversidade</b>	<b>Total</b>	<b>EI</b>	<b>EE</b>	<b>EEN</b>	<b>EECS</b>
$H_S$	0,189 (0,0594)	0,220 (0,1061)	0,174 (0,0754)	0,359 (0,1116)	0,027 (0,0267)
$H_T$	0,484 (0,0763)	0,210 (0,0837)	0,167 (0,0636)	0,313 (0,0684)	0,027 (0,0260)
$G_{ST}$	0,611 (0,1285)	-0,051 (NC)	-0,042 (NC)	-0,147 (0,0227)	0,000 (NC)
$V_S$	0,221 (0,0559)	0,217 (0,0822)	0,172 (0,0600)	0,350 (0,0682)	0,027 (0,0267)
$V_T$	0,481 (0,0759)	0,209 (0,0692)	0,167 (0,0524)	0,312 (0,0448)	0,027 (0,0260)
$N_{ST}$	0,541 (0,1146)	-0,038 (NC)	-0,033 (NC)	-0,122 (NC)	0,000 (NC)
$N_{ST} - G_{ST}$	-0,070*	0,013	0,009	0,025	0
$U N_{ST}/G_{ST}$	-0,40*				0

Nota:  $H_T$  e  $V_T$  = diversidade genética total,  $H_S$  e  $V_S$  = diversidade genética intra-populacional;  $G_{ST}$  e  $N_{ST}$  = índices de diferenciação.

\*Significativamente diferente de zero no nível de  $P < 0.05$ . Valores em parênteses representam o desvio padrão. NC significa valor não calculado.

Observou-se que o haplótipo 3 foi o mais comum (95,2%) em *E. erythropappus* e para *E. incanus* o mais frequente foi o haplótipo 2. Esse último não foi encontrado nas populações de *E. erythropappus* na região centro-sul, ocorrendo somente no norte com uma frequência de 11%. Dessa forma, evidencia-se uma tendência de separação entre as espécies, a partir do haplótipo 2 exclusivo para *E. incanus* e o haplótipo 3 para *E. erythropappus*. Entretanto, possivelmente a presença do haplótipo 3 em um e dois indivíduos das populações FS e LA, respectivamente, evitou a separação completa das duas espécies.

Além disso, ressalta-se que é possível que a divergência entre os haplótipos 2 e 3 tenha ocorrido junto à separação das duas espécies de um ancestral comum cujo haplótipo 1 era mais frequente. Entretanto, não se pode inferir se a presença do haplótipo 3 em *E. incanus* e do haplótipo 2 em *E. erythropappus* seja indício de hibridação entre as espécies ou simplesmente uma variação haplotípica.

Nas análises realizadas por Estopa et al. (2006) utilizando marcador nuclear, a população ST foi caracterizada como sendo *E. erythropappus*, e esta foi a mais divergente dentre as demais analisadas. Nos resultados aqui obtidos com cpDNA ficou evidente o padrão haplotípico observado como sendo igual às das populações de *E. incanus*. Assim, existe a possibilidade que tenha ocorrido um erro de identificação botânica o qual resultou na análise de cpDNA de uma árvore de *E. erythropappus* ao invés de um indivíduo de *E. incanus*, o que também poderia justificar os resultados encontrados para as amostras *E. incanus* oriundas de São Tomé. Outro fato intrigante é o diagnóstico das principais espécies que compõem a Serra de São Tomé, o qual descreve esta espécie, *E. incanus*, como sendo a mais frequente tanto em áreas preservadas como em áreas de transição e impactadas pela mineração (VASCONCELOS, 2001). Entretanto, no geral ocorre sobreposição das áreas de ocorrência de *E.*

*erythropappus* e *E. incanus*, de tal forma que é comum encontrar ambas as espécies coexistindo na mesma área. Portanto, novas análises deverão ser realizadas para comprovar se ocorreu ou não um erro na identificação das espécies.

Em análises filogeográficas recomenda-se que seja amostrado um número elevado de populações. Pons e Petit (1995) enfatizam a necessidade de se amostrar um maior número de populações possíveis, com tamanhos amostrais homogêneos, dado que a amostragem de populações (ou regiões geográficas) tem uma grande influência nas estimativas de diferenciação. O aumento no tamanho amostral dentro das populações gera somente um pequeno aumento na precisão das estimativas. Segundo os autores, o tamanho amostral ótimo é de cerca de sete indivíduos por população. No presente estudo, mesmo quando as populações foram analisadas a partir do mesmo tamanho amostral (igual a três indivíduos), por meio de teste de rarefação, não foram observados resultados significativos de subestruturação por meio da AMOVA (Anexo 1, Tabela 11).

Desta forma, o reduzido tamanho amostral em algumas populações, pode ter influenciado os resultados obtidos de contribuição genética de cada população, sendo difícil fazer comparações entre as populações.

Segundo Avise et al. (1987), restrições na distribuição geográfica de espécies ou populações, ainda que filogeneticamente próximas podem gerar diferentes variantes moleculares ou haplótipos. Como mencionado por Lynch e Crease (1990, p. 386), “o  $N_{ST}$  será maior ou menor do que o  $F_{ST}$ , dependendo de onde os pares de haplótipos relativamente divergentes tendem a se distribuir entre e dentro das populações”. Sendo assim, a distribuição geográfica relativa dos haplótipos pode não ser devida a distância genética, no caso de linhagens antigas que tiveram tempo para se redistribuírem geograficamente desde seu surgimento após a mutação. Então, os resultados obtidos para os congêneres *E. incanus* e *E. erythropappus* se deve ao fato de que haplótipos mais relacionados

não se encontram distribuídos nas mesmas populações. Esse resultado pode ser atribuído a fatores ecológicos, como uma restrita dispersão de pólen, e também a fatores evolutivos como a seleção intrapopulacional em micro habitats. Contudo, como mencionado por Pons e Petit (1995), identificar um processo evolutivo que possa ter levado a situações onde alelos distantemente relacionados são mais frequentemente encontrados na mesma população, ainda parece difícil.

Neste estudo, 10 populações de *E. erythropappus* e quatro de *E. incanus*, analisadas em conjunto, apresentaram uma baixa frequência de haplótipos (três haplótipos) e uma diversidade genética total de 0,484 e 0,481 para alelos não ordenados ( $H_T$ ) e ordenados ( $V_T$ ). No geral, os parâmetros de diversidade não foram alterados ao levarmos em conta a distância entre os haplótipos. Em conjunto, foi registrado diferenciação populacional,  $G_{ST} = 0,611$  e  $N_{ST} = 0,541$ , o que demonstra que as espécies apresentam padrões haplotípicos diversos. No entanto, não houve diferenciação populacional por espécie.

A análise por espécie revelou uma diversidade genética total com valores de  $H_T$  e  $V_T$  iguais a 0,167 e intrapopulacional com valores de  $H_S$  e  $V_S$  de iguais a 0,174 e 0,172 para *E. erythropappus*. Observou-se também que as populações localizadas ao norte apresentaram maior variabilidade que as suas localizadas ao sul, com valores de  $V_S$  de 0,350 e  $V_T$  de 0,312 e com valores iguais a 0,027 para os mesmos parâmetros para as populações localizadas ao sul. Quanto a *E. incanus*, os valores encontrados para  $H_T$  e  $V_T$  foram de 0,210 e 0,209 e  $H_S$  e  $V_S$  de 0,220 e 0,217 respectivamente.

Desta forma, não foi observada subestrutura genética para as espécies estudadas e foram observados valores nulos e negativos para a diferenciação genética ( $G_{ST}$  e  $N_{ST}$ ). Analisando as espécies em conjunto, foi encontrado um valor negativo e significativo de  $G_{ST} - N_{ST}$ , indicando que a diferenciação genética encontrada não é devida a distribuição geográfica dos haplótipos. Não foi possível estimar os parâmetros de diversidade genética entre as regiões para a

espécie *E. incanus* devido ao número reduzido de populações. A ausência de subestrutura dentro das espécies e para as duas regiões indica que as populações, da mesma espécie, são representadas pelos mesmos haplótipos em proporções similares umas às outras.

Algumas espécies tropicais estudadas no Brasil apresentaram resultados diferentes, como por exemplo, em *Carapa guianensis* foram observados baixos valores de diversidade intrapopulacional ( $H_S$  e  $V_S$ ) iguais a 0,02 e valores altos de diversidade total ( $H_T$  e  $V_T$ ) iguais a 0,82 e 0,73, bem como de diferenciação genética ( $N_{ST}$ ) de 0,97 nas populações amostradas em 11 áreas diferentes (CLOUTIER et al., 2005). Os valores de  $H_S$  e  $H_T$  para *Araucaria angustifolia*, estudada por Schlögl, Souza e Nodari (2007) foram de 0,441 e 0,612 respectivamente e também foi relatado um baixo valor de  $N_{ST}$  (0,280). Na América do Sul, os trabalhos com *Cedrela odorata*, em que populações amostradas no México, Guatemala, Honduras e Nicarágua (região Mesoamericana), apresentaram baixos valores de  $H_S$  e  $V_S$  (0,03 e 0,01), altos valores de  $H_T$  e  $V_T$  (0,70) e diferenciação  $G_{ST}$  e  $N_{ST}$  estatisticamente iguais com valor de 0,98 (CAVERS; NAVARRO; LOWE, 2003a). Entretanto, a mesma espécie amostrada apenas em Costa Rica apresentou baixos valores de diversidade intrapopulacional ( $H_S = 0,03 - 0,13$ ), mas quando todas as amostras foram analisadas, o valor foi alto ( $H_T = 0,27$ ), além disso, observou-se a formação de grupos distintos haplotipicamente (CAVERS; NAVARRO; LOWE, 2003b). Os valores de  $H_T$  e  $H_S$  para *Dicorynia guianensis* foram 0,69 e 0,41, respectivamente e os valores de  $G_{ST}$  e  $N_{ST}$  foram 0,41 e 0,25, respectivamente (CARON et al., 2000). *Vouacapoua americana* apresentou altos valores de  $H_T$ ,  $H_S$  e  $G_{ST}$  (0,09; 0,87 e 0,89) (DUTECH; MAGGIA; JOLY, 2003).

Portanto, a diversidade total observada para *E. erythropappus* e *E. incanus* foi relativamente menor dentro das populações comparada aos estudos acima mencionados. Essa baixa diversidade pode ser devida possivelmente ao

número de haplótipos observados, que foi somente três (haplótipos 1, 2, 3. Figura 3). Esse resultado é confirmado pela AMOVA (Tabela 10), a qual mostra que a maior parte da variação genética está entre as espécies. Apesar da baixa variação entre as populações de cada espécie, foi observada significativa variação genética. A AMOVA revelou que populações de *E. erythropappus* estão estruturadas em regiões e que a maior parte da variação genética encontra-se entre as populações. No entanto, para *E. incanus*, não foi observada variação genética entre regiões.

Tabela 10 Análise hierárquica da variância molecular de 13 populações de *E. erythropappus* e *E. incanus*

Nível hierárquico	GL	Soma de quadrados	% de variação
Entre espécies	1	23,123	86,71
Entre populações (mesma espécie)	11	1,003	0,66
Dentro de populações	153	8,450	12,62

GL: Graus de liberdade.

† Significância calculada usando 1000 permutações.

Populações que ocorrem em ambientes que exercem uma pressão seletiva significativa, como o caso dos ambientes de ocorrência da candeia, somado a alta densidade populacional sugere uma maior probabilidade de fixação de novos alelos por mutação do que populações pequenas e ocorrentes em ambientes homogêneos (PATWA; WAHL, 2008). Além disso, alta densidade populacional pode favorecer altos níveis de cruzamentos em função da menor distância entre coespecíficos e do grande número de indivíduos em fase reprodutiva nas vizinhanças reprodutivas. A família Asteraceae apresenta mecanismos de autoincompatibilidade esporofítica para prevenir a autofecundação e endogamia biparental, favorecendo a ocorrência desse padrão (FERRER; EGUIATE; MONTANA, 2004).

Outro aspecto importante é que segundo Freitas, Lemos e Lovato (2008) o provável polinizador de *E. erythropappus* são abelhas pequenas que possuem curta distância de voo, o que restringe o cruzamentos entre árvores próximas e, conseqüentemente, limitando o fluxo de alelos via pólen. Por outro lado, segundo Vieira, Fajardo e Carvalho (2009), as flores de candeia são atrativas às abelhas, principalmente às das espécies *Apis mellifera* e *Trigona* sp. De acordo com Southwick e Buchmann (1995), pequenas abelhas, a exemplo de *Apis mellifera*, possuem uma área de forrageamento semelhante à de grandes abelhas como a *Bombus terrestris* que é em torno de 9,8 Km (GOULSON; STOUT, 2001).

No entanto, apesar das abelhas poderem voar a distâncias longas, a distribuição das manchas de floresta pode favorecer o isolamento de algumas espécies, como observado em *Tibouchinia papyrus* (COLLEVATTI et al., 2012a), limitando o fluxo alélico. Esse fato provavelmente pode ocorrer em espécies de candeias, pois, as manchas podem estar isoladas nos topos de morro, em meio a paisagens antropizadas que limitariam o movimento dos polinizadores entre as manchas, limitando o fluxo alélico. Dessa forma, o aumento da distância entre as matrizes, causado pelo manejo florestal, aumentaria a área de forrageamento dos agentes polinizadores. Conseqüentemente haveria uma expansão do fluxo alélico para mais além da zona de estrutura familiar da espécie, que corresponde, segundo Arriel (2009) a três metros, favorecendo o cruzamento entre indivíduos menos aparentados.

Por outro lado, diferentemente do genoma nuclear, o genoma do cloroplasto é clonal e herdado maternalmente e as variações contidas no cpDNA são mais influenciadas por eventos históricos como glaciações e mudanças climáticas do que pelo tempo geológico (AVISE, 1994; AVISE et al., 1987). Isso acontece por que esses eventos somados a presença de barreiras físicas afetam diretamente os padrões de dispersão da candeia. Assim sendo, eventos

climáticos recentes, bem como o isolamento causado pela fragmentação podem influenciar na dispersão das sementes e conseqüentemente no padrão haplotípico.

A baixa diferenciação entre as populações de candeia, evidenciada a partir de marcadores de cpDNA pode ser, provavelmente, devido, em grande parte, a distribuição das mesmas durante a Último Máximo Glacial. Durante o Último Máximo Glacial, entre 18.000 e 12.000 anos atrás, o ambiente neotropical era ao mesmo tempo mais frio e seco que atualmente, e a vegetação que existia então, teria refletido a esses dois fatores (PENNINGTON; PRADO; PENDRY, 2000), por meio da retração da floresta tropical na época seca e expansão das Florestas Estacionais Deciduais (FEDs). Algumas evidências baseiam-se na distribuição contemporânea de espécies nas áreas disjuntas, sazonalmente secas, das florestas tropicais e nas ligações históricas entre todas essas áreas (PRADO; GIBBS, 1993).

Por exemplo, a baixa frequência encontrada para o haplótipo 1, em ambas as espécies, pode ser um indício do processo de redução demográfica seguida de uma expansão mais recente nas florestas, conforme a hipótese do Arco Pleistocênico e atestado pelo baixo polimorfismo do cpDNA (PRADO; GIBBS, 1993). Segundo Collevatti, Rabelo e Vieira (2009), a ocorrência de fenômenos de expansão e retração das florestas durante os períodos glaciais e interglaciais, podem ter causado ciclos de propagação e extinção, implicando no desaparecimento de haplótipos de baixa frequência. Entretanto, seria necessário o uso de técnicas que resultem em maior polimorfismo do cpDNA e aumento do número de populações para a confirmação desta hipótese.

A divergência entre haplótipos 2 e 3, presentes em alta frequência em cada espécie, respectivamente, pode ter surgido em decorrência da separação de *E. erythropappus* e *E. incanus* ou poderia representar polimorfismo mais antigo, no qual cada haplótipo estaria, inicialmente, somente em parte associado com as espécies.

As populações de *E. erythropappus* nas quais se observa maior diversidade de haplótipos se encontram na região norte (todas as populações AD, FS, JO e RP) a exceção de LA, localizada na região centro-sul, sugerem a possibilidade de um possível isolamento dessas populações. De fato, essas regiões representam centros de diversidade, ainda que não se possa afirmar que correspondem aos centros de origem ou refúgio da espécie durante as flutuações climáticas do Quaternário.

Estas questões poderão ser esclarecidas provavelmente a partir do aumento do número de marcadores de cpDNA (por exemplo, utilizando o sequenciamento de regiões não codificadoras do genoma do cloroplasto) e também por meio da análise de maior número de populações. Dessa forma, haverá um melhor conhecimento da taxonomia e da distribuição geográfica da variação do cpDNA dessas espécies e a dinâmica evolutiva das mesmas.

## 5 CONCLUSÕES

Apenas a combinação primer/enzima (SFM/HinfI) revelou polimorfismo, o que permitiu a identificação de três haplótipos para as espécies estudadas. Sendo que o haplótipo 1 é ancestral e raro, enquanto os haplótipos 2 e 3, mais próximos, são derivados do ancestral e encontrados em alta frequência em *Eremanthus incanus* (90%) e *E. erythropapus* (95,2%).

Para *Eremanthus incanus* as populações FS (localizada na região norte) e LV (localizada na região sul) contribuíram para a diversidade genética, sendo que a contribuição desta última foi muito próxima à zero (0,05%).

Os resultados da AMOVA e teste de Mantel ( $r = -0,36$ ;  $p = 0,91$ ) evidenciaram a ausência de subestruturação, com uma maior variação genética dentro de populações (97,7%) e apenas 3,3% devido às diferenças dentro de populações entre regiões.

As diversidades estimadas e observadas nas duas espécies foram muito baixas e valores nulos e negativos para a diferenciação genética foram observados ( $G_{ST}$  e  $N_{ST}$ ).

Não foi possível separar as espécies *Eremanthus incanus* e *E. erythropapus* utilizando o polimorfismo do cpDNA detectado. Apesar de ter sido observada uma tendência na frequência dos haplótipos, sugerindo tal possibilidade.

As áreas prioritárias para a conservação de *E. erythropapus* seriam as populações de Medina por apresentar o haplótipo 1 e as outras, Francisco Sá, Joáima e Rio Pardo de Minas por possuírem o haplótipo 2, exclusivo ao norte. Na região Centro-Sul destaca-se a população de Lavras pela presença do haplótipo ancestral 1, diferenciando-se das demais na região. Quanto a *E. incanus* se faz necessário a conservação das Populações de Francisco Sá (Norte) por apresentar o haplótipo 3 e as populações de Lavras, por também

apresentar o haplótipo 3 e a de São Tomé das Letras por ser a única a registrar o haplótipo 1.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das informações geradas a partir do presente estudos e dos demais trabalhos de diversidade genética realizados para as espécies em estudo, visando capturar a maior parte da variabilidade genética possível, e dentro do contexto de operacionalidade e viabilidade econômica sugere-se a limitação das áreas prioritárias para conservação.

Para estratégias de preservação, essas áreas devem abranger as populações amostradas nesse trabalho, sendo as populações selecionadas:

- a) *E. erythropapus*: Medinae Francisco Sá ao norte. E na região Centro-Sul Lavras;
- b) *E. incanus*: Francisco Sá (Norte) e populações de Lavras e São Tomé das Letras.

De acordo com Pádua (2011), população de Francisco Sá é considerada uma unidade operacional tendo em vista a variabilidade genética da espécie *E. erythropapus* contida na mesma e os alelos exclusivos que a diferencia das outras populações amostradas, e no presente trabalho, nas regiões centrais e sul do estado. Para *E. incanus* os dados obtidos por Arriel (2009) demonstram que a população de Lavras apresenta consideráveis índices de heterosidade,  $He = 0,34$ , e polimorfismo,  $P = 85,71\%$ , sendo apropriada para ser definida como unidade de conservação da espécie.

Para futuros trabalhos a partir da análise de sequenciamento de cpDNA, ressalta-se que, as informações aqui obtidas pelo uso da variação do cpDNA pela análise de PCR-RFLP são importantes para serem aplicadas em uma etapa inicial, pois pode direcionar a utilização de primers de cpDNA e enzimas de

restrição que sejam mais informativos, o que viabiliza as atividades de laboratório, diminuindo o tempo e o valor das análises de sequenciamento.

Recomenda-se ainda, para o melhor entendimento dos aspectos filogeográficos da candeia a coleta de amostras em mais locais para *E. incanus*, e principalmente, na região central e leste do estado, o que possivelmente permitirá identificar os locais de maior diversidade haplotípica e os centros de diversidade para as espécies, sugerindo as áreas prioritárias para a sua conservação.

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, R. J.; BROCHMANN, C. History and evolution of the arctic flora: in the footsteps of Eric Hulten. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 299-313, Feb. 2003.

ABBOTT, R. J.; COMES, H. P. Evolution in the Arctic: a phylogeographic analysis of the circumarctic plant, *Saxifraga oppositifolia* (Purple saxifrage). **New Phytologist**, Cambridge, v. 161, n. 2, p. 211-224, Feb. 2004.

AGUILAR, R. et al. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 24, p. 5177-5188, 2008.

ANDRADE, I. S. **Avaliação técnica e econômica de sistemas de manejo de candeais nativos**. 2009. 121 p. Tese (Doutorado em Florestas de Produção) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ARAÚJO, L. C. *Vanillosmopsis erythropappa* (DC.) Sch. Bip: sua exploração florestal. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1944. 58 p.

ARIAS, M. C.; INFAME-MALACHIAS, M. E. RFLP: o emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismo no DNA. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 171-180.

ARRIEL, D. A. A. **Diversidade genética e distribuição genética espacial de três espécies de *Eremanthus erythropappus* no parque ecológico Quedas do Rio Bonito, Lavras, Minas Gerais**. 2009. 47 p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994. 511 p.

\_\_\_\_\_. **Phylogeography: history and formation of the species**. Cambridge: Harvard University, 2000. 447 p.

\_\_\_\_\_. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 3-15, Jan. 2009.

AVISE, J. C. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 489-522, 1987.

AVISE, J. C.; HAMRICK, J. L. **Conservation genetics, case histories from nature**. New York: Chapman & Hall, 1996. 512 p.

AZEVEDO, V. C. R. et al. Genetic structure and mating system of *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev., a heavily logged Amazonian timber species. **Journal of Heredity**, Washington, v. 98, n. 7, p. 646-654, 2007.

BARREIRA, S. **Diversidade genética em população natural de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish como base para o manejo florestal**. 2005. 61 p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

BARREIRA, S. et al. Diversidade genética e sistema de reprodução em população nativa de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish sob exploração. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 71, p. 119-130, ago. 2006.

BENDICH, A. J. Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 7, p. 1661-1666, July 2004.

BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal Forest Research**, Ottawa, v. 27, n. 3, p. 415-424, Mar. 1997.

BIRKY, C. W. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 35, p. 125-148, 2001.

BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética e filogeografia de *Ceiba pubiflora* (A.St.-Hil.) K. Schum. (MALVACEAE)**. 2012. 115 p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

BROWN, A. D.; KAPPELLE, M. Introducción a los bosques nublados del neotrópico: una síntesis regional. In: \_\_\_\_\_. **Bosques nublados del neotrópico**. Santo Domingo de Heredia: Instituto Nacional de Biodiversidad, 2001. p. 25-40.

BURBAN, C. et al. Rangewide variation of the maritime pine bast scale *Matsucoccus feytaudi* Duc. (Homoptera: Matsucoccidea) in relation to the genetic structure of its host. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 10, p. 1593-1602, Oct. 1999.

CADDAH, M. K. et al. Species boundaries inferred from microsatellite markers in the *Kielmeyera coriacea* complex (Calophyllaceae) and evidence of asymmetric hybridization. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 299, n. 4, p. 731-741, Apr. 2013.

CAMOLESI, J. F. **Volúmetria e teor  $\alpha$ -bisabolol para a candeia *Eremanthus erythropappus***. 2007. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

CÂNDIDO, J. F. **Cultura da candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* (DC.) Sch. Bip.)**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 7 p. (Boletim de Extensão, 35).

CARON, H. et al. Spatial and temporal distribution of chloroplast DNA polymorphism in a tropical tree species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 1089-1098, Aug. 2000.

CARVALHO, D. de et al. **Manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência florestal em Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2012. 329 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 640 p.

CAVALLARI, M. M. et al. Population genetic relationships between *Casearia sylvestris* (Salicaceae) varieties occurring sympatrically and allopatrically in different ecosystems in south-east Brazil. **Annals of Botany**, London, v. 106, n. 4, p. 627-636, 2010.

CAVALLARI-NETO, M. **Efeito do manejo na diversidade genética de populações naturais de *Tabebuia cassinoides* Lan (DC), por marcadores isoensimáticos**. 2004. 92 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2004.

CAVERS, S.; NAVARRO, C.; LOWE, A. J. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 1451-1460, June 2003a.

\_\_\_\_\_. Combination of molecular markers identifies evolutionarily significant units in *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in Costa Rica. **Conservation Genetics**, Berlin, v. 4, n. 5, p. 571-580, Jan. 2003b.

CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Ecofisiologia da candeia:** relatório técnico. Belo Horizonte, 1994. 104 p.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Belo Horizonte, 1996. 163 p.

CHAVES, M. M. F. **Descrição morfológica de sementes, de plântulas e de mudas de 10 espécies arbóreas pioneiras na microrregião de Viçosa, MG.** 1994. 108 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1994.

CHAVES, M. M. F.; RAMALHO, R. S. Estudos morfológicos em sementes, plântulas e mudas de duas espécies arbóreas pioneiras da família Asteraceae (*Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip. e *Vernonia discolor* Spreng- Kess.). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 20, n. 1, p. 1-7, jan./fev. 1996.

CLOUTIER, D. et al. Chloroplast DNA variation of *Carapa guianensis* in the Amazon basin. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 54, n. 6, p. 270-274, 2005.

COLLEVATTI, R. G. et al. A coupled phylogeographical and species distribution modelling approach recovers the demographical history of a Neotropical seasonally dry forest tree species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 21, n. 23, p. 5845-5863, 2012a.

\_\_\_\_\_. Phylogeography of *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae), an endangered tree species from rocky savannas, suggests bidirectional expansion due to climate cooling in the Pleistocene. **Ecology and Evolution**, Oxford, v. 2, n. 5, p. 1024-1035, 2012b.

\_\_\_\_\_. Recovering the demographical history of a Brazilian Cerrado tree species *Caryocar brasiliense*: coupling ecological niche modeling and coalescent analyses. **Natureza & Conservação**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 169-176, 2012c.

COLLEVATTI, R. G.; RABELO, S. G.; VIEIRA, R. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), a endangered cerrado shrub species. **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 4, p. 655-664, 2009.

COMES, H. P.; KADEREIT, J. W. The effect of quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 3, n. 11, p. 432-438, Nov. 1998.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1961. v. 1, 433 p.

CRANDALL, K. A. et al. Considering evolutionary processes in conservation biology. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 15, n. 7, p. 290-295, July 2000.

CRANDALL, K. A.; TEMPLETON, A. R. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. **Genetics**, Austin, v. 134, n. 3, p. 959-969, July 1993.

CRNOKRAK, P.; ROFF, D. A. Inbreeding depression in the wild. **Heredity**, Washington, v. 83, n. 3, p. 260-270, Sept. 1999.

DEGEN, B. et al. Impact of selective logging on genetic composition and demographic structure of four tropical tree species. **Biological Conservation**, Essex, v. 131, n. 3, p. 386-401, 2006.

DEMESURE, B.; SODZI, N.; PETIT, R. J. A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 129-131, Mar. 1995.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, Feb. 1990.

DUARTE, J. F. **Conservação genética de *Ficus bonijesulapensis* R.M. Castro em florestas decíduas sobre afloramento calcários**. 2011. 61 p. Dissertação (Mestrado Ecologia Aplicada) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

DUMOLIN-LAPEGUE, S.; PEMONGE, M. H.; PETIT, R. J. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 393-397, Apr. 1997.

DUTECH, C.; MAGGIA, L.; JOLY, H. I. Chloroplast diversity in *Vouacapoua Americana* (Caesalpinaceae), a neotropical forest tree. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 9, p. 1427-1432, Sept. 2000.

DUTRA, R. C. et al. Caracterização morfoanatômica das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 818-824, dez. 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2010000600001&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000600001&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 15 abr. 2013.

ESTOPA, R. A. **Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish)**. 2003. 46 p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

ESTOPA, R. A. et al. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 71, p. 119-130, ago. 2006.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. L. **Arlequin versão 3.11: a software for population genetic data analysis**. Geneva: University of Geneva, 2007. Software.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. **Genetics**, Austin, v. 136, n. 1, p. 343-359, Jan. 1994.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 131, n. 2, p. 479-491, June 1992.

FERREIRA, D. K. et al. Genetic analysis of 50-year old Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) plantations: implications for conservation planning. **Conservation Genetics**, Berlin, v. 13, n. 2, p. 435-442, Apr. 2012.

FERRER, M. M.; EGUIATE, L. E.; MONTANA, C. Genetics structure and outcrossing rates in *Flourensia cernua* (Asteraceae) growing at different densities in the South-Werstern Chihuahun Desert. **Annals of Botany**, London, v. 94, n. 3, p. 419-426, Sept. 2004.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.; BRISCOE, D. **An introduction to conservation genetics**. Cambridge: Cambridge University, 2002. 644 p.

FREITAS, M. L. M. et al. Variação genética em progênes de *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão em três sistemas de cultivo. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 3, p. 319-329, jun. 2006.

FREITAS, V. L. O.; LEMOS, J. P.; LOVATO, M. B. Contrasting genetic diversity and differentiation of populations of two successional stages in a Neotropical pioneer tree (*Eremanthus erythropappus*, Asteraceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 2, p. 388-398, Apr. 2008.

GARCIA, M. G. et al. Molecular evidence of cryptic speciation, historical range expansion, and recent intraspecific hybridization in the Neotropical seasonal forest tree *Cedrela fissilis* (Meliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 61, n. 3, p. 639-649, Sept. 2011.

GE, X. J. et al. Low genetic diversity and significant population structuring in the relict *Amentotaxus argotaenia* complex (taxaceae) based on ISSR fingerprinting. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 118, n. 6, p. 415-422, 2005.

GONELA, A. et al. Genetic diversity and mating system of *Copaifera langsdorffii* (Leguminosae/Caesalpinioideae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 1, p. 569-580, 2013.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A. et al. Chloroplast DNA variation in the *Quercus affinis* – *Q. laurina* complex in Mexico: geographical structure and associations with nuclear and morphological variation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 11, p. 3467-3476, 2004.

GOULSON, D.; STOUT, J. C. Homing ability of the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). **Apidologie**, Versailles, v. 32, n. 1, p. 105-111, Jan./Feb. 2001.

GRANVILLE, J. J. de. Phytogeographical characteristics of the Guianan forests. **Taxon**, Utrecht, v. 37, n. 3, p. 578-594, Aug. 1988.

HAMILTON, M. B. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 513-525, 1999.

HEWITT, G. The genetic legacy of the quaternary ice ages. **Nature**, London, v. 405, n. 6789, p. 907, June 2000.

INSTITUTO MINEIRO DE GESTÃO DAS ÁGUAS. **Dados pluviométricos de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2009. 25 p.

JIMÉNEZ, P. et al. High variability of chloroplast DNA in three Mediterranean evergreen oaks indicates complex evolutionary history. **Heredity**, Washington, v. 93, n. 5, p. 510-515, 2004.

KAGEYAMA, P. Y. Uso e conservação de florestas tropicais: qual paradigma? In: SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS BRASILEIROS: CONSERVAÇÃO, 5., 2000, Vitória. **Anais...** São Paulo: ACIESP, 2000. p. 72-82.

KAGEYAMA, P. Y. et al. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 64, p. 93-107, dez. 2003.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. In: SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS DA COSTA BRASILEIRA, 3., 1993, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ACIESP, 1993. v. 2, p. 1-9.

KELLEHER, C. T. et al. Species distinction in Irish populations of *Quercus petraea* and *Q. robur*: morphological versus molecular analyses. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 7, p. 1237-1246, 2005.

KING, R. A.; FERRIS, C. Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 1151-1161, Feb. 1998.

LACERDA, A. E. B.; NIMMO, E. R.; SEBBENN, A. M. Modeling the long-term impacts of logging on genetic diversity and demography of *Hymenaea courbaril*. **Forest Science**, Bethesda, v. 59, n. 1, p. 15-26, 2013.

LEBERG, P. L. Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. **Evolution**, Lancaster, v. 46, n. 2, p. 477-494, Apr. 1992.

LEMES, M. R. et al. Flexible mating system in a logged population of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae): implications for the management of a threatened Neotropical tree species. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 192, n. 1, p. 69-79, Jan. 2007.

LILLY, J. W. et al. Cytogenomic analyses reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 13, n. 2, p. 245-254, 2001.

LOEUILLE, B. **Eremanthus in lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB005315,2012.323>>. Acesso em: 20 mar. 2013.

\_\_\_\_\_. **Towards a phylogenetic classification of Lychnophorinae (Asteraceae: Vernoniae)**. 2011. 432 p. Thesis (Ph.D. in Botany) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LOEUILLE, B.; LOPES, J. C.; PIRANI, J. R. Taxonomic novelties in *Eremanthus* (Compositae: Veronieae) from Brazil. **The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens**, Kew, v. 67, n. 1, p. 1-9, Mar. 2012.

LOISELLE, B. A. et al. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 82, n. 11, p. 1420- 1425, 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.

LYNCH, M.; CREASE, T. J. The analysis of population survey data on DNA sequence variation. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 7, n. 4, p. 377-394, 1990.

MACLEISH, N. F. F. Revision of *Eremanthus* (Compositae: *Vernonieae*). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 47, p. 265-290, 1987.

MALIGA, P. Plastid transformation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 289-313, 2004.

MILLER, M. P. **TFPGA (Tools for Population Genetic Analyses)**. Version 1.3. Flagstaff: Northern Arizona University, 1997. Software.

MINAS GERAIS. **Portaria nº 01**, de 5 janeiro de 2007. Dispõe sobre normas para elaboração e execução do Plano de Manejo para Produção Sustentada da Candeia - *Eremanthus erythropappus* e *Eremanthus incanus* no Estado de Minas Gerais e dá outras providências. Belo Horizonte, 2007. Disponível em: <<http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=6692>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

MINAS GERAIS. Secretária de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. Resolução Conjunta SEMAD/IEF nº 1804, de 11 de janeiro de 2013. Dispõe sobre os procedimentos para autorização da intervenção ambiental no Estado de Minas Gerais e dá outras providências. **Diário do Executivo de "Minas Gerais"**, Belo Horizonte, ano 121, n. 23, p. 23-25, 2 fev. 2013.

MOGG, R. J.; BOND, J. M. A cheap, reliable and rapid method of extracting high quality DNA from plants. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 666-668, Oct. 2003.

MOURA, M. C. de O. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish por isoenzimas e RAPD.** 2005. 165 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

NAGATA, N. et al. The selective increase or decrease of organellar DNA in generative cells just after pollen mitosis one controls cytoplasmic inheritance. **Planta**, Berlin, v. 209, n. 1, p. 53-65, July 1999.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings National Academy Sciences**, Washington, v. 70, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, Lancaster, v. 29, p. 1-10, 1975.

NEWTON, A. C. et al. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 140-145, Apr. 1999.

NOVAES, R. M. L. et al. Phylogeography of *Plathymentia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 7, p. 985-998, July 2010.

OLDENBURG, D. J.; BENDICH, A. J. Most chloroplast DNA of maize seedlings in linear molecules with defined ends and branched forms. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 335, n. 4, p. 953-970, Jan. 2004.

PÁDUA, J. A. R. de. **Genética da paisagem: áreas prioritárias para manejo e a conservação de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish no Estado de Minas Gerais.** 2011. 80 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

PALMER, J. D. Cell organelles. In: HERRMANN, R. G. (Ed.). **Plant gene research**. Vienna: Springer-Verlag, 1992. p. 99-122.

PALMER, J. D.; STEIN, D. B. Conservation of chloroplast genome structure among vascular plants. **Current Genetics**, New York, v. 10, n. 3, p. 823-833, Mar. 1986.

PATWA, Z.; WAHL, L. The fixation probability of beneficial mutations. **Journal of the Royal Society Interface**, London, v. 5, n. 28, p. 1279-12896, Nov. 2008.

PEDRALLI, G. Estrutura diamétrica, vertical e análise do crescimento da candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip.) na estação ecológica do Tripuí, Ouro Preto, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 21, n. 2, p. 301-306, mar./abr. 1997.

PEDRALLI, G.; TEIXEIRA, M. C. B.; NUNES, Y. R. Estudos sinecológicos sobre a candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip) na estação ecológica de Tripuí, Ouro Preto, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 21, p. 301-306, 1997.

PENNINGTON, R. T.; PRADO, D. A.; PENDRY, C. Neotropical seasonally dry forests and Pleistocene vegetation changes. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 27, p. 261-273, Feb. 2000.

PÉREZ, J. F. M. **Sistema de manejo para candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish)**. 2001. 71 p. Dissertação (Mestrado em Produção Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

PÉREZ, J. F. M. et al. Equações para a estimativa do volume, peso seco, peso de óleo e número de moirões para a candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 2, p. 257-273, jul./dez. 2004.

PETIT, R. J.; EL MOUSADIK, A. E.; PONS, O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, Boston, v. 12, n. 4, p. 844-855, Aug. 1998.

PETIT, R. J. et al. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, n. 18, p. 9996-10001, 1997.

\_\_\_\_\_. Chloroplast DNA variation in European white oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 156, n. 1, p. 5-26, Jan. 2002.

PETIT, R. J.; KREMER, A.; WAGNER, D. B. Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. **Heredity**, Washington, v. 71, n. 4, p. 630-641, Dec. 1993.

PONS, O.; PETIT, R. J. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity I., Haploid locus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, n. 3/4, p. 462-470, Mar. 1995.

\_\_\_\_\_. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. **Genetics**, Austin, v. 144, n. 3, p. 1237-1245, Nov. 1996.

PONS, T. et al. Structural model for family 32 of glycosyl-hydrolase enzymes. **Proteins**, New York, v. 33, n. 3, p. 383-395, Nov. 1998.

PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South-America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 80, n. 4, p. 902-927, Aug. 1993.

PRANCE, G. T. **Biological diversification in the tropics**. New York: Columbia University, 1982. 137 p.

\_\_\_\_\_. Phylogeographic support for the theory of Pleistocene forest refuges in the Amazon Basin, based on evidence from distribution patterns in Caryocaraceae, Chrysobalanaceae, Dichapetalaceae and Lecythidaceae. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 3, p. 5-26, 1973.

QUÉMÉRÉ, E. et al. Landscape genetics of an endangered lemur (*Propithecus tattersalli*) within its entire fragmented range. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 1606-1621, Mar. 2010.

RAJORA, O. P.; PLUHAR, S. A. Genetic diversity impacts of forest fire, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 7, p. 1203-1212, May 2003.

RAMOS, A. C. S.; LEMOS-FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Phylogeographical structure of the neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. **Journal of Heredity**, Washington, v. 100, n. 2, p. 206-216, Oct. 2009.

RIBEIRO, R. A. et al. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, Washington, v. 106, n. 1, p. 46-57, Jan. 2011.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**: manual de dendrologia brasileira. São Paulo: E. Blücher, 1979. 296 p.

ROSAL, L. F. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish)**. 2004. 106 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

SCHLÖGL, P. S.; SOUZA, A. P. D.; NODARI, R. O. PCR-RFLP analysis of non-coding regions of cpDNA in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p. 423-427, 2007.

SCOLFORO, J. R. S. et al. **Manejo da candeia nativa**. Lavras: UFLA, 2008. 44 p.

\_\_\_\_\_. **Manejo sustentável das candeias *Eremanthus erythropappus* e *Eremanthus incanus***: relatório técnico científico. Lavras: UFLA-FAEPE, 2002. 350 p.

SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. **O manejo sustentável da candeia**: o caminhar de uma nova experiência florestal em Minas Gerais. Lavras: UFLA, 2012. 329 p.

SEBBENN, A. M. **Distribuição da variação genética de populações de jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* Mart., O.ktze) por caractere quantitativos e isoenzimas**. 2001. 210 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2001.

SEBBENN, A. M. et al. Effects of the management on the genetic structure of caixeta (*Tabebuia cassinoides*) populations. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 58, p. 127-143, dez. 2000.

SHAW, J. et al. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 94, n. 3, p. 275-288, 2007.

SILVA, A. C. da et al. Variação genética entre e dentro de populações de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 3, p. 271-277, jul./set. 2007.

SILVA, E. F. **Caracterização edáfica e fitossociológica em áreas de ocorrência natural de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Sch. Bip.)**. 2001. 118 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

SOLTIS, P. S.; GITZENDANNER, M. A. Molecular systematics and the conservation of rare species. **Conservation Biology**, Boston, v. 13, n. 3, p. 471-483, June 1999.

SOUTHWICK, E. E.; BUCHMANN, S. L. Effects of horizon landmarks on homing success in honey bees. **American Naturalist**, Chicago, v. 5, p. 748-764, Nov. 1995.

SOUZA, H. A. V. E.; LOVATO, M. B. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 49-56, 2010.

STEHLIK, I. Glacial history of the alpine herb *Rumex nivalis* (Polygonaceae): a comparison of common phylogeographic methods with nested clade analysis. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 89, n. 12, p. 2007-2016, Dec. 2002.

TABERLET, P. et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 17, n. 5, p. 1105-1109, Nov. 1991.

TARAZI, R. et al. Edge effects enhance selfing and seed harvesting efforts in the insect-pollinated Neotropical tree *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). **Heredity**, Washington, v. 110, n. 6, p. 578-585, June 2013.

TORO, M. A.; CABALLERO, A. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, London, v. 360, n. 1459, p. 1367-1378, July 2005.

TRIBSCH, A.; SCHÖNSWETTER, P.; STUESSY, T. F. *Saponaria pumila* (Caryophyllaceae) and the ice age in the European alps. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 89, n. 12, p. 2024-2033, Dec. 2002.

TURCHETTO-ZOLETA, A. C. et al. Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 65, n. 1, p. 174-182, 2012.

VASCONCELOS, F. C. W. **Desenvolvimento de tecnologia para a recomposição vegetal com espécies nativas, nas pilhas de rejeito/estéril geradas pela mineração de pedra São Tomé, no município de São Thomé das Letras, Minas Gerais**. 2001. 148 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

VIEIRA, F. de A. et al. Métodos de extração de DNA e seleção de *primers* de cpDNA para *Ficus bonijesulapensis* (Moraceae). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 4, p. 69-74, 2010.

VIEIRA, F. de A.; FAJARDO, C. G.; CARVALHO, D. de. Biologia floral da candeia (*Eremanthus erythropappus*, Asteraceae). **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 477, dez. 2012.

\_\_\_\_\_. Biologia reprodutiva de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (Asteraceae). In: CONGRESSO NORDESTINO DE ENGENHARIA FLORESTAL, 2., 2009, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: UFPB, 2009. 1 CD-ROM.

WEISING, K.; GARDNER, R. C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 1, p. 9-19, Feb. 1999.

WIDMER, A.; LEXER, C. Glacial refugia: sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 16, n. 6, p. 267-268, June 2001.

WRIGHT, S. **Variability within and among natural populations**. Chicago: University of Chicago, 1978. 423 p.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, Austin, v. 28, p. 114-138, 1943.

ZAGHLOUL, M. S. et al. Genetic diversity within and among Sinai populations of three *Ballota* species (Lamiaceae). **Journal of Heredity**, Washington, v. 97, n. 1, p. 45-54, 2006.

## ANEXOS

**ANEXO A** - Diversidade e contribuição de cada população para a diversidade total e a riqueza alélica total para cada espécie, *Eremanthus erythropappus* e *E. incanus*

População	Região	Tamanho Amostral	Ao	h <sub>s</sub>	R	C <sub>T</sub> *	C <sub>RT</sub> *
<i>E. erythropappus</i>							
Medina	Norte	15	2	0.133	0.200	-0.031	-0.801
Francisco Sá	Norte	12	2	0.303	0.455	-0.038	-0.615
Mata Escura	Norte	6	2	0.333	0.500	-0.098	-0.696
Rio Pardo de Minas	Norte	3	2	0.667	1.000	-0.088	-0.186
Morro do Pilar	Centro-Sul	15	1	0.000	0.000	0.019	-0.989
Airuoca	Centro-Sul	15	1	0.000	0.000	0.019	-0.989
Carrancas	Centro-Sul	15	1	0.000	0.000	0.019	-0.989
Baependi	Centro-Sul	30	1	0.000	0.000	0.019	-1.091
Lavras	Centro-Sul	15	2	0.133	0.200	-0.031	-0.801
<i>E. incanus</i>							
Francisco Sá	Norte	4	2	0,500	0.750	0.378	0.149
Rio Pardo de Minas	Norte	6	1	0.000	0.000	-0.284	-0.416
Lavras	Centro-Sul	15	2	0.248	0.371	0.019	-0.213
São Tomé das Letras	Centro-Sul	15	2	0.133	0.200	-0.113	-0.145

\*: tamanho populacional relativo à rarefação com tamanho amostral = 3; Ao: número de haplótipos observados; h<sub>S</sub>: diversidade genética; R: riqueza alélica após a rarefação; C<sub>T</sub>: contribuição para a diversidade genética total; C<sub>RT</sub>: contribuição para a riqueza alélica total.