



**DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE JABORANDI**  
*(Pilocarpus microphyllus)*

**ELISA FERREIRA MOURA**

**2003**

**ELISA FERREIRA MOURA**

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE JABORANDI**  
**(*Pilocarpus microphyllus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador  
Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2003

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Moura, Elisa Ferreira

Divergência genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus  
microphyllus*) / Elisa Ferreira Moura -- Lavras : UFLA, 2003.

75 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Planta medicinal. 2. RAPD. 3. Análise multivariada. 4. Genética de populações I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.93724

**ELISA FERREIRA MOURA**

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE JABORANDI  
(*Pilocarpus microphyllus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 04 de julho de 2003

Prof. Dr. João Bosco dos Santos

UFLA

Prof. Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto

UFLA

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

*Dedico...*

*Aos meus pais, Edíla e Moura,*

*minha irmã Helena,*

*a Bené,*

*A meus avós Semírames e Joaquim, Josefa e Alfredo (in*

*memoriam),*

*Família que tanto fez falta nesses dois anos,*

*E ao Roberto, pelos momentos de alegria e cumplicidade.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me ajudado a concluir mais esta etapa.

À Universidade Federal de Lavras, pela oferta do curso.

À CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pela concessão da bolsa de estudos.

A Embrapa Amazônia Oriental por ter concedido os materiais vegetais.

Aos meus pais e minha irmã, pelo carinho, apoio e incentivo.

Ao Roberto, pela companhia e carinho.

Ao casal de “tios” Sérgio e Ana Rita Alves, pela amizade, confiança e apoio que sempre proporcionaram.

Aos meus avós, tios e padrinhos, família que sempre torceu por mim.

Ao Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pelos ensinamentos, orientação, paciência e apoio durante todos os momentos do curso.

Ao Prof. João Bosco dos Santos, pela paciência e disponibilidade durante a orientação e pelos ensinamentos passados.

Ao Prof. César Augusto Brasil Pereira Pinto, pela grande ajuda que deu na condução deste trabalho.

Ao Dr. Osmar Alves Lameira, da Embrapa, por ajudar na coleta de dados e nas informações sobre o jaborandi.

Ao Prof. Daniel Ferreira do DEX/UFLA e ao estudante José Airton, pela grande contribuição na análise dos dados.

Ao funcionário Paulo e às estagiárias do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, pela ajuda na coleta dos dados.

Ao Lamartine, pela grande ajuda no laboratório.

Aos colegas Jair Duarte e Déa Alécia, pela ajuda nos programas.

Aos pesquisadores Ladislau Skorupa, da Embrapa e Pedro Magalhães, do CPQBA, pelas valiosas informações sobre o jaborandi.

Aos professores Magno, Lisete, Elaine, João Cândido e Wagner, pelos ensinamentos.

Aos amigos de curso Gilvan, Fábio, Nelcimar, Nara, Juliano, Socorro e Patrícia, pela troca de experiências e momentos compartilhados durante o curso, assim como pela sua amizade.

Aos demais alunos do curso, em especial aos colegas de turma, Lourenço e Ricardo.

Aos amigos Rairys, Cláudia, Ilma, Carol, Aurélio, Carmen, pelos momentos de descontração e amizade.

Às amigas Karen, Luciana e Tânia que mesmo de longe pareciam estar próximas.

A todos que estiveram presentes e contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Jaborandi.....	3
2.1.1 Botânica e ocorrência.....	3
2.1.2 Propriedades farmacológicas.....	3
2.1.3 Uso e exploração comercial.....	4
2.2 Bancos de germoplasma.....	5
2.3 Análise da variabilidade genética.....	6
2.3.1 Marcadores genéticos.....	8
2.3.1.1 Estudo de populações com marcadores RAPD.....	10
2.3.2 Análise multivariada.....	12
2.3.2.1 Medidas de similaridade ou dissimilaridade.....	12
2.3.2.2 Análises de agrupamento.....	14
2.3.2.3 Análises por componentes principais e variáveis canônicas.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Avaliação com dados RAPD.....	17
3.1.1 Material genético.....	17
3.1.2 Extração de DNA.....	18
3.1.3 Reação RAPD.....	19
3.1.4 Estimativa das similaridades genéticas.....	19
3.1.5 Análise da variância molecular.....	21
3.2 Avaliação por dados fenotípicos.....	22
3.2.1 Material genético.....	22
3.2.2 Coleta dos dados.....	23
3.2.3 Análise da variância univariada.....	24
3.2.4 Análise de variância multivariada.....	25
3.2.5 Variáveis canônicas e descarte de variáveis.....	26
3.2.6 Estimativa das distâncias fenotípicas.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Avaliação por marcadores RAPD.....	31
4.1.1 Dados RAPD.....	31
4.1.2 Distribuição da variabilidade genética.....	32
4.1.3 Diversidade genética.....	37
4.2 Dados fenotípicos.....	39
4.2.1 Análises de variância uni e multivariada.....	39
4.2.2 Variáveis canônicas.....	40
4.2.3 Distâncias fenotípicas.....	44
4.2.5 Diversidade fenotípica.....	48

4.3	Correlação entre dados RAPD e dados fenotípicos.....	49
5	CONCLUSÕES.....	50
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
	ANEXOS.....	59

## RESUMO

MOURA, Elisa Ferreira. **Divergência genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*):** UFLA, 2003. 75p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia /Genética e Melhoramento de Plantas)\*

O jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) é uma espécie medicinal que produz o alcalóide pilocarpina, usado em tratamento de glaucoma e tratamento capilar, entre outros. O objetivo deste trabalho é estudar a variabilidade existente em um banco de germoplasma de jaborandi da Embrapa Amazônia Oriental, por meio de marcadores RAPD e fenotípicos. Para a análise com os dados RAPD, foram amostrados 93 indivíduos provenientes de 12 áreas de coleta nos estados do Maranhão e Pará. As similaridades de Nei e Li foram calculadas para indivíduos e áreas de coleta para a construção de dois dendrogramas e para a analisar os coeficientes de variação entre e dentro de áreas de coleta por meio da análise de variância molecular (AMOVA). Foi estimado o índice de Shannon para cada área de coleta. Para a análise com dados fenotípicos, foram amostrados 152 indivíduos provenientes de 14 áreas de coleta nos estados do Maranhão e Pará. Foram coletadas folhas dos indivíduos em duas épocas, sendo analisados a matéria seca de folha, o número de folíolos/folha, o comprimento e a largura de folíolos, a relação comprimento/largura e a área foliar. Foi feita a análise de variância multivariada usando o critério de Wilks. Foram obtidas as variáveis canônicas e, a partir delas, as distâncias euclidianas entre as populações. A distância entre os indivíduos foi obtida a partir da distância euclidiana média com os dados padronizados. As análises demonstraram que existe diferenciação genética entre as áreas de coleta. A AMOVA demonstrou que 24,16% da variação estão contidos entre populações e 75,84% estão contidos dentro, resultado comparável ao de outras espécies arbustivas alógamas. O índice de diversidade de Shannon indicou que as populações do Pará apresentaram maior diversidade. As três primeiras variáveis canônicas explicaram 84,13% da variação total e os seis caracteres originais foram altamente correlacionados com elas. Sendo assim, nenhuma variável foi descartada. Não houve correlação entre as distâncias obtidas com os dados fenotípicos e os dados RAPD.

---

\*Comitê de Orientação: Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Orientador), Prof. Dr. João Bosco dos Santos (Co-orientador)

## ABSTRACT

MOURA, Elisa Ferreira. **Genetic divergence among jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) accessions**: UFLA, 2003. 75p. (Dissertation – Master in Agronomy – Plant Genetics and Breeding)\*

Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) is a medicinal species that produces an alkaloid named pilocarpine, used for glaucoma and hair treatments, among others. The aim of this work is to study the presence of variability in the germplasm bank of Embrapa Amazônia Oriental using RAPD and phenotypic markers. For RAPD analysis, it was sampled 93 individuals from 12 sample areas in the states of Pará and Maranhão. Pairwise similarities of Nei and Li were calculated for individuals and sample areas, then used to construct two dendrograms and to analyze intra- and intersample areas variance coefficients by analysis of molecular variance (AMOVA). The Shannon index was calculated for each sample area. For the phenotypic analyses, 152 individuals were sampled from 14 sample areas in the states of Pará and Maranhão. Leaves were sampled in two seasons, being analyzed the leaf dry weight, number of leaflets /leaf number, leaf length and width, length/width ratio and leaf area. It was obtained the multivariate variance analysis, using Wilks criterion. The canonical variables were obtained and used to calculate the Euclidean distances among sample areas. The average Euclidian distance was used to calculate the distances among individuals with standardized data. The analysis demonstrated that there is genetic differentiation between sample areas, and AMOVA demonstrated that 24.16% of genetic variation is maintained among sample areas and 75.84% is within. These results were comparable to others estimated for herbaceous and alogamous species. The Shannon diversity index showed that Pará populations have greater diversity. The first three canonical variables explained 84.13% of total variation, and the six original variables were highly correlated to them and no variable was discarded. There was no correlation between distances obtained from phenotypic data and RAPD data.

---

\*Guidance Committee: Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Major Professor),  
Dr. João Bosco dos Santos

## 1 INTRODUÇÃO

Mudanças nos hábitos da população em relação à busca por qualidade de vida têm incentivado a incorporação de novos produtos vegetais no mercado, em especial aqueles que agreguem algum benefício nutricional ou ambiental. Entre eles, está o uso de plantas medicinais, que vem aumentando gradativamente nos últimos anos. Um crescimento do mercado fitoterapêutico vem sendo observado nos últimos 15 anos. Somente para os mercados americano e europeu, atingiu aproximadamente US\$ 7 bilhões e 5 US\$ bilhões, respectivamente, no ano de 1999. Segundo a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial fazem uso de alguma erva para fins terapêuticos.

As plantas medicinais são indicadas por serem de fácil acesso, rápido preparo e gerar efeitos colaterais mais brandos que os provocados pelos medicamentos fabricados em laboratório.

Entre as plantas com efeito medicinal comprovado, o jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) é considerado planta prioritária em programas de conservação (Vieira, 1999). Tem como princípio ativo a pilocarpina, um alcalóide imidazólico cuja principal ação ocorre no tratamento contra o glaucoma e encontra-se em maior concentração nas folhas. Esta espécie sofreu reduções significativas com a coleta extrativista nos anos de 1970 e 80, mas atualmente já existem plantios racionais.

O processo de domesticação de uma espécie envolve vários estágios, desde esforços para coleta de germoplasma até o seu melhoramento genético, visando obter características agronomicamente superiores. Existem várias metodologias que auxiliam neste processo e a abordagem de avaliação de germoplasma é uma delas. É ela que irá descrever a diversidade disponível, além de dar detalhes sobre as características da espécie. Para isso, pode-se utilizar os

marcadores morfológicos, utilizando métodos de análise multivariada para avaliar a distribuição genética entre e dentro de populações, as distâncias genéticas entre os genótipos e para realizar a seleção de descritores de germoplasma. Os marcadores moleculares também surgiram como excelente ferramenta para a análise de diversidade e relações genéticas entre os acessos, já que permitem cobrir uma boa parte do genoma e não possuem influência do ambiente.

Em 1992, foi estabelecido um banco de germoplasma de jaborandi na Embrapa Amazônia Oriental em Belém, PA, visando à sua conservação e utilização em programa de melhoramento genético. Entretanto, pouco foi feito para se avaliar este germoplasma, o que impede desde a organização do banco até o início de programas de melhoramento.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é avaliar as relações genéticas entre os acessos e a diversidade genética existente no banco de germoplasma por meio de marcadores morfológicos e de marcadores RAPD.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Jaborandi

#### 2.1.1 Botânica e ocorrência

O gênero *Pilocarpus* pertence à subtribo Pilocarpinae, tribo Cusparieae, subfamília Rutoideae, da família Rutaceae. Corresponde a um arbusto ou arvoreta, possuindo de 1 a 7,5 m de altura. É perene e alógama. Possui folhas compostas, fruto do tipo mericarpo, flores hermafroditas e a deiscência dos frutos é do tipo explosiva. O seu número cromossômico é  $2n=2x=44$ , sendo que o número básico do gênero possivelmente é  $x=22$  (Skorupa, 2000a).

Segundo Skorupa (2000b), *P. microphyllus* ocorre na Amazônia, nas áreas do leste do Estado do Pará, oeste e norte do Maranhão e ao norte do Piauí. É comum em florestas ombrófilas densas, e também em afloramentos rochosos em que as matas são menos densas. No interior das matas é encontrado preferencialmente em ambientes mais iluminados, como em clareiras.

#### 2.1.2 Propriedades farmacológicas

O gênero *Pilocarpus*, em especial as espécies *P. microphyllus* e *P. jaborandi*, é a única fonte natural da droga pilocarpina, um alcalóide imidazólico que é usado na oftalmologia para contração da pupila e em tipos primários de glaucoma. A pilocarpina era usada pelos índios brasileiros por causar sudorese e salivação, uso comprovado cientificamente (Merck, 1989). A agência que regula a liberação de medicamentos nos Estados Unidos, *Food and Drug Administration*, aprovou, em 1994, seu uso para o tratamento da xerostomia pós-irradiação em pacientes com câncer. Além disso, também é usada no tratamento para queda de cabelos, sendo ingrediente no preparo de xampus e condicionadores.

### **2.1.3 Uso e exploração comercial**

A pilocarpina é usada comercialmente na fabricação de um colírio indicado para o controle do glaucoma. As indústrias farmacêuticas Merck S.A. atuam quase exclusivamente na exploração do jaborandi no Maranhão. A Merck cuida da comercialização das folhas, sendo a pilocarpina extraída pela sua subsidiária Vegetex, em Parnaíba, Piauí. Os sais são então exportados para os laboratórios que fabricam este colírio.

Na década de 1980, além da Vegetex, havia outras empresas que concorriam pelas folhas de jaborandi. A concorrência era grande entre a Vegetex e a Fitobrás no Maranhão. A partir daí, a coleta das folhas passou a ser uma atividade quase predatória, já que o preço pago pelas empresas aos camponeses passou a ser maior que a diária pelo trabalho na agricultura. No final dos anos 1980, a extração atingiu seu clímax. Esta exploração predatória teve muitos efeitos negativos para as populações naturais de jaborandi, já que a coleta das folhas deixava as plantas seriamente danificadas, levando à sua morte (Pinheiro, 1997). Foram dizimadas populações naturais, levando-a a entrar na lista das espécies ameaçadas do IBAMA, em 1992. Alguns consideram a exploração do jaborandi pela Merck como um dos maiores exemplos de biopirataria no Brasil uma vez que os coletores do Maranhão, assim como o próprio Estado, não tiveram nenhum aproveitamento direto desta exploração (Pinheiro, 2002).

Em virtude dessa redução dos recursos naturais, a Merck passou, em 1989, a procurar domesticar o jaborandi. Atualmente, ela possui uma plantação no Maranhão de 15 milhões de plantas, em uma área de, aproximadamente, 500 ha. Mesmo assim, ainda relata-se o extrativismo por populações maranhenses e paraenses (Pinheiro, 2002). Atualmente, a produção de pilocarpina sintética vem tomando espaço no mercado, mas pode não haver o abandono do recurso natural, em virtude de maiores exigências de qualidade pela população.

## 2.2 Bancos de germoplasma

A conservação de recursos genéticos é composta de ações estabelecidas para resgatar e manter disponível o potencial utilitário da biodiversidade ou diversidade genética dos organismos (Vilela Morales *et al.*, 1997). A conservação pode ser *in situ*, quando se preserva a espécie em suas áreas de ocorrência, ou *ex situ*, quando se mantêm coleções ou bancos de germoplasma em instituições de pesquisa. A conservação *ex situ* pode ser na forma de banco de sementes, cultura de tecidos, criopreservação e na forma de plantações. A necessidade de espaço e atenção contínuos faz deste último método de conservação um dos mais caros, restritos e vulneráveis (Brown, 1992). Entretanto, ele facilita a avaliação genética dos materiais e o uso direto do germoplasma em programas de melhoramento.

Germoplasma refere-se a qualquer material que constitui a base física da herança e que pode se transmitir de uma geração a outra (IBPGR, 1991). O objetivo de um banco é representar todos os alelos contidos nas áreas de ocorrência natural da espécie. Entretanto, a eficiência desta representação depende de fatores como a biologia da espécie, sua estrutura genética e do grau de dificuldade proporcionado pelo posicionamento geográfico das áreas de coleta (Sousa & Souza, 2001).

A estrutura genética de uma espécie pode ser definida como a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações, ou áreas de ocorrência. O conhecimento desta estrutura é um importante passo para se direcionar coletas. Segundo Brown (1992), as primeiras coletas devem se basear na grande diversidade entre regiões, para se coletar em um máximo de locais e a partir destas coletas estudar a estruturação genética. Após este estudo, poder-se-ia então montar estratégias mais eficientes de coleta.

### 2.3 Análise da variabilidade genética

A etapa de avaliação da variabilidade genética de uma espécie, seja dos materiais contidos em banco de germoplasma ou de amostras de populações naturais, é de extrema importância para se estabelecer estratégias de conservação da espécie, de coletas, organização dos bancos de germoplasma e no uso em programas de melhoramento.

São diversos os fatores que afetam a distribuição da variabilidade da espécie ao longo de suas áreas de ocorrência, como a forma de reprodução, forma de acasalamento, migração, seleção natural e deriva genética, entre outros (Hamrick, 1982).

Populações de espécies alógamas tendem a trocar pólen entre si e, por isso, espera-se obter menores níveis de diferenciação entre populações, estando a maior parte da variação genética dentro das populações. Para espécies alógamas, as porcentagens de variação entre populações podem ser afetadas pelos mecanismos de dispersão de pólen e sementes (Hamrick, 1982). Espécies que são polinizadas pelo vento possuem menor ou nenhuma diferenciação populacional; este é considerado o meio mais eficiente de dispersão de pólen (Hamrick, 1982). Além disso, espécies arbóreas tendem a ser mais eficientes nos mecanismos de dispersão, o que é observado nas distribuições da variação comparadas às de espécies herbáceas. Reis (1999) obteve 8% de variação genética entre populações da árvore *Myracrodruon urundeuva*, enquanto Wadt (2001) obteve 28% de variação entre populações da herbácea *Piper hispidinervium*, sendo as duas espécies tropicais e alógamas.

Um fator importante que influencia a estruturação genética de uma espécie nativa de florestas é a fragmentação florestal com conseqüente redução populacional. Os seus principais efeitos são: perda de diversidade genética, mudança na estrutura populacional e aumento nas taxas de endogamia (Rotman & Boyle, 2000). Muito se deduziu sobre os efeitos da redução populacional nas

espécies, como perda de 90% a 99% da variabilidade, o que depois, com a publicação de artigos com estudos genéticos, demonstrou-se ser um exagero (Amos & Balmford, 2001). Segundo esses autores, as perdas genéticas podem chegar a 25%, sendo a variabilidade “útil” das espécies, que permite seu ajuste as modificações no ambiente, ainda menos sentida. Mesmo assim, não se pode deixar de levar em conta os efeitos que a ação humana tem sobre a variabilidade genética das espécies. Espécies que sofreram fragmentação tendem a apresentar maior diferenciação genética entre populações, já que o fluxo gênico é prejudicado, principalmente quando os agentes polinizadores são animais (Ratman & Boyle, 2000).

Além dos efeitos da fragmentação dos ambientes naturais das espécies vegetais, outro fator que causa perda de variação genética é a redução das populações, seja pelo deflorestamento ou pela sua exploração irracional. A redução populacional tem como consequência os aumentos nas taxas de endogamia e maiores efeitos da deriva genética, podendo levar a perdas alélicas. A deriva genética se refere a mudanças nas frequências alélicas devido à amostragem aleatória dos gametas. Gillies et al. (1999) verificaram que a diversidade em locais em que houve extração de árvores de *Swietenia macrophylla* era menor que naqueles locais onde não houve exploração. Já Prober & Brown (1994) encontraram relação positiva entre o tamanho populacional e a riqueza alélica em *Eucalyptus albens* e *Rutidosia leptorrhynchoides*, espécies com diferentes históricos de colonização. Os efeitos da redução populacional na redução na diversidade também foram relatados para espécies de orquídeas (Sun & Wong, 2001; Wong & Sun, 1999).

Sendo assim, verifica-se a importância de se fazerem inferências sobre a estrutura genética de populações, medir a sua diversidade e verificar relações entre populações de diferentes locais, para que se possa chegar a conclusões

mais claras sobre os efeitos da ação humana sobre elas. Para isso, os marcadores genéticos surgem como uma importante ferramenta.

### **2.3.1 Marcadores genéticos**

Os marcadores genéticos permitem o estudo comparativo dos genótipos e são bastante úteis no estudo genético, já que permitem verificar a herança de caracteres, ajudam na construção de mapas genéticos e permitem verificar as relações entre os genótipos. Eles podem ser de três tipos: morfológicos, bioquímicos e moleculares.

Os marcadores morfológicos foram os primeiros a serem utilizados em estudos genéticos e serviram para desenvolver as teorias de Mendel, para desenvolver as teorias sobre ligações gênicas e para construir os primeiros mapas genéticos. Apesar de atualmente serem preteridos pelos marcadores moleculares por gerarem poucas informações e sofrerem influência ambiental, é importante utilizá-los em análises de bancos de germoplasma, especialmente quando as informações gerais sobre a espécie são escassas. Assim, poderia se identificar materiais genéticos que contenham características desejáveis (Steiner & Greene, 1996).

Estes marcadores vêm sendo utilizados para estabelecer a variação genética entre e dentro de populações naturais (Harrison et al., 1997; Boulli, Baaziz & Hirit, 2001) e para avaliar a variabilidade existente em bancos de germoplasma (Araújo, 2000; Nascimento Filho et al., 2001; Bered et al., 2002).

Marcadores bioquímicos são os gerados por isoenzimas, que apesar de gerarem mais marcadores genéticos que os morfológicos, não tiveram o mesmo impacto que os marcadores moleculares ou de DNA. Entretanto, ainda hoje são usados por serem de natureza codominante e permitirem a inferência de diversos parâmetros em estudos populacionais (Nassar, Hamrick & Fleming, 2001; Saenz-Romero, Guries & Monk, 2001; Hoebee & Young, 2001).

O primeiro marcador molecular a surgir foi o RFLP (“restriction fragment length polymorphism”), que se baseava no uso de enzimas de restrição (Grodzicker et al., 1974). Mais tarde, o surgimento da técnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) gerou o surgimento de outras técnicas moleculares. Em 1990, Welsh & McClelland e Williams et al. publicaram artigos simultaneamente, nos quais descreviam que os produtos genômicos amplificados por *primers* arbitrários poderiam ser usados como marcadores genéticos. A técnica descrita por Williams et al. (1990) foi denominada RAPD (“random amplified polymorphic DNA”) e foi a técnica de marcador molecular que mais se popularizou, apesar de demonstrar problemas, como a baixa reprodutibilidade (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Além disso, são marcadores dominantes e só se detectam dois alelos por loco, o produto amplificado e o não amplificado. A dominância dos marcadores RAPD deve-se ao fato de que basta uma das moléculas do DNA de um genoma diplóide (ou poliplóide) possuir um sítio de reconhecimento do *primer* para que seja verificada a presença da banda na análise dos produtos da amplificação no gel. Estes marcadores vêm sendo utilizados em vários estudos, como na estimação de variabilidade genética, identificação de alelos favoráveis e construção de mapas genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os marcadores RAPD já foram bastante usados no acesso da variabilidade genética em bancos de germoplasma de várias espécies, como de *Vicia faba* (Link et al., 1995), *Oryza sativa* (Virk et al., 1995), *Phoenix dactylifera* (Sedra et al., 1998), *Psycotria ipecacuanha* (Lima, 2002), entre outros.

A relação direta entre as informações geradas por marcadores morfológicos e marcadores moleculares não parece ser uma regra. Em um estudo com populações e subespécies de *Fragaria*, Harrison et al. (1997) verificaram que os dados morfológicos e os dados de RAPD geraram agrupamentos diferentes. Steiner & De Los Santos (2001) usaram marcadores

morfológicos e marcadores RAPD para avaliar a divergência entre acessos de *Lotus corniculatus* e constataram que somente as distâncias geradas pelos marcadores morfológicos mostraram relação significativa com as distâncias geográficas. Entretanto, Duarte, Santos & Melo (1999b) verificaram correlação de 0,89 entre as distâncias estimadas por RAPD e por dados fenotípicos para cultivares de feijão. Pode ser que a divergência entre materiais genéticos que tenham se separado há mais tempo um do outro, que durante muito tempo não tenham se inter cruzado, como parece ter sido o caso das cultivares de feijão estudadas por Duarte, Santos & Melo (1999), envolva um maior número de locos e por isso encontra-se maior correlação entre os dois tipos de marcadores.

McKay & Latta (2002) sugerem que marcadores moleculares e caracteres fenotípicos comportam-se de maneira diferente na divergência adaptativa das populações e por isso, não se deve extrapolar de uma variação para outra.

### **2.3.1.1 Estudo de populações com marcadores RAPD**

A análise da estrutura e diversidade em populações naturais com marcadores RAPD sofre algumas limitações no que diz respeito a estimar a diversidade genética, as frequências genotípicas e as taxas de endogamia, devido à sua natureza dominante e binária. Pode-se obter as frequências alélicas e genotípicas por meio de dados RAPD, sendo para isso necessário pressupor que as populações estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Em alguns casos, utilizaram-se informações sobre o coeficiente de endogamia das populações, pré-estimado com marcadores codominantes, para estabelecer a proporção de heterozigotos e assim obter os índices de diversidade por meio de marcadores dominantes (Mariette et al., 2001; Wadt, 2001).

Entretanto, em espécies que sofreram redução populacional, como já foi mencionado para o jaborandi, espera-se uma taxa maior de endogamia, o que

eliminar a pressuposição de que tais populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Se uma população teve seu tamanho reduzido, há maior chance de ocorrerem acasalamentos entre indivíduos aparentados, aumentando a estimativa de  $F$ .

O parâmetro  $F_{ST}$  é um dos coeficientes  $F$  de Wright e estima o coeficiente de endogamia de uma subpopulação em relação à população total, medindo o grau de diferenciação entre as subpopulações. Pode também ser um índice de fixação, que representa a redução na heterozigosidade em uma subpopulação devido à deriva genética. A estimativa deste parâmetro depende da obtenção das frequências alélicas da população. Jenczewski et al. (1999) mostraram que o parâmetro  $F_{ST}$  é superestimado ao se utilizarem marcadores RAPD para estimar as frequências alélicas. Sendo assim, existem outras metodologias capazes de fazer mensurações sobre a distribuição da variabilidade existente em populações naturais usando marcadores RAPD.

Em 1993, Huff et al. utilizaram o programa WINAMOVA desenvolvido por Excoffier, Smouse & Quattro (1992), que analisa a variância molecular entre haplótipos para avaliar a distribuição da variabilidade genética em uma estrutura hierárquica de regiões e populações da espécie *Digitalis obscura*, utilizando dados RAPD. Esta metodologia trata as distâncias genéticas como desvios da média de um grupo e usa os quadrados dos desvios como variâncias. A partir daí, muitos trabalhos utilizando marcadores dominantes para estudo de estrutura genética de populações utilizaram esta metodologia, como para *Camellia sinensis* (Kaundun & Park, 2002), *Piper hispidinervum* (Wadt, 2001), *Pedicularis palustris* (Schmidt & Jensen, 2000), *Populus tremuloides* (Yeh et al., 1995), entre outros. Os resultados concordaram com o histórico dessas espécies.

A maioria dos índices de diversidade depende da estimativa da heterozigosidade na população. Uma medida de diversidade que vem sendo

utilizada em análises populacionais através de RAPD é o índice de diversidade de Shannon, que tem a vantagem de ser insensível ao viés causado pela não detecção dos genótipos heterozigotos, já que ele se baseia na frequência fenotípica da banda na população. Esta medida de diversidade já foi utilizada em alguns trabalhos que utilizaram marcadores RAPD (Oiki et al., 2001; Sun & Wong, 2001; Yeh et al., 1995).

### **2.3.2 Análise multivariada**

A utilização das técnicas multivariadas permite ao geneticista avaliar o seu material genético a partir de um conjunto de variáveis contidas na unidade experimental. Nesse sentido, vários métodos podem ser aplicados. Os mais utilizados na comparação de genótipos são análise por variáveis canônicas e componentes principais e os métodos aglomerativos (Cruz & Regazzi, 2001). Estes últimos necessitam da estimativa de medidas de similaridade ou dissimilaridade genética.

#### **2.3.2.1 Medidas de similaridade ou dissimilaridade**

A similaridade é uma medida estabelecida entre um genótipo  $i$  e um genótipo  $j$  ( $s_{ij}$ ) e geralmente apresenta valores entre 0 e 1. Associada a ela, a dissimilaridade mede-se por  $d_{ij} = 1 - s_{ij}$ , é simétrica e não negativa. É grande o número de coeficientes que já foram propostos (Krzanowski, 1988) para estimar estas medidas. Elas podem ser tomadas por meio de variáveis quantitativas ou dicotômicas.

As medidas mais simples são aquelas relacionadas a variáveis dicotômicas, geradas por marcadores moleculares dominantes como o RAPD e o AFLP. Para estes marcadores, as quatro possíveis observações de comparação entre dois genótipos são classificadas baseadas na presença (1) ou ausência (0) da banda no gel de eletroforese, conforme a Tabela 1.

**TABELA 1** Tabela de contingência mostrando os quatro possíveis resultados de comparações de dois genótipos por marcadores dominantes.

		Genótipo i	
		1	0
Genótipo j	1	a (1,1)	b (0,1)
	0	c (1,0)	d (0,0)

Os diferentes coeficientes propostos combinam as quantidades a, b, c e d. Aqueles que não consideram a quantidade d são preferidos em estudos com marcadores dominantes, já que não se sabe a natureza molecular da ausência da banda. Sokal & Sneath (1963) citam vários coeficientes, sendo que os mais utilizados em estudos com RAPD são os de Jaccard e Sorensen-Dice ou Nei & Li, considerados os mais simples. Duarte, Santos & Melo (1999a) verificaram correlação de 100% entre os coeficientes de Jaccard e Nei & Li na obtenção das similaridades genéticas e na formação do dendrograma entre 27 cultivares de *Phaseolus vulgaris*. Entretanto, o coeficiente de Nei & Li foi o mais eficiente na dispersão dos genótipos em um plano bidimensional e, por isso, os autores consideraram este o mais eficiente na análise de marcadores RAPD.

Em estudos em que se deseja obter distâncias genéticas a partir de marcadores morfológicos, vêm se utilizando preferencialmente as distâncias euclidianas e as distâncias generalizadas de Mahalanobis (Bered et al., 2002; Nascimento Filho et al., 2001; Araújo, 2000; Ribeiro, Soares & Ramalho, 1999; Dias, 1994).

A distância euclidiana pode ser usada para os dados obtidos em experimentos sem controle local e apresenta como inconveniente o fato de ser alterada com a mudança na escala de medições, com o número de caracteres estudados e não levar em conta a correlação entre eles (Cruz & Regazzi, 2001). Para contornar alguns problemas, é recomendável padronizar os dados e utilizar

a distância euclidiana média, mas, ainda assim, ela não considera as correlações.

A distância generalizada de Mahalanobis é usada para dados obtidos a partir de experimentos com controle local, já que é uma medida que leva em conta a correlação entre as variáveis analisadas.

Dias (1994) verificou ausência de correlação entre as distâncias obtidas pela medida de Mahalanobis e pela distância euclidiana média, e, segundo Cruz & Regazzi (2001), só haverá correlação entre as medidas se a correlação entre as variáveis for zero.

#### **2.3.2.2 Análises de agrupamento**

As análises de agrupamento são usadas quando a finalidade é reunir, por algum critério de classificação, os genótipos em grupos, de tal forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos (Cruz & Regazzi, 2001). Os métodos mais comumente usados em estudos genéticos são os hierárquicos e os de agrupamento.

Nos métodos hierárquicos, os genótipos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis até que seja estabelecido o dendrograma ou diagrama de árvore. Há várias metodologias disponíveis, sendo que a mais utilizada para distâncias genéticas obtidas a partir de marcadores moleculares e morfológicos é a da média aritmética entre pares não-ponderados ou UPGMA (“unweighted pair-group means arithmetics”), também chamado de método do grupo médio ou método da ligação média. Esta metodologia foi usada por Duarte, Santos & Melo (1999b), Collignon & Favre (2000), Oiki (2001), Lima (2002), entre outros.

#### **2.3.2.3 Análises por componentes principais e variáveis canônicas**

A análise por componentes principais consiste em transformar um conjunto original de variáveis em outro conjunto de dimensão equivalente, mas

que retenha o máximo da informação em termos de variação total (Cruz & Regazzi, 2001). Cada componente principal é uma combinação linear das variáveis originais. A vantagem desse método é que pode ser usado em dados provenientes de experimentos sem repetições.

É uma metodologia bastante utilizada na estimativa da divergência genética entre materiais (Araújo, 2000; Harrison et al., 1997; Santos, Oliveira & Menezes, 1995), já que eles possibilitam resumir o conjunto de variáveis em poucos componentes, possibilitando uma aproximação do comportamento dos genótipos em um espaço bi ou tridimensional. Segundo Cruz & Regazzi (2001), os primeiros componentes principais permitem uma boa análise quando explicam mais ou menos 80% da variação total. Araújo (2000) utilizou 11 variáveis para estimar as distâncias genéticas entre 27 clones de *Theobroma grandiflorum* e, por meio dos componentes principais, verificou que os dois primeiros explicavam 76% da variação total. Mesmo assim, conseguiu obter um agrupamento dos materiais semelhante ao obtido pelo método de Tocher com a distância de Mahalanobis.

A análise por variáveis canônicas é um processo semelhante, em que se obtêm as variáveis mais relevantes para o estudo da divergência genética para se avaliar o comportamento dos genótipos em gráficos de dispersão bi ou tridimensionais. Entretanto, esta metodologia leva em conta a matriz de covariância residual e a covariância fenotípica entre os caracteres avaliados e só é utilizada para aqueles dados obtidos de experimentos com repetições.

Além da possibilidade de gerar informações sobre a divergência genética entre os materiais avaliados, os componentes principais e as variáveis canônicas permitem descartar variáveis redundantes, ajudando a estabelecer descritores para a avaliação do germoplasma de uma espécie. Santos, Oliveira & Menezes (1995) utilizaram os componentes principais para estabelecer descritores na análise de germoplasma de *Cajanus cajan*, e das vinte variáveis

avaliadas, puderam selecionar sete. Já Ribeiro, Soares & Ramalho (1999) utilizaram as variáveis canônicas para estimar a divergência genética entre populações de *Cocus nucifera* e, de dezenove caracteres utilizados, quatro foram selecionados para a avaliação.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Avaliação com dados RAPD

##### 3.1.2 Material genético

Foram utilizados neste trabalho 93 plantas de jaborandi pertencentes a 12 diferentes locais de coleta provenientes do banco de germoplasma localizado na Embrapa Amazônia Oriental-CPATU em Belém, PA. A identificação dos locais de coleta, assim como o número de plantas por local está contido na Tabela 2. Todos os materiais eram provenientes de populações naturais, com exceção dos materiais provenientes da Merck-MA. A indicação da localização dos municípios está na Figura 1A (Anexo).

**TABELA 2** Áreas de coleta de jaborandi com o respectivo número de plantas coletadas por área.

<b>Local de Coleta</b>	<b>Número de plantas coletadas</b>
Dom Eliseu, PA (DE)	5
São Félix do Xingu, PA (SF)	6
Serra dos Carajás, PA (SC)	18
Breu Branco, PA (BB)	13
Merck-MA (ME)	10
Moju, PA (1) (MO1)	10
Moju, PA (2) (MO2)	14
Açailândia, MA (AÇ)	6
Nina Rodrigues, MA (NR)	3
Mata Roma, MA (MR)	2
Brejo, MA (BR)	4
Santa Quitéria, MA (SQ)	2

### 3.1.3 Extração de DNA

Foram utilizadas como fonte de extração de DNA folhas, de preferência jovens, coletadas das plantas do banco de germoplasma. Logo após coletadas, as folhas foram mantidas em isopor com gelo até o transporte a Lavras, onde permaneceram em freezer -80°C até a extração de DNA.

Para a extração de DNA, foram utilizados cerca de dois gramas de folhas frescas, que foram maceradas em 10 ml de tampão de extração com CTAB a 65°C, juntamente com 200 µl de β-mercaptoetanol em um almofariz, com auxílio de areia esterilizada. O tampão de extração contém 2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH = 8,0), 20 mM de EDTA (pH = 8,0), 1,4 M de NaCl e 1% de PVP (polivinilpirrolidona). O macerado foi mantido em banho-maria por aproximadamente 30 minutos, sendo agitado a cada 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 10 mL da solução clorofórmio: álcool isoamil (24:1), seguido da homogeneização e centrifugação durante 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi misturado a 30 mL da solução, álcool etílico a 95%:acetato de amônio 7,5 M (6:1) e levado ao freezer (-20° C) por uma hora, no mínimo. Ao DNA coletado foram adicionados 300 µL de TE (Tris 1 mM e EDTA 0,1 mM, pH 7,7). O DNA dissolvido foi submetido a uma segunda extração com clorofórmio álcool isoamil, sendo o sobrenadante coletado e misturado com o triplo de seu volume com álcool a 95%:acetato de sódio 3M (20:1) e mantido no freezer (-20° C) por, no mínimo, uma hora. A solução de álcool acetato de sódio foi eliminada e o DNA dissolvido em 50-100 µL de TE. Após este processo o material foi quantificado, usando-se o fluorímetro Hoefffer Scientific TKO100. Para isso, foram utilizados 2 µL da solução de DNA em 2 mL de tampão (Tris 10 mM, EDTA 1,0 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4), juntamente com 0,1 µL/mL do corante H32258. As amostras foram diluídas em TE para uma concentração de 10 ng/ µL, para as reações RAPD.

### 3.1.4 Reação RAPD

A reação RAPD foi preparada em volume de 16 µl, semelhante ao procedimento utilizado por Nienhuis et al. (1995). Cada mistura de reação continha: 30 ng de DNA genômico, 50 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4 µM de um oligonucleotídeo iniciador (*primer*), 0,6 unidades da enzima Taq DNA polimerase, tampão de reação (50 mM tris pH 8,0; 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM de KCl; 250 µg/mL de albumina soro bovino; 1% de ficoll 400 e 1 mM de tartrazine).

As reações foram realizadas em tubos tipo *ependorf* de 0,5 ml ou de 200 µl, em termociclador Eppendorf MaterCycler Gradient 5331, programado para 40 ciclos, subdivididas em dois programas: 1) nos dois primeiros ciclos, a desnaturação do DNA era feita a 94°C por 2 minutos, o anelamento do primer a 37°C por 15 segundos e a elongação a 72°C por um minuto; 2) os 38 ciclos seguintes diferiram apenas no tempo de desnaturação do DNA que foi de 15 segundos. Após os 40 ciclos, realizou-se uma etapa de extensão final por 2 minutos a 72° C.

Após a amplificação, os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE (0,45 M de Tris-Borato e 0,01 M EDTA), a 70 volts, durante 4 horas, corados com brometo de etídio a uma concentração de 0,5 µg/ml e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne.

### 3.1.5 Estimativa das similaridades genéticas

Durante a avaliação dos géis, cada banda polimórfica foi tratada como um caráter único. Foi elaborada uma matriz de 0 e 1, a partir da codificação da presença (1) e ausência (0) das bandas polimórficas, presentes nas 93 plantas. A

estimativa da similaridade genética ( $sg_{ij}$ ), entre cada par de plantas, foi efetuada pelo coeficiente de Nei e Li, por meio da seguinte expressão (Rohlf, 1992).

$$sg_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Os significados de a, b, e c são apresentados na Tabela 1.

As análises de similaridade genética foram realizadas por meio do programa NTSYS-pc 2.0 (Rohlf, 1992).

Os erros associados a cada estimativa de similaridade foram estimados de acordo com a seguinte expressão modificada de Skroch, Tivang e Nienhuis (1992):

$$\text{Erro padrão estimado: } (s_{sg}) = \sqrt{sg_{ij} \frac{1 - sg_{ij}}{(n - 1)}}$$

em que **n** é o número total de combinações **a**, **b** e **c** para cada par de plantas.

A análise de agrupamento das similaridades foi feita pelo método da média das similaridades (UPGMA), gerando um dendrograma, por meio do programa NTSYS-pc 2.0 (Rohlf, 1992).

As plantas geneticamente diferentes foram identificadas no dendrograma a partir da estimativa de valor máximo significativo de similaridade ( $sg_m$ ). O  $sg_m$  foi estimado por meio do teste de t, a 1% de probabilidade, utilizando-se a seguinte expressão:

$$sg_m = 1 - (t \cdot \bar{s}_{sg})$$

em que **t** é o valor Tabelado de t com n-2 graus de liberdade e  $\bar{s}_{sg}$  o erro médio das comparações consideradas no dendrograma.

Para o cálculo da correlação entre as distâncias geográficas e as similaridades genéticas, obtiveram-se as similaridades entre os locais de coleta

por meio da média das similaridades de dois grupos de indivíduos, sendo utilizado o coeficiente de correlação de Pearson.

Para o cálculo de diversidade dentro de 10 áreas de coleta (não se utilizou as que continham duas plantas por amostra) utilizou-se o índice de Shannon, dado pela expressão:

$$H = -\sum p_i (\log_2 p_i)$$

Em que:

$p_i$ : é a proporção de indivíduos que possuem a banda em um determinado loco;  
 $\log_2 p_i$ : é o logaritmo de  $p_i$  com base 2.

### 3.1.6 Análise de variância molecular

A análise foi realizada com o auxílio do programa WINAMOVA 1.55 (Excoffier, Smouse & Quattro 1992). Um resumo da análise de variância está apresentado na Tabela 3.

Para esta análise, foi usado o complemento  $d_{ij} = 1 - s_{ij}$ , que corresponde às distâncias genéticas.

A variância genética total ( $\sigma^2$ ) corresponde a  $\sigma_b^2 + \sigma_w^2$ .

Os componentes de variância foram testados a partir do coeficiente  $\Phi_{ST}$ , obtido pela expressão:

$$\Phi_{ST} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_w^2}$$

em que:

$\Phi_{ST}$  = corresponde à razão de variância entre áreas de coleta pela variância total e representa o valor de indivíduos tomados ao acaso dentro de áreas de coleta, em relação a indivíduos tomados ao acaso em toda a amostra.

**TABELA 3** Esquema da análise de variância molecular (AMOVA).

Fonte de variação	Graus de liberdade	E(QM)
Entre áreas de coleta	$s-1$	$\sigma_b^2 + n\sigma_w^2$
Dentro de áreas de coleta	$r-s$	$\sigma_w^2$
Total	$r-1$	

$s$ : Número de áreas de coleta;  $r$ : número de indivíduos

$\sigma_b^2$ : Variância entre as distâncias genéticas médias das áreas de coleta;

$\sigma_w^2$ : Variância entre as distâncias genéticas dos indivíduos dentro das áreas de coleta;

$n$ : Valor ponderado em função do número diferente de indivíduos para cada área de coleta.

Fonte: Adaptado de Excoffier, Smouse & Quattro (1992).

Foram utilizados somente os dados das áreas de coleta que continham mais de dois indivíduos por amostra.

### 3.2 Avaliação por dados fenotípicos

#### 3.2.1 Material genético

Foram utilizadas neste trabalho 152 plantas de jaborandi pertencentes a 14 diferentes locais de coleta e provenientes do banco de germoplasma da espécie localizado na Embrapa Amazônia Oriental-CPATU em Belém, PA. A identificação dos locais de coleta, assim como o número de plantas por local, é feita na Tabela 4. Todos os materiais eram provenientes de populações naturais, com exceção dos materiais provenientes da Merck-MA. A figura 1A demonstra a localização das áreas de coleta no mapa.

**TABELA 4** Áreas de coleta de jaborandi com o respectivo número de plantas coletadas por área.

<b>Local de coleta</b>	<b>Número de plantas coletadas</b>
Dom Eliseu, PA (DE)	5
Serra dos Carajás, PA (1) (SC1)	5
Serra dos Carajás, PA (2) (SC2)	20
Moju, PA (1) (MO1)	19
Moju, PA(2) (MO2)	16
Moju, PA (3) (MO3)	11
Moju, PA (4) (MO4)	12
Breu Branco, PA (BB)	20
Merck-MA (ME)	20
Açailândia, MA (AÇ)	10
Nina Rodrigues, MA (NR)	4
Mata Roma, MA (MR)	4
Brejo, MA (BR)	5
Santa Quitéria, MA (SQ)	2

### **3.2.2 Coleta dos dados**

Foram realizadas duas coletas, uma em agosto de 2002, e a outra em janeiro de 2003. Para a coleta das folhas, consideraram-se os pontos cardeais da planta, sendo coletada duas folhas por ponto. Os seis caracteres analisados foram:

- matéria seca de folha (PS): as folhas foram coletadas e secas em estufa a 60°C durante três dias e depois pesadas em balança de precisão;

- número de folíolos por folhas, comprimento e largura dos folíolos: as medidas foram tomadas com régua para todos os folíolos de cada folha e depois foram tomadas as médias;
- relação comprimento/largura: foi obtida para todos os folíolos de cada folha e depois tomadas as médias;
- área foliar: foi obtida através do programa Quantraiz v.1.0.0.21 da UFV.

### 3.2.3 Análise de variância univariada

Foi realizada uma análise de variância em parcelas subdividas para verificar o efeito dos pontos de coleta e das épocas nas médias dos tratamentos. Verificou-se que os pontos cardeais não interferiram significativamente, e, por isso, eles foram desconsiderados. Para realizar a análise de variância, os caracteres avaliados nos dois tempos foram transformados em variáveis, obtendo-se um total de 12 caracteres.

Estes 12 caracteres foram submetidos à análise de variância para verificar a diferenciação entre áreas de coleta, segundo o modelo matemático:

$$Y_{ij} = m + p_i + d_{ij}$$

em que:

$Y_{ij}$ : é o valor observado na unidade experimental referente a  $i$ -ésima área de coleta do  $j$ -ésimo indivíduo;

$m$ : é a média geral;

$p_i$ : é o efeito da  $i$ -ésima área de coleta;

$d_{ij}$ : é o efeito do  $j$ -ésimo indivíduo da  $i$ -ésima área de coleta; em que os  $d_{ij}$  são considerados independentes com distribuição normal, com média zero e variância  $\sigma^2$ , ( $i = 1, 2, 3 \dots 14$ ; e  $j = 1, 2, 3 \dots 20$ ).

### 3.2.4 Análise de variância multivariada

Foi usada para avaliar a variabilidade genética global entre as áreas de coleta. O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

$$Y_{ijk} = m_k + p_{ik} + d_{ijk}$$

Onde:

$Y_{ijk}$ : é o valor observado na unidade experimental referente a  $i$ -ésima área de coleta do  $j$ -ésimo indivíduo para a  $k$ -ésima variável;

$m_k$ : é a média geral para a  $k$ -ésima variável;

$p_{ik}$ : é o efeito da  $i$ -ésima área de coleta associado a  $k$ -ésima variável;

$d_{ijk}$ : é o efeito do  $j$ -ésimo indivíduo da  $i$ -ésima área de coleta associado a  $k$ -ésima variável; onde os  $d_{ij}$  são considerados independentes com distribuição multinormal, com média zero e matriz de covariância  $\Sigma$  ( $i = 1, 2, 3 \dots 14$ ;  $j = 1, 2, 3 \dots 20$ ; e  $k = 1, 2, 3 \dots 12$ ).

O critério para avaliar se houve diferenças entre os vetores médias de tratamentos foi o de Wilks, com base na estatística  $\Lambda$ , dada por

$$\Lambda = \frac{\text{Det}(E)}{\text{Det}(E + T)}$$

em que:

E: é a matriz de soma de quadrados e produtos residual;

T: é a matriz de soma de quadrados e produtos entre populações;

A distribuição de  $\Lambda$  é muito complexa e uma alternativa para se avaliar a significância é a sua transformação para F, que possui Tabelas próprias já preparadas. Uma fórmula aproximada é a de Harris (1975) apresentada por Pimentel Gomes (1990):

$$F_{[p(n-1), ab-c]} = \left[ \left[ \frac{1}{\Lambda} \right]^{1/b} - 1 \right] \frac{ab-c}{p(n-1)}$$

em que:

p: é o número de caracteres analisados

n: é o número de áreas de coleta

a = gl do erro - 0,5 (p-n+2)

c = 0,5 [p(n-1)-2]

b = 1 se  $p^2 + (n+1)^2 = 5$

b =  $\left[ \frac{p^2(n-1)^2 - 4}{p^2 + (n-1)^2 - 5} \right]^{1/2}$  se  $p^2 + (n+1) \neq 5$

### 3.2.5 Variáveis canônicas e descarte de variáveis

A partir da análise de variância multivariada obtiveram-se as matrizes de soma de quadrados e produtos residuais E e a soma dos quadrados e produtos T, relativa às áreas de coleta. As variáveis canônicas permitem resumir as p variáveis a um novo conjunto, que são combinações lineares das variáveis originais e que não são correlacionadas entre si.

As variáveis canônicas podem ser representadas da seguinte forma:

$$Y_1 = a_1^{(1)} x_1^{(1)} + a_2^{(1)} x_2^{(1)} + \dots + a_p^{(1)} x_p^{(1)}$$

$$Y_2 = a_1^{(2)} x_1^{(2)} + a_2^{(2)} x_2^{(2)} + \dots + a_p^{(2)} x_p^{(2)}$$

$$\dots$$

$$Y_p = a_1^{(p)} x_1^{(p)} + a_2^{(p)} x_2^{(p)} + \dots + a_p^{(p)} x_p^{(p)};$$

em que:

$a_j^{(r)}$  é o j-ésimo elemento do autovetor associado à r-ésima variável canônica;  
 $x_i^{(1)}$  é a média da j-ésima variável para a i-ésima área de coleta  
de modo que:

- a.  $\text{Var}(Y_r) = \lambda_r$
- b.  $\text{Cov}(Y_r, Y_k) = 0, r \neq k$
- c.  $\sum_{j=1}^p \left[ a_j^{(r)} \right] = 1, (r = 1, 2, \dots, p)$
- d. a ordem das variâncias é dada por:  $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \lambda_3 \geq \dots \geq \lambda_p \geq 0$

Para se determinar os autovalores ( $\lambda_r$ ) e os autovetores associados aos  $\lambda_r$ 's,  
basta resolver o sistema indeterminado das equações:

$$(T - \lambda_r E) \underline{a}^{(r)} = \underline{0}$$

sendo  $\underline{a}^{(r)} \neq \underline{0}$ . Isto implica que:

$$\det(T - \lambda_r E) = 0$$

em que:

$\underline{a}^{(r)}$  : é o vetor característico referente à r-ésima variável canônica.

Foi feita a transformação de E em I, matriz identidade P x P, da seguinte forma:

$$(S^{-1})' E S^{-1} = I$$

em que:

$S^{-1}$ : é a inversa do fator de Cholesky para a matriz E;

Desta forma, aplicando a mesma transformação em T, tem-se:

$$L = (S^{-1})' T S^{-1}$$

Essa transformação é possível e não afeta a variação global existente, pois suas estimativas podem ser obtidas por meio de solução de equação determinantal, semelhante a dos componentes principais (Jonhson & Wichern, 1988; Morrison, 1967 e Bock, 1975, apresentados por Ferreira, 1993).

$$\text{Det}(L - \lambda_r I) = 0$$

A importância de cada variável é dada pela razão:

$$\%V_r = \frac{\lambda_r}{\sum_{r=1}^p \lambda_r} = \frac{\text{Var}(Y_r)}{\text{Traço}L}$$

No estudo da divergência genética, adotou-se um número de variáveis canônicas necessário para explicar um mínimo de 80% da variação entre as populações de jaborandi.

Para o descarte de variáveis redundantes, foram obtidas as correlações entre as variáveis canônicas e os caracteres da seguinte forma:

$$r_{ir} = \frac{a_i^{(r)} \sqrt{\lambda_r}}{s_i}$$

em que:

$r_{ir}$ : é a correlação entre a  $i$ -ésima variável e à  $r$ -ésima variável canônica,  $i, r = 1, 2, \dots, p$ ;

$a_i^{(r)}$ : é o elemento da  $i$ -ésima variável do  $r$ -ésimo autovetor associado a  $r$ -ésima variável canônica;

$\lambda_r$ : é o autovalor (variância) relativo à  $r$ -ésima variável canônica

$s_i$ : é o desvio padrão da  $i$ -ésima variável, obtido pela raiz quadrada do elemento  $l_{ii}$  da matriz  $L$

O descarte de caracteres redundantes foi feito com base na análise das variáveis canônicas selecionadas, ou seja, as que explicaram um mínimo de 80% da variação disponível. O critério utilizado foi o de descartar as variáveis que não apresentaram altas correlações com nenhuma das variáveis canônicas selecionadas.

### 3.2.6 Estimativa das distâncias fenotípicas

Os escores obtidos a partir das variáveis canônicas que explicaram mais de 80% da variação para as 14 áreas de coleta foram usados como variáveis para obter as distâncias euclidianas entre as populações. A padronização destes escores foi feita a partir da expressão:

$$\text{Escore padronizado} = \frac{\text{escoreVC}}{\sqrt{\lambda}}$$

em que  $\lambda$  é o autovalor de cada variável canônica.

A média da  $i$ -ésima área de coleta relativa à  $r$ -ésima variável foi representada por  $X_{ir}$  e foi utilizada para estimar as distâncias entre pares de áreas de coleta.

As estimativas foram feitas a partir de:

$$d_{ii'} = \sqrt{\sum_{j=1}^p (X_{ij} - X_{i'j})^2}$$

em que:

$\underline{X}_{ij}$  e  $\underline{X}_{i'j}$ : são os vetores média associados às áreas de coleta  $i$  e  $j$ , respectivamente;

As distâncias euclidianas médias padronizadas foram utilizadas para estimar as distâncias entre os indivíduos. Como a distância euclidiana altera-se com a mudança de escala de mensuração dos caracteres e com o número deles em estudo, emprega-se a distância euclidiana média estimada de dados padronizados. A padronização foi realizada por meio da seguinte expressão:

$$\chi_{ij} = \frac{X_{ij} - \overline{X_j}}{s(X_j)}$$

Após a padronização, a distância euclidiana média foi calculada pela nova expressão:

$$d_{ii} = \sqrt{\left[ \sum_{j=1}^p (\chi_{ij} - \chi_{i'j})^2 \right] / p}$$

Foi feita a correlação de Pearson entre as distâncias euclidianas das áreas de coleta e as distâncias geográficas das mesmas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação por marcadores RAPD

#### 4.1.1 Dados RAPD

Para este estudo foram utilizados 17 *primers*, que geraram um total de 85 bandas polimórficas para os 93 materiais genéticos de jaborandi (Tabela 5), gerando uma média de 5 bandas polimórficas por *primer*.

O número de bandas polimórficas utilizadas em trabalhos avaliando variabilidade genética em plantas tem variado bastante, indo de 27 para a samambaia *Dryopteris cristata* (Lander Gott et al., 2001) até 289 para feijão (Link et al., 1995). Segundo Dudley (1994), resultados obtidos com 50 a 100

**TABELA 5** *Primers* que geraram polimorfismo para jaborandi com suas respectivas seqüências de bases e número de bandas polimórficas.

<i>Primer</i>	<b>Bandas polimórficas</b>	<i>Primer</i>	<b>Bandas polimórficas</b>
OPAH-10	5	OPAO-05	4
OPAM-04	4	OPAO-06	5
OPAM-07	5	OPAO-08	7
OPAM-10	5	OPAO-17	4
OPAM-14	4	OPAP-01	7
OPAM-20	4	OPAP-06	6
OPAN-07	3	OPAP-07	6
OPAN-10	6	OPAP-14	8
OPAN-17	4	Total	<b>85</b>

bandas tendem a coincidir com informações baseadas no *pedigree* das amostras e, sendo assim, as 85 bandas obtidas podem ser consideradas suficientes.

#### 4.1.2 Distribuição da variabilidade genética

A similaridade genética entre as plantas variou de 0,55 a 0,91, com média de 0,67. A análise genética em outros bancos de germoplasma de plantas nativas verificou variações na similaridade de 0,24 a 0,99 (*Psychotria ipecacuanha*, Lima, 2002) e de 0,54 a 0,86 (*Myracrodruon urudeuva*, Reis, 1999), indicando que o banco de germoplasma de jaborandi tem variação genética considerável.

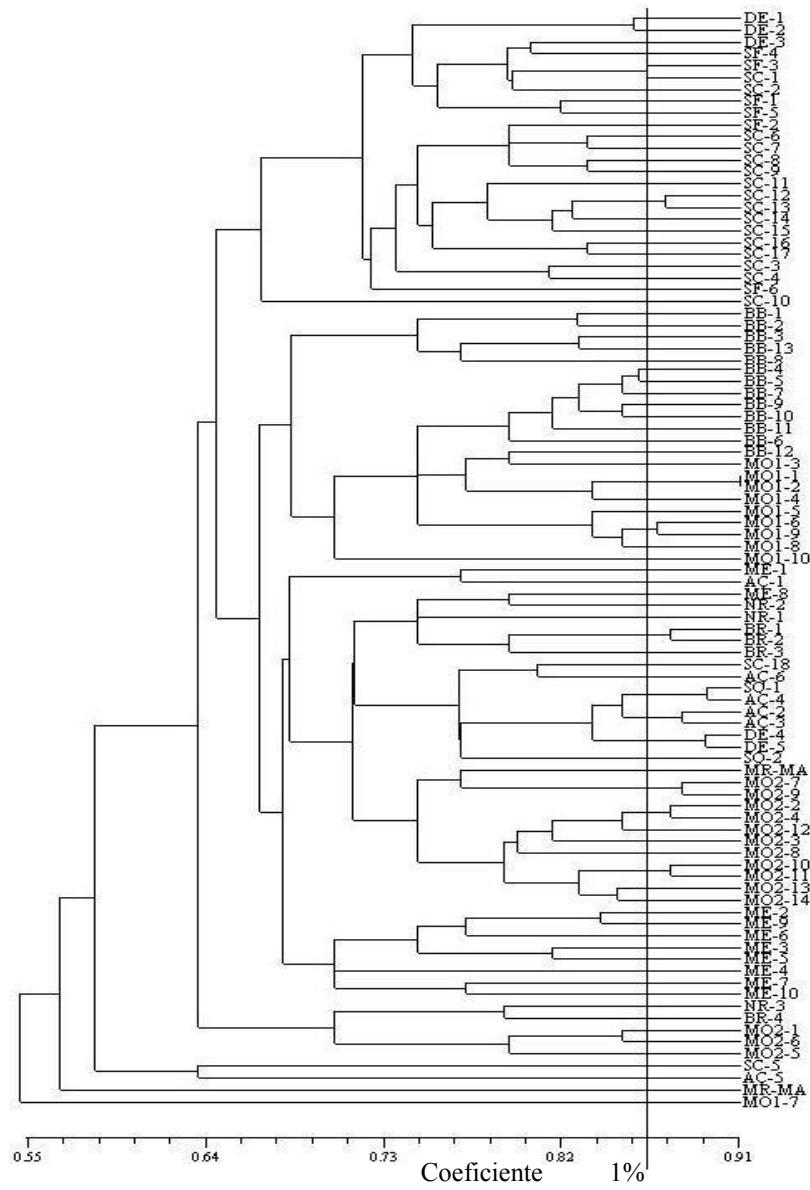
O valor mínimo de similaridade obtido, a 1% de significância, foi de 0,86, sendo que com isso, foram encontrados 11 pares de duplicatas (Figura 1). Com exceção de dois casos, sendo que em um deles dois indivíduos de São Félix do Xingu, PA e da região de Serra dos Carajás, PA e no outro, dois indivíduos de Santa Quitéria, MA e Açailândia, MA foram considerados geneticamente iguais, os outros pares de duplicatas foram todos provenientes da mesma área de coleta. A população 2 de Moju, PA foi a que mais apresentou pares de duplicatas (4).

As similaridades genéticas calculadas entre as áreas de coleta variaram de 0,61 entre a população 2 de Moju, PA e São Félix do Xingu, PA a 0,74, entre Nina Rodrigues, MA e Brejo, MA, com média de 0,66, valores relativamente baixos para uma espécie alógama. Castellen (2000) encontrou similaridades entre populações de *Esenbeckia leiocarpa*, espécie arbórea alógama, que variaram de 0,81 a 0,98. Estes baixos valores de similaridade entre as populações são corroborados pelos resultados obtidos com a análise de variância molecular. Pela AMOVA, verificou-se que a diferenciação genética entre as áreas de coleta é altamente significativa ( $F_{ST} = 0,242$ ,  $p < 0,001$  estando 24,16%

da variação genética entre áreas de coleta e 75,84% contidos dentro de áreas de coleta (Tabela 6).

Estes resultados são concordantes com os encontrados para outras espécies alógamas, herbáceas e tropicais. O que vem sendo notado é que, apesar da proporção de variação genética dentro de populações ser maior, existe uma considerável proporção de variação genética entre as populações destas espécies, indicando que seu sistema de dispersão de pólen e sementes não é tão eficiente quanto o de espécies arbóreas. Trabalhos com espécies arbóreas demonstram diferenciação significativa entre populações, mas com valores bem menores, como foi o caso de *Swietenia macrophylla* (12,58%, Gillies et al., 1999), *Esenbeckia leiocarpa* (10,06%, Castellen, 2000), *Myracrodruon urudeuva* (8%, Reis, 1999) e *Populus tremuloides* (2,6%; Yeh et al. 1995). Já no caso de espécies alógamas arbustivas, foram encontrados 28,58% de variação genética entre populações de *Digitalis minor* (Sales et al., 2001), 28,1% para *Piper hispidinervium* (Wadt, 2001) e 16,2% para *Camellia sinensis* (Kaundun & Park, 2000).

A porcentagem de variação entre áreas de coleta pode ser considerada normal e pouco afetada pelos efeitos de redução populacional, já que é comparável à de outras espécies com características semelhantes, mas que não sofreram redução populacional. Landergott et al. (2001) encontraram grande diferenciação entre populações de *Dryopteris cristata*, com 49% da variação genética, o que atribuíram ao efeito de redução populacional, já que, segundo eles, a espécie possui eficiente meio de dispersão de esporos.



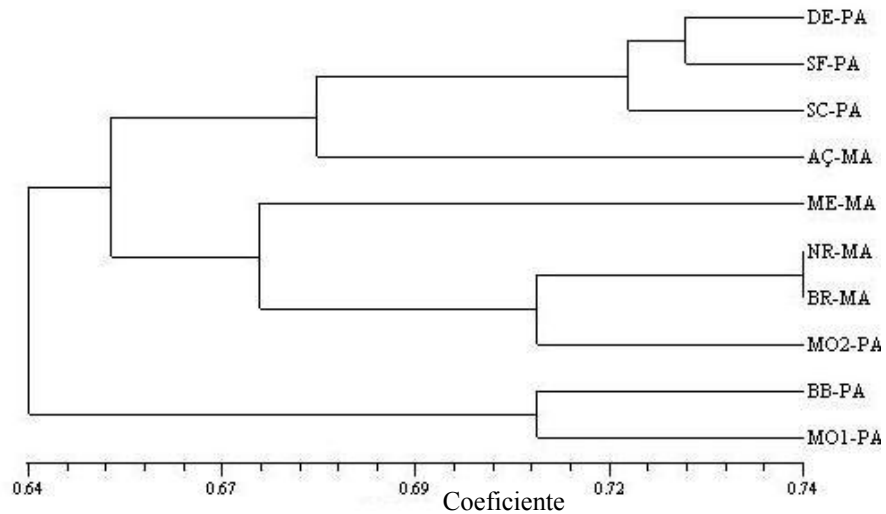
**FIGURA 1** Dendrograma das similaridades genéticas entre os acessos de jaborandi.

**TABELA 6** Análise de variância molecular para 10 áreas de coleta de jaborandi analisadas com marcadores RAPD.

	Variância	% Total	P	ST
Entre áreas de coleta	0,0412	24,16	0,001	0,242
Dentro de áreas de coleta	0,0129	75,84		

Primeiramente, a análise de variância molecular foi realizada segundo três níveis: entre estados, entre áreas dentro de estados e dentro de áreas. Entretanto, a variância encontrada entre os estados do Pará e do Maranhão foi zero e, por isso, foi relatada a variância somente em dois níveis. O dendrograma (Figura 2) obtido a partir das similaridades entre as áreas de coleta não evidenciou separação entre os estados do Pará e do Maranhão.

O valor da correlação entre as distâncias geográficas e as similaridades genéticas foi baixo, mas significativo,  $r = -0,41^{**}$ . Observa-se, no dendrograma (Figura 2), que há um agrupamento entre as populações de Serra dos Carajás, PA e São Félix do Xingu, PA, que estão próximas geograficamente (145 km); entre Nina Rodrigues, MA e Brejo, MA (130 km) e entre Breu Branco, PA e Moju1, PA (193,18 km). Wadt (2001) verificou que existia correlação entre distâncias geográficas e entre distâncias genéticas de *P.hispidinervium* até 150 km e depois desta distância não era mais encontrada correlação. Lima (2002), trabalhando com acessos de *Psychotria ipecacuanha*, não verificou correlação entre distância geográfica e distância genética, sendo que neste trabalho as áreas de coleta pertenciam a regiões bem mais distantes que as do jaborandi. Segundo Sousa & Souza (2001), a observação de que as amostras da distribuição geográfica correspondem à estrutura genética de uma espécie nem sempre é válida e por isso ela deve ser verificada.



**FIGURA 2** Dendrograma das similaridades genéticas entre as áreas de coleta do jaborandi.

Um resultado curioso foi a baixa similaridade genética encontrada entre as duas populações de Moju, PA (0,67). Isso pode ter sido resultado da influência das populações locais na composição genética destas populações, já que o jaborandi é uma espécie medicinal com uso empírico por populações interioranas. Além disso, podem ter sido realizadas coletas em épocas diferentes e essa baixa similaridade pode ser resultado da sobreposição de gerações. Esse resultado também pode ser um efeito de amostragem, já que foram amostradas de 10 a 13 plantas por população. Sugere-se que sejam realizadas mais coletas nesta região para avaliar melhor essa variação.

A correlação entre as similaridades de Nei & Li e as distâncias obtidas a partir dos teores de pilocarpina entre as áreas de coleta foi baixa, sendo  $r = 0,0106^{ns}$ . Isso pode ser demonstrado pelas populações de Nina Rodrigues, MA e Brejo, MA, que apesar de terem apresentado a maior similaridade genética entre as áreas de coleta, foram bastante divergentes quanto ao teor de pilocarpina

(0,76% e 0,56%, respectivamente). Skoula, Hilali & Makris (1999) utilizaram dados RAPD e da composição do óleo essencial de *Salvia fruticosa* para estudar as relações genéticas entre 48 clones e verificaram que houve correlação entre os dados, já que ambos separaram os clones em três grupos semelhantes, de acordo com suas regiões de origem. Segundo Crawford (1990), populações exibindo composição molecular semelhante, mas caracteres fenotípicos distintos, podem ter sido resultado de pressões seletivas recentes com poucas modificações gênicas. Considerando o caso de *Salvia*, pode ser que os clones das três regiões distintas tenham tido o seu fluxo gênico interrompido ou reduzido há muito tempo, o que levou a esta alta correlação.

As populações 1 e 2 de Moju, PA e a população proveniente da Merck-MA, possuem os mesmos teores de pilocarpina (0,67%), mas similaridades genéticas não muito altas (entre 0,68 e 0,65). Poder-se-ia relacionar este fato com a possibilidade de se obter ganhos com a heterose se realizados cruzamentos entre estes acessos. Entretanto, muitos trabalhos vêm demonstrando que não existe uma relação direta entre a heterose e distâncias genéticas obtidas com marcadores (Duarte, Santos & Melo, 1999; Joyce et al., 1999; Parentoni et al., 2001). A predição de ganhos com a heterose feita a partir de marcadores ligados ao caráter de interesse seria mais confiável.

#### **4.1.3 Diversidade genética**

Os índices de diversidade variaram de 0,3217 a 0,2301. Os índices para cada área de coleta estão resumidos na Tabela 7. O estado do Pará apresentou variação de 0,3217 a 0,2742 e o do Maranhão, de 0,2762 a 0,2301. A menor diversidade observada nas áreas pertencentes ao Maranhão pode ser resultado da maior ocorrência de extração de folhas de jaborandi neste estado (Pinheiro, 2002), já que a intensiva extração de folhas levaria a morte das plantas, causando reduções populacionais (Pinheiro, 1997). Por outro lado, o número de

**TABELA 7** Índices de diversidade de Shannon, amplitude e variância das similaridades genéticas para 10 áreas de coleta de jaborandi.

Área de coleta	Índice de Shannon	Amplitude das similaridades	Variância
Dom Eliseu, PA	0,2974	0,6326-0,8966	0,009
São Félix do Xingu, PA	0,2742	0,6207-0,8293	0,004
Serra dos Carajás, PA	0,3217	0,5714-0,8762	0,004
Breu Branco, PA	0,3027	0,5556-0,8631	0,005
Merck-MA	0,3147	0,6170-0,8431	0,002
Maju, PA (1)	0,2934	0,5974-0,9143	0,006
Maju, PA (2)	0,2918	0,6316-0,8846	0,003
Açailândia, MA	0,2762	0,5376-0,8037	0,006
Nina Rodrigues, MA	0,2527	0,7527-0,8000	0,001
Brejo, MA	0,2301	0,7273-0,8850	0,002

plantas coletadas por área de coleta no Maranhão foi menor em relação ao Pará, o que pode ter contribuído para uma menor estimativa da diversidade.

O índice de Shannon varia de 0 a 1 e considera-se que quanto mais próximo o valor for de zero, mais baixas são as diversidades. Estes valores se mostraram abaixo dos obtidos para as espécies arbóreas *Populus tremuloides* (0,58-0,69; Yeh et al., 1995), *Fitzroya cupressoides* (0,42-0,56; Allnut et al., 1999) e *Swietenia macrophylla* (0,41-0,27, Gillies et al., 1999). Entretanto, segundo Hamrick & Lovelles (1989), espécies arbóreas e com ampla distribuição apresentariam mais diversidade genética que espécies herbáceas e com pouca distribuição. No caso do jaborandi, sua distribuição só abrange o leste do Estado do Pará, oeste e norte do Maranhão e o norte do Piauí (Skorupa, 2000b). Em uma espécie herbácea de reduzida distribuição geográfica,

*Campanula microdonta*, foram encontrados valores do índice de diversidade que variaram de 0,076 a 0,122 (Oiki et al., 2001). Para a orquídea *Zeuxine gracilis*, foram encontrados índices de diversidade de Shannon que variaram de 0,224 a 0,018. Os autores atribuíram a baixa diversidade encontrada em algumas populações ao pequeno tamanho populacional, resultado do impacto humano nas florestas (Sun & Wong, 2001). Baixas diversidades também foram encontradas para a orquídea *Goodyera procera* (0,16-0,37, Wong & Sun, 1999), tendo os autores mencionado o efeito do fundador e a deriva genética como fatores que podem ter contribuído para a diminuição da diversidade em algumas populações.

Percebe-se que não existe uma relação entre a variância das similaridades genéticas em cada área de coleta com o índice de Shannon encontrado, já que a população que teve o maior índice (0,3217) não teve a maior variância (0,004). Da mesma forma, as variâncias obtidas para o estado do Maranhão, 0,006 (Açailândia) a 0,001 (Nina Rodrigues), foram menores que as do Estado do Pará, com 0,009 (Dom Eliseu) a 0,003 (Moju 2), o que também pode ter sido um efeito de amostragem.

Deve ser ressaltado que a obtenção de maiores índices para as populações da Merck-MA, Breu Branco, PA e Serra dos Carajás, PA possivelmente é consequência do fato dessas populações estarem representadas por um maior número de indivíduos. Sendo assim, sugere-se que sejam feitas mais coletas nas outras regiões para que se possam tirar conclusões mais seguras sobre a diversidade em cada local.

## **4.2 Dados fenotípicos**

### **4.2.1 Análises de variância uni e multivariada**

Os resumos das análises de variância para todas as variáveis são apresentados na Tabela 1A (Anexo). A precisão dos experimentos variou de

31,75% para matéria seca na coleta 1 a 7,38% para relação comprimento/folículo na coleta 2. No delineamento experimental usado não houve controle local e nem aleatorização, o que deve ter contribuído para a obtenção de maiores estimativas do erro experimental e menor precisão. Mesmo assim, observou-se variação significativa entre as áreas de coleta, para todos os caracteres.

Pelo critério de Wilks, obteve-se um valor  $\lambda = 0,04892$  correspondente a um valor F de 2,98 ( $p < 0,0001$ ) com 156 e 1150 graus de liberdade respectivamente, indicando haver variação significativa entre as áreas de coleta. Essa diferenciação também foi observada com os dados RAPD. Entretanto, segundo McKay & Latta (2002), a diferenciação entre populações obtida com dados fenotípicos tende a ocorrer com maior frequência e com valores maiores de variação, independente das taxas de fluxo gênico, especialmente se estiverem sendo medidos caracteres que tenham importância adaptativa para a espécie. Sebben, Kageyama & Zanatto (2001) verificaram que determinados caracteres demonstraram maiores valores de divergência genética entre populações de *Cariniana legalis*, evidenciando que estes teriam importância adaptativa para a espécie.

O fato de todos os caracteres terem apresentado variação significativa não descarta a possibilidade de se encontrar variáveis redundantes pelas variáveis canônicas, já que uma variável pode representar indiretamente outras.

#### **4.2.2 Variáveis canônicas**

Os autovalores associados às variáveis canônicas, com base nas 12 variáveis analisadas, bem como as variâncias em porcentagens individuais e acumuladas estão apresentados na Tabela 8.

**TABELA 8** Variância, variância percentual e variância acumulada das variáveis canônicas, obtidas a partir das doze variáveis mensuradas para o jaborandi.

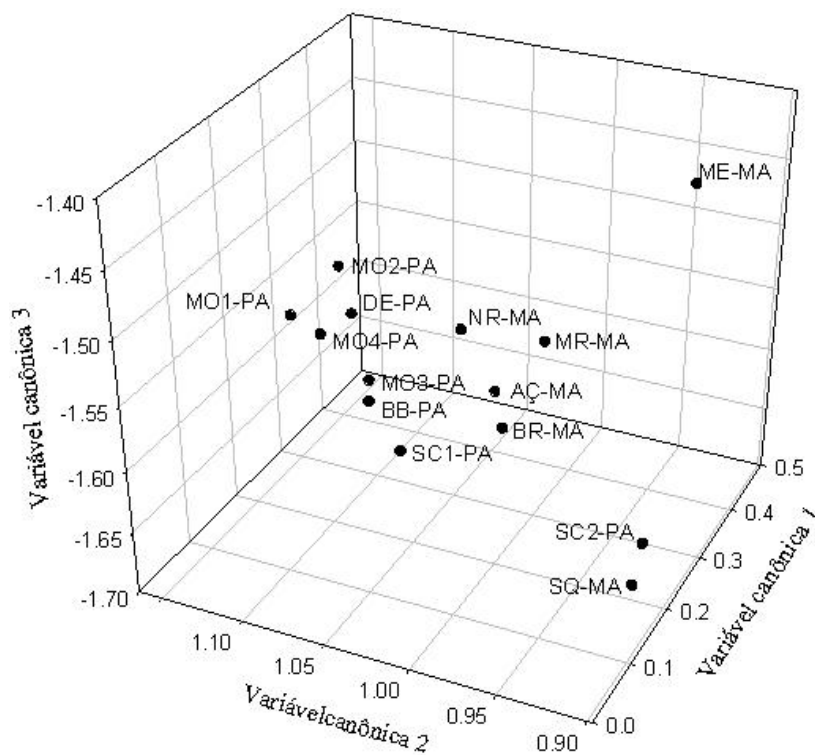
<b>Variáveis canônicas</b>	<b>(Autovalores) Variâncias</b>	<b>Variância percentual (%)</b>	<b>Variância percentual acumulada</b>	<b>Teste F</b>
1	2,2782	0,4967	0,4967	<0,0001
2	0,9601	0,2093	0,7060	<0,0001
3	0,6204	0,1353	0,8413	0,0014
4	0,2647	0,0577	0,8990	0,3927
5	0,1778	0,0388	0,9377	0,8275
6	0,1002	0,0218	0,9596	0,9679
7	0,0741	0,0162	0,9757	0,9832
8	0,0556	0,0121	0,9879	0,9894
9	0,0317	0,0069	0,9948	0,9942
10	0,0139	0,0031	0,9978	0,9932
11	0,0098	0,0021	0,9999	0,9667
12	0,0003	0,0001	1,0000	0,9799

Como se pode observar, as três primeiras variáveis explicaram 84,13% da variação total e foram significativas segundo o teste F. Essa performance pode ser considerada muito boa, já que Ferreira (1993) obteve 60,5% da variação total nas três primeiras variáveis canônicas avaliando 19 caracteres em milho. Segundo Cruz & Regazzi (2001), quando se obtém mais de 80% da variação nas duas ou três primeiras variáveis canônicas, é possível realizar a análise de agrupamento dos genótipos em gráficos de dispersão.

A partir dos autovetores associados às variáveis canônicas principais foram obtidos os escores das 14 áreas de coleta. A dispersão gráfica dos escores

das três primeiras variáveis canônicas estão apresentados na Figura 3. A partir do gráfico, verifica-se que somente a população da Merck, que já deveria ter sofrido alguma seleção para maior produção de folhas e de pilocarpina, mostra-se isolada.

Observa-se a formação de dois grupos entre as populações naturais do Pará e do Maranhão, os quais não estão muito distantes no gráfico, o que pode ser resultado da proximidade geográfica entre os dois estados. As populações de Serra dos Carajás2, PA e Santa Quitéria, MA mostraram-se isoladas do grupo das populações naturais no gráfico, o que pode ter sido um efeito de amostragem.



**FIGURA 3** Gráfico de dispersão dos escores obtidos a partir das três primeiras variáveis canônicas para as 14 áreas de coleta.

Por meio das correlações entre as variáveis e as variáveis canônicas mais importantes (Tabela 9), observa-se que os caracteres matéria seca de folha, número de folíolos por folha, comprimento de folíolo, largura de folíolo e área foliar tiveram altas correlações com a primeira variável canônica e a variável relação comprimento/largura teve alta correlação com a segunda variável. Sendo assim, conclui-se que todas as variáveis são importantes para a análise de divergência genética entre e dentro das áreas de coleta do jaborandi. A correlação de todas as variáveis com as variáveis canônicas menos importantes foram baixas, corroborando esta conclusão.

**TABELA 9** Coeficiente de correlação entre os caracteres e as três variáveis canônicas principais, aquelas que explicaram mais de 80% da variação total acumulada.

Variáveis originais	Época	Variáveis canônicas		
		1	2	3
Matéria seca	1	<b>0,9466</b>	0,0644	0,2664
	2	<b>0,9711</b>	0,1884	0,1285
Folíolos/Folha	1	<b>-0,8444</b>	0,1809	0,3454
	2	<b>-0,8719</b>	0,2542	0,3629
Comprimento Folíolo	1	<b>0,9908</b>	-0,0657	0,0683
	2	<b>0,9969</b>	0,0123	0,0261
Largura Folíolo	1	<b>0,9798</b>	0,1601	0,0691
	2	<b>0,9776</b>	0,1855	0,0861
Relação comprimento/largura	1	0,0031	<b>-0,9456</b>	-0,0111
	2	-0,2104	<b>-0,8224</b>	-0,4234
Área foliar	1	<b>0,9500</b>	0,0552	0,2689
	2	<b>0,9501</b>	0,2346	0,1598

#### 4.2.3 Distâncias fenotípicas

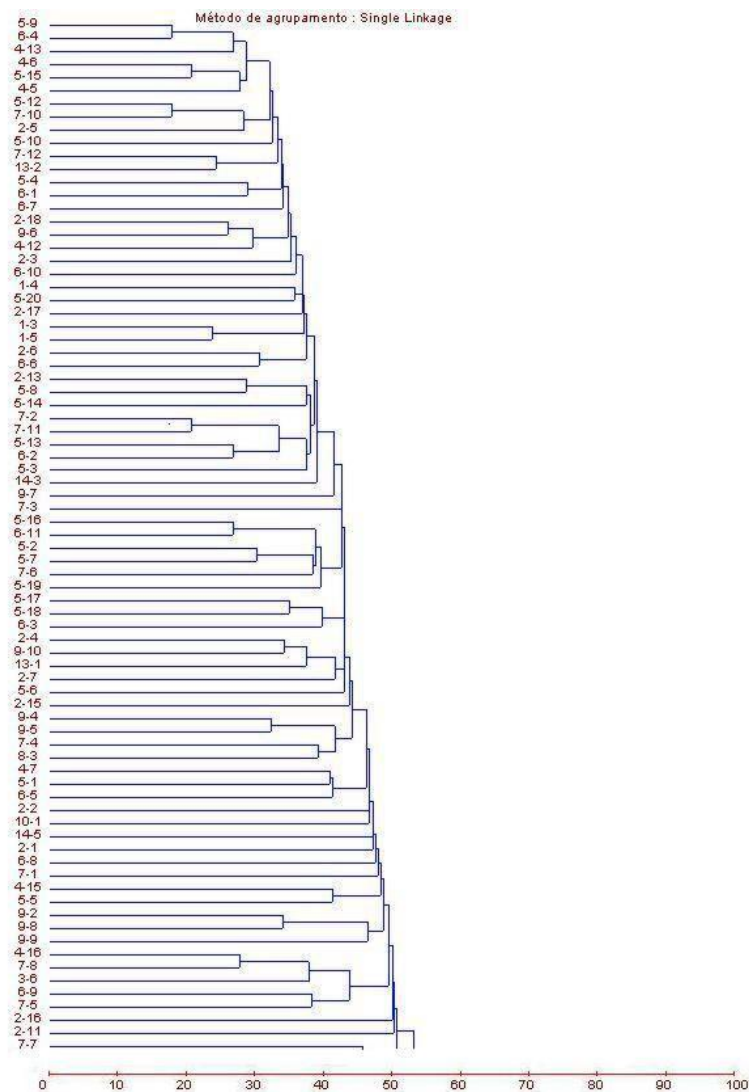
As distâncias euclidianas médias entre os indivíduos variaram de 3,7829, entre um indivíduo da população 2 de Moju, PA e um indivíduo de Mata Roma, MA a 0,15987, entre um indivíduo de Breu Branco, PA e um da população 3 de Moju, PA, com média de 1,2944. Não se observa no dendrograma (Figura 4) agrupamento aparente dos indivíduos de acordo com sua área de coleta, o que indica que a variação dentro das áreas de coleta é maior que entre as áreas também a partir de dados fenotípicos.

As distâncias euclidianas entre as áreas de coleta variaram de 0,3202, entre a população 3 de Moju, PA e Santa Quitéria, MA e 0,0216, entre a população 1 de Moju, PA e Breu Branco, PA, com média de 0,1821. O dendrograma com base nestas distâncias está representado na Figura 5.

O dendrograma não demonstrou agrupamento de acordo com os estados do Pará e Maranhão, e nem entre as populações provenientes de Moju, PA. Como também foi observado com os dados RAPD, a correlação entre as distâncias geográficas e as distâncias euclidianas não foi alta, sendo  $r = 0,3131^{**}$ . Considerando que as variações fenotípicas podem ser resultado de seleção natural, e, portanto, não terem muita associação com as taxas de fluxo gênico, seria esperado que houvesse correlação não com a distância geográfica, mas com as condições climáticas de cada região. Steiner & De Los Santos (2001) verificaram correlação significativa entre alguns caracteres fenotípicos e as características ecológicas dos locais de origem de acessos de *Lotus corniculatus*. Da mesma forma, Boulli, Baaziz & M'Hirit (2001) encontraram correlação entre caracteres de *Pinus halepensis* e fatores como latitude, longitude e altitude dos locais de coleta. Como não foi possível correlacionar as diferenças entre os acessos e as condições ecológicas de seus locais de origem, somente presume-se que elas podem ter tido influência na seleção de determinados caracteres.

As distâncias entre as populações de Moju variaram de 0,2539 (Moju 1 e 3) a 0,0630 (Moju 2 e 4), com média de 0,1479, pouco abaixo da média para todas as áreas de coleta. Esse é um resultado curioso, já que elas apresentaram distâncias altas entre si, o que não seria esperado para populações tão próximas geograficamente. As populações de Serra dos Carajás, PA também não se agruparam no dendrograma, sendo a distância entre elas 0,1489. O mesmo foi observado com os dados RAPD, onde duas populações de Moju\_PA mostraram baixa similaridade (0,67). Como foi explicado para as similaridades obtidas com o RAPD, estas altas distâncias entre as populações de Moju, PA e Serra dos Carajás, PA podem ser atribuídas à ação humana nos seus locais de origem, pois a espécie é medicinal e, assim, podem ter sido coletadas plantas de outras regiões que se “misturaram” às plantas nativas. Outra hipótese teria sido coletas em épocas diferentes e o efeito de amostragem.

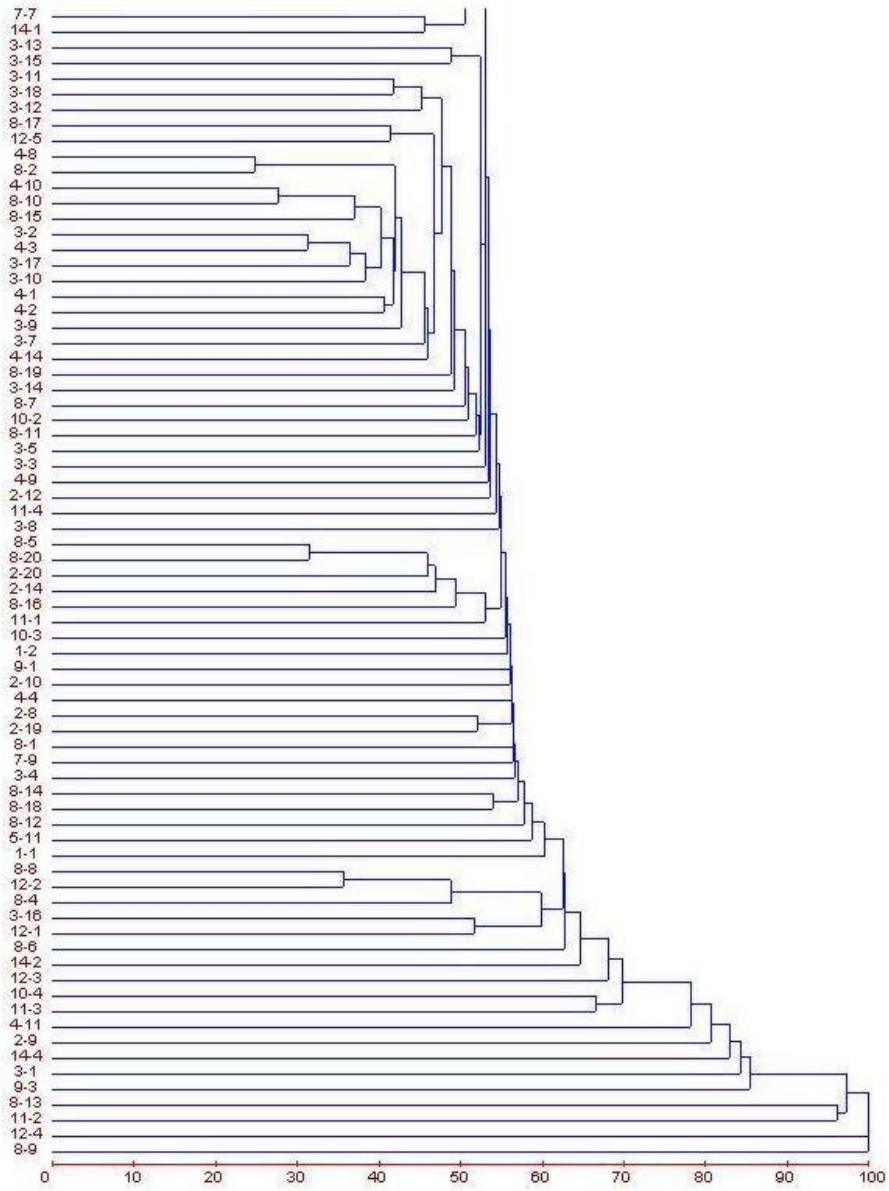
A população proveniente da Merck no Maranhão não se agrupou com nenhuma das outras no dendrograma. Essa população possivelmente já havia sofrido algum tipo de seleção para caracteres relacionados com a produção de pilocarpina, sendo que suas médias para matéria seca de folhas e área foliar foram 0,39 g e 37,96 cm<sup>2</sup> (Tabela 3A), as maiores entre as 14 áreas de coleta. Apesar do teor de pilocarpina obtido para esta população não ter sido o maior (0,67%, sendo o maior 0,97% para Serra dos Carajás, PA), o fato das médias da área foliar e do matéria seca terem sido as maiores, indica que estava sendo realizada seleção com o propósito de obter maior produção do princípio ativo. No dendrograma obtido por marcadores RAPD, esta população não se isolou das populações naturais, indicando que essa seleção talvez tenha envolvido poucos locos.

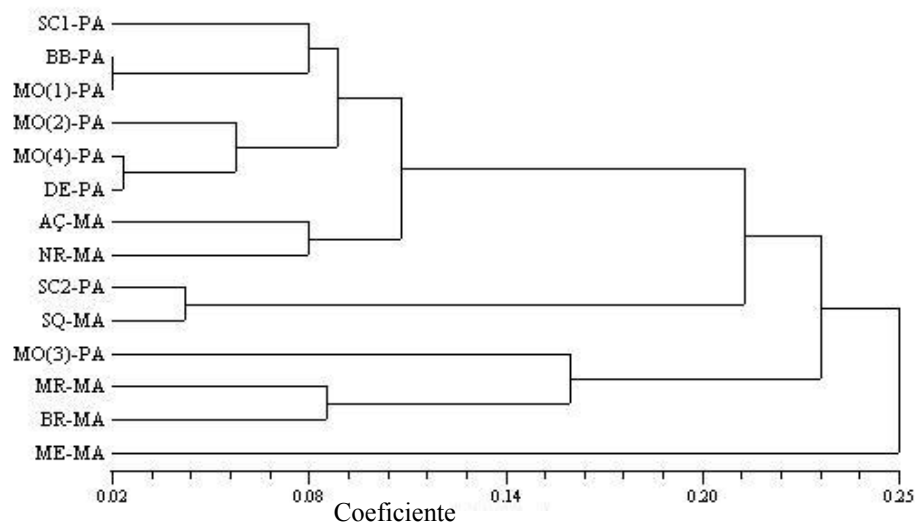


**FIGURA 4** Dendrograma das distâncias genéticas entre os acessos de jaborandi.

1 = Serra dos Carajás, PA (1); 2 = Serra dos Carajás, PA (2); 3 = Moju, PA (1); 4 = Moju, PA (2); 5 = Novo Breu Branco, PA; 6 = Moju, PA (3); 7 = Moju, PA (4); 8 = fazenda Merck-MA; 9 = Açailândia, MA; 10 = Nina Rodrigues, MA; 11 = Mata Roma, MA; 12 = Brejo, MA; 13 = Santa Quitéria, MA; 14 = Dom Eliseu,PA, cont...

FIGURA 4 CONT





**FIGURA 5** Dendrograma das distâncias genéticas entre as áreas de coleta do jaborandi.

#### 4.2.5 Diversidade fenotípica

Ao contrário do que foi observado com os dados RAPD, as variâncias das distâncias fenotípicas foram maiores para as populações do Maranhão (Tabela 10), variando de 0,2347 (Brejo) a 0,1060 (Nina Rodrigues). No Pará, elas variaram de 0,3734 (Moju2) a 0,0322 (Breu Branco).

Como foi demonstrado, a variação fenotípica depende de fatores como a seleção natural e pode ser que as condições ambientais no Maranhão favoreçam a ocorrência de maior variação morfológica. Neste caso, fica ainda mais evidenciada a ausência de correlação entre a variação expressa por marcadores moleculares e a variação fenotípica.

**TABELA 10** Médias, amplitude e variância das distâncias fenotípicas para 10 áreas de coleta de jaborandi.

<b>Área de coleta</b>	<b>Média das distâncias</b>	<b>Amplitude</b>	<b>Variância</b>
Serra dos Carajás1-PA	0,8738	0,2125-1,2424	0,098
Serra dos Carajás2-PA	0,83661	0,3412-1,7674	0,090
Moju1-PA	0,79211	0,3865-1,3752	0,061
Moju2-PA	1,321	0,24956-2,424	0,3734
Moju3-PA	0,8508	0,1658-1,7674	0,090
Moju4-PA	0,8322	0,1852-1,4300	0,0720
Breu Branco, PA	0,6312	0,2723-1,2035	0,0322
Dom Eliseu,PA	1,0938	0,2125-1,2424	0,1327
Merck-MA	1,0653	0,1523-2,6648	0,1700
Açailândia, MA	0,8658	0,2908-1,8723	0,1535
Nina Rodrigues, MA	1,14632	0,7836-1,5742	0,1060
Mata Roma, MA	1,5794	0,7818-2,1457	0,2175
Brejo, MA	1,3762	0,5512-1,7703	0,2347

### 4.3 Correlação entre dados RAPD e dados fenotípicos

A correlação entre as distâncias euclidianas obtidas pelos dados fenotípicos e as similaridades de Nei & Li obtidas com dados RAPD para as áreas de coleta foi baixa,  $r = -0,1334^{ns}$ . O mesmo foi obtido por outros autores que compararam dados obtidos com RAPD e com dados fenotípicos (Steiner & De Los Santos, 2001; Harrison et al., 1997). A ausência de correlação entre as similaridades obtidas com RAPD e as distâncias obtidas por dados fenotípicos pode ser devido à diferente ação da seleção natural. Conforme já comentado, McKay & Latta (2002) sugerem que marcadores moleculares e caracteres

fenotípicos se comportam de maneira diferente na divergência adaptativa das populações e, por isso, não se deve extrapolar de uma variação para outra.

Entretanto, em alguns casos, a correlação entre as distâncias geradas pelos dois marcadores foi alta, como entre cultivares de feijão (Duarte, Santos & Melo, 1999) e de arroz (Li et al., 2000), de origens geográficas diferentes. Neste caso, a ocorrência de sucessivos eventos de seleção artificial e ausência de cruzamentos entre estas cultivares pode ter contribuído para a diferenciação genética envolvendo uma maior porção do genoma, o que contribuiria para a ocorrência de correlação.

## **5 CONCLUSÕES**

Existe variação genética no banco de germoplasma de jaborandi da Embrapa Amazônia Oriental, tanto molecular quanto fenotípica.

Os marcadores moleculares e fenotípicos são eficientes em separar os acessos de jaborandi.

Existe diferenciação genética entre as áreas de coleta, evidenciado pelos dois tipos de marcadores. Entretanto, a variação dentro das áreas é maior que entre, o que pode ajudar no estabelecimento de novas estratégias de coleta de germoplasma do jaborandi.

Não há correlação entre as distâncias obtidas por dados RAPD e por dados fenotípicos.

São necessárias mais coletas, principalmente no estado do Maranhão, para que se possa concluir com mais certeza sobre a variação nesta região.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLNUT, T. R.; NEWTON, A. C.; LARA, A.; ARMESTO, J. J.; PREMOLI, A.; VERAGA, R.; GARDNER, M. Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened South American conifer. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 975-987, June 1999.

AMOS, W.; BALMFORD, A. When does conservation genetics matter? **Heredity**, Oxford, v. 87, n. 3, p. 257-265, Sept. 2001.

ARAÚJO, D. G. de **Caracterização de germoplasma de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willd ex. Spreng Schum) utilizando descritores de fruto**. 2000. 65 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; ROCHA, B. M. da; PEGORARO, D. G.; VACARO, E.; CARVALHO, F. I. F. de Caracterização de germoplasma de trigo por meio dos caracteres adaptativos ciclo e estatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 145-150, fev. 2002.

BOULLI, A.; BAAZIZ, M.; M'HIRIT, O. Polymorphism of natural populations of *Pinus halepensis* Mill. in Morocco as revealed by morphological characters. **Euphytica**, Wageningen, v. 119, n. 3, p. 309-316, 2001.

BROWN, A. H. D. Human impact on plant gene pools and sampling for their conservation. **Oikos**, Copenhagen, v. 63, n. 1, p. 109-118, Feb. 1992.

CASTELLEN, M. da S. **Uso de marcadores RAPD e isoenzimáticos na quantificação da diversidade genética em populações naturais de *Esenbeckia leiocaroa* Engl.** 2000. 76 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

COLAVITTE, F. Fitoterápicos ganham a confiança dos consumidores. **Galileu**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 129, p. 53-64, abr. 2002.

COLLIGNON, A. M.; FAVRE, J. M. Contribution to the postglacial history at the western margin of *Picea abies*' natural area using RAPD markers. **Annals of Botany**, London, v. 85, n. 6, p. 713-722, June 2000.

CRAWFORD, D. J. **Plant molecular systematics**. New York: John Wiley and Sons, 1990.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. R. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2001. 390 p.

DIAS, L. A. S. **Divergência genética e fenética multivariada na predição de híbridos e preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao* L.)** 1994. 94 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

DUARTE J. M.; SANTOS, J. B. dos; MELO, L. C. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 427-432, Sept. 1999a.

DUARTE, J. M.; SANTOS, J. B. dos; MELO, L. C. Genetic divergence among common bean cultivars from different races based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 419-426, Sept. 1999b.

DUDLEY, J. W. Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data. In: **Analysis of molecular marker data**. Corvallis: Oregon, 1994. p. 3-7.

EXCOFFIER, N. C.; 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**, Baltimore, v. 131, n. 2, p. 479-491, June 1992.

FERREIRA, D. F. **Métodos de avaliação da divergência genética em milho e suas relações com os cruzamentos dialélicos**. 1993. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

GILLIES, A. C. M.; NAVARRO, C.; LOWE, A. J.; NEWTON, A. C.; HERNÁNDEZ, M.; WILSON, J.; CORNELIUS, J. P. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. **Heredity**, Oxford, v. 83, n. 6, p. 722-732, Dec. 1999.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology**, Plainview, v. 39, p. 439-446, 1974.

HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution **American Journal of Botany**, Columbus, v. 69, n. 10, p. 1685-1693, Oct. 1982.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. In: BOCK, J. H.; LINHART, Y. B. (Ed.). **The evolutionary biology of plants**. Boulder: Westview Press, 1989. p. 129-146.

HARRISON, R. E.; LUBY, J. J.; FURNIER, G. R.; HANCOCK, J. F. Morphological and molecular variation among populations of octoploid *Fragaria virginiana* and *F. chiloensis* (Rosaceae) from North America. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 84, n. 5, p. 612-620, May 1997.

HOEBEE, S. E.; YOUNG, A. G. Low neighbourhood size and high interpopulation differentiation in the endangered shrub *Grevillea iaspicula* McGill (Proteaceae). **Heredity**, Oxford, v. 86, n. 4, p. 489-496, Apr. 2001.

IBPGR. **Elseviers dictionary of plant genetic resources**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1991. 187 p.

JENCZEWSKI, E.; PROSPERI, J. M.; RONFORT, J. Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison to allozymes. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 8, p. 1317-1330, Aug. 1999.

JOYCE, T. A.; ABBERTON, M. T.; MICHAELSON-YEATES, T. P. T.; FORSTER, J. W. Relationships between genetic distance measured by RAPD-PCR and heterosis in inbred lines of white clover (*Trifolium repens* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 107, n. 3, p. 159-165, 1999.

KAUNDUN, S. S.; PARK, Y. G. Genetic structure of six Korean tea populations as revealed by RAPD PCR markers. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 2, p. 594-601, Mar./Apr. 2002.

KRZANOWSKI, W. J. **Principles of multivariate analysis: a user's perspective**. Oxford: Oxford Science, 1988. 563 p.

LANDERGOTT, U.; HOLDEREGGER, R.; KOZLOWSKI, J.; SCHNELLER, J. J. Historical bottlenecks decrease genetic diversity in natural populations of *Dryopteris cristata*. **Heredity**, Oxford, v. 87, n. 3, p. 344-355, Sept. 2001.

LI, R.; JIANG, T. B.; XU, C. G.; LI, X. H.; WANG, X. K. Relationship between morphological and genetic differentiation in rice (*Oryza sativa* L.) **Euphytica**, Wageningen, v. 114, n. 1, p. 1-8, 2000.

LIMA, P. S. G. **Divergência genética e efeito do nitrogênio total no crescimento *in vitro* de ipeca [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes]** 2002. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LINK, W.; DIXKENS, C.; SINGH, M.; SCWALL, M.; MELCHINGER, A. E. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. **Theoretical Applied in Genetics**, Berlin, v. 90, n. 1, p. 27-32, Jan. 1995.

MARIETTE, S.; CHAGNÉ, D.; PASTUSZKA, P.; RAFFIN, A.; PLOMION, C.; KREMER, A. Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellites markers. **Heredity**, Oxford, v. 86, n. 4, p. 469-479, Apr. 2001.

McKAY J. K.; LATTA, R. G. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 17, n. 6, p. 285-291, June 2002.

MERCK **Index Merck**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. New Jersey: Susan Budavari, Ed., 1989.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Cold Spring Harbor symposia on Quantitative Biology**, Plainview, v. 55, n. 1, p.263-273, 1986.

NASCIMENTO FILHO, F. J. do, ATROCH, A. L.; SOUSA, N. R. de, GARCIA, T. B.; CRAVO, M. da S.; COUTINHO, E. F. Divergência genética entre clones de guaranazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 501-506, mar. 2001.

NASSAR, J. M.; HAMRICK, J. L.; FLEMING, T. H. Genetic variation and population structure of the mixed-mating cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactaceae). **Heredity**, Oxford, v. 87, n. 1, p. 69-79, July 2001.

NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SKROCH, P.W. & SANTOS, J.B. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as

measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.120, p.300-306, 1995.

OIKI, S.; KAWAHARA, T.; INOUE, K.; OHARA, M.; MAKI, M. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among populations of the insular endemic plant *Campanula microdonta* (Campanulaceae). **Annals of Botany**, London, v. 87, n. 5, p. 661-667, May 2001.

PARENTONI, S. N.; MAGALHÃES, J. V.; PACHECO, C. A. P.; SANTOS, M. X.; ABADIE, T.; GAMA, E. E. G.; GUIMARÃES, P. E. O.; MEIRELLES, W. F.; LOPES, M. A.; VASCONCELOS, M. J. V.; PAIVA, E. Heterotic groups based on yield-specific combining ability data and phylogenetic relationship determined by RAPD markers for 28 tropical maize open pollinated varieties. **Euphytica**, Wageningen, v. 121, n. 2, p. 197-208, 2001.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 468 p.

PINHEIRO, C.U.B. Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*): a wild species and its rapid transformation into a crop. **Journal for Economical Botany**, v.51 (1), p.49-58, 1997.

PINHEIRO, C. U. B. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex. Holm; Rutaceae) no Maranhão, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, São Carlos, v. 16, n. 2, p. 141-150, abr./jun. 2002.

PROBER, S. M.; BROWN, A. H. D. Conservation of the grassy white box woodlands population genetics and fragmentation of *Eucalyptus albens*. **Conservation Biology**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 1003-1013, Dec. 1994.

REIS, A. M. M. **Distribuição da variabilidade genética em aroeira (*Myracrodruon urudeuva* – Anacardiaceae) por marcadores RAPD e polimorfismo de seqüência de cpDNA**. 1999. 60 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

RHOLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, 1992. 470 p.

RIBEIRO, F. E.; SOARES, A. R.; RAMALHO, M. A. P. Divergência genética entre populações de coqueiro-gigante-do-Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1615-1622, set. 1999.

ROTMAM, W.; BOYLE, T. J. Effects of logging and other forms of harvesting in humid tropical forests. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Ed.). **Forest conservation genetics, principles and practice**. Australia: CSIRO, 2000. p. 115-122.

SAENZ-ROMERO, C.; GURIES, R. P.; MONK, A. I. Landscape genetic structure of *Pinus banksiana*: allozyme variation. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 79, n. 8, p. 871-878, Aug. 2001.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S. J.; HIGUCHI, G.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, n. 4839, p. 487-491, Jan. 1988.

SALES, E.; NEBAUER, S. G.; MUS, M.; SEGURA, J. Population genetic study in the Balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, n. 10, p. 1750-1759, Oct. 2001.

SANTOS, C. A.; OLIVEIRA, C. A.; MENEZES, E. A. Seleção de descritores na caracterização e avaliação preliminar de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 7, p. 971-975, jul. 1995.

SEBBEN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; ZANATTO, A. C. S. Estrutura genética de jequitibá-rosa (*Carciniana legalis* (Mart.) O. Ktze) por caracteres quantitativos e isoenzimas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 121-134, jun. 2001.

SEDRA, M. H.; LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; COMBES, M. C.; HAMON, S. Identification and genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties from Morocco using RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 103, n. 1, p. 75-82, 1998.

SCHMIDT, K. & JENSEN, K. Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components. **American Journal of Botany**, v. 87, p. 678-689, 2000.

SKORUPA, L. A. Espécies de *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae) da Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 30, n. 1, p. 59-70, mar. 2000a.

SKORUPA, L. A. New chromosome numbers in *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Carlos, v. 14, n. 1, p. 11-14, jan./mar. 2000b.

SKOULA, M.; HILALI, I. E.; MAKRIS, A. M. Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparison with the essential oils profiles. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 559-568, Sept. 1999.

SKROCH, P.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. In: APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING, 1992, Minneapolis. **Proceedings...** Minneapolis: Crop Science Society of America, 1992. p. 26-30

SOKAL, R. R.; SNEATH, P. H. A. **Principles of numeric taxonomy**. San Francico: W. H. Freeman, 1963. 359 p.

SOUSA, N. R.; SOUZA, A. das G. C. Conservação ex-situ e utilização de espécies nativas. In: SOUSA, N. R.; SOUZA, A. das G. C. **Recursos fitogenéticos na Amazônia Ocidental**, Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. 205 p.

STEINER, J. J.; GREENE, S. L. Proposed ecological descriptors and their utility for plant germplasm collections. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 2, p. 439-451, Mar./Apr. 1996.

STEINER, J. J.; De Los SANTOS, G. G. Adaptive ecology of *Lotus corniculatus* L. genotypes: I. Plant morphology and RAPD marker characterization. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 2, p. 552-563, Mar./Apr. 2001.

SUN, M.; WONG, K. C. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, n. 12, p. 2180-2188, Dec. 2001.

VIEIRA, R. F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. In: JANICK, J. **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 1999. p. 152-159.

VILELA MORALES, E. A.; VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetales** Brasília: Embrapa-CENARGEN/Embrapa-SPI, 1997. 78 p.

VIRK, P. S.; NEWBURY, H. J.; JACKSON, M. T.; FORD-LLOYD, B. V. The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, n. 7/8, p. 1049-1055, June 1995.

WADT, L. H. de O. **Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) visando seu uso e conservação**. 2001. 95 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

WONG, K. C.; SUN, M. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 86, n. 10, p. 1406-1413, Oct. 1999.

YEH, F. C.; CHONG, D. K. X.; YANG, R. C. RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. **Journal of Heredity**, Carey, v. 86, n. 6, p. 454-460, Nov./Dec. 1995.

## ANEXOS

<b>TABELA 1A.</b> Análise de variância para os seis caracteres nos dois tempos de coleta para avaliar a existência de diferenciação genética entre áreas de coleta do jaborandi.....	60
<b>TABELA 2A.</b> Teores de pilocarpina obtidos para 15 áreas de coleta do jaborandi.....	61
<b>TABELA 3A.</b> Médias dos caracteres para cada área de coleta na época 1.....	62
<b>TABELA 4A.</b> Médias dos caracteres para cada área de coleta na época 2.....	62
<b>TABELA 5A.</b> Matriz de 1 e 0 obtida pelos padrões de bandas dos 93 indivíduos de jaborandi.....	63
<b>FIGURA 1A.</b> Mapa mostrando os locais de coleta dos acessos de jaborandi nos estados do Pará e Maranhão.....	75

**TABELA 1A.** Análise de variância para os seis caracteres nos dois tempos de coleta para avaliar a existência de diferenciação genética entre áreas de coleta do jaborandi.

Variáveis	Coleta	Quadrados médios	Média	C.V. (%)
		“entre”	total	
Matéria seca (g)	1	0,06679**	0,255	31,75
	2	0,0100**	0,0800	29,80
Folíolos/ Folha	1	8,6667**	8,5800	13,91
	2	10,099**	8,6612	12,32
Comprimento Folíolo (cm)	1	3,48423**	2,6113	16,35
	2	3,5043**	2,600	16,45
Largura Folíolo (cm)	1	1,1015**	1,4746	17,53
	2	1,23775**	1,4465	17,39
Relação comp/lar	1	0,06675**	1,791	8,36
	2	0,08371**	1,8199	7,38
Área foliar (cm <sup>2</sup> )	1	763,573**	24,69	28,14
	2	863,256**	24,40	30,80

\*\* significativo a 1% pelo teste F.

**TABELA 2A.** Teores de pilocarpina obtidos para 15 áreas de coleta do jaborandi.

<b>Áreas de coleta</b>	<b>Teores de pilocarpina (%)</b>
Dom Eliseu,PA	0,78
São Félix do Xingu, PA	0,77
Serra dos Carajás, PA(1)	0,85
Serra dos Carajás, PA(2)	0,59
Moju, PA (1)	0,66
Moju, PA (2)	0,67
Breu Branco, PA	0,70
Moju, PA (3)	0,67
Moju, PA (4)	0,68
Fazenda Merck-MA	0,67
Açailândia, MA	0,89
Nina Rodrigues, MA	0,76
Mata Roma, MA	0,76
Brejo, MA	0,56
Santa Quitéria, MA	0,77

**TABELA 3A.** Médias dos caracteres para cada área de coleta na época 1.

Áreas de coleta	MS1	NF1	CF1	LF1	R1	AF1
Serra dos Carajás1,PA	0.170	9.500	2.105	1.203	1.807	18.882
Serra dos Carajás2, PA	0.195	8.200	2.439	1.294	1.884	19.377
Moju3, PA	0.325	7.854	3.104	1.892	1.652	33.169
Moju2, PA	0.275	9.039	2.565	1.514	1.731	26.455
Breu Branco, PA	0.170	9.719	1.974	1.106	1.796	16.115
Moju1, PA	0.178	9.159	1.943	1.123	1.753	15.417
Moju4, PA	0.208	9.646	2.186	1.276	1.728	20.159
Merck-MA	0.385	7.894	3.497	1.885	1.873	39.131
Açailândia, MA	0.222	7.938	2.506	1.386	1.848	20.116
Nina Rodrigues, MA	0.296	7.969	2.773	1.634	1.711	27.496
Mata Roma, MA	0.356	6.656	3.767	2.080	1.837	37.403
Brejo, MA	0.331	6.850	3.233	1.728	1.826	25.544
Santa Quitéria, MA	0.215	9.375	2.183	1.169	1.883	17.911
Dom Eliseu, PA	0.259	9.400	2.389	1.359	1.823	22.132

**TABELA 4A.** Médias dos caracteres para cada área de coleta na época 2.

Áreas de coleta	MS2	NF2	CF2	LF2	R2	AF2
Serra dos Carajás1,PA	0.173	8.825	2.229	1.205	1.869	18.017
Serra dos Carajás2, PA	0.197	8.106	2.421	1.231	1.985	17.505
Moju3, PA	0.391	7.847	3.233	1.911	1.704	37.009
Moju2, PA	0.275	9.414	2.549	1.484	1.742	26.756
Breu Branco, PA	0.178	9.763	2.003	1.093	1.840	15.955
Moju1, PA	0.176	9.648	1.957	1.101	1.787	16.150
Moju4, PA	0.209	9.781	2.146	1.219	1.775	18.944
Merck-MA	0.400	7.700	3.443	1.895	1.829	36.796
Açailândia, MA	0.213	8.550	2.320	1.313	1.798	18.836
Nina Rodrigues, MA	0.318	7.531	2.681	1.583	1.705	23.559
Mata Roma, MA	0.436	6.781	3.699	2.054	1.838	38.037
Brejo, MA	0.364	7.225	3.210	1.698	1.881	30.243
Santa Quitéria, MA	0.156	9.125	2.068	1.074	2.008	14.935
Dom Eliseu, PA	0.229	9.700	2.278	1.255	1.827	19.805

**TABELA 5A.** Matriz de 1 e 0 obtida pelos padrões de bandas dos 93 indivíduos de jaborandi.

	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	3-2	3-3	4-1	4-2	4-4	6-1	6-2	7-1	7-2
AP14-1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
AP14-2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
AP14-3	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1
AP14-4	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AP14-5	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP14-6	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AP14-7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
AP14-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AO8-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
AO8-2	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1
AO8-3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AO8-4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
AO8-5	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
AO8-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
AO8-7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AO6-1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0
AO6-2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
AO6-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AO6-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AO6-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM7-1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1
AM7-2	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
AM7-3	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
AM7-4	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0
AM7-5	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
AN17-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN17-2	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
AN17-3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
AN17-4	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
AM10-1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
AM10-2	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
AM10-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
AM10-4	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
AM10-5	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
AM20-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AM20-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
AM20-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
AM20-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0
AO17-1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
AO17-2	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1
AO17-3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
AO17-4	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
AN10-1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1
AN10-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN10-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN10-4	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
AN10-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1
AN10-6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
AM4-1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1
AM4-2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AN7-1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AN7-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Continua...

**TABELA 5A. CONT.**

	7-5	8-2	8-4	8-5	8-8	9-2	9-11	9-13	9-14	12-2	12-6	12-8	12-9	12-10	12-11	12-12	12-13	12-14	
AP14-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP14-2	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1
AP14-3	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP14-4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP14-5	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
AP14-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP14-7	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
AP14-8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
AO8-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
AO8-2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
AO8-3	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AO8-4	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
AO8-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AO8-6	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
AO8-7	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
AO6-1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AO6-2	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AO6-3	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AO6-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
AO6-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM7-1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AM7-2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AM7-3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AM7-4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AM7-5	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN17-1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
AN17-2	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
AN17-3	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN17-4	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
AM10-1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
AM10-2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
AM10-3	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AM10-4	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
AM10-5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM20-1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0
AM20-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
AM20-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM20-4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
AO17-1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
AO17-2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AO17-3	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AO17-4	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
AN10-1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
AN10-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN10-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN10-4	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
AN10-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
AN10-6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AM4-1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AM4-2	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
AN7-1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN7-2	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Continua...

**TABELA 5A. CONT.**

	12-15	12-16	12-18	12-20	15-2	15-3	15-4	15-6	15-9	15-12	15-13	15-16	15-19	15-20	13-1	13-2	13-3	13-4	
AP14-1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
AP14-2	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
AP14-3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP14-4	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP14-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP14-6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
AP14-7	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
AP14-8	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
AO8-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AO8-2	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
AO8-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AO8-4	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1
AO8-5	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AO8-6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AO8-7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AO6-1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
AO6-2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1
AO6-3	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
AO6-4	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AO6-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM7-1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
AM7-2	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
AM7-3	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM7-4	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
AM7-5	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN17-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
AN17-2	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
AN17-3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
AN17-4	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1
AM10-1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM10-2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
AM10-3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
AM10-4	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AM10-5	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AM20-1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0
AM20-2	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
AM20-3	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AM20-4	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1
AO17-1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
AO17-2	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AO17-3	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
AO17-4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
AN10-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN10-2	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
AN10-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN10-4	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
AN10-5	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
AN10-6	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0
AM4-1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
AM4-2	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
AN7-1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
AN7-2	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Continua...

**TABELA 5A. CONT.**

	13-5	13-6	13-7	13-8	13-9	13-10	16-4	17-1	17-4	17-5	18-1	18-3	19-1	19-3	19-4	19-5	20-1	20-3	
AP14-1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP14-2	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0
AP14-3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP14-4	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
AP14-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
AP14-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP14-7	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1
AP14-8	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AO8-1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
AO8-2	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
AO8-3	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
AO8-4	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AO8-5	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1
AO8-6	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AO8-7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AO6-1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
AO6-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
AO6-3	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1
AO6-4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AO6-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AM7-1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0
AM7-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
AM7-3	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0
AM7-4	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
AM7-5	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
AN17-1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
AN17-2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
AN17-3	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
AN17-4	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AM10-1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
AM10-2	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
AM10-3	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
AM10-4	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AM10-5	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AM20-1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
AM20-2	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0
AM20-3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AM20-4	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
AO17-1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AO17-2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
AO17-3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AO17-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AN10-1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AN10-2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN10-3	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN10-4	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
AN10-5	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
AN10-6	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
AM4-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
AM4-2	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN7-1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN7-2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0

Continua...

**TABELA 5A. CONT.**

	21- 1	21- 2	21- 5	22- 1	22- 5	23- 3	23- 5	11- 1	11- 2	11- 4	11- 5	11- 6	11- 7	11- 8	11- 9	11- 10	11- 11	11- 12
AP14-1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP14-2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
AP14-3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP14-4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1
AP14-5	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
AP14-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP14-7	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
AP14-8	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0
AO8-1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
AO8-2	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AO8-3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
AO8-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AO8-5	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
AO8-6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AO8-7	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
AO6-1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
AO6-2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AO6-3	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
AO6-4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AO6-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM7-1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
AM7-2	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM7-3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
AM7-4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
AM7-5	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
AN17-1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN17-2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AN17-3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
AN17-4	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
AM10-1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AM10-2	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
AM10-3	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
AM10-4	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
AM10-5	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1
AM20-1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
AM20-2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
AM20-3	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
AM20-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
AO17-1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
AO17-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
AO17-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AO17-4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
AN10-1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1
AN10-2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN10-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN10-4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN10-5	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
AN10-6	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1
AM4-1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
AM4-2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN7-1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0
AN7-2	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1

Continua...

**TABELA 5A. CONT.**

	11- 13	11- 14	11- 15
AP14-1	1	1	1
AP14-2	1	1	1
AP14-3	0	0	0
AP14-4	0	1	1
AP14-5	1	0	0
AP14-6	0	0	0
AP14-7	1	1	0
AP14-8	0	0	1
AO8-1	1	1	1
AO8-2	1	1	0
AO8-3	0	1	0
AO8-4	1	1	1
AO8-5	1	0	1
AO8-6	0	0	0
AO8-7	1	1	1
AO6-1	1	0	0
AO6-2	1	0	0
AO6-3	1	1	1
AO6-4	1	1	1
AO6-5	1	1	1
AM7-1	1	1	0
AM7-2	1	1	1
AM7-3	0	0	0
AM7-4	1	1	1
AM7-5	1	0	0
AN17-1	0	0	0
AN17-2	0	0	0
AN17-3	0	0	0
AN17-4	1	0	1
AM10-1	1	1	1
AM10-2	1	1	1
AM10-3	1	0	1
AM10-4	1	0	0
AM10-5	1	0	0
AM20-1	0	0	0
AM20-2	1	1	1
AM20-3	1	1	1
AM20-4	1	1	1
AO17-1	1	1	1
AO17-2	0	0	0
AO17-3	1	0	0
AO17-4	1	0	0
AN10-1	1	1	1
AN10-2	1	1	1
AN10-3	1	1	1
AN10-4	0	1	1
AN10-5	1	1	1
AN10-6	1	1	1
AM4-1	0	1	1
AM4-2	1	1	1
AN7-1	0	0	1
AN7-2	1	1	1

Continua...

**TABELA 5A. CONT.**

	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	3-2	3-3	4-1	4-2	4-4	6-1	6-2	7-1	7-2
AN7-3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AM14-1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
AM14-2	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
AM14-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM14-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
AP1-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP1-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
AP1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP1-4	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
AP1-5	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
AP1-6	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
AP1-7	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP6-1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0
AP6-2	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
AP6-3	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
AP6-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP6-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP6-6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AH10-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AH10-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AH10-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
AH10-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AH10-5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP7-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP7-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP7-3	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
AP7-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP7-5	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
AP7-6	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
AOS-1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AOS-2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AOS-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AOS-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Continua...

**TABELA 5A. CONT.**

	7-5	8-2	8-4	8-5	8-8	9-2	9-11	9-13	9-14	12-2	12-6	12-8	12-9	12-10	12-11	12-12	12-13	12-14	
AN7-3	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AM14-1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AM14-2	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
AM14-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AM14-4	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AP1-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AP1-2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP1-4	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
AP1-5	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP1-6	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP1-7	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP6-1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP6-2	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
AP6-3	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AP6-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
AP6-5	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
AP6-6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AH10-1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
AH10-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AH10-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
AH10-4	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
AH10-5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AP7-1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP7-2	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP7-3	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AP7-4	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP7-5	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP7-6	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AO5-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AO5-2	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AO5-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AO5-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0

Continua...

**TABELA 5A. CONT**

	12-15	12-16	12-18	12-20	15-2	15-3	15-4	15-6	15-9	15-12	15-13	15-16	15-19	15-20	13-1	13-2	13-3	13-4
AN7-3	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0
AM14-1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM14-2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
AM14-3	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
AM14-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
AP1-1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0
AP1-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP1-4	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1
AP1-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP1-6	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
AP1-7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
AP6-1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AP6-2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AP6-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
AP6-4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
AP6-5	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
AP6-6	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AH10-1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
AH10-2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
AH10-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AH10-4	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
AH10-5	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AP7-1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
AP7-2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
AP7-3	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
AP7-4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1
AP7-5	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
AP7-6	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AOS-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AOS-2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
AOS-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AOS-4	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0

Continua...

**TABELA 5A. CONT.**

	13- 5	13- 6	13- 7	13- 8	13- 9	13- 10	16- 4	17- 1	17- 4	17- 5	18- 1	18- 3	19- 1	19- 3	19- 4	19- 5	20- 1	20- 3	
AN7-3	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0
AM14-1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM14-2	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AM14-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM14-4	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
AP1-1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP1-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AP1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP1-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AP1-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
AP1-6	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
AP1-7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
AP6-1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
AP6-2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
AP6-3	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0
AP6-4	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP6-5	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
AP6-6	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1
AH10-1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0
AH10-2	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
AH10-3	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
AH10-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AH10-5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP7-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP7-2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
AP7-3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
AP7-4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1
AP7-5	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
AP7-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
AOS-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
AOS-2	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
AOS-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AOS-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0

Continua...

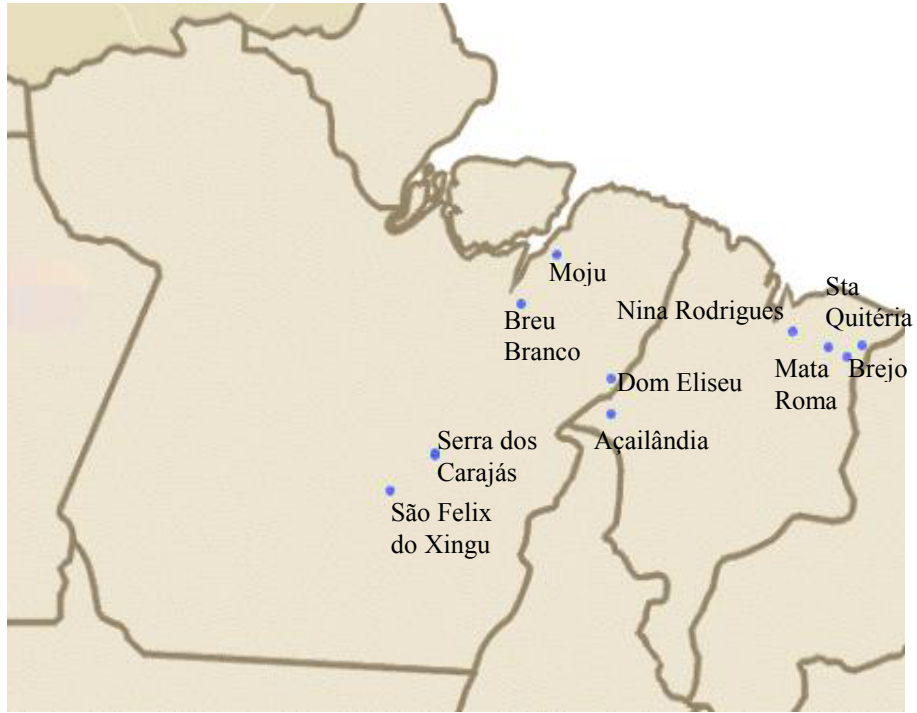
**TABELA 5A. CONT.**

	21- 1	21- 2	21- 5	22- 1	22- 5	23- 3	23- 5	11- 1	11- 2	11- 4	11- 5	11- 6	11- 7	11- 8	11- 9	11- 10	11- 11	11- 12
AN7-3	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
AM14-1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM14-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0
AM14-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM14-4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1
AP1-1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
AP1-2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP1-3	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
AP1-4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP1-5	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP1-6	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
AP1-7	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
AP6-1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
AP6-2	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP6-3	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP6-4	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
AP6-5	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP6-6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AH10-1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
AH10-2	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AH10-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
AH10-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AH10-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
AP7-1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1
AP7-2	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP7-3	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP7-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AP7-5	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AP7-6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
AO5-1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AO5-2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0
AO5-3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
AO5-4	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1

Continua...

**TABELA 5A. CONT.**

	11- 13	11- 14	11- 15
AN7-3	0	1	1
AM14-1	1	1	1
AM14-2	1	1	0
AM14-3	1	1	1
AM14-4	1	1	1
AP1-1	1	1	1
AP1-2	0	0	0
AP1-3	0	0	1
AP1-4	1	1	1
AP1-5	1	1	1
AP1-6	1	1	1
AP1-7	1	0	1
AP6-1	1	1	1
AP6-2	1	1	1
AP6-3	1	1	1
AP6-4	0	0	0
AP6-5	1	1	1
AP6-6	1	1	1
AH10-1	1	1	1
AH10-2	1	1	1
AH10-3	0	0	0
AH10-4	1	1	1
AH10-5	0	0	0
AP7-1	1	1	0
AP7-2	1	1	0
AP7-3	1	1	1
AP7-4	1	1	1
AP7-5	0	1	0
AP7-6	0	1	0
AO5-1	0	0	0
AO5-2	1	1	1
AO5-3	0	0	0
AO5-4	1	1	1



**FIGURA 1A** Mapa mostrando os locais de coleta dos acessos de jaborandi nos estados do Pará e Maranhão.