

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Vinícius Lourenço Garcia de Brito**

**Biologia da polinização, reprodução e genética de duas  
populações de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae)  
em gradiente altitudinal no sudeste do Brasil.**

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biologia para  
obtenção do Título de  
Mestre em Biologia  
Vegetal.

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Vinícius L. G. Brito  
Marlies Sazima  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientadora: Marlies Sazima

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**B777b**

Brito, Vinícius Lourenço Garcia de  
Biologia da polinização, reprodução e genética de duas  
populações de *Tibouchina pulchra* Cogn.  
(Melastomataceae) em gradiente altitudinal no sudeste do  
Brasil / Vinícius Lourenço Garcia de Brito. – Campinas, SP:  
[s.n.], 2010.

Orientadora: Marlies Sazima.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Manacá-da-serra. 2. Limitação de pólen. 3.  
Segurança reprodutiva. 4. Poliploidia. 5. Fluxo de pólen.  
I. Sazima, Marlies. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Pollination, reproductive biology and genetic of two populations of *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) at altitudinal gradient in southeastern Brazil.

**Palavras-chave em inglês:** Manacá-da-serra; Pollen limitation; Reproductive assurance; Polyploidy; Pollen flow.

**Área de concentração:** Biologia Vegetal.

**Titulação:** Mestre em Biologia Vegetal.

**Banca examinadora:** Marlies Sazima, Silvana Buzato, Maria Imaculada Zucchi.

**Data da defesa:** 12/07/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Vegetal.

BANCA EXAMINADORA

Campinas, 12 de julho de 2010.

Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Marlies Sazima (Orientadora)

  
Assinatura

Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Silvana Buzato

  
Assinatura

Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Imaculada Zucchi

  
Assinatura

Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Anete Pereira de Souza

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Kayna Agostini

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Às mulheres da minha vida: Regina, Inêz, Terezinha,

Maria, Carol, Ju, Ia, Dani e Vi que,

sendo, me ensinam o que eu busco ser.

*“Sound is different from noise. Sound is something which comes out more real and which comes out from your practice is sound. Noise is more – something more objective, you know, something, you know, which will bother you, you know. The noise is more objective being. The sound is both objective and subjective (...). You may say, ‘The bird is singing there – over there’. But we think, you know – bird – when we hear the bird, bird is ‘me’, you know, already. Actually I am not listening to bird. Bird is here, you know, in my mind already, and I am singing with the bird. ‘Peep – peep – peep’. If you think, when you are reading something, if you think, ‘Bird is there’, you know, ‘blue-jay is over my roof’, ‘blue-jay is singing, but their voice is not so good,’ you know. When you think in that way, that is noise, you know. When you are not disturbed by the blue-jay, you know, the blue-jay will come right into your heart, and you will be a blue-jay, and blue-jay will (be) reading something. Then the blue-jay doesn’t disturb your reading. Because – because you think, ‘Blue-jay is there. Blue-jay should not be over my roof’, you know. When you think in that way, that is more primitive understand of being. Why we understand things in that way is because of our want of practice, you know. When you practice zazen more, you can accept things as your own, whatever it is, you know.”*

Shunryu Suzuki Roshi

## AGRADECIMENTOS

A meu ver, o processo de ensino e aprendizagem, apesar de focado em apenas alguns personagens, é algo complexo, mediado por várias pessoas e situações cuja totalidade é impossível atingir. Assim sendo, começo meus agradecimentos certo do erro de menosprezar ou esquecer algo ou alguém que mediou ou fez parte deste processo.

Começo pelos meus pais, meus genitores genéticos, culturais, educacionais e tantos outros. Sem eles nada seria possível, eu não existiria e nada existiria para mim. Agradeço a minha mãe por ter me ensinado a noção do outro e a meu pai, martirizado em mim, que me mostrou que é possível ser sério e alegre ao mesmo tempo. Esses são os ingredientes caseiros indispensáveis na formação de um profissional, principalmente na ciência, onde sabemos que muitas vezes há carência de alegria, importância e respeito para aquilo que é o não-eu e o não-meu. Contrário a isto foi minha orientadora, professora Marlies, no seu aspecto doce e sereno. Agradeço por sua paciência infinita e capacidade de sempre mostrar uma alternativa simples que parece resolver todos os problemas, porém jamais pensada por uma mente turbulenta. Aqui, então, reparto a grande admiração que tive e tenho por todos os meus professores, desde aquelas que me ensinaram a ler e escrever, as tias do ensino fundamental, até os professores do ensino médio e de hoje.

Passo agora aos meus outros familiares. Em primeiro lugar minhas irmãs que abriram o caminho para a minha vida de caçula. Agradeço a vocês duas pela alegria característica de cada uma. É impossível estar com ou lembrar-se de vocês sem se sentir feliz! Capacidade essa, de criar alegria por um simples pensamento, transmitida inquestionavelmente aos meus queridos sobrinhos: João Pedro, Marininha e Arthurzinho. Aos meus irmãos Jorginho, Toninho, Maic e Lê, além da minha querida irmãzinha Vivizinha agradeço profundamente a nova história que vocês estão escrevendo conosco. Aqui também está o Luizão, o João e o Rei que tiraram de mim a responsabilidade de homem da família, cuidando destas meninas. Agradeço às minhas tias e tios: Inez, Terezinha, Didi, Tita, Lene, Cinira, Tia Maria, Tio Maurício e Gilberto por, de uma forma ou de outra, sempre estarem presentes em minha vida, desde a difícil tarefa de construir uma pipa até uma conversa descontraída num destes aniversários ou fins de ano. Às primas e

primos queridos: Doni, Mandica, Thaís, Ná, Ana Cláudia, Lu, Karine, Helton e João Maurício me sinto muito contente por ser da mesma família de vocês.

Queria agradecer profundamente a Ia que nesses anos de graduação e pós-graduação tem estado continuamente ao meu lado de forma muito especial. Estar com você é como sentar na calçada em frente a minha casa numa manhã de começo de inverno, quando o frio já começa, mas o sol ainda esquentava. É uma sensação de conforto, segurança, certeza e alegria, como se, mesmo que o mundo virasse de ponta cabeça, eu conseguisse ser quem eu sou. Obrigado por fazer parte da minha vida e por trazer novas pessoas: Bruna, Danilo, Josi, Márcia, Durval, Reginaldo, Vânia, Dona Maria e Seu João, Dona Lucila e tantos novos tios que fazem parte da minha família agora. Um obrigado especial ao Pintadinho, mesmo sabendo que talvez ele nunca entenda, por me mostrar todo dia que dormir e passear são coisas simples que podem nos fazer muito felizes. Obrigado ao Terence, Duque, Dalmen, Pombo, Grenynha, Belinha, Lindinha, Tina, Columbina, Alfredo, Lampião e Maria Bonita, Aurora e Dorotéia, Duckinho, sapo Tom Jobim, besouro Edivaldo e a todos os seres que dedicaram ou dedicam, sem saber, parte de suas vidas a felicidade dos outros.

Nesse parágrafo minha intenção inicial é agradecer aos meus amigos, que sem dúvida foram importantes para eu chegar até aqui. Porém começo já certo de que alguns ficarão perdidos em minha memória. Começando por Duartina: Godoy, Gaspar, Rei (felizmente algumas pessoas aparecem duas vezes na nossa vida... hoje, meu amigo de infância é meu cunhado!), Bitelo, Gabi, Biko, Lu, Nari e Galo, Secão, Vevinha, Guntinho, Caião, Tati, Ju, Camila e Elina, Pepe, Roya, Lã e André. Todos os amigos que conheci em Bauru e em Arealva. Aqui em Campinas agradeço aos amigos, aos seus poréns e não-poréns, que em algum momento me ensinaram ou deram oportunidade para eu aprender algo e formaram uma segunda família para mim: Mário, Tarci e Joaquim, Paulão, Lyndinha, Marcelinho e Fernandinho, Daninha e Ulisses, Marcelinho e Biba, Zébola, Chabes, Luluzinha, Marcel, Marcelão Pupo, Léo, Dani e Marcela, Pipoquinha, Mardiore, Kayna, Rubão, Carla, Gilberto da fisio, Sertãozinho, Diegão, Felipe, Mao, Coquinho, Graham, Carol Scultori, Vanessinha, Carol e Ana da biossistemática, Catia, Léo Meireles, Alexandre, Lori, Larissinha, Larissão, Vivi, Maíra, Gugu Shimizu, Gu Mori, Fer Cidade, Adna, Cris Baldauf, Mandrake, Brunão Rosado, Pedro, Bruno e Ilê, Sarah Papiorek, Arildão, Pequeno, Bruno, minha inesquecível e querida mãe na biologia Rosa, Davis, Beleza, Juninho, Lucas, a

todos que idealizaram e participaram das L10Arte's, Rodrigo Eisinger, Caiame e sua banda Irmãs da Providência, Gislaine, Fernando, Laurinha, Nicole, também conhecida como “a Bruxa”, Lauraceae, Trolha, Samantha, Godoy, Flávia, Cabeça, Sandra Obando, Sonia, João Aranha, Carlão, Lucas, Rick, Sebastian, Daniel Paiva, Rafa e todo pessoal do futebol BotEco, Alê, Felipe Curitiba e todo pessoal que formou o Cursinho Cio da Terra, Eliel, Josi, Aneci, Dona Benê e Maísa, Damião, Márcio e todos os educadores e educandos do cursinho PROCEU, o cursinho da Moradia, aos irmãos Palito e Piruca, o pessoal da Universo Lúdico e da Melampus, ao Murilão, Ricardo “Manfroto”, Paty, Débora, Gi, Daniel, André, professor Mourão e professor Humberto Castro e todos que fizeram os cursos de fotografia comigo. Agradeço, mais uma vez, porém por outro aspecto, à Biba e a professora Anete que me ajudaram e me ensinaram muito, com paciência imensa. Metade desta tese é pura ajuda de vocês.

Por fim, alguns agradecimentos não menos importantes. Aos técnicos: Iara Bressan pelo carisma e charme de sempre! Juver, Paty e Carlão pela ajuda e bate-papo. Sem vocês nossos laboratórios não funcionariam. A secretária Maria Roseli por me ajudar sempre nos trâmites acadêmicos. As agências de fomento: CNPq que garantiu minha bolsa e ao projeto Biota-Fapesp Gradiente Funcional pelo apoio para as viagens de campo, estadia, comida e discussões.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	5
<b>Referências</b> .....	10
<b>CAPÍTULO I</b> .....	13
<b>Resumo</b> .....	14
<b>Introdução</b> .....	14
<b>Metodologia</b> .....	17
<i>Área de estudo</i> .....	17
<i>Fenologia</i> .....	18
<i>Biologia floral, dinâmica de pólen e crescimento de tubos polínicos</i> .....	19
<i>Sistema reprodutivo, produção e germinação de sementes</i> .....	20
<i>Visitantes florais e polinizadores</i> .....	20
<i>Análise estatística</i> .....	21
<b>Resultados</b> .....	22
<i>Fenologia</i> .....	22
<i>Biologia floral, dinâmica de pólen e crescimento de tubos polínicos</i> .....	23
<i>Sistema reprodutivo, produção e germinação de sementes</i> .....	24
<i>Visitantes florais e polinizadores</i> .....	25
<b>Discussão</b> .....	26
<b>Referências</b> .....	31
<b>Tabela e Figuras</b> .....	39

<b>CAPÍTULO II</b> .....	48
<b>Abstract</b> .....	49
<b>References</b> .....	52
<b>Table</b> .....	54
<b>CAPÍTULO III</b> .....	55
<b>Resumo</b> .....	56
<b>Introdução</b> .....	56
<b>Metodologia</b> .....	58
<i>Área de estudo: local e caracterização</i> .....	58
<i>Espécie estudada</i> .....	59
<i>Extração de DNA, amplificação e genotipagem</i> .....	59
<i>Análise genética das populações</i> .....	60
<b>Resultados</b> .....	61
<b>Discussão</b> .....	63
<b>Referências</b> .....	66
<b>Tabelas e Figuras</b> .....	71
<b>Anexo 1:</b> .....	79
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	81

## RESUMO

As montanhas apresentam alta diversidade e diferentes condições ambientais ao longo de curtas distâncias. Assim, as montanhas são ideais para estudos ecológicos e evolutivos que podem somar valores e aprimorar projetos de conservação. Em altitudes elevadas as condições ambientais podem reduzir a quantidade de polinizadores, principalmente de abelhas. Desta forma, em espécies estritamente melitófilas, características como a fenologia, o sistema reprodutivo, o fluxo de pólen e a estrutura genética das populações pode variar ao longo do gradiente, uma vez que a transferência de grãos de pólen aos estigmas co-específicos também varia ao longo do gradiente. No caso de áreas de elevada altitude, a transferência de pólen é limitada (limitação de pólen), reduzindo as possibilidades de polinização cruzada. O presente estudo tem por objetivo obter informações sobre a biologia da polinização, reprodução e genética de duas populações de *Tibouchina pulchra* (Melastomataceae) ocorrentes em duas áreas de gradiente altitudinal: Núcleo Santa Virgínia (NSV) e Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba (NDP) do Parque Estadual da Serra do Mar. Foram feitas observações mensais para definir padrões e estratégias de floração, registrar dados sobre a biologia floral e reprodutiva, além de verificar a riqueza e abundância dos polinizadores e caracterizar as interações dessa espécie com as abelhas visitantes. Material genético de 44 indivíduos do NSV e 45 indivíduos do NDP foram coletados para o desenvolvimento e caracterização de 12 loco microsatélites polimórficos e estes foram utilizados para fazer análises de agrupamento, ordenação bayesiana e medidas de diversidade genética nas duas populações. Os aspectos da biologia reprodutiva são diferentes entre as duas áreas: na área elevada a florada é mais intensa, a produção de pólen é menor, há limitação na transferência de pólen, mas a fertilização de sementes provindas de polinização cruzada manual é maior. Na outra área são produzidos mais frutos e há maior riqueza e abundância de polinizadores. Ocorre diferenciação genética entre as populações, mas com uma interface de contato entre elas, além de menor diversidade genética na população da área elevada. Estes resultados indicam que a ausência de polinizadores na região de altitude elevada está associada a diferentes estratégias na biologia floral e reprodutiva para balancear a limitação de pólen. Além disso, diferentes dinâmicas de fluxo gênico mediado pelo pólen nas duas populações e as características de distribuição e reprodução podem influenciar a estrutura e a diversidade genética de *Tibouchina pulchra* ao longo da Serra do Mar.

## ABSTRACT

Mountains have high diversity and many environmental conditions at short distances. Hence, they are an ideal place to develop ecological and evolutionary studies that can improve conservation projects. At high altitudes, the environmental conditions reduce pollinator abundance, mainly bees. Therefore, traits such as phenology, breeding system and genetic structure of plant populations pollinated by bees could vary in an altitudinal gradient, because pollen grain transference to co-specific flowers varies also. At high altitudes pollen transference is limited (pollen limitation) reducing cross-pollination. The main goal of the present study was to obtain information about pollination biology, breeding system and genetic structure of two populations of *Tibouchina pulchra* (Melastomataceae) that occur in two different areas of an altitudinal gradient: Núcleo Santa Virgínia (NSV) and Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba (NDP) of Parque Estadual da Serra do Mar. Field work was done monthly to describe the flowering patterns and strategies, record floral and reproductive biology, verify pollinator diversity and characterize the interactions among this plant species and bee visitors. Genetic material was collected from 44 *Tibouchina pulchra* individuals of NSV and 45 individuals of NDP to develop and characterize 12 microsatellite polymorphic loci, which were used to analyze population's genetics by different methods. At the higher area the plants have greater flowering intensity, the flowers produce less pollen grains and the stigmas receive less pollen, but set more seeds after manual cross pollination than individuals at the lower area, where pollinator diversity is higher and plants produce more fruits. There is genetic differentiation, but also an interface contact between the two populations. The population at higher altitude has less genetic diversity than the one at lower altitude. The lack of pollinators at the higher area is associated with different floral and reproductive strategies to compensate pollen limitation. Moreover the genetic structure and diversity respond to different dynamics of pollen flow and the patterns of distribution and reproduction of *Tibouchina pulchra* at the altitudinal gradient of Serra do Mar.

# INTRODUÇÃO GERAL

## Montanhas e gradiente de altitude

Segundo os critérios adotados por Körner (2004), 24,3% da área terrestre global está localizada em montanhas com mais de 300m de altitude, uma área habitada por um quinto da população mundial. Além disso, metade da população mundial depende das águas advindas de montanhas (Messerli *et al.* 2004) seja para consumo, irrigação ou produção de energia elétrica.

Montanhas, em escalas globais ou regionais, são *hotspots* de riqueza biológica (Barthlott *et al.* 1996). Uma estimativa conservadora aponta que cerca de 50.000 das 240.000 espécies de angiospermas estão localizadas em montanhas. Incluindo as montanhas tropicais de terras baixas, esta estimativa pode ser até duas vezes maior (Körner 2004). Essa cobertura vegetal garante a estabilidade do solo e a qualidade da água, reduz erosões e deslizamentos, provêm produtos e serviços ecológicos, além do alto potencial para recreação e turismo (Martinelli 2007).

Desta forma, as montanhas são tidas como alvos de conservação por programas como o *Mountain Work Programme* (MWP) proposto pela *Convention on Biological Diversity* em 2002, convenção esta que o Brasil é signatário, apesar dos documentos brasileiros sobre biodiversidade não fazerem nenhuma referência às montanhas (Martinelli 2007). No Brasil, as montanhas existentes, apesar da sua dinâmica ecossistêmica única, são tratadas como partes de outros biomas que foram criados a partir de características de terras baixas.

A alta diversidade e a facilidade de se obter diferentes condições ambientais em curtas distâncias fazem das montanhas um “experimento natural”, um lugar ideal para estudos ecológicos e evolutivos que podem somar valores e aprimorar os projetos de conservação. Porém nem sempre as variações ambientais em uma montanha são previsíveis e isso explica a dificuldade de se formar uma teoria global dos fenômenos biológicos ocorrentes em um gradiente de altitude. Segundo Körner (2007) existem duas categorias de mudanças ambientais ao longo de um gradiente de altitude: aquelas que estão diretamente relacionadas ao gradiente altitudinal como pressão atmosférica, temperatura e radiação solar; e aquelas que geralmente não estão relacionadas a altitude como a precipitação, velocidade do vento e sazonalidade. Assim, é

necessário estar atento às variantes que podem determinar um fenômeno biológico em uma montanha, principalmente quando resultados de locais diferentes são comparados.

Estudos biológicos realizados em gradientes altitudinais geralmente envolvem o número de espécies (Rahbek 1995), produtividade (Luo *et al.* 2004), tamanho de caracteres morfológicos (Fabbro & Körner, 2004), tendências sobre características da história de vida (Klimes 2003), bem como características morfológicas (Luo *et al.* 2004, He *et al.* 2006), fisiológicas (Hoch & Körner, 2003) ou genética-ecológicas (George *et al.* 2001, Yan *et al.* 2009). No Brasil, uma iniciativa interessante foi dada pelo projeto Biota-Fapesp Gradiente Funcional “Composição estrutura e funcionamento da Floresta Ombrófila Densa do Parque Estadual da Serra do Mar”, ao qual o presente trabalho está vinculado.

### **Mutualismo de polinização e sistema reprodutivo em plantas**

Interações mutualísticas geralmente se originam de interações antagonísticas, e mutualismos podem, por sua vez, produzir linhagens descendentes que são comensalistas ou antagonistas. Portanto, mutualismos e antagonismos devem ser pensados como finais de um continuum (Dale *et al.* 2002). Se um organismo pode usar não somente seus próprios genes, mas também aqueles de outras espécies para aumentar suas chances de sobrevivência e reprodução relativa aos outros organismos de uma população, isso pode ser favorecido pela seleção natural. A maioria destas interações será antagonística, produzindo parasitas, galhas ou predadores. Mas uma gama de interações entre espécies geneticamente variáveis serão mutualísticas e seus efeitos serão inevitavelmente variáveis entre os ambientes (Thompson 2005).

Segundo Herre *et al.* (1999), a concepção de mutualismo como uma relação em que organismos de espécies diferentes interagem em seu benefício mútuo, envolvendo, em geral, a troca de bens ou serviços e resultando na aquisição de capacidade(s) nova(s) por pelo menos um parceiro, é errônea. A teoria atual sugere que mutualismos são mais bem vistos como explorações recíprocas que apesar de tudo providencia benefícios líquidos para cada um dos parceiros. Esta visão salienta o potencial disruptivo dos conflitos de interesses entre os parceiros de outrora. Daí, então, a importância de se identificar fatores que influenciam os custos e benefícios destas interações.

Na maioria das plantas o obstáculo físico para a dispersão de seus genes é aliviado através da formação de mutualismos com animais que transportam grãos de pólen entre estigmas e também dispersam suas sementes. No caso da polinização, as plantas tendem a aperfeiçoar a transferência e recepção do pólen, buscando o menor custo energético possível enquanto que os animais tendem a aperfeiçoar a coleta de recursos como pólen e néctar (Pellmyr 2002). Para as plantas, o uso de animais como pássaros e insetos na polinização de suas flores garante que haja um aumento na probabilidade (em relação a vetores abióticos como o vento e a água) de um grão de pólen de uma flor atinja o estigma de outra flor co-específica. Além disso, plantas polinizadas por animais podem alocar menos recursos na produção de pólen e se estabelecer em locais em que os ventos não são tão fortes, como o interior de uma floresta (Pellmyr 2002). Porém, estas vantagens serão verdadeiras somente para as plantas que possuem um sistema reprodutivo inteiramente dependente dos vetores de polinização, como a dioecia, heterocronia dos elementos reprodutivos, heterostilia, enantioestilia e flexistilia (*cf.* Barrett 2002).

O sistema reprodutivo de uma planta pode afetar diretamente sua ecologia e evolução (Charlesworth 2006). De maneira geral, populações apomíticas rapidamente aumentam a frequência dos homozigotos e os indivíduos expressam mutações deletérias recessivas ou parcialmente recessivas e sofrem menores chances de sobrevivência e redução de fertilidade, aspectos característicos do que é conhecido como depressão endogâmica. Além disso, populações endogâmicas tendem a ter menor tamanho efetivo quando comparadas as exogâmicas e menor diversidade genética (Charlesworth 2006, Lloyd 1992). Essas características levaram a interpretação de que a diversidade dos sistemas reprodutivos sempre evoluiu no sentido de promover o cruzamento e evitar a probabilidade de depressão endogâmica. Porém, a transição de sistemas reprodutivos dependentes de animais para sistemas independentes (apomixia, autopolinização) é mais comum que o contrário, evoluiu em cerca de 20% das angiospermas (Barrett 2002) e a condição obrigatória de polinização cruzada é um aspecto geralmente relacionado a espécies ancestrais (Charlesworth 2006, Wyatt 1988, Stebbins 1970). Além disso, a condição de apomixia garante algumas vantagens como aumento na transmissão de genes próprios para a próxima geração, garantia da segurança reprodutiva na qual a polinização é reduzida ou não há parceiros reprodutivos (Lloyd & Schoen 1992), além de evitar o “custo da meiose” (Jain 1976).

Entretanto, cerca de um terço das espécies de plantas sobrevivem praticando tanto autofertilização como fertilização cruzada (sistema reprodutivo misto) (Barrett 2002). Mesmo em espécies polinizadas por animais, o sistema reprodutivo é mais bem entendido como um caráter quantitativo e não discreto e a condição de autofertilização e fertilização cruzada são apenas extremos de um *continuum*. Em alguns casos, esta variação pode ocorrer dentro de uma mesma espécie, com populações variando da fertilização cruzada completa até a autofertilização (Barrett & Husband 1990). Nesse sentido, as técnicas de marcadores genéticos moleculares, aliadas a estudos de campo, são uma ótima ferramenta para estimar o sistema reprodutivo e entender as conseqüências destes sistemas na estrutura genética de populações naturais.

### **Marcadores moleculares microssatélites**

Um marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento de DNA. Atualmente, existem vários tipos de marcadores moleculares que podem ser usados em estudos ecológicos e muitas perguntas podem ser respondidas com mais de um tipo de marcador. De maneira geral, um bom marcador molecular deve ter ampla cobertura genômica, alto polimorfismo, não depender do estágio de desenvolvimento do organismo e ser seletivamente neutro (Ferreira & Grattapaglia 1998).

Entre os marcadores que apresentam estas características estão os microssatélites, um dos mais utilizados nas últimas duas décadas em estudos ecológicos (Schlötterer 2004). Microssatélites são regiões do genoma, freqüentemente encontradas no DNA nuclear, mitocondrial e cloroplastidial da maioria dos organismos, que contêm seqüências de 2-6 nucleotídeos repetidas em tandem (Oliveira *et al.* 2006). A região da fita de DNA que está localizada ao lado do microssatélite é chamada de região flaqueadora. Estas regiões são geralmente conservadas (ou seja, únicas e não mutativas) nos indivíduos e muitas vezes entre diferentes espécies. Assim, é possível construir pequenas seqüências (ca. de 18-22 oligonucleotídeos) complementares às regiões flaqueadoras, chamadas *primers*, capazes de guiar a amplificação da região microssatélite através da reação da polimerase em cadeia (PCR). Diferentemente da região flaqueadora, a região microssatélite sofre mutações freqüentemente no processo de replicação do DNA, alterando o numero de repetições e conseqüentemente o seu

comprimento (Oliveira *et al.* 2006). Assim, estas regiões podem variar em comprimento (*ca.* de 5 a 40 repetições) entre indivíduos de uma mesma espécie. Estas variações podem ser percebidas em gel de alta resolução permitindo rápida genotipagem de vários indivíduos em vários locos.

Os marcadores do tipo microssatélites estão entre os mais usados em estudos ecológicos em parte porque têm o potencial de prover estimativas precisas de migração, têm o poder de resolução para distinguir desvios de panmixia e podem estimar o parentesco entre indivíduos (Selkoe & Toonen 2006). Além disso, estes marcadores permitem o uso de amostras pequenas de tecido que podem ser estocadas por bastante tempo, são codominantes e permitem uma genotipagem da população de forma relativamente rápida e barata (Selkoe & Toonen 2006). Por outro lado, existem algumas desvantagens como a dificuldade de transferir microssatélites desenvolvidos para uma espécie para outros grupos taxonômicos, seus mecanismos mutacionais ainda não estão totalmente claros, podem esconder diversidade alélica e apresentar problemas com a amplificação. Mesmo assim, as taxas mutacionais nestas regiões são extremamente altas, o que gera altos níveis de diversidade alélica necessários para estudos genéticos de processos atuando numa escala de tempo ecológica.

O presente estudo descreve a biologia da polinização e a reprodução, a estrutura e diversidade genética de duas populações de *Tibouchina pulchra* em dois pontos de um gradiente de altitude: Núcleo Santa Virgínia (NSV) e Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba (NDP) no Parque Estadual da Serra do Mar. No primeiro capítulo mostramos que, para esta espécie, a diversidade e abundância de polinizadores é menor no ambiente mais alto e as conseqüências para a dinâmica de pólen e a reprodução são discutidas. Aspectos da biologia floral também foram descritos. No segundo capítulo apresentamos, em uma pequena nota técnica, os dados gerais obtidos no desenvolvimento de 12 marcadores moleculares do tipo microssatélites para esta espécie. No terceiro capítulo a estrutura e a diversidade genética destas duas populações são apresentadas e discutidas a luz dos resultados do primeiro capítulo.

## Referências

- BARRETT S.C.H. & HUSBAND B.C. 1990. Variation in outcrossing rates in *Eichhornia paniculata*: the role of demographic and reproductive factors. *Plant Species Biol.* 5: 41–56.
- BARRETT S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nat Rev Genet* 3(4): 274-284.
- BARTHLOTT W., LAUER W. & PLACKE A. 1996. Global distribution of species diversity in vascular plants: Towards a world map of phytodiversity. *Erdkunde* 50(1): 317-327.
- CHARLESWORTH D. 2006. Evolution of Plant Breeding Systems. *Current Biology* 16 (17): R726-R735.
- DALE C., PLAGUE G.R., WANG B., OCHMAN H. & MORAN N.A. 2002. Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis. *PNAS* 99: 12397 - 12402.
- FABBRO T. & KÖRNER C. 2004. Altitudinal differences in flower traits and reproductive allocation. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 199(1): 70-81.
- FERREIRA M.E. & GRATTAPAGLIA D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa-Cenargen. Brasília.
- GEORGE T., JOSEPH L., VARGHESE G., KALYANARAMAN K.K. & KURIACHAN P. 2001. Analysis of phenotypic and genetic variations among populations of *Oryza malampuzhaensis* show evidence of altitude-dependent genetic changes. *Canadian Journal of Botany* 79: 1090-1098.
- HE J.S., WANG Z., WANG X., SCHMID B., ZUO W., ZHOU M., ZHENG C., WANG M. & FANG J. 2006. A test of the generality of leaf trait relationships on the Tibetan Plateau. *The New Phytologist* 170(4): 835-848.
- HERRE E.A., KNOWLTON N., MUELLER U.G. & REHNER, S.A. 1999. The evolution of mutualisms: exploiting the paths between conflict and cooperation. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 49-53.

- HOCH G. & KÖRNER C. 2003. The carbon charging of pines at the climatic treeline: a global comparison. *Oecologia* 135(1): 10-21.
- KLIMES L. 2003. Life-forms and clonality of vascular plants along an altitudinal gradient in E Ladakh (NW Himalayas). *Basic and Applied Ecology* 4(4): 317-328.
- KÖRNER C. 2004. Mountain biodiversity, its causes and function. *Ambio Special Report* 13: 11–17.
- KÖRNER C. 2007. The use of ‘altitude’ in ecological research. *Trends in Ecology & Evolution* 22(11): 569-574.
- JAIN S.K. 1976. The evolution of inbreeding in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 7: 469–495.
- LLOYD D.G. 1992. Self- and Cross-Fertilization in Plants. II. The Selection of Self-Fertilization. *International Journal of Plant Sciences* 153, no. 3: 370.
- LLOYD D.G. & SCHOEN D.J. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Science* 153: 358–369.
- MARTINELLI G. 2007. Mountain biodiversity in Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 30: 587–597.
- MESSERLI B., VIVIROLI D. & WEINGARTNER R. 2004. Mountains of the world: vulnerable water towers for the 21st century. *Ambio*: 29–34.
- OLIVEIRA E.J., PÁDUA J.G., ZUCCHI M.I., VENCOVSKY R., VIEIRA M.L.C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29(2): 294-307.
- PELLMYR O. 2002. Pollination by animals. *In* *Plant-animal Interactions an Evolutionary Approach* (C.M. Herrera & O. Pellmyr, eds) Blackwell Publishing, Oxford, p.157-184.
- RAHBEK C. 1995. The elevational gradient of species richness: a uniform pattern? *Ecography* 18(2): 200-205.

- SARMIENTO F.O. 2002. Human drivers of landscape change: treelines dynamics in neotropical montology. *Ecotropicos* 15:129-146.
- SCHLOTTERER C. 2004. The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? *Nat Rev Genet* 5 (1): 63-69.
- SELKOE A.K. & TOONEN R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615–629.
- STEBBINS G.L. 1970. Adaptive radiation in angiosperms. I. Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1: 307–326.
- LUO T., PAN Y., OUYANG H., SHI P., LUO J., YU Z. & LU Q. 2004. Leaf area index and net primary productivity along subtropical to alpine gradients in the Tibetan Plateau. *Global ecology and biogeography* 13(4): 345-358.
- THOMPSON J.N. 2005. The geographic mosaic of coevolution. The University of Chicago Press. pp: 247-248.
- WYATT R. 1988. Phylogenetic aspects of the evolution of self-pollination. In L. D. Gottlieb and S. K. Jain [eds.], *Plant evolutionary biology*, 109–131. Chapman and Hall, London, UK.
- YAN X.B., GUO Y.X., ZHAO C., LIU F.Y. & LU B.R. 2009. Intra-population genetic diversity of two wheatgrass species along altitude gradients on the Qinghai-Tibetan Plateau: its implication for conservation and utilization. *Conservation Genetics* 10 (2): 359-3

# CAPÍTULO I

**Biologia da polinização e reprodução de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) em gradiente altitudinal no sudeste do Brasil\***

**Vinícius Lourenço G. Brito e Marlies Sazima**

Departamento de Biologia Vegetal, Unicamp

**Palavras-chave:** manacá-da-serra, limitação de pólen, segurança reprodutiva, heteranteria, Serra do Mar

---

\*Projeto de pesquisa vinculado ao projeto Biota Gradiente Funcional (Processo Fapesp 03/12595-7), Coordenadores Dr. Carlos Alfredo Joly e Luiz Antonio Martinelli.

## Resumo

O processo de polinização é essencial para a manutenção da biodiversidade das plantas sendo também indiretamente responsável pela permanência de outras guildas além dos polinizadores. Porém estudos que envolvem este processo têm sido pouco realizados em gradientes ambientais, como o latitudinal e o altitudinal, devido às dificuldades espaciais, taxonômicas e amostrais em conseguir este tipo de dados, principalmente em florestas úmidas. O presente estudo tem por objetivo obter informações sobre a biologia da polinização e da reprodução de *Tibouchina pulchra* (Melastomataceae) ocorrente em duas áreas extremas de um gradiente altitudinal: Núcleo Santa Virgínia (NSV) e Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba (NDP) do Parque Estadual da Serra do Mar. Foram feitas observações mensais para definir padrões e estratégias de floração, registrar dados sobre a biologia floral e reprodutiva, além de verificar a riqueza e abundância dos polinizadores e caracterizar as interações dessa espécie com as abelhas visitantes. Estes aspectos são diferentes entre as duas áreas: no NSV a intensidade da floração (soma dos valores = 102) é maior que no NDP (soma dos valores = 77). A produção de pólen por flor é menor no NSV que no NDP ( $t=2,659$ ;  $p<0,05$ ). No NSV apenas 5 abelhas visitaram as flores (6-12 flores) no período total de observação (60h) enquanto que no NDP, no mesmo período, houveram 948 visitas. Na área mais elevada também houve maior limitação na transferência de pólen quando comparado ao NDP. Porém, a proporção de sementes fertilizadas a partir do tratamento de polinização cruzada é maior ( $t=2,635$ ;  $p<0,05$ ). Estas diferenças entre a fenologia, sistema reprodutivo e visitas dos polinizadores nos dois locais são discutidas, bem como as estratégias para balancear a limitação de pólen na região mais elevada.

## Introdução

As espécies de plantas silvestres dos *hotspots* de biodiversidade são importante fonte de recursos para produtos e serviços ecossistêmicos que provêm como medicamentos, alimentos e ciclagem de nutrientes (Ricketts 2004a). O processo de polinização é essencial para a manutenção dessas populações, sendo ele indiretamente responsável pela permanência de outras guildas além dos polinizadores, como a dos herbívoros e dos predadores de sementes, que dependem dos recursos vegetais (Potts *et al.* 2006). Além disso, sistemas agrícolas freqüentemente dependem, pelo menos em parte, de populações de polinizadores de habitats adjacentes para a sua produtividade (Kremen & Ricketts 2000). Atualmente, há evidências

crescentes de que os polinizadores e os seus serviços estão sob aumento de risco de diversas fontes antropogênicas que incluem: perda de habitat ou fragmentação (Ricketts 2004b), intensificação agrícola (Kremen *et al.* 2004), agroquímicos (Kearns *et al.* 1998), doenças (Watanabe 1994), introdução de plantas exóticas (Brown *et al.* 2002) e mudanças climáticas (Price & Waser 1998).

As comunidades vegetais tropicais são amplamente conhecidas pela sua admirável riqueza de espécies. Entretanto, ano após ano, ocorrem irreversíveis destruições nestas formações vegetais, sem que se tenha conhecimento de sua estrutura, da dinâmica, da evolução e da taxonomia de várias espécies que habitam estas comunidades (Franco 1995). É o caso da Mata Atlântica, um bioma de grande complexidade biológica, que ocupava 12% do território nacional, restando hoje apenas 11,4%-16% de sua cobertura original, espalhados na forma de fragmentos florestais (Ribeiro *et al.* 2009), sendo considerado um dos biomas mais ameaçados do mundo pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN 1986).

Estudos sobre a biologia da polinização e reprodução têm sido amplamente utilizados para a conservação de habitats naturais afetados, pois podem fornecer informações importantes relacionadas à partilha e competição por polinizadores, sucesso reprodutivo e manutenção do fluxo gênico intraespecífico (Bawa 1990, Kearns *et al.* 1998). Porém estes estudos têm sido pouco realizados em gradientes ambientais, como o latitudinal e o altitudinal, devido às dificuldades espaciais, taxonômicas e amostrais, em conseguir este tipo de dados (Devoto *et al.* 2005), principalmente para espécies arbóreas em florestas úmidas.

Ambientes com temperaturas mais baixas, estações de crescimento menores e mais imprevisíveis, como aqueles que ocorrem em altitudes elevadas, interferem na reprodução das plantas (Bell & Bliss 1980). A alta frequência de períodos nublados e as constantes neblinas nestes locais reduzem a fotossíntese e, conseqüentemente, a fonte de carbono disponível para a produção de sementes sadias (Bell & Bliss 1980). Além disso, em ambientes andinos e alpinos, estudos sugerem que estas condições ambientais somadas aos ventos fortes reduzem a quantidade de polinizadores, e conseqüentemente a transferência de grãos de pólen aos estigmas de flores co-específicas (limitação de pólen), reduzindo as possibilidades de polinização cruzada (Arroyo *et al.* 1985, Totland 1993). Assim, acredita-se que estas sejam forças importantes que

dirigem a evolução da autopolinização em altas altitudes e latitudes (Molau 1993, Sandvik *et al.* 1999).

De maneira geral, a autopolinização nestes locais pode ocorrer de três formas: anteras podem depositar passivamente pólen no estigma (autogamia); polinizadores podem transferir pólen de anteras para estigmas dentro da mesma flor (autogamia) e; polinizadores podem transferir pólen entre flores na mesma planta (geitonogamia) (Sandvik *et al.* 1999). Desta forma, a reprodução através da autopolinização em plantas autogâmicas pode ser vista como uma forma de segurança reprodutiva em condições em que as visitas por insetos são poucas ou mesmo inexistentes (Sandvik *et al.* 1999, Lloyd & Schoen 1992). Assim, em plantas que dependem de polinizadores para a sua reprodução, deve haver diferença na quantidade de pólen que atinge os estigmas, nas estratégias de vida, nos sistemas de reprodução e na estrutura genética ao longo de gradiente altitudinal.

A família Melastomataceae compreende 4200-4500 espécies e é bem representada em ecossistemas tropicais e subtropicais das Américas, onde são encontradas cerca de 3000 espécies (Renner 1993). No Brasil encontram-se 68 gêneros com cerca de 1500 espécies estimadas (Martins 1997). Suas flores são geralmente polinizadas por abelhas que coletam o pólen das anteras tubulosas quase sempre poricidas. Estas abelhas abraçam as anteras e efetuam movimentos vibratórios com os músculos das asas e como consequência o pólen é expelido, aderindo à porção ventral do visitante, local que, com frequência, é contatado pelo estigma. Este tipo de polinização é denominado de polinização vibrátil (“buzz pollination”, Buchmann 1983).

O gênero *Tibouchina* pertence à tribo Melastomeae, sendo o gênero neotropical de mais ampla distribuição e com maior número de espécies com fruto capsular dentro das Melastomataceas (Renner 1993). Com cerca de 240 espécies, este gênero pode ser encontrado desde o oeste do México até o nordeste da Argentina e Paraguai (Todzia & Almeida 1991, Guimarães & Martins 1997). No Brasil, estudos sobre a biologia reprodutiva e da polinização foram conduzidos nas espécies *T. pulchra* (Silva 2006), *T. cerastifolia*, *T. clinopodifolia* e *T. gracilis* (Franco 2007) e indicam que estas espécies são autocompatíveis, mas dependem dos polinizadores para sua reprodução. Esse sistema reprodutivo também é mencionado para *T. sellowiana* e *T. semidecandra* (Goldenberg & Varassin 2001) e *T. stenocarpa* (Goldenberg & Shepherd 1998).

O objetivo deste trabalho foi estudar a biologia da polinização e da reprodução de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) em dois pontos de gradiente altitudinal na Mata Atlântica no sudeste brasileiro situados no: Núcleo Santa Virgínia e Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba do Parque Estadual da Serra do Mar, comparando: 1) a fenologia, 2) a biologia da polinização, 3) o sistema reprodutivo e 4) as abelhas visitantes desta espécie nos dois locais do gradiente. A hipótese *a priori* deste estudo é de que, devido às diferenças ambientais, haja menor diversidade e abundância de polinizadores na região de maior altitude e como consequência: 1) menor quantidade de pólen atinge os estigmas, e 2) para assegurar formação de sementes é esperada a ocorrência de autogamia independente dos polinizadores nestas populações.

## **Metodologia**

### *Área de estudo*

O estudo foi desenvolvido no Parque Estadual da Serra do Mar no Núcleo Santa Virgínia (NSV) e no Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba (NDP) ambos situados no litoral norte do estado de São Paulo (figura 1). A região serrana do litoral norte do estado de São Paulo, parte da cadeia de montanhas conhecida como Serra do Mar, representa uma escarpa erosiva constituída por rochas granito-gnáissicas, com perfis retilíneos de grandes desníveis e vertentes entalhadas por numerosas ravinas. Os granitos são rochas resistentes que geralmente resultam em formas de cristas, nas maiores altitudes, enquanto os vales são entalhados em rochas menos resistentes, como xistos e filitos (Almeida 1964).

O NSV situa-se na região de escarpas e reversos da Serra do Mar, no Planalto de Paraitinga-Paraibuna próximo ao município de São Luís do Paraitinga-SP, entre altitudes que variam de 870 m a 1.100 m (Tabarelli & Mantovani 1999). De acordo com Veloso *et al.* (1991), a vegetação pode ser classificada como Floresta Ombrófila Densa Montana. Conforme classificação climática de Köppen (1948) o clima regional é tropical temperado sem estação seca (Tabarelli & Mantovani 1999). A precipitação média anual é de 2.180 mm, sendo os meses mais úmidos: dezembro, janeiro e fevereiro; e os menos chuvosos: junho, julho e agosto. Mesmo nos meses menos chuvosos a precipitação média mensal nunca é inferior a 60 mm (Tabarelli & Mantovani 1999). Nos anos de 2008 e 2009 a precipitação mensal média foi de 142 mm e 203

mm, a temperatura média foi de 15,9°C e 16,2 °C (figura 2) e a velocidade do vento de 4,8m/s e 4,6m/s respectivamente (fonte: CPTEC, disponível em <http://satelite.cptec.inpe.br/PCD/>, acesso em 15/02/2010).

O NDP localiza-se próximo ao município de Ubatuba-SP, na planície costeira, estendendo-se da orla do mar até o sopé das montanhas que formam a Serra do Mar. A vegetação da área é considerada como Floresta Ombrófila Densa (Veloso *et al.* 1991). O clima desta região é classificado, segundo Köppen (1948), como tropical chuvoso, apresentando uma estação superúmida de outubro a abril, com precipitação média superior a 200 mm mensais, e uma estação menos úmida de maio a setembro, com precipitação média acima de 100 mm mensais (Morellato *et al.* 2000). A precipitação mensal média anual é de 2.100 mm e a temperatura média anual é cerca de 22°C (Bencke & Morellato 2002). Nos anos de 2008 e 2009 a precipitação média foi de 143 mm e 150 mm, a temperatura média foi de 20,69°C e 21,9 °C (figura 2) e a velocidade do vento de 4,1m/s e 4,2m/s respectivamente (fonte: CPTEC, disponível em <http://satelite.cptec.inpe.br/PCD/>, acesso em 15/02/2010 às 17:14).

### *Fenologia*

As áreas de estudo foram visitadas mensalmente durante os meses de fevereiro de 2008 até março de 2009 com o intuito de definir o padrão fenológico das seguintes fenofases: emissão de botões, floração, frutificação e emissão de folhas jovens. O padrão da floração foi estabelecido de acordo com os padrões fenológicos definidos por Newstrom *et al.* (1994). A intensidade da fenofase pôde ser definida através do índice de intensidade que consiste em uma escala ordinal com valores de zero a quatro, que permite distinguir categorias (postos ou ranks) subjetivas de intensidade. Nesta escala, os valores zero, um, dois, três e quatro correspondem, respectivamente, à ausência da fenofase, 1-25%, 26-50%, 51-75% e 76-100% de intensidade. Este índice é calculado somando-se os valores de cada indivíduo em um dado mês (modificado de Bencke 1999). Quando a observação da fenologia foi repetida em meses de anos diferentes, usou-se a média dos dois valores encontrados. O pico de atividade foi considerado como o período em que a somatória dos valores atribuídos a cada fenofase foi máxima. Foram marcados e monitorados 45 indivíduos em cada área, nos quais foram acompanhados os eventos fenológicos.

### *Biologia floral, dinâmica de pólen e crescimento de tubos polínicos*

O horário, seqüência e duração da antese, presença de odor e receptividade do estigma foram determinados diretamente no campo (Dafni 1992; n=5 flores em 5 indivíduos diferentes), durante o período do pico de floração. A viabilidade do pólen foi avaliada observando-se grãos de pólen corados com carmim acético sob microscopia de luz, considerando-se o grão como viável, quando apresentava citoplasma evidenciado pelo corante. Como as flores apresentam dois tipos de anteras (grandes e pequenas), esta análise foi realizada em grãos de pólen provenientes de ambos os tipos em flores recém abertas coletadas nas populações dos dois locais (n=15 anteras de cada tipo e local em 15 indivíduos diferentes) e fixadas em solução de Formol, Ácido Acético e Álcool Etilico 70% (FAA 70%). Para estimar a produção de pólen por cada tipo de antera, flores recém abertas foram coletadas nos dois locais, sendo retiradas uma antera grande e uma pequena de posições diferentes (n= 15 anteras de cada tipo e local em 15 indivíduos) e foram fixadas em FAA 70%. No laboratório, os grãos de pólen foram cuidadosamente retirados das anteras e espalhados em um hemocitômetro para a estimativa do número total de grãos.

Este procedimento também foi utilizado para estimar a disponibilidade de grãos de pólen ao longo do primeiro dia de antese em flores de ambos os locais, coletadas às 0500h, 0700h, 0900h, 1100h, 1300h e 1500h e fixadas em FAA a 70%. O número total de grãos de pólen por flor foi estimado através da quantidade de grãos de pólen disponível em uma antera grande e uma antera pequena de cada flor (n= 15 flores em 15 indivíduos para cada horário, nos dois locais). Destas flores também foram retirados os estigmas que foram diafanizados com solução de hipoclorito de sódio e posteriormente corados com azul de anilina para observação do crescimento de tubos polínicos sob microscopia de fluorescência (adaptado de Martin 1959). A carga polínica na superfície do estigma de cada flor (n= 15 flores em 15 indivíduos para cada horário, nos dois locais) foi estimada segundo o índice de carga polínica descrito por Valdivia & González-Gómez (2006, adaptado do índice de herbivoria de Dirzo & Domínguez 1995) que considera categorias de 0 – 4 com 0%, 1-10%, 11-25%, 26-50% e 51-100% da superfície estigmática coberta com grãos de pólen, respectivamente. Para cada horário foi estimado um valor médio do índice nos dois locais. Para avaliar o crescimento de tubos polínicos em tratamentos de autopolinização e polinização cruzada nos dois locais, foram realizados

experimentos de polinização manual e as flores foram coletadas 12h, 24h, 36h, 48h e 72h após cada tratamento (n=3 flores em 3 indivíduos para cada horário).

### *Sistema reprodutivo, produção e germinação de sementes*

O sistema reprodutivo foi avaliado por meio de experimentos de polinização realizados no campo nas populações dos dois locais. Os testes de polinização seguiram aqueles descritos por Radford *et al.* (1974): agamospermia - botões em pré-antese foram emasculados e ensacados; autopolinização espontânea - botões foram ensacados sem tratamento posterior; autopolinização manual - grãos de pólen foram depositados no estigma da própria flor; polinização cruzada - grãos de pólen, provenientes de flores de indivíduos diferentes, foram transferidos para o estigma de flores emasculadas de outros indivíduos; controle - foram marcados botões destinados a verificar a formação de frutos sob condições naturais. Para cada um dos testes foram utilizadas 30 flores (distribuídas em ca. 10 indivíduos), com exceção do tratamento controle em que foram utilizadas 100 flores (em ca. 20 indivíduos) em cada uma das áreas. Cerca de um mês após as polinizações foi verificada a porcentagem de frutificação em cada um dos tratamentos.

Foram coletados 18 frutos maduros produzidos por polinização natural no NSV e 21 no NDP para comparar o número de sementes produzidas. O peso total das sementes de cada fruto foi medido no laboratório e o número de sementes estimado a partir do peso médio de uma quantidade de sementes conhecida. Em outro experimento, 15 frutos provenientes dos tratamentos de autopolinização manual, polinização cruzada e controle, nos dois locais, foram coletados quando maduros. As sementes de cada um dos frutos foram espalhadas uniformemente em papel quadriculado e a proporção de sementes fertilizadas foi estimada. Destas, 30 sementes de cada tratamento e de cada local foram espalhadas sobre papel filtro umedecido e depois de 17-21 dias as sementes que emitiram cotilédones foram contadas e a proporção de sementes germinadas foi estimada.

### *Visitantes florais e polinizadores*

As observações foram feitas durante o período de floração e abrangendo o período do dia de maior atividade dos visitantes: das 0500 h às 1500 h. Foram feitas observações em seis a 12

flores ao longo de seis dias não consecutivos em cada área, totalizando 60 horas em cada local. Os visitantes florais que durante as visitas às flores contataram o estigma e as anteras foram considerados polinizadores. A cada visita dos polinizadores, o valor da umidade relativa do ar e da temperatura foi anotado.

Foram registradas as frequências de visitas de todas as abelhas visitantes, de hora em hora durante o período estabelecido. A importância de cada visitante em relação à polinização foi determinada através dos valores de frequência relativa de visitas e de contato com o estigma.

O comportamento dos visitantes foi interpretado através de observação visual direta ou da análise de fotografias. Os insetos visitantes foram capturados com rede entomológica, colocados em frascos de vidro com acetato de etila, devidamente registrados com o nome ou número da planta visitada, o horário de coleta e as condições ambientais (temperatura e umidade) no momento da coleta. Após este processo os espécimes foram montados em laboratório e etiquetados.

A identificação das abelhas foi feita, quando possível, até o nível de espécie ou gênero, através de literatura especializada, ajuda de especialista ou comparação com coleções de referência do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC), onde os espécimes foram depositados. Exsiccatas das plantas foram depositadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC).

#### *Análise estatística*

Aspectos como a viabilidade do pólen, a quantidade de pólen nas flores, proporção de sementes fertilizadas e proporção de sementes germinadas foram comparados através de ANOVA de dois fatores com os dados ranqueados, conforme proposto por Zar (1996), uma vez que, por meio de teste de Shapiro-Wilk, foi detectado desvio da distribuição normal nesses dados (viabilidade do pólen – SW=0,925,  $p<0,05$ ; quantidade de pólen nas flores - SW=0,904,  $p<0,001$ ; proporção de sementes fertilizadas - SW=0,935,  $p<0,001$ ; proporção de sementes germinadas - SW=0,882,  $p<0,001$ ). Os fatores considerados foram: local e tipo de antera, para a viabilidade do pólen; local e horário, para a quantidade de pólen nas flores e local e tratamento para a proporção de sementes fertilizadas e proporção de sementes germinadas. O teste *post hoc*

de Bonferroni com os dados ranqueados foi utilizado para comparações múltiplas nos fatores com mais de dois níveis, quando necessário. A quantidade de pólen nas anteras grandes e pequenas foi comparada pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. A comparação entre o número de frutos produzidos em condições naturais nos dois locais foi feita através de teste Qui-quadrado de Pearson. A produção de sementes nestes frutos foi comparada pelo teste ANOVA, pois estes dados não se desviam de uma distribuição normal ( $SW=0,969$ ,  $p=0,348$ ). Para todos os testes foi assumido um intervalo de confiança de 95% e foi utilizado o software Systat11 (Systat Software Inc., Point Richmond, CA).

## **Resultados**

### *Fenologia*

Os indivíduos das duas áreas estudadas emitem folhas jovens durante todo o ano, mas com o início da emissão dos botões, seguido da floração e produção de frutos, as plantas diminuem a intensidade de produção de folhas novas. Nas duas áreas estudadas a emissão de botões, a floração e a produção de frutos de *Tibouchina pulchra* está concentrada na estação mais chuvosa (figura 2 e 3).

Houve assincronia fenológica reprodutiva das populações de *T. pulchra* nas duas áreas estudadas. Na população do NSV a fenologia de floração é posterior (janeiro-junho) à da população do NDP (dezembro-abril), com pico de floração em março e em fevereiro, respectivamente. Porém, no NSV a intensidade da floração (somatória dos índices de intensidade = 102) é maior que no NDP (somatória dos índices de intensidade = 77). Além disso, nas plantas do NSV a floração durou 6 meses, enquanto no NDP a floração durou apenas 5 meses. Porém, no NSV o pico de frutificação das plantas teve somatória dos índices de intensidade de apenas 20, enquanto que no NDP essa somatória foi de 137. A amplitude da curva de frutificação também foi menor no NSV, onde foi possível observar frutos nas plantas durante os meses de fevereiro-agosto, enquanto que no NDP os frutos permaneceram nas plantas de janeiro-novembro.

*Biologia floral, dinâmica de pólen e crescimento de tubos polínicos*

*Tibouchina pulchra* possui flores brancas com bordas arroxeadas, do tipo aberto (figura 4A) e produzem perfume agradável e fraco. A antese inicia por volta das 0500h, ocasião em que o estigma está receptivo. Possuem estames heteromórficos com anteras falciformes de diferentes tamanhos (heteranteria), poricidas e o pólen é retirado somente por vibração (“buzz pollination” *sensu* Buchmann 1983). O pólen é o único recurso oferecido pelas flores. De dois a três dias subsequentes à antese o estigma não é mais receptivo e as anteras não contém mais pólen. Além disso, a cor das flores muda gradualmente para tons rosa/arroxeados e no quarto dia os elementos florais se desprendem.

Considerando os dois locais, a quantidade de grãos de pólen nas anteras grandes, que possuem em média  $2,07 \times 10^5 \pm 1,09 \times 10^5$  grãos de pólen, é maior que nas anteras pequenas, com  $1,78 \times 10^5 \pm 1,29 \times 10^5$  grãos de pólen ( $W=222$ ,  $p=0,022$ ). Por outro lado, ao longo do primeiro dia de antese das flores coletadas nos dois locais, a quantidade de grãos de pólen nas anteras foi diferente entre os horários de coleta ( $F_{(5,168)}= 17,296$ ,  $p<0,001$ ), entre os locais ( $F_{(1,168)}= 78,981$ ,  $p<0,001$ ) e houve interação entre os dois fatores ( $F_{(5,168)}= 12,226$ ,  $p<0,001$ ), indicando que o padrão de variação ao longo do tempo é diferente nos dois locais (figura 5A). No início do dia, a quantidade de grãos de pólen nas flores do NSV é menor que nas do NDP ( $t=2,659$ ;  $p<0,05$ ). Porém esse padrão não se mantém: a quantidade de grãos de pólen nas flores permanece quase que inalterada ao longo do dia no NSV enquanto que no NDP a quantidade de pólen decresce. Por outro lado, a dinâmica de deposição da carga polínica nos estigmas indica que no NSV as flores praticamente não recebem grãos de pólen ao longo do dia enquanto que no NDP a carga polínica aumenta, atingindo quase a saturação da superfície estigmática no final do dia (figura 5B).

A viabilidade do pólen das anteras grandes, no NSV, foi de  $97 \pm 3,37\%$  e das anteras pequenas foi de  $96 \pm 4,67\%$ . No NDP a viabilidade do pólen das anteras grandes foi de  $95 \pm 6,78\%$  e das pequenas foi de  $94 \pm 7,13\%$ . A viabilidade do pólen é semelhante independente do local ( $F_{(1,56)}=0,720$ ,  $p=0,40$ ) e do tipo do antera ( $F_{(1,56)}=0,003$ ,  $p=0,959$ ) e não há interação entre estes fatores ( $F_{(1,56)}= 0,567$ ,  $p=0,454$ ).

Os tubos polínicos parecem crescer a velocidade semelhante, independente do tratamento e do local. Nas primeiras 12 horas, os tubos crescem até quase a metade do estilete e atingem as proximidades do ovário depois de 36 horas. Em *T. pulchra*, os tubos polínicos crescem como um tubo maciço na região mediana do estilete e 48 horas após o tratamento é possível verificar tubos na região do ovário. Ao atingir o ovário o tubo maciço se reparte em cinco feixes e cada um se direciona a cada um dos cinco lóculos do ovário. Dentro de cada um dos lóculos os tubos se dispersam e somente após 72 horas foram observados tubos fertilizando os óvulos (figura 6A). Após 72 horas de tratamento, é possível visualizar alguns óvulos inchados e com certa deposição de calose na parede do saco embrionário (figura 6B).

### *Sistema reprodutivo, produção e germinação de sementes*

Nos indivíduos do NSV não houve formação de frutos por agamospermia, mas por autopolinização espontânea se desenvolveram 16% de frutos. Houve formação de frutos em 93% e 90% dos tratamentos de autopolinização manual e polinização cruzada, respectivamente (tabela 1). Por outro lado, nos indivíduos do NDP foi registrada a formação de um fruto proveniente de agamospermia, que foi abortado depois de algumas semanas. Nos tratamentos de autopolinização espontânea não houve formação de frutos. A frutificação nos tratamentos de autopolinização manual e polinização cruzada também foi alta: 84% e 86%, respectivamente (tabela 1). Nas duas áreas, a porcentagem de frutos formados em tratamentos de polinizações manuais (autopolinizações e polinizações cruzadas) é maior que em condições naturais (controle). Porém, na área de maior altitude (NSV) foram formados apenas 10% de frutos em condições naturais, enquanto que na baixada (NDP) formaram-se 79% de frutos nas mesmas condições ( $\chi^2=95,864$ ; g.l.=1;  $p<0,001$ ) (tabela 1).

A produção de sementes por fruto em condições naturais entre os dois locais foi semelhante ( $F_{(1,37)}=2,041$ ,  $p=0,161$ ). No NSV, estes frutos possuem  $3076,67\pm 1787,51$  sementes, enquanto que no NDP os frutos possuem  $3851,70\pm 1600,17$  sementes. A proporção de sementes fertilizadas foi semelhante nos dois locais ( $F_{(1,84)}= 0,021$ ;  $p=0,885$ ), mas diferiu entre os tratamentos ( $F_{(2,84)}= 4,191$ ;  $p<0,05$ ) e houve interação entre local e tratamento ( $F_{(2,84)}= 6,967$ ;  $p<0,01$ ). No NSV a proporção de sementes fertilizadas em condições naturais (controle) foi de  $0,31 \pm 0,18$ , enquanto que no NDP foi de  $0,53 \pm 0,27$  ( $t=2,635$ ;  $p<0,05$ ). A proporção de

sementes fertilizadas dos frutos provenientes de polinização cruzada foi de  $0,52 \pm 0,22$  no NSV e de  $0,32 \pm 0,16$  no NDP ( $t=2,635$ ;  $p<0,05$ ), enquanto que no tratamento de autopolinização esta taxa foi de  $0,29 \pm 0,11$  e  $0,28 \pm 0,13$ , respectivamente ( $t=0,252$ ;  $p>0,05$ ) (figura 7). Os três frutos formados no tratamento de autopolinização espontânea no NSV não formaram sementes férteis.

A proporção de sementes germinadas foi semelhante entre os locais ( $F_{(1,84)}=0,219$ ;  $p>0,05$ ) e não houve interação entre local e tratamento ( $F_{(2,84)}=2,051$ ,  $p=0,135$ ) (figura 7). Porém, houve diferença entre os tratamentos ( $F_{(2,84)}=13,944$ ,  $p>0,01$ ), sendo que a proporção de sementes germinadas no tratamento de polinização cruzada foi maior que no tratamento de autopolinização ( $t=5,190$ ;  $p<0,05$ ) e em condições naturais (controle) ( $t=4,810$ ;  $p<0,05$ ), mas não houve diferença entre a proporção de sementes germinadas do tratamento de autopolinização e de condições naturais (controle) ( $t=0,380$ ;  $p>0,05$ ).

### *Visitantes florais e polinizadores*

Comparando-se a frequência de visitas das abelhas nos dois locais estudados, esta foi muito menor no local de maior altitude (NSV) onde foram registradas apenas cinco visitas no período total de observação ao passo que no NDP foram registradas 948 visitas no período de igual duração. No NSV, as visitas observadas ocorreram em um único dia entre 1030h e 1130h. Ao passo que no NDP as visitas começam no início do dia (0530h), aumentam gradativamente, sendo que o pico de visitas ocorre entre 1000h e 1100h (figura 8), ocasião em que a umidade relativa do ar está baixa e a temperatura é relativamente amena (figura 9) e terminam por volta de 1430h (figura 8).

O número de espécies de visitantes florais também declinou com o gradiente de altitude. No NSV foram coletadas apenas duas espécies de abelhas da espécie *Bombus morio* e uma espécie pequena, ainda não identificada, mas apenas *Bombus morio* atua como polinizador. No NDP foram coletadas sete espécies de abelhas das quais *Bombus morio*, *Xylocopa brasiliatorum*, *Xylocopa frontalis*, *Epicharis* sp 1 e uma espécie não identificada atuam como polinizadores. De maneira geral, *Bombus morio* é o principal polinizador de *T. pulchra* sendo responsável por 89% das visitas, seguido de *Epicharis* sp 1 (6,2%), *Xylocopa brasiliatorum* (3%), *Xylocopa frontalis* (1,5%) e a espécie não identificada (0,2%). Durante a visita, os polinizadores agarram os elementos reprodutivos das flores de *T. pulchra* (figura 2B) e vibram os músculos das asas. Ao

mesmo tempo friccionam as anteras menores com as mandíbulas forçando a saída do pólen para a região ventral do tórax e abdômen. O pólen das anteras maiores é depositado na região dorsal e lateral do abdômen das abelhas, local onde ocorre o contato com o estigma. Abelhas pequenas (que não foram identificadas) vibram apenas uma antera por vez e são incapazes de polinizar *T. pulchra*.

## **Discussão**

A fenologia reprodutiva de *T. pulchra* está associada a estação mais chuvosa com diminuição da produção de folhas jovens nesse período, o que sugere que a espécie está alocando os recursos para a função reprodutiva. Segundo Morellato *et al.* (2000), em locais com baixa sazonalidade climática, como a Mata Atlântica, a disponibilidade hídrica é sempre alta, mesmo nos meses considerados secos. Assim, o comprimento do dia pode ser um importante fator que desencadeia a fenologia reprodutiva de espécies arbóreas. Portanto, este aspecto pode estar influenciando o padrão fenológico em *T. pulchra*, pois nos dois locais, na estação mais chuvosa, os dias são mais longos.

Segundo a definição de Newstrom *et al.* (1994) o padrão de floração de *T. pulchra* nos dois locais é anual. Porém ocorre assincronia fenológica reprodutiva entre os dois locais. A temperatura também é outro fator que pode influenciar os padrões fenológicos sazonais onde não há diferença no regime pluvial (Morellato *et al.* 2000). De fato, baixas temperaturas podem limitar a fenologia em florestas temperadas e semi-decíduas (Morellato *et al.* 1989, Morellato 1991). Assim, a assincronia da fenologia reprodutiva entre as populações destes dois locais pode estar relacionada às baixas temperaturas médias da região alta (NSV) no início da estação úmida.

Diferenças na intensidade e amplitude de floração, como aquelas observadas em *T. pulchra*, entre o NSV e o NDP, afetam o número e a atividade dos polinizadores (Buzato *et al.* 2000), ou seja, quanto maior o número de flores e o período de floração, maior a disponibilidade de recursos aos polinizadores e maior as chances de que ocorra polinização. Porém, o fato de serem produzidos poucos frutos durante um período menor no NSV parece contradizer a maior intensidade e amplitude de floração neste local.

As características da morfologia e da biologia floral de *T. pulchra* são aquelas atribuídas às flores melitófilas (*sensu* Faegri & van der Pijl 1979). O fenômeno da mudança de cor das estruturas florais no decorrer da antese de *T. pulchra* foi descrito e discutido por Silva (2006), mas a questão ainda permanece em aberto. Segundo Gori (1983), este fenômeno de mudança das características florais pós-polinização (ou ao longo da antese como ocorre em *T. pulchra*) pode aumentar o *fitness* da espécie aumentando o número de sementes produzidas devido à diminuição de visitas supérfluas a flores sem pólen e/ou cujo estigma não é mais receptivo. A permanência das flores em fases finais de antese (mudança de cor) na planta pode contribuir para a atratividade e conseqüente manutenção do interesse do polinizador por este recurso. Apesar disso, esta hipótese permanece não testada de forma sistemática para espécies de *Tibouchina* cujas flores mudam de cor. Nesses experimentos as mudanças nas características florais (como cor e odor) devem ser consideradas do ponto de vista cognitivo do polinizador (*cf.* Chittka & Thomson 2003).

Apesar de não haver diferença na viabilidade do pólen entre os dois tipos de anteras, as anteras grandes de *Tibouchina pulchra*, destinadas à polinização, produzem mais grãos de pólen. A diferença no tamanho e formato das anteras (heteranteria), como a que ocorre em *T. pulchra*, tem sido associada a uma “divisão de trabalho” em que um tipo de antera (pequeno) atrai polinizadores e satisfaz sua demanda por pólen e o outro tipo de antera (grande) satisfaz a necessidade das plantas de dispersar gametas intactos (Vallejo-Marín *et al.* 2009, Luo *et al.* 2009). A deposição dos grãos de *T. pulchra* na porção lateral e no dorso do polinizador, torna a coleta e a manipulação dos grãos menos eficiente (Vallejo-Marín *et al.* 2009) e são os locais contatados pelo estigma. Assim, a maior quantidade de grãos de pólen nas anteras destinadas a polinização indica que a “divisão de trabalho” pode ocorrer em *T. pulchra*. Porém, métodos mais eficazes na determinação da viabilidade polínica e capacidade de germinação, como aqueles descritos por Dafni (2005), devem ser usados para testar esta idéia de forma mais concreta.

O crescimento dos tubos polínicos foi semelhante ao que ocorreu em *T. cerastifolia*, *T. clinopodifolia* e *T. gracilis* (Franco 2007) com apenas um único tubo crescendo por grão de pólen e ocorreu entre 12h e 48h após os dois tipos de tratamentos. A semelhança na velocidade do crescimento dos tubos polínicos em tratamentos de autopolinização e de polinização cruzada pode indicar que não há sítios de reações de autoincompatibilidade nesta espécie.

Os experimentos de biologia reprodutiva indicam que em ambos os locais *T. pulchra* é autocompatível, mas não apomítica. Este resultado está de acordo com aqueles apresentados em outros estudos realizados na Mata Atlântica para *T. pulchra* (Silva 2006), *T. cerastifolia*, *T. clinopodifolia* e *T. gracilis* (Franco 2007) e *T. semidecandra* (Goldenberg & Varassin 2001). Goldenberg & Shepherd (1998) e Goldenberg & Varassin (2001) observaram que *T. stenocarpa* e *T. sellowiana*, respectivamente, possuem autocompatibilidade e tem capacidade de autopolinização espontânea, porém a viabilidade das sementes produzidas neste tratamento não foi testada. Em *T. pulchra* alguns frutos formados nos tratamentos de agamospermia ou autopolinização espontânea nos dois locais, ou foram abortados ou não produziram sementes férteis, evidenciando que esta espécie necessita de polinizadores para reprodução. Segundo Almeda (1977/1978 *apud* Renner 1989), movimentos vigorosos das flores em condições de vento e chuva podem levar à liberação de pólen das anteras poricidas e permitir a autopolinização espontânea em algumas espécies de Melastomataceae, mesmo em condições de hercogamia pronunciada. Além disso, gotículas de água carregando pequenas quantidades de pólen também podem ser uma via para a autopolinização espontânea. Quando grãos de pólen atingem o estigma, liberam hormônios de crescimento e estimulam o desenvolvimento do ovário (Stephenson 1981) mesmo que a carga polínica não seja suficiente para a produção e maturação das sementes. Isso pode explicar a formação de frutos sem sementes nos tratamentos de autopolinização espontânea como ocorreu no NSV.

Os resultados obtidos nos experimentos de dinâmica de retirada de pólen podem ser compreendidos quando associados à dinâmica de atividade dos polinizadores nos dois locais. No NSV raramente as flores são visitadas por abelhas capazes de promover polinização e por isso é muito baixa a retirada de pólen das anteras e também é baixa sua deposição nos estigmas. No NDP a atividade dos polinizadores, a retirada e a deposição de pólen são ao inverso: há grande quantidade de visitas por polinizadores de diferentes espécies, a quantidade de pólen retirado das anteras é alta, quase esgotando o pólen no final do dia e a carga polínica nos estigmas é alta, saturando-o de pólen. Maior frequência de visitas das abelhas a *T. pulchra* coincide com baixa umidade relativa do ar e temperatura amena assim como mencionado para *T. cerastifolia*, *T. clinopodifolia* e *T. gracilis* (Franco 2007). Este fato seria influenciado pela facilidade na obtenção dos grãos de pólen, uma vez que com baixa umidade relativa o pólen se desagregaria e facilitaria sua retirada das anteras com o comportamento de vibração, o que não aconteceria nas

primeiras horas da manhã com umidade do ar mais alta e temperatura mais baixa (Franco 2007). A diminuição das visitas a *T. pulchra* depois deste período de alta atividade, provavelmente é devido à diminuição da quantidade de pólen nas anteras. *Bombus morio* foi o principal polinizador de *T. pulchra* nos dois locais. A importância desta espécie de abelha na polinização de sistemas tanto de baixas quanto de altitudes mais elevadas na Mata Atlântica tem sido relatada por diversos autores (Brito *et al.* 2010, Pinheiro & Sazima 2007, Freitas & Sazima 2006).

Em condições naturais, os frutos de *T. pulchra* do NSV possuem menos sementes fertilizadas que os frutos do NDP. Isso provavelmente ocorre porque no NSV há menos visitas à mesma flor que no NDP e poucas visitas não são suficientes para fertilizar todos os óvulos, aspecto registrado em *Cambessedesia hilarianai* (Melastomataceae) na qual a quantidade de visitas aumentou a quantidade de sementes fertilizadas (Fracasso e Sazima 2004). Assim, a proporção de sementes fertilizadas em condições naturais após um número maior de visitas seria um aspecto interessante a ser estudado em *T. pulchra*, pois poderia mostrar qual o polinizador mais efetivo para esta espécie e se este polinizador varia no gradiente de altitude.

Por outro lado, a proporção de sementes germinadas nos dois locais em condições naturais é semelhante. Isto corrobora os resultados de viabilidade polínica (que é semelhante) e sugere que em ambos os locais a viabilidade dos óvulos também é igual. Além disso, a viabilidade do pólen é comprovada pelos experimentos com tubos polínicos que crescem e atingem os óvulos, independente da origem dos grãos de pólen (autopolinização ou polinização cruzada). *T. pulchra* é considerada uma espécie pioneira, assim como outras espécies deste gênero (Silva 2006, Franco 2007, Zaia & Takaki 1998). Assim, mesmo com taxas de germinação não muito altas (*cf.* Zaia & Takaki 1998), a quantidade de sementes viáveis produzidas por um único indivíduo pode ser suficientemente alta para garantir seu sucesso reprodutivo seja por autopolinização ou por polinização cruzada. Além disso, na presença de fotoperíodo, suas sementes são capazes de germinar depois de 12 meses (Zaia & Takaki 1998) ou mesmo depois de 2 anos (dados não apresentados).

A formação de frutos em condições naturais e os resultados da dinâmica de retirada e deposição de pólen indicam que as flores do NSV sofrem maior limitação na quantidade de pólen que atinge os estigmas (limitação de transferência de pólen) e explicam a pequena frutificação neste local. A hipótese de maior limitação de pólen com o aumento da altitude foi

comprovada em ambientes andinos e alpinos (Arroyo *et al.* 1985, Totland 1993), porém estes dados nunca foram testados para espécies em florestas tropicais. Segundo estes autores, maior limitação do pólen estaria relacionada à diminuição da densidade e atividade dos polinizadores em altitudes mais elevadas, principalmente de abelhas. De fato, a riqueza e abundância de polinizadores em *T. pulchra* são menores no NSV e evidenciam essa limitação da transferência do pólen em maiores altitudes (Duan *et al.* 2007). Segundo Gugerli (1998) e Bliss (1971) esta redução de polinizadores é principalmente consequência de condições abióticas extremas como baixas temperaturas, diminuição das estações de crescimento e ventos fortes, fato que pode estar ocorrendo no NSV. A baixa frequência de visitas e consequente limitação transferência de pólen pode ser um dos fatores que afetam a diversidade genética em populações de plantas ao longo de gradiente altitudinal (Semagn *et al.* 2000, Yan *et al.* 2009). Esse aspecto permanece ainda sem ser estudado em espécies nativas brasileiras e *T. pulchra*, por ser abundante, é um bom modelo para este tipo de estudo (ver Capítulo III).

*Tibouchina pulchra* não garante o seu sucesso reprodutivo por autopolinização espontânea ou apomixia na altitude mais elevada onde os polinizadores são escassos, como prevê a hipótese da segurança reprodutiva (Lloyd & Schoen 1992). Segundo esta hipótese a transição da polinização cruzada para a auto-polinização espontânea ou apomixia ocorre com frequência em locais onde a polinização cruzada é cronicamente baixa ou temporariamente impossibilitada seja pela ausência de indivíduos coespecíficos, seja pela falta de polinizadores (Charlesworth & Charlesworth 1987), e garantem o sucesso reprodutivo nessas condições (Lloyd & Schoen 1992). Além disso, evitando o “custo da meiose”, a autopolinização é uma “vantagem seletiva automática” (Jain 1976), porque as sementes provindas deste sistema reprodutivo terão duas cópias dos genes maternos, enquanto que teriam apenas uma no sistema de polinização cruzada.

Ao contrário da segurança reprodutiva, os resultados sugerem que outros mecanismos podem balancear a limitação de transferência de pólen no NSV. As observações fenológicas indicam que no NSV a florada é mais pronunciada que no NDP. De fato, a produção de mais flores e consequentemente o aumento na intensidade e amplitude de florada pode aumentar a atratividade para os polinizadores, bem como a abundância e a atividade dos polinizadores (Mitchell *et al.* 2004, Buzato *et al.* 2000). Porém, devido às poucas categorias utilizadas neste estudo para detectar a intensidade das fenofases, esta hipótese deveria ser testada por um método

mais detalhado, como contagem de flores em cada um dos indivíduos para obter a intensidade de floração numa escala mais fina. Outra hipótese que deveria ser testada posteriormente é a de que no NSV as flores de *T. pulchra* são maiores que no NDP e uma vez que os polinizadores tendem a visitar espécies com flores maiores ao invés de menores (Geber 1985), isto deveria favorecer o aumento do tamanho da flor onde polinizadores são escassos.

Outro mecanismo que balanceia a limitação de transferência de pólen no NSV é a produção de menos grãos de pólen (em relação ao NDP), diminuindo o “custo da meiose” no local onde a polinização é mais incerta. Além disso, evita o fenômeno conhecido como “desconto de pólen” (pollen discounting *sensu* Harder & Wilson 1998), ou seja, diminuição do sucesso reprodutivo por cruzamento por causa de autopolinização. Por outro lado, houve maior proporção de sementes fertilizadas por polinização cruzada no NSV, o que levaria a menor depressão endogâmica e maior vigor dos híbridos (Lloyd 1992).

Segundo Pannel & Barret (1998), fatores da história de vida também podem diminuir as pressões seletivas em espécies com falta de segurança reprodutiva. Entre estes estão: a condição de espécie perene, com vários eventos reprodutivos durante a vida (iteroparidade) que garante que uma espécie continue se reproduzindo após um ano mal sucedido; e a capacidade de produzir banco de sementes viáveis por muitos anos que permite que sementes que não germinaram no começo de uma estação de crescimento possam sobreviver para germinar em estações posteriores. Este parece ser o caso das populações de *T. pulchra* no NSV, uma espécie de floração anual, que produz muitas sementes viáveis com capacidade de dormência e que garante seu sucesso reprodutivo mesmo na escassez de polinizadores (limitação de transferência de pólen).

## Referências

- ALMEIDA F.F.M. 1964. Os fundamentos geológicos do relevo paulista. Série teses e monografias 14. Instituto de Geografia/Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ARROYO M.T.K., ARMESTO J.J. & PRIMACK R.B. 1985. Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of Central Chile II. Effect of temperature on

- visitation rates and pollination possibilities. *Plant Systematics and Evolution* 149: 187–203.
- BAWA K.S. 1990. Plant - pollinator interactions in tropical rain forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 399-422.
- BELL K.L. & BLISS L.C. 1980. Plant reproduction in a high arctic environment. *Arctic and Alpine Research* 12: 1-10.
- BLISS L.C. 1971. Arctic and alpine plant life cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics* 2: 405-438
- BENCKE C.C. 1999. Estudo comparativo do comportamento fenológico de espécies arbóreas em três áreas de Floresta Atlântica no litoral norte do estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro.
- BENCKE C.C. & MORELLATO P.L.C. 2002. Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Revista Brasileira de Botânica* 25 (3): 269-275.
- BRITO V. L. G., PINHEIRO M. & SAZIMA M. 2010. *Sophora tomentosa* e *Crotalaria vitellina* (Fabaceae): biologia reprodutiva e interações com abelhas na restinga de Ubatuba, São Paulo. *Biota Neotropica* 10(1).
- BROWN B.J., MITCHELL R.J. & GRAHAM S.A. 2002. Competition for pollination between an invasive species (purple loosestrife) and a native congener. *Ecology* 83: 2328–2336.
- BUCHMANN S.L. 1983. Buzz pollination in Angiosperms. *In Handbook of experimental pollination biology* (C.E. Jones & R.J. Little, eds.). Van Nostrand Reinhold, New York, p.73-113.
- BUZATO S., SAZIMA M. & SAZIMA I. 2000. Hummingbird-Pollinated Floras at Three Atlantic Forest Sites. *Biotropica*: 32 (4): 824-841.
- CHARLESWORTH D., & CHARLESWORTH B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 237–268.
- CHITTKA L. & THOMSON J.D. 2003. *Cognitive Ecology of Pollination*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

- DAFNI A. 1992. *Pollination Ecology - A practical approach*. Oxford University Press, Oxford.
- DAFNI A., PACINI E. & NEPI M. 2005. Pollen and stigma biology. *In Practical Pollination Biology* (A. Dafni, P.G. Kevan & B.C. Husband, eds). Enviroquest, Cambridge, p. 83-146.
- DEVOTO M., MEDAN D. & MONTALDO N.H. 2005. Patterns of interaction between plants and pollinators along an environmental gradient. *Oikos* 109: 461-472.
- DUAN Y.W., ZHANG T.F. & LIU J.Q. 2007. Interannual fluctuations in floral longevity, pollinator visitation and pollination limitation of an alpine plant at two altitudes. *Plant Systematics and Evolution* 267: 255-265.
- FAEGRI K. & VAN DER PIJL L. 1979. *The principles of pollination ecology*. Pergamon Press, Oxford.
- FRACASSO C.M. & SAZIMA M. 2004. Polinização de *Cambessedesia hilariana* (Kunth) DC.(Melastomataceae): sucesso reprodutivo versus diversidade, comportamento e frequência de visitas de abelhas. *Revista Brasileira de Botânica* 27(4): 797-804.
- FRANCO A.L.M. 1995. *Ecologia da polinização e biologia reprodutiva de sete espécies de Phaseoleae (Fabaceae)*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- FRANCO A.M. 2007. *Biologia reprodutiva de três espécies de Melastomataceae (Tibouchina cerastifolia Cogn., T. clinopodifolia Cogn. e T. gracilis Cogn.) nos Mananciais da Serra, Piraquara, Paraná*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- FREITAS L. & SAZIMA M. 2006. Pollination biology in a tropical high-altitude grassland in Brazil: interaction at the community level. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 93: 465-516.
- GEBER M.A. 1985. The relationship of plant size to self-pollination on *Mertensia ciliata*. *Ecology* 66(3): 762-772.
- GOLDENBERG R. & SHEPHERD G.J. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in “cerrado” vegetation. *Plant Systematics and Evolution* 211(1): 13-29.

- GOLDENBERG R. & VARASSIN I.G. 2001. Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, Jundiá, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 24: 283-288.
- GORI D.F. 1983. Post-pollination phenomena and adaptative floral changes. *In Handbook of experimental pollination biology* (C.E. Jones & R.J. Little, eds.). Van Nostrand Reinhold, New York, p.31-49.
- GUGERLI F. 1998. Effect of elevation on sexual reproduction in alpine populations of *Saxifraga oppositifolia* (Saxifragaceae). *Oecologia* 114 (1): 60-66
- GUIMARÃES P.J.F. & MARTINS A.B. 1997. *Tibouchina* sect. *Pleroma* (D. Don) Cogn. (Melastomataceae) no estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 2(1): 11-33.
- HARDER L.D. & WILSON W.G.. 1998. A clarification of pollen discounting and its joint effects with inbreeding depression on mating system evolution. *American Naturalist* 152: 684-695.
- IUCN. 1986. *Plants in Danger. What do we know?* Cambridge.
- JAIN S.K. 1976. The evolution of inbreeding in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 7: 469–495.
- KEARNS C.A., INOUE D.W. & WASER N.M. 1998. Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 83–112.
- KREMEN C. & RICKETTS T. 2000. Global perspectives on pollination disruptions. *Conservation Biology* 14: 1226–1228.
- KREMEN C., WILLIAMS N.M., BUGG R.L., FAY J.P. & THORP R.W. 2004. Estimating the area requirements of an ecosystem service, crop pollination. *Ecological Letters* 7: 1109–1119.
- KÖPPEN W. 1948. *Climatologia*. Fondo de Cultura Económica, México.
- LLOYD D.G. & SCHOEN D.J. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Science* 153: 358–369.

- LLOYD D.G. 1992. Self- and Cross-Fertilization in Plants. II. The Selection of Self-Fertilization. *International Journal of Plant Sciences* 153, no. 3: 370.
- LUO Z.L, GU L. & ZHANG D.X. 2009. Intrafloral differentiation of stamens in heterantherous flowers. *Journal of Systematics and Evolution* 47(1): 43–56.
- MARTIN F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technol* 34(3): 125-128.
- MARTINS E. 1997. Revisão taxonômica do gênero *Trembleya* DC. (Melastomataceae). Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MITCHELL R.J., KARRON J.D., HOLMQUIST K.G. & BELL J.M. 2004. The influence of *Mimulus ringens* floral display size on pollinator visitation. *Func. Ecol.* 18(1): 116-124.
- MOLAU U. 1993. Relationships between flowering phenology and life history strategies in tundra plants. *Arctic and Alpine Research* 25: 391-402.
- MORAES P.L.R., MONTEIRO R. & VENCOVSKY R. 1999. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 22 (2): 237-248.
- MORELLATO L.P.C. 1991. Estudo da fenologia de árvores, arbustos e lianas de uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. Tede de Doutorado (Ecologia), UNICAMP, Campinas, Brasil.
- MORELLATO L.P.C., RODRIGUES R.R., LEITÃO-FILHO H.F. & JOLY C. 1989. Estudo comparativo da fenologia de espécies arbóreas de floresta de altitude e floresta mesófila semidecídua na Serra do Japi, Jundiai, São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 12 (1/2): 85-98.
- MORELLATO L.P., TALORA D.C., TAKAHASI A., BENCKE C.C., ROMERA E.C. & ZIPPARRO, V.B. 2000. Phenology of Atlantic Rain Forest Trees: A Comparative Study. *Biotropica* 32 (4b): 81 1-823.
- NEWSTROM L.E., FRANKIE G.W. & BAKER H.G. 1994. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland Tropical Rain Forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* 26 (2): 141-159.

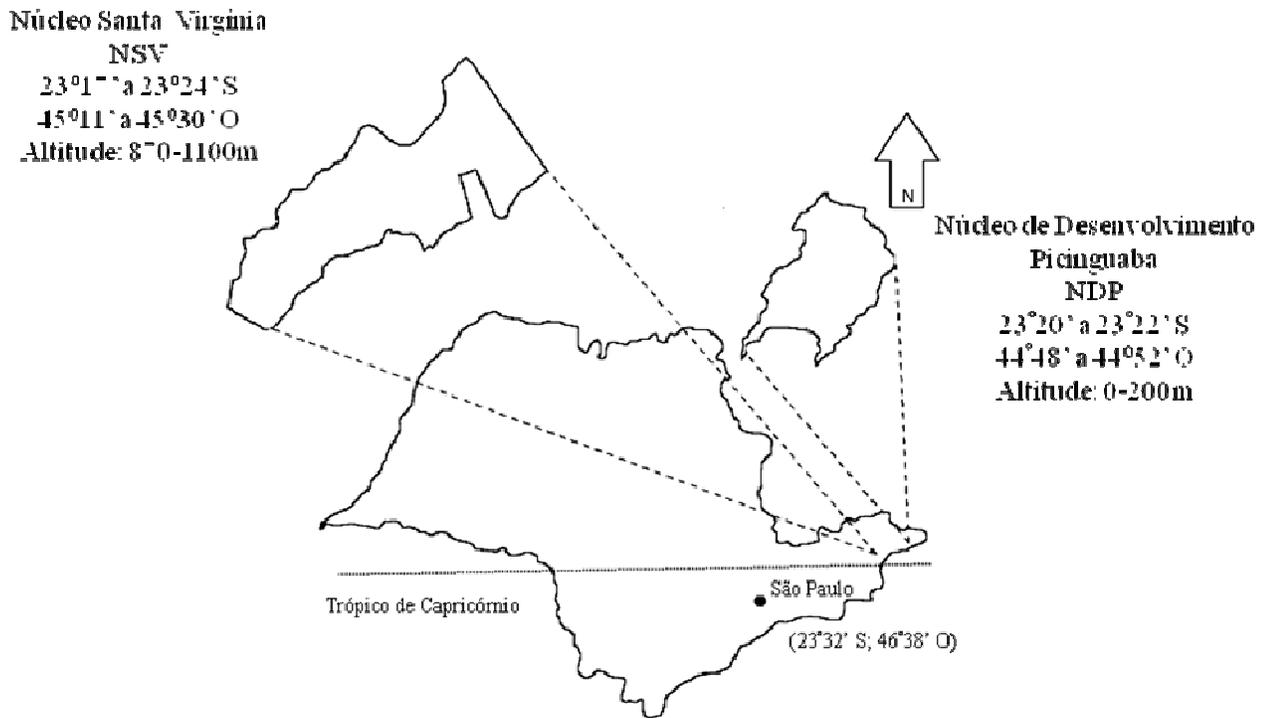
- PANNELL J.R. & BARRET S.C.H. 1998. Baker's Law Revisited: Reproductive Assurance in a Metapopulation. *Evolution* 52(3): 657-668.
- PINHEIRO M. & SAZIMA M. 2007. Visitantes florais e polinizadores de seis espécies arbóreas de Leguminosae melitófilas na Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. *Rev. Bras. Bioc.* 5(1): 447-449.
- POTTS S.G., PETANIDOU T., ROBERTS S., O'TOOLE C., HULBERT A. & WILLMER P. 2006. Plant-pollinator biodiversity and pollination services in a complex Mediterranean landscape. *Biological Conservation* 129 (4): 519-529.
- PRICE M.V. & WASER N.M. 1998. Effects of experimental warming on plant reproductive phenology in a subalpine meadow. *Ecology* 79: 1261–1271.
- RADFORD A.E., DICKISON W.C., MASSEY J. R. & BELL C.R. 1974. *Vascular plant systematics*. New York: Harper & Row.
- RENNER S.S. 1989. A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76: 469-518.
- RENNER S.S. 1993. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. *Nordic Journal of Botany* 13: 519-540.
- RIBEIRO M.C., METZGER J.P., MARTENSEN A.C., PONZONI F.J. & HIROTA M.K. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141–1153.
- RICKETTS T.H. 2004a. Tropical forest fragments enhance pollinator activity in nearby coffee crops. *Conservation Biology* 18: 1262-1271.
- RICKETTS T.H. 2004b. Do tropical forest fragments enhance pollinator activity in nearby coffee crops? *Conservation Biology* 18: 1–10.
- SANDVIK S.M., TOTLAND O. & NYLEHN, J. 1999. Breeding system and effects of plant size and flowering time on reproductive success in the alpine herb *Saxifraga stellaris* L. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 31 (2): 196-201.

- SEMAGN K., BJORNSTAD A., STEDJE B. & BEKELE E. 2000. Comparison of multivariate methods for the analysis of genetic resources and adaptation in *Phytolacca dodecandra* using RAPD. TAG Theoretical and Applied Genetics 101(7): 1145-1154.
- SILVA J.B. 2006. Biologia das interações entre os visitantes florais (Hymenoptera, Apidae) e *Tibouchina pulchra* Cong. (Melastomataceae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- STEPHENSON A.G. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. Annual Review of Ecology and Systematics 12(1): 253–279.
- TABARELLI M. & MANTOVANI W. 1999. A riqueza da floresta Atlântica de encosta no estado de São Paulo (Brasil). Revista Brasileira de Biologia 59 (2): 239-250
- TODZIA C.A. & ALMEIDA F. 1991. A revision of *Tibouchina* sect. *Lepidotae* (Melastomataceae:Tibouchinae). Proceedings of the California Academy of Sciences 47 (6): 175-206.
- TOTLAND Ø. (1993) Pollination in alpine Norway: flowering phenology, insect visitors, and visitation rates in two plant communities. Canadian Journal of Botany 71: 1072–1079.
- VALDIVIA C.E. & GONZÁLEZ-GÓMEZ P.L. 2006. A trade-off between the amount and distance of pollen dispersal triggered by the mixed foraging behaviour of *Sephanoides sephaniodes* (Trochilidae) on *Lapageria rosea* (Philesiaceae). Acta Oecologica 29 (3): 324-327.
- VALLEJO-MARÍN M., MANSON J.S., THOMSON J.D. & BARRETT S.C.H. 2009. Division of labour within flowers: heteranthery, a floral strategy to reconcile contrasting pollen fates. Journal of Evolutionary Biology 22(4): 828-839.
- VELOSO H.P., RANGEL-FILHO A.L.R. & LIMA J.C.A. 1991. Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro.
- WATANABE M.E. 1994. Pollination worries rise as honey bees decline. Science 265: 1170.
- YAN X.B., GUO Y.X., ZHAO C., LIU F.Y. & LU B.R. 2009. Intra-population genetic diversity of two wheatgrass species along altitude gradients on the Qinghai-Tibetan Plateau: its implication for conservation and utilization. Conservation Genetics 10(2): 359-367.

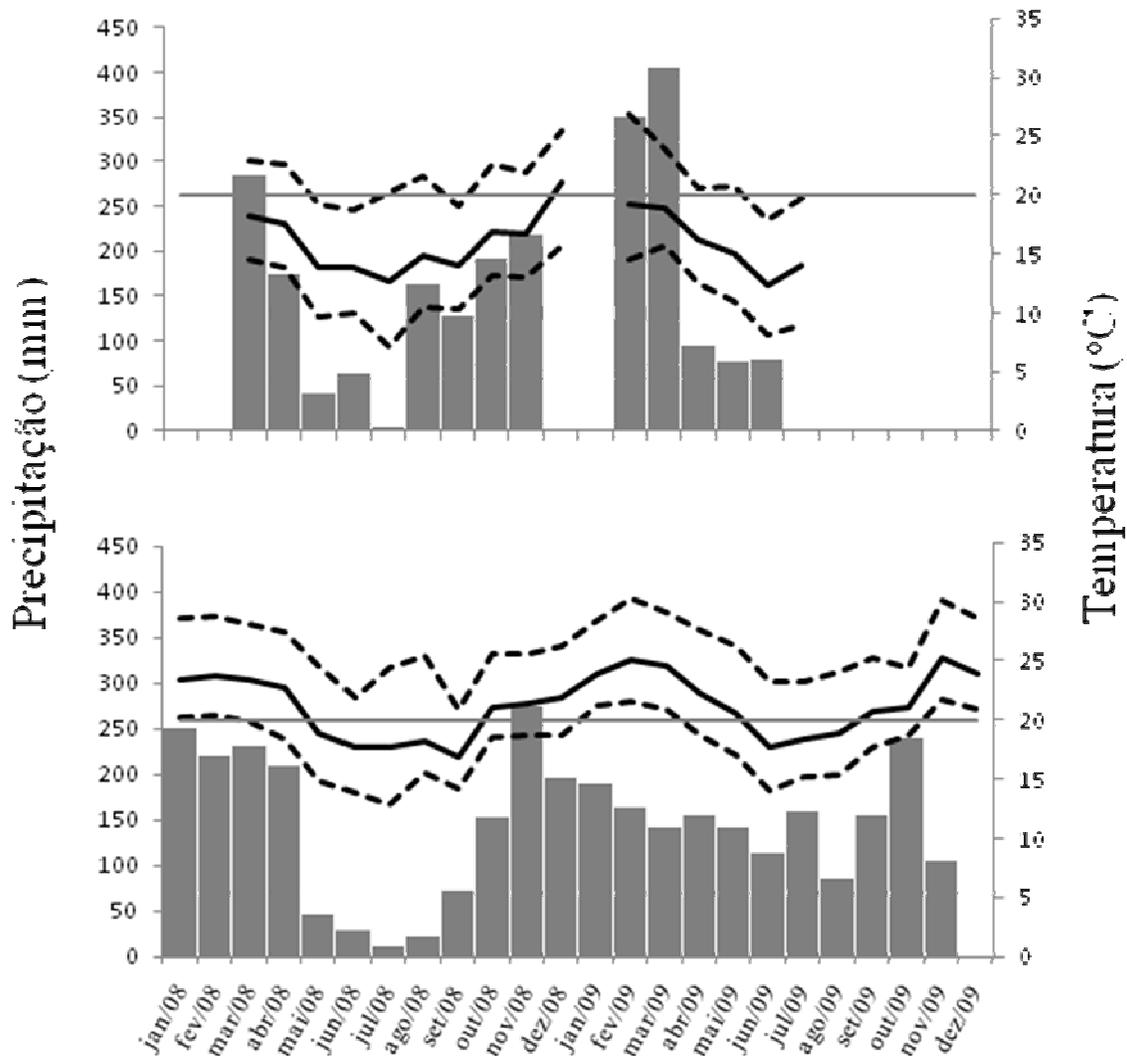
ZAIA J.E. & TAKAKI M. 1998. Estudo da germinação de sementes de espécies arbóreas pioneiras: *Tibouchina pulchra* Cong. e *Tibouchina granulosa* Cong. (Melastomataceae). Acta bot. bras. 12 (3): 221-229.

**Tabela 1.** Percentual de formação de frutos de *Tibouchina pulchra* em diferentes tratamentos no Núcleo Santa Virgínia - NSV e Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba - NDP. Entre parêntesis número de frutos/flores. . Números seguidos de letras diferentes indicam que há diferença significativa pelo teste  $\chi^2$  de Pearson.

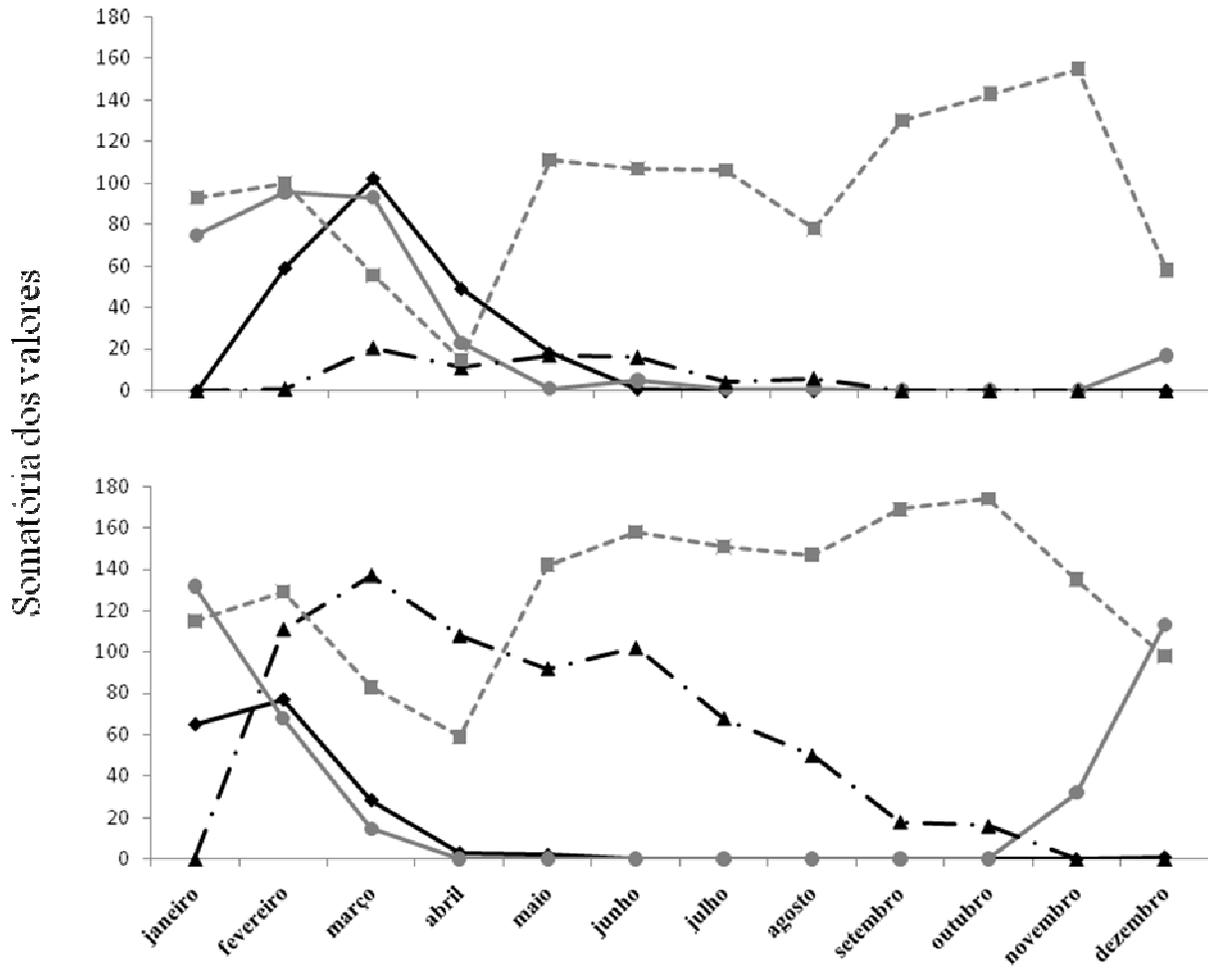
Tratamentos	NSV	NDP
Emasculação (agamospermia)	0% (0/28)	3,3% (1/30)
Autopolinização espontânea	16% (5/31)	0% (0/32)
Autopolinização manual	93% (28/30)	84% (26/31)
Polinização cruzada	90% (26/29)	86% (25/29)
Controle (condições naturais)	10% (10/102) <sup>b</sup>	79% (75/95) <sup>a</sup>



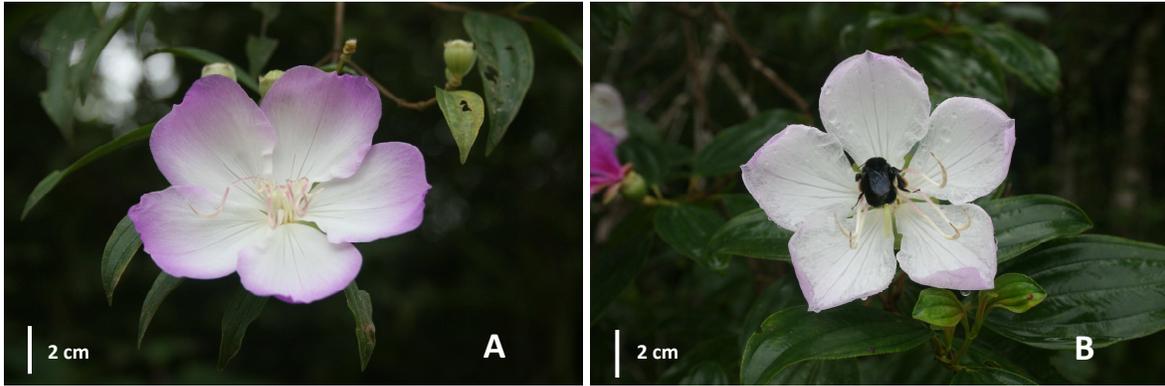
**Figura 1.** Mapa de localização das áreas de estudos no Parque Estadual da Serra do Mar - SP. Ver texto para detalhes. (adaptado de Moraes *et al.* 1999).



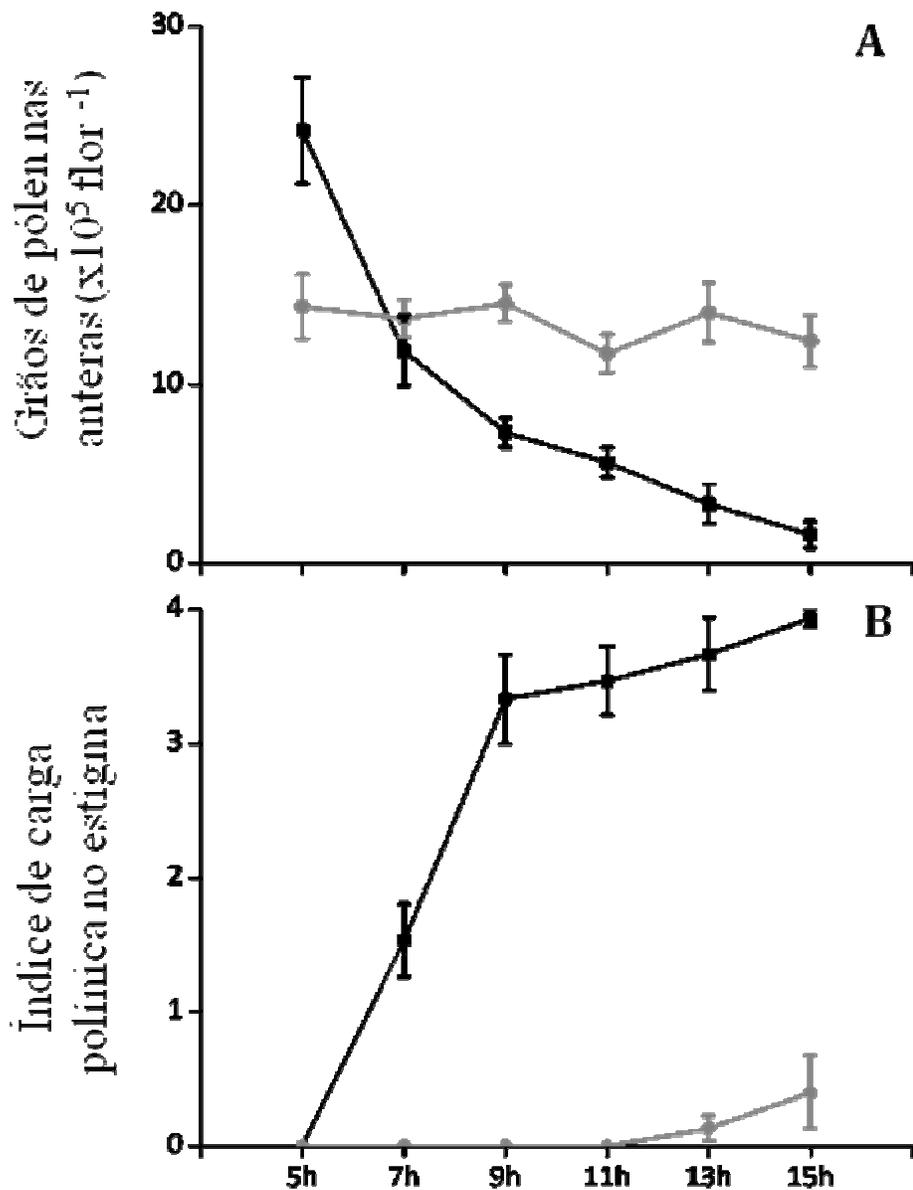
**Figura 2.** Dados de precipitação média (barras), temperatura média (linha sólida), temperatura máxima e mínima (linhas tracejadas) do Núcleo Santa Virgínia (acima) e Núcleo de desenvolvimento Pinguaba (abaixo) do Parque Estadual da Serra do Mar - SP. Dados para jan, fev, dez 2008 e jan, jul-dez 2009 estão faltando para NSV. Dados de dez 2009 estão faltando para NDP. (fonte: CPTEC, disponível em <http://satelite.cptec.inpe.br/PCD/>, acesso em 15/02/2010).



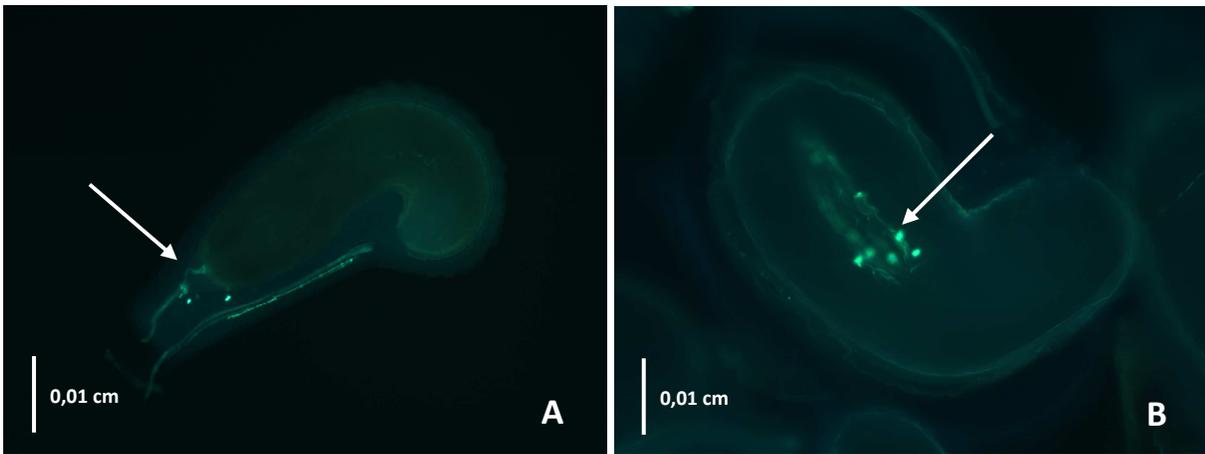
**Figura 3.** Fenologia de *Tibouchina pulchra* ao longo do ano em duas áreas do gradiente altitudinal: Núcleo Santa Virgínia-NSV (acima) e Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba-NDP (abaixo) (n=45 em cada área). —◆— florada; —●— emissão de botões; ·—▲· frutificação; - -■- - emissão de folhas jovens.



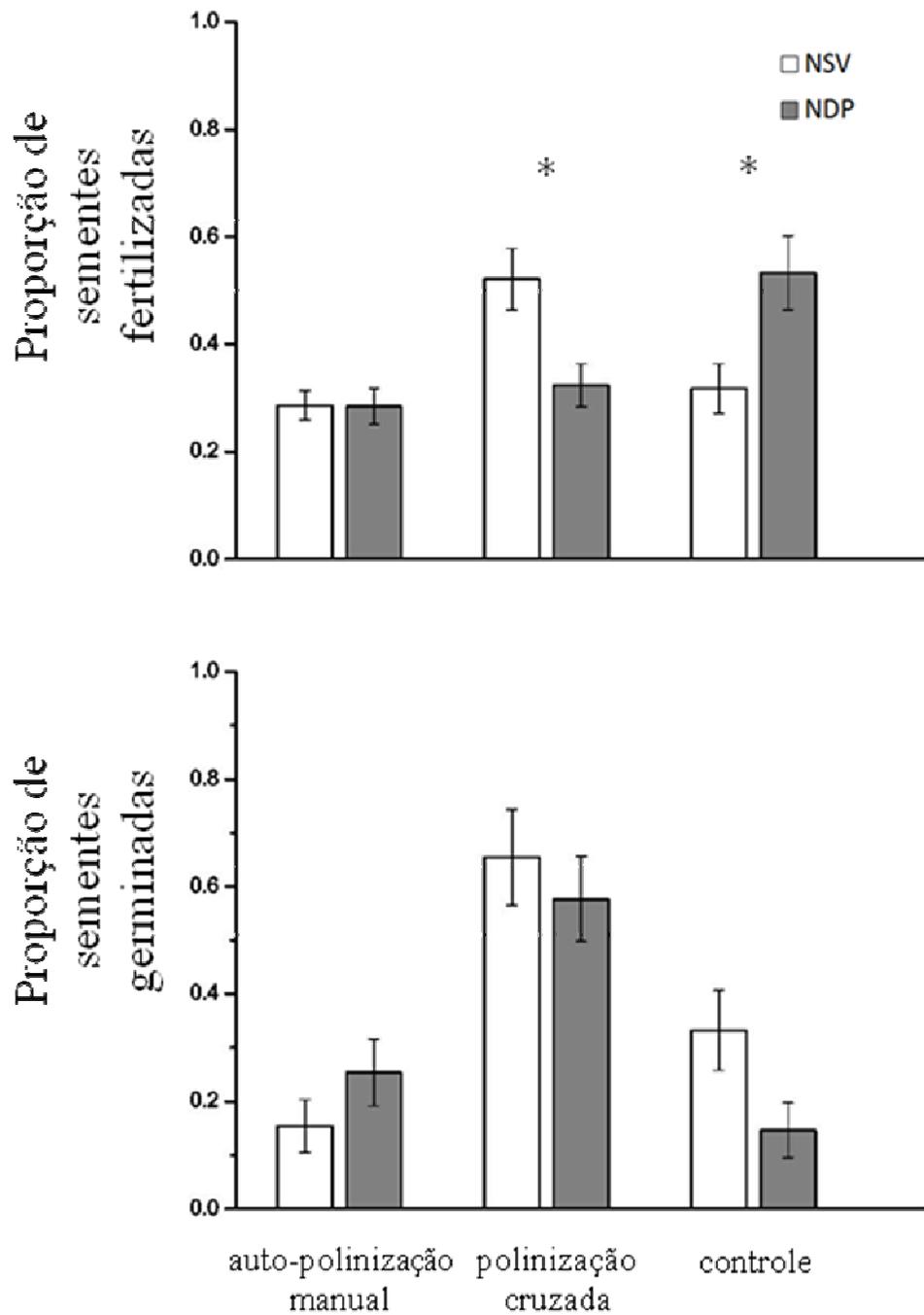
**Figura 4.** (A) Aspecto da flor de *Tibouchina pulchra*. (B) Visita de *Bombus morio* principal polinizador de *T. pulchra*.



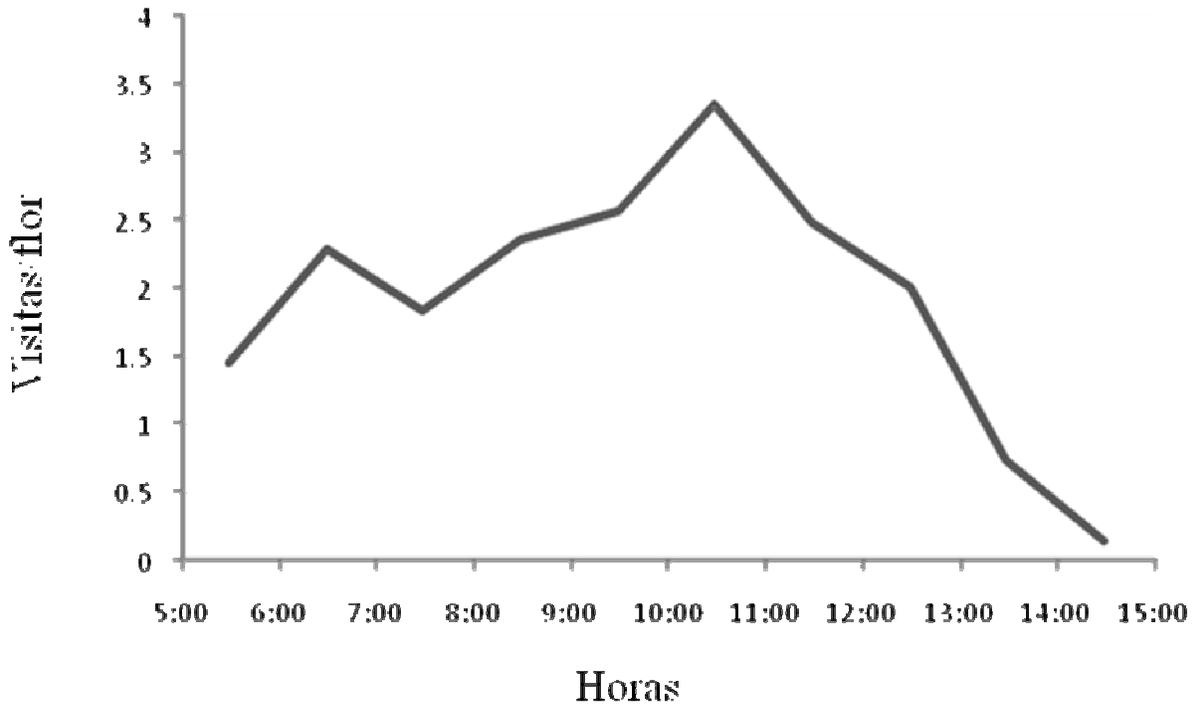
**Figura 5.** Dinâmica de retirada e deposição de pólen nas flores de *Tibouchina pulchra*: (A) quantidade de grãos de pólen nas anteras ao longo do primeiro dia de antese e (B) índice de carga polínica no estigma ao longo do primeiro dia de antese em duas áreas do gradiente altitudinal, (—●—) Núcleo Santa Virgínia-NSV e (—■—) Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba-NDP. Barras indicam o erro padrão.



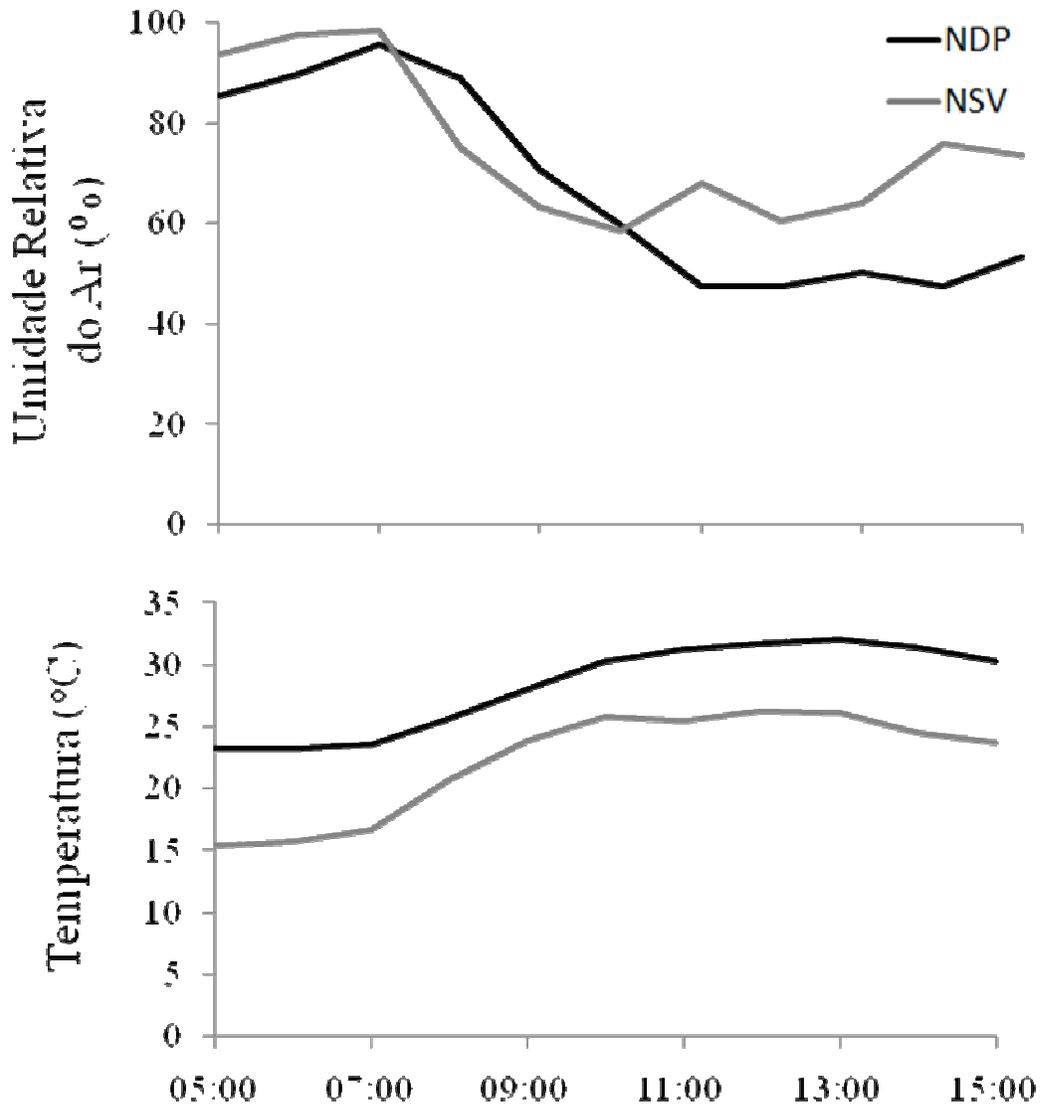
**Figura 6.** Desenvolvimento de tubos polínicos em *Tibouchina pulchra*. (A) Momento em que o tubo polínico (seta) atinge o saco embrionário do óvulo após 72h. (B) Deposição de calose (seta) na parede do saco embrionário após a fertilização.



**Figura 7.** Proporção de sementes fertilizadas (acima) e proporção de sementes germinadas (abaixo) em tratamentos de autopolinização manual, polinização cruzada e controle em *Tibouchina pulchra* no Núcleo Santa Virgínia - NSV e Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba - NDP. Barras indicam o erro padrão. (\*) indica que há diferença entre os locais pelo teste de Bonferroni.



**Figura 8.** Frequência de visitas de abelhas às flores de *Tibouchina pulchra* durante o período de observação (60 horas) no Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba (NDP).



**Figura 9.** Média da umidade relativa do ar (%) e da temperatura (°C) ao longo dos dias de coleta dos polinizadores de *Tibouchina pulchra* no Núcleo Santa Virgínia - NSV e Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba - NDP.

## CAPÍTULO II

### Characterization of 12 microsatellite loci from an enriched genomic library in polyploid *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae)\*

Vinícius Lourenço G. Brito<sup>1</sup>, Bianca B. Z. Vigna<sup>2</sup> e Anete P. Souza<sup>1,2</sup>

1 - Departamento de Biologia Vegetal, Unicamp

2- Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Unicamp

**Keywords:** manacá-da-serra, polymorphism, microsatellite, conservation genetics, polyploidy

---

\* Nota técnica publicada *online* pela revista Conservation Genetics Resources no dia 09 de abril de 2010.

## Abstract

*Tibouchina pulchra* is a common hermaphroditic canopy tree of the Melastomataceae in the Brazilian Atlantic Rain Forest that is important for bee communities, reforestation, soil and air bio-indication and urban ornamentation. Twelve polymorphic microsatellite markers were isolated and characterized in 89 genotypes of *T. pulchra* from two populations of Ubatuba and São Luís do Paraitinga municipalities (São Paulo, Brazil). The number of alleles observed for each locus ranged from 4 to 31 with an average of 12 alleles per locus. The polymorphism information content (PIC) varied between 0.51 to 0.92 (average 0.74) and the discriminating power (D) ranged from 0.66 to 0.99 (average 0.87). These microsatellite markers will be useful for assessing genetic studies, conservation management, and ecological and phylogenetic evaluations.

Biodiversity-rich habitats, like the Atlantic Rain Forest of Brazil, are major sources of plant products and ecosystem services, but fragmentation and reduction have occurred rapidly in such habitat. Understanding genetic structure, reproductive systems and gene flow of tree populations in such heterogeneous habitats is essential for studies in conservation, ecology and evolutionary biology (Narain 2000).

*Tibouchina pulchra* (Melastomataceae), known in Brazil as manacá-da-serra, is a common hermaphroditic canopy tree that grows in the Atlantic Rain Forest of Brazil. This plant produces many flowers with large amount of pollen and plays a critical role in this habitat, offering resources for pollinating large bees able to buzz the poricidal anthers. The tree's seeds are dispersed by gravity, have high germination capacity and often colonize recently fragmented areas (Zaia and Takaki 1998). Its leaves and roots are very sensitive to pollution and can be used as bio-indicators of air and soil quality (Mazzoni-Viveiros and Trufem 2004, Furlan et al. 2008). *T. pulchra* is a pioneer species used in environmental landscape planning and urban ornamentation (Lorenzi 1992). Genetic knowledge about *T. pulchra* is still limited, however, which has restricted its use and conservation. In this study, we report the development of 12 microsatellite loci for *T. pulchra*, which could be extremely important in the conservation genetic studies of the diversity in this species.

Young leaf tissues were collected from 89 genotypes in the field and stored in a freezer at -20°C. The genomic DNA samples were extracted from leaf tissue of *T. pulchra* using the cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method (Doyle and Doyle 1987). A microsatellite-enriched library was constructed according to the protocol described by Billotte *et al.* (1999). Genomic DNA samples were digested with *RsaI* restriction enzyme, and the resulting DNA fragments were linked to *RsaI* adapters. A library was enriched for dinucleotide sequences using (CT)<sub>8</sub> and (GT)<sub>8</sub> biotinylated microsatellite primers with labeled probes that were bound to Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles (Promega, Fitchburg, WI, USA) as indicated by the manufacturer.

The selected fragments were amplified by PCR using primer sequences complementary to the adapters (*Rsa21* 50-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-30 and *Rsa25* 50-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-30) and then cloned into the pGEM-T vector (Promega). Plasmids were introduced into *Escherichia coli* XL-1 Blue strain cells and transformed cells were cultivated on agar plates containing 100 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin (Sigma, Germany), 50 µg ml<sup>-1</sup> X-galactosidase and isopropyl b-D-1-thiogalacto7 pyranoside (IPTG) (MBI Fermentas, Glen Burnie, MD, USA). A total of 96 containing positive clones were bi-directionally sequenced in an automated sequencer ABI 377 (PerkinElmer, Applied Biosystems) using T7 and SP6 primers and the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Sequences were assembled and edited using Seqman (DNASar). The Simple Sequence Repeat Identification Tool (SSRIT) was used to identify SSRs present in all non-redundant sequences (Temnykh *et al.* 2001). Fifty four percent of the clones contained microsatellite motifs with more than 5 repeats and flanking regions suitable for primer design. The Primer Select (DNASar) software was used to design 33 primer pairs.

Eighty-nine genotypes from two populations in Ubatuba and São Luís do Paraitinga municipalities in the state of São Paulo, Brazil, were used to evaluate microsatellite polymorphisms. Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed in 25 µL total volume containing 4.0 ng of template DNA, 0.8 mM of forward and reverse primers, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15 mM of each dNTP and 1 U *Taq* DNA Polymerase. A PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA/USA) was used for PCR with the following program: 96°C for 1 min followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1

min, specific annealing temperature for 1 min and a final extension of 72°C for 5 min. Amplification products were verified by electrophoresis on 3% agarose gels containing 0.1 mg ethidium bromide per ml in 1X TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.0) and genotyped on 6% denaturing polyacrylamide gels stained with silver nitrate (Creste *et al.* 2001). Allele sizes were estimated by comparison to a 10 bp DNA ladder standard (Invitrogen).

Twelve microsatellite markers were successfully amplified by PCR and had polymorphic alleles. A total of 140 putative alleles were obtained from the 12 loci. The number of alleles ranged from 4 to 31, with an average of 12 alleles per putative locus. Polymorphism information content (PIC) was calculated in order to estimate marker informativeness (Cordeiro *et al.* 2003). The PIC values of the 12 microsatellite loci ranged from 0.51 to 0.92 (average 0.74). The highest PIC value was found in the TP03 locus, which contained the most alleles (31 alleles). For the purposes of comparing the efficiency of markers in genotype identification, we estimated the discriminating power (D) of each primer (Tessier *et al.* 1999). The calculated D values ranged from 0.66 to 0.99 (average 0.87). The highest D values were found in TP03 (0.99) and TP01 (0.99), which had the highest PIC values (Table 1). The polyploid nature of *T. pulchra* does not allow for estimation of the exact copy number of each allele. Therefore, standard tests for deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium were not applied.

These microsatellite markers can contribute to genetic analysis, conservation, phylogenetic evaluations and ecological and evolutionary studies for this species.

**Acknowledgments** V.L.G.B., B.B.Z.V. and A.P.S. are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo for fellowships and financial support, to Fernanda Witt Cidade and Gustavo Maruyama Mori for technical support and to Adna Cristina Barbosa de Sousa and Graham Wyatt for critical review of the manuscript. Special thanks to Marlies Sazima for helpful scientific contributions during discussions which originated this work. This work was supported by Projeto Temático Gradiente Funcional (Processo 03/12595-7) Programa BIOTA/FAPESP - O Instituto Virtual da Biodiversidade ([www.biota.org.br](http://www.biota.org.br)).

## References

- BILLOTTE N, RISTERUCCI AM, BAURENS FC (1999) Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54:277–288
- CORDEIRO GM, TAYLOR GO, HENRY RJ (2003): Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploidy species. *Plant Science* 155:161-168.
- CRESTE S, TULMANN NETO A, FIGUEIRA A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol Biol Rep* 19: 299–306. doi:10.1007/BF02772828
- DOYLE JJ, DOYLE JL (1987) A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15
- FURLAN CM, MORAES RM, BULBOVAS P, SANZ MJ, DOMINGOS M, SALATINO A (2008) *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn., a native Atlantic Forest species, as a bio-indicator of ozone: visible injury. *Environmental Pollution* 152(2): 361–365.
- LORENZI H (1992) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Editora Plantarum Ltda, Nova Odessa.
- MAZZONI-VIVEIROS SC, TRUFEM SFB (2004) Efeitos da poluição aérea e edáfica no sistema radicular de *Tibouchina pulchra* Cogn.(Melastomataceae) em área de Mata Atlântica: associações micorrízicas e morfologia *Rev. Bras. Bot* 27(2): 337-348.
- NARAIN, P (2000) Genetic diversity – Conservation and assessment. *Current Science* 79 (2): 170.
- TESSIER C, DAVID J ,THIS P, BOURSIQUOT JM, CHARRIER A (1999). Optimizations of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 98:171-177.
- TEMNYKH S, DECLERCK G, LUKASHOVA A, LIPOVICH L, CATINHO S, MCCOUCH S (2001) Computational and Experimental Analysis of Microsatellites in

Rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, Length Variation, Transposon Associations, and Genetic Marker Potential. *Genome* 11:1441-1452.

ZAIA JE, TAKAKI M (1998) Estudo da germinação de sementes de espécies arbóreas pioneiras: *Tibouchina pulchra* Cong. e *Tibouchina granulosa* Cong. (Melastomataceae). *Acta bot. bras.* 12 (3): 221-229.

**Table 1** Description of 12 microsatellites developed for *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae).

SSR locus	GenBank accession number	Repeat motif	<i>Ta</i>	Predicted product size (bp)	Primers sequences (5'-3')	<i>Nb</i>	<i>Ni</i>	Size range (bp)	D	PIC
TP01	GU583789	(CA) <sub>2</sub> AG(CA) <sub>8</sub>	60	160	F:AATTCACCCCTCCCCTCTATCT R:TTCATTGGTTCTTTGGCTGTAA	14	1 - 4	157-180	0.985	0.8736
TP03	GU583790	(TC) <sub>10</sub> (CT) <sub>7</sub> (CA) <sub>9</sub> (TA) <sub>2</sub> (CA) <sub>4</sub>	60	208	F: CTGGGTCCGAGGTCAACA R: TTCTTCTTCATATGCTTCTCAAA	31	1 - 6	262-185	0.992	0.9230
TP05	GU583791	(TTA) <sub>3</sub> (ATT) <sub>3</sub>	60	248	F: ACGCAGTACAACCCCTTAT R: CACACGTCTCAATTTTTATCAT	10	1 - 3	261-171	0.951	0.7919
TP10	GU812340	(AC) <sub>6</sub>	60	166	F: GGGGGTTGGGTTTATTTTA R: GGATTCCAGCCTTGATTTT	4	1 - 2	166-170	0.706	0.5296
TP12	GU583793	(GTT) <sub>6</sub>	60	258	F: ATAATCCAACCTCCCTCCACAAA R: GCCAATACCAATACCAATACCC	17	1 - 4	281-241	0.973	0.8706
TP20	GU784837	(CGT) <sub>3</sub>	50	251	F: CCCAGTTCAATCAATCATA R: CCTCAAGGTTGAAAGAGTTA	4	1 - 2	250-233	0.77	0.5474
TP23	GU784835	(TG) <sub>9</sub>	60	151	F: GACTACCCAGAAAACCGCATCC R: CACCCGCCACTACGACCCT	11	1 - 4	160-147	0.94	0.7614
TP25	GU784836	(GT) <sub>8</sub>	60	168	F: ACAAAAAGCACAAGGGCAAAC R: AAGGCGCAAAGGGATAAACAAC	7	1 - 3	181-165	0.906	0.7432
TP27	GU784838	(CTT) <sub>5</sub>	60	167	F: TTGGGATGGGATGGGATGGA R: GGGGGCAGGACAGGGACAG	5	1 - 3	188-166	0.66	0.5083
TP28	GU784839	(TGGGA) <sub>3</sub>	60	162	F: TTGGTGGGAAGAAGATAAAAG R: GGGGGAAAGAAGAAGAAGAAG	15	1 - 4	169-197	0.916	0.7865
TP29	GU784840	(TG) <sub>6</sub> (ATT) <sub>3</sub>	60	220	F: AGACGCCCTGACCTATTC R: TGTGCTTACGTACGCTCATT	8	1 - 2	225-200	0.716	0.6517
TP33	GU784841	(CTT) <sub>9</sub> ...(TTTTCC) <sub>3</sub>	60	239	F: CATTCAATTGACTCACCCAT R: AGGTATCGATGTAATAAAGTGA	14	1 - 4	247-228	0.977	0.8661

*Ta* is specific annealing temperature (°C); *Nb* is total number of bands; *Ni* is number of b per individual

## CAPÍTULO III

### **Estrutura e diversidade genética em duas populações de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) em gradiente altitudinal no sudeste do Brasil\***

**Vinícius Lourenço G. Brito<sup>1</sup>, Bianca B. Z. Vigna<sup>2</sup> e Anete P. Souza<sup>1,2</sup>**

1 - Departamento de Biologia Vegetal, Unicamp

2- Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Unicamp

**Palavras-chave:** manacá-da-serra, poliploidia, fluxo de pólen, Serra do Mar

---

\*Projeto de pesquisa vinculado ao projeto Biota Gradiente Funcional (Processo Fapesp 03/12595-7), Coordenadores Dr. Carlos Alfredo Joly e Luiz Antonio Martinelli.

## Resumo

Em um gradiente de altitude, a estrutura e diversidade genética em plantas podem mudar significativamente, pois diferentes altitudes regulam condições ecológicas diferentes. Diversos fatores podem influenciar esta estrutura e diversidade como as mutações, a seleção, o contexto biológico de cada espécie de planta e o fluxo gênico, que pode ser considerado um dos mais importantes. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a estrutura e diversidade genética de populações de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) em dois pontos de um gradiente altitudinal: Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba e Núcleo Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar, usando marcadores moleculares microssatélites. Foram desenvolvidos 12 locos polimórficos e estes foram utilizados para fazer análises de agrupamento, ordenação, bayesiana e medidas de diversidade genética nas duas populações. As análises de agrupamento e ordenação indicam a existência de diferenciação genética entre as populações, mas com uma interface de contato entre elas, além de menor diversidade genética na população da região mais elevada. A análise bayesiana mostra que na população da região mais elevada os indivíduos são mais semelhantes entre si. Os parâmetros de diversidade genética como número de fenótipos, número total de alelos não compartilhados entre pares de indivíduos e diversidade fenotípica média de Shannon-Weaver também foram menores na região mais elevada. Estes resultados podem ser explicados pela dinâmica de fluxo gênico mediado pelo pólen nas duas populações e pelas características de distribuição e reprodução de *Tibouchina pulchra* ao longo da Serra do Mar.

## Introdução

Populações vegetais não são diversos conjuntos de genótipos estruturados randomicamente no tempo e no espaço. Existe uma organização genética que pode se manifestar entre populações geograficamente distintas, dentro de grupos locais de plantas ou até na progênie dos indivíduos (Loveless & Hamrick 1984). Diversos fatores podem influenciar o grau de estruturação e diversidade genética das populações de plantas como as mutações, a seleção, o contexto biológico de cada espécie de planta e o fluxo gênico, que pode ser considerado um dos mais importantes (Loveless & Hamrick 1984, Slatkin 1987). Em plantas, este fluxo pode ocorrer através da dispersão do pólen e da semente. Assim, os mecanismos de polinização e de dispersão

de sementes têm implicações diretas sobre a estrutura genética das populações e têm sido considerados as causas da origem e diversificação das angiospermas (Bawa 1995).

A falta de fluxo gênico pode diminuir o tamanho efetivo e a diversidade genética, gerando o que ficou conhecido por depressão endogâmica (Ellstrand 1992, Charlesworth & Charlesworth 1987). Essa redução da diversidade e aumento dos níveis de endogamia das populações naturais pode acarretar na diminuição da capacidade adaptativa destas populações (Reis 1996). Por outro lado, altos níveis de diversidade genética, gerados pelo movimento dos grãos de pólen e/ou das sementes e a consequente troca de genes entre populações, possibilitam um grande número de novas combinações genotípicas, aumentando o potencial evolutivo das espécies pela maior capacidade de adaptação às possíveis mudanças ambientais (Sebbenn *et al.* 2000). Porém, este fluxo gênico intra-específico também pode aumentar a depressão exogâmica, ou seja, uma redução do *fitness* depois da hibridização, principalmente em espécies raras (Waser & Price 1989).

A estrutura e a diversidade genética em plantas podem mudar significativamente com a variação de altitudes que regulam condições ecológicas diferentes, de um habitat particular (George *et al.* 2001, Semagn *et al.* 2000, Yan *et al.* 2009). Conseqüentemente, estudos que relacionam a variação da diversidade genética com gradientes de altitude são importantes tanto para a biologia teórica quanto para a conservação. A diferenciação genética entre populações ao longo de um gradiente de altitude tem sido demonstrada em várias espécies de plantas, sendo que a diversidade pode aumentar, diminuir ou mesmo flutuar com o aumento da altitude (Yan *et al.* 2009, Zhao *et al.* 2001, Semagn *et al.* 2000). Alguns destes estudos sugerem que o fluxo gênico restrito entre populações e forte seleção natural influencia a diversidade genética de populações de plantas (George *et al.* 2001, Slatkin 1987).

A família Melastomataceae compreende 4200-4500 espécies e é bem representada em ecossistemas tropicais e subtropicais das Américas, onde são encontradas cerca de 3000 espécies (Renner 1993). No Brasil encontram-se 68 gêneros com estimativa de 1500 espécies (Martins 1997). Suas flores são geralmente polinizadas por abelhas que coletam o pólen das anteras tubulosas quase sempre poricidas. Estas abelhas abraçam as anteras e efetuam movimentos vibratórios com os músculos das asas e como consequência o pólen é expelido, aderindo à porção ventral do visitante, local que, com freqüência, é contatado pelo estigma. Este tipo de

polinização é denominado de polinização vibrátil (“buzz pollination”, Buchmann 1983). Plantas que possuem este sistema de polinização podem ser um ótimo modelo para testar hipóteses sobre fluxo de pólen e sua influência na estrutura da população, uma vez que nestes sistemas, devido a hercogamia pronunciada, o fluxo está praticamente todo restrito ao movimento dos polinizadores.

O objetivo deste trabalho é avaliar a estrutura e diversidade genética de duas populações de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) localizadas em dois pontos de um gradiente altitudinal: Núcleo Santa Virgínia (NSV) e Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba (NDP) do Parque Estadual da Serra do Mar. Devido à maior limitação de pólen na região do NSV (Capítulo I), espera-se que: 1) exista diferenciação genética entre as duas populações e, 2) a população localizada na região mais alta (NSV) tenha diversidade genética menor que a população localizada na região mais baixa (NDP).

## **Metodologia**

### *Área de estudo: local e caracterização*

O estudo foi desenvolvido no Parque Estadual da Serra do Mar no Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba (NDP) e Núcleo Santa Virgínia (NSV) ambos situados na região norte do estado de São Paulo (figura 1).

A área de estudo referente ao NSV situa-se na região de escarpas e reversos da Serra do Mar, no Planalto de Paraitinga-Paraibuna próximo ao município de São Luís do Paraitinga-SP, entre altitudes que variam de 870 m a 1.100 m (Tabarelli & Mantovani 1999). De acordo com Veloso *et al.* (1991), a vegetação pode ser classificada como Floresta Ombrófila Densa Montana. Conforme classificação climática de Köppen (1948) o clima regional é tropical temperado sem estação seca (Tabarelli & Mantovani 1999). A precipitação média anual é de 2.180 mm, sendo os meses mais úmidos: dezembro, janeiro e fevereiro; e os menos chuvosos: junho, julho e agosto. Não se observa mês com precipitação média inferior a 60 mm (Tabarelli & Mantovani 1999).

A área de estudo referente ao NDP localiza-se na planície costeira localiza-se no município de Ubatuba-SP, estendendo-se da orla até o sopé das montanhas que formam a Serra

do Mar. A vegetação da área é considerada como Floresta Ombrófila Densa (Veloso *et al.* 1991). O clima desta região é classificado, segundo Köppen (1948), como tropical chuvoso, apresentando uma estação superúmida de outubro a abril, com precipitação média superior a 200 mm mensais, e uma estação menos úmida de maio a setembro, com precipitação média acima de 100 mm mensais (Morellato *et al.* 2000). A precipitação média anual é de 2.100 mm e a temperatura média anual é cerca de 22°C (Bencke & Morellato 2002).

### *Espécie estudada*

O gênero *Tibouchina*, pertencente à tribo Melastomeae, é o gênero neotropical de mais ampla distribuição e com maior número de espécies dentro das melastomataceas de fruto capsular, com cerca de 240 espécies (Renner 1993), sendo encontrado desde o oeste do México até o nordeste da Argentina e Paraguai (Todzia & Almeida 1991, Guimarães & Martins 1997). *Tibouchina pulchra*, também conhecida como o manacá-da-serra, é uma planta arbórea pioneira que possui flores brancas com bordas arroxeadas e do tipo aberto e emana um perfume agradável e fraco, características de flores melitófilas (*sensu* Faegri & van der Pijl 1979). As flores possuem cinco estames grandes e cinco pequenos, ambos com anteras falciformes e poricidas e o único recurso oferecido pelas flores, o pólen, é retirado somente por vibração (“buzz pollination”, Buchmann 1983). Pólen é o único recurso oferecido pelas flores. *Tibouchina pulchra* é autocompatível, mas não autogâmica, necessitando de polinizadores para sua reprodução. Seus frutos são do tipo capsular e após a deiscência liberam mais de 3000 sementes que germinam depois de cerca de 15 dias (Capítulo I).

### *Extração de DNA, amplificação e genotipagem*

Amostras de folhas jovens de 89 indivíduos (44 indivíduos do NSV e 45 indivíduos do NDP) foram coletadas com tesoura esterilizada e estocadas em biofreezer a – 80°C. Indivíduos distantes em pelo menos 5m foram amostrados segundo sua ordem de aparição na borda das florestas em três áreas distintas de cada local. Esses indivíduos foram identificados como “SXX” ou “PXX”, onde ‘S’ ou ‘P’ indicam o local de coleta (NSV ou NDP, respectivamente) e ‘XX’ o número da coleta. As amostras seguiram a metodologia de extração apresentadas no anexo 1. Um

único genótipo de *T. pulchra* foi utilizado para a construção da biblioteca genômica enriquecida com microssatélites, conforme descrito por Billotte *et al.* (1999). As seqüências que apresentaram microssatélites adequados (5 ou mais repetições para dinucleotídeos, quatro ou mais repetições para trinucleotídeos e três ou mais repetições para tetra, penta e hexanucleotídeos) foram utilizadas para desenho dos *primers*. As condições de amplificação dos locos microssatélites foram estabelecidas a partir de testes em diferentes temperaturas de anelamento dos *primers* na PCR. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25µl contendo 20 mM de Tris-HCl pH 8,4; 50 mM de KCl, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,15 mM de cada dNTP; 0,8 mM de cada primer; 4 ng de DNA e 1 unidade de Taq DNA polimerase. Depois de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 1 minuto seguiram-se 30 ciclos compostos pelas seguintes temperaturas e duração: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos primers a temperatura específica por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Os produtos obtidos foram resolvidos em géis de agarose 3% para analisar se houve amplificação dos fragmentos e, posteriormente, em géis de poliacrilamida 6%, corados com Nitrato de Prata. A partir da análise de cada gel, cada indivíduo foi genotipado para a presença/ausência de bandas, dada a impossibilidade de determinar a frequência alélica em poliplóides, sendo os microssatélites utilizados como marcadores dominantes. Foi gerada uma matriz de presença/ausência contendo os indivíduos nas linhas e os alelos de cada um dos locos nas colunas.

#### *Análise genética das populações*

Através do programa FDASH (Obbard *et al.* 2006) foram calculadas as seguintes estimativas da diversidade genética para cada um dos locos dentro de cada uma das duas populações: número total de alelos, número total de fenótipos, número total de alelos não compartilhados entre pares de indivíduos, diversidade fenotípica média de Shannon-Weaver, número médio de alelos diferentes carregados por cada indivíduo e número de alelos compartilhados entre pares de indivíduos. Estas estimativas são calculadas através do número médio de alelos através dos quais pares de indivíduos diferem e são ideais para espécies aloploplóides, como provavelmente é o caso de *T. pulchra* (ver Discussão; Obbard *et al.* 2006). Uma vez que estas estimativas existem para cada loco dentro das populações, cada uma das

populações foi comparada através do teste não paramétrico de Wilcoxon pelo software Systat11 (Systat Software Inc., Point Richmond, CA), a um intervalo de confiança de 95%.

Usou-se a Análise de Variância Molecular (AMOVA) baseada nas distâncias quadráticas, através do software ARLEQUIN versão 3.1 (Excoffier *et al.* 2005) para saber como a variação genética está particionada dentro e entre as duas populações deste estudo.

A relação genética entre todos os indivíduos e formação de grupos foi acessada através de uma análise de agrupamento sobre a matriz de similaridade gerada pelo coeficiente assimétrico de Jaccard. Segundo Legendre & Legendre (2003) o coeficiente de Jaccard é o melhor conhecido para dados binários em que se quer evitar o problema da dupla ausência. Na genotipagem através de microssatélites, compartilhar a ausência de um alelo deve-se a vários fatores, não necessariamente significa semelhança entre os indivíduos. Por outro lado, a dupla-presença é uma forte indicação de semelhança. Usou-se o método de Neighbor-joining (Saitou & Nei 1987) para o agrupamento e construção da árvore no programa DARwin5 (Perrier & Jacquemoud-Collet 2006).

Para investigar a variação nos dados sem antes agrupar os indivíduos em classes definidas usou-se a Análise de Coordenadas Principais (PCoA), a partir da matriz de similaridade de Jaccard, através do programa DARwin5 (Perrier & Jacquemoud-Collet 2006).

A avaliação da estrutura genética das populações foi feita utilizando-se o programa Structure 2.2. Através de inferência Bayesiana descrita por Pritchard *et al.* (2000), os indivíduos foram designados a determinadas populações (K, variando de 2 a 10). Utilizou-se o modelo de ancestralidade com mistura e com frequência de alelos correlacionada entre as populações com e sem a localidade informada *a priori*. Para testar a consistência dos resultados, cada valor de K foi estimado dez vezes independentemente, a partir de 10.000 interações. A estimativa do melhor K foi calculada a partir da estatística *ad hoc* delta K, proposta por Evanno *et al.* (2005).

## **Resultados**

Dos 33 pares de *primers* desenvolvidos, 19 não tiveram boa amplificação na PCR e não apresentaram bandas claras e dois foram monomórficos. No total, foram usados 12 pares de *primers* cujas características, como a repetição e a temperatura de anelamento, são mostradas na

Tabela 1 (ver também Capítulo II). O número total de bandas variou de quatro a 31, enquanto o número de bandas por indivíduo por loco variou de um a seis. Isso revela um padrão multi-banda típico de organismos poliplóides. O número de cópias alélicas por indivíduo não pôde ser acessado por que a dosagem alélica dos heterozigotos em poliplóides não pode ser estimada.

A comparação entre as medidas de diversidade calculadas pelo programa FDASH, indicam que a população do NSV é menos diversa geneticamente que a população do NDP (tabela 2). Apenas o número total de fenótipos foi significativamente menor no NSV pelo teste de Wilcoxon ( $z=-2,553$ ;  $p<0,05$ ), mas outras medidas como o número total de alelos não compartilhados entre pares de indivíduos ( $z=-1,804$ ;  $p=0,07$ ) e a diversidade fenotípica média de Shannon-Weaver ( $z=-1,726$ ;  $p=0,08$ ) tiveram significância marginal. O número total de alelos, o número médio de alelos diferentes carregados por cada indivíduo e número de alelos compartilhados entre pares de indivíduos não foram diferentes entre as duas populações.

A Análise de Variância Molecular indica que a maior parte da variação 90,08% está dentro das populações, enquanto que entre população a variação foi de 9,92% ( $p<0,001$ ; Tabela 3). Através da árvore construída pelo método Neighbor Joining de agrupamento a partir da matriz de similaridade de Jaccard, pode-se perceber dois grupos bem distintos. Cada um destes grupos está formado quase que exclusivamente por indivíduos do NDP ou do NSV (figura 2). Porém alguns indivíduos foram agrupados na outra população como S15, S27, S41 e S44 coletados no NSV e P31, P38, P39 e P41 coletados no NDP. Os ramos que agrupam os indivíduos do NSV estão distribuídos de forma uniforme, indicando que esses indivíduos são mais parecidos entre si, enquanto que os ramos que representam os indivíduos do NDP formam pequenos grupos dentro do grupo maior.

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) mostra um padrão semelhante àquele descrito acima, dividindo as duas populações de *T. pulchra* que ocorrem nos dois locais, apesar de os três primeiros eixos obtidos nesta análise mostrarem apenas 8,61%, 5,97% e 4,89% da inércia total, respectivamente (figura 3 e 4). Analisando-se o gráfico de dispersão, percebe-se uma associação entre a similaridade genética dos indivíduos e sua distribuição nas diferentes altitudes, porém existe uma interface de contato entre os dois grupos. Nesta análise também alguns indivíduos foram agrupados na outra população: S27, S38, S41 e S44 coletados no NSV e P31, P38 e P39 coletados no NDP. Esta análise também mostrou que os indivíduos do NSV são

mais semelhantes entre si: os pontos que representam estes indivíduos estão mais concentrados nos espaços representados na figura 3 e 4. Por outro lado, nestas figuras, os pontos que representam os indivíduos coletados no NDP estão mais espalhados.

O teste de atribuição de indivíduos às populações utilizando o modelo de ancestralidade sem mistura com frequência de alelos correlacionada aplicado a estes dados mostrou o melhor K com valor de cinco a partir da estimativa de Evanno *et al.* (2005), quando a informação sobre a localidade não foi considerada (figura 5A). Neste caso, observa-se que os indivíduos da população do NSV, em sua maioria, têm maior probabilidade de pertencer a apenas um grupo (magenta) enquanto que os indivíduos do NDP têm em seus genomas mais de um único grupo (vermelho, verde, azul, amarelo e magenta), indicando que esta população é mais diversa geneticamente. Este padrão também foi observado nas corridas que consideravam outros valores de K, sempre com a população do NSV mais homogênea (predominância de uma única cor) e a do NDP mais diversa (várias cores). Esta análise também mostrou que alguns indivíduos são mais parecidos com indivíduos da outra população, como os indivíduos S41 e S44 coletados no NSV e P38 e P39 coletados no NDP. Quando a informação sobre a localidade foi considerada *a priori* (figura 5B), apesar do melhor K ter tido valor de três, apenas dois grupos prevalecem (vermelho e verde) e separam bem as duas populações. O grupo azul está representado em mais de 30% apenas nos indivíduos S41 e S44.

## **Discussão**

A condição de poliploidia para *T. pulchra* nunca havia sido descrita, porém, Almeda & Chuang (1992) destacam que a tetraploidia é a condição mais comum no gênero, seguida de diploidia e hexaploidia. A poliploidia em *T. pulchra* também foi confirmada por técnicas citogenéticas (Brito, dados não publicados), mas o número cromossômico não pode ser estimado. O nível de ploidia também não pode ser inferido através de padrões de bandas ou eletroferogramas (Brochmann 1992). Assim, o nível de ploidia de *T. pulchra* não pôde ser confirmado neste estudo e deve ser investigado por métodos citogenéticos mais precisos. Poliploidia tem sido um dos modos mais predominantes de especiação em plantas (Otto & Whitton 2000) e pode ser classificada em dois tipos: alopoliploidia, plantas que contêm mais de dois genomas distintos e autopoliploidia, plantas que contêm múltiplos genomas iguais (*cf.* De

Silva *et al.* 2005). Nos alopoliplóides ocorre a formação de bivalentes durante a meiose como ocorre em diplóides e a herança, devido ao movimento dos locos aos pólos opostos, é chamada de dissômica, produzindo géis de genotipagem com padrão de bandas semelhante ao padrão diplóide. Nos autopoliplóides são formados multivalentes durante a meiose e a herança é chamada de polissômica, produzindo várias combinações de bandas por indivíduo nos géis de genotipagem. Porém estes dois tipos de herança em poliplóides são apenas extremos de um *continuum*, com várias espécies apresentando, nos géis de genotipagem, uma combinação destes dois tipos. A presença de mais de dois alelos por indivíduo associada aos complexos padrões de herança descritos acima não permite o cálculo direto das frequências de alelos em poliplóides e impede o uso de métodos tradicionais para medir a variabilidade genética (De Silva *et al.* 2005). Porém, marcadores polimórficos desenvolvidos para poliplóides, como os aqui apresentados, podem ser usados como marcadores dominantes em estudos ecológicos e evolutivos (Byrne *et al.* 2008, Caddah *et al.* 2009). Para as análises em *T. pulchra* foram utilizados programas desenvolvidos para poliplóides ou especificamente para alopoliplóides, pois a maioria dos locos apresentou um padrão de herança dissômico (Obbard *et al.* 2006).

A Análise de Variância Molecular indica que existe certa semelhança entre as duas populações. De fato, as duas populações, que ocorrem na borda da floresta, possivelmente são recentes e se originaram de um mesmo ‘pool’ gênico. Apesar desta semelhança, as análises de agrupamento e ordenação dos dados sugeriram certa diferenciação genética entre as populações do NSV e NDP com uma interface de contato entre elas. Assim, apesar da semelhança, é possível detectar a diferença entre as populações. O isolamento genético efetivo de populações é causado pela restrição ou ausência de fluxo gênico através do fluxo de pólen ou de sementes em plantas (Yan *et al.* 2009). A diferenciação genética entre populações ao longo de um gradiente de altitude tem sido demonstrado em várias espécies de plantas, sendo que a diversidade pode aumentar, diminuir ou mesmo flutuar com o aumento da altitude (Yan *et al.* 2009, Zhao *et al.* 2001, Semagn *et al.* 2000). Porém este é o primeiro trabalho deste tipo que considera uma espécie arbórea de floresta úmida.

Segundo Bockelmann *et al.* (2003) a diferenciação entre populações ao longo de gradiente só pode ser entendida quando se considera dois fatores que influenciam o fluxo gênico: isolamento por distância ou diferenciação de habitat. Em plantas, a curta distância de dispersão

do pólen ou das sementes em conjunto com a limitação física de estabelecimento dos propágulos, não permite um fluxo gênico em longas distâncias. Conseqüentemente, o aumento da distância geográfica levará ao isolamento genético das populações. Por outro lado, drásticas diferenças ambientais, como temperatura, características do solo, luminosidade, também podem restringir o estabelecimento das plântulas e limitar o fluxo gênico, levando a diferenciação das populações.

*Tibouchina pulchra* é uma espécie pioneira com grande área de distribuição (Lorenzi 1992), seus frutos produzem milhares de sementes, dispersas por gravidade, sendo que de 10 a 30% são capazes germinar em condições naturais (Capítulo I). Na Serra do Mar, a distribuição desta espécie é contínua, ocorrendo desde a região de restinga até as regiões mais elevadas (Lorenzi 1992, Brito obs. pessoal). Por outro lado, a disponibilidade de polinizadores varia drasticamente com o gradiente altitudinal (Capítulo I). Nas áreas mais altas (NSV) a frequência de abelhas capazes de extrair o pólen das anteras poricidas e realizar a polinização é até 200 vezes menor que nas áreas mais baixas (NDP) (Capítulo I). Isso pode implicar em diferentes dinâmicas de fluxo de pólen dentro das populações de acordo com a altitude. Assim, por estas características de *T. pulchra*, o fluxo gênico entre populações parece ser limitado principalmente pelas capacidades de dispersão do pólen e das sementes do que pela capacidade de estabelecimento de suas plântulas. Soma-se a isto o fato de estas populações possuírem deslocamento fenológico de florada e frutificação (Capítulo I), o que pode aumentar a diferenciação genética entre populações (Hall *et al.* 1994). Por outro lado, a alta capacidade reprodutiva e germinativa aliada a sua distribuição contínua ao longo da Serra do Mar levaria à introgressão de genes de uma população a outra, o que causaria uma interface de contato, como os resultados das análises aqui empregadas demonstraram. Ainda, o fato de que alguns indivíduos da população do NSV foram agrupados com a população do NDP e vice-versa (p. ex. indivíduos P38, P39, S41 e S44), por métodos diferentes, reforça a idéia de que esta introgressão pode realmente estar ocorrendo nestas populações.

A dinâmica de fluxo de pólen parece influenciar também a diversidade genética dentro das populações: a população do NSV é menos diversa que a população do NDP. Esse resultado é reforçado uma vez que os indivíduos mais diversos do NSV (S41 e S44) foram classificados na população do NDP, enquanto que os indivíduos mais homogêneos do NDP (P38 e P39) foram classificados junto a população do NSV pelas análises de agrupamento e ordenação. Se o pólen

tem dispersão melhor que as sementes, como parece ser o caso em *T. pulchra* e na maioria das árvores tropicais (Loveless & Hamrick 1984), a dispersão gênica dependerá quase que exclusivamente deste componente (Hardy *et al.* 2006). Assim, a falta de polinizadores e a conseqüente limitação de pólen observada na região mais alta de ocorrência de *T. pulchra*, associada à dependência dos polinizadores (hercogamia pronunciada), levam a menor diversidade genética, apesar dos mecanismos que esta população apresenta para balancear esta limitação (Capítulo I). Mesmo com maior florada e maior taxa de germinação de sementes produzidas por polinização cruzada (Capítulo I) no NSV, as poucas visitas de abelhas não garantem a mistura de ‘pools’ alélicos, como parece acontecer no NDP. O menor número total de fenótipos (o programa FDASH considera que as bandas formam fenótipos e não genótipos devido a não possibilidade de marcar bandas como alelos em poliplóides) no NSV reforça essa idéia. Isso levaria a formação de uma população com indivíduos semelhantes no NSV, como evidenciado pelo teste de atribuição realizado neste estudo. A falta de variabilidade genética dentro das populações poderia levar ao aumento da endogamia e diminuição da capacidade adaptativa (Reis 1996). Porém, para testar a ocorrência de depressão endogâmica (Ellstrand 1992, Charlesworth & Charlesworth 1987) nestas populações, estudos com coletas mais abrangentes devem ser realizados nas regiões altas da Serra do Mar.

Por fim, a análise de ordenação também demonstrou que a variabilidade genética total desta espécie está bem distribuída nestes dois pontos do gradiente, sendo que qualquer uma das duas populações aqui estudadas sozinha não é capaz de assegurar toda esta variação. De fato, populações localizadas nas condições extremas de seus gradientes de distribuição, como nas altitudes baixas e altas, provavelmente incluem alguns mutantes valiosos que devem ser considerados para a conservação da diversidade genética (Yan *et al.* 2009).

## **Referências**

- ALMEDA F. & CHUANG T.I. 1992. Chromosome Numbers and Their Systematic Significance in Some Mexican Melastomataceae. *Systematic Botany* 17(4): 583-593.
- BAWA K. S. 1995. Pollination, seed dispersal and diversification of angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution* 10 (8): 311–312.

- BENCKE C.C. & MORELLATO P.L.C. 2002. Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Revista Brasileira de Botânica* 25 (3): 269-275.
- BILLOTTE N. *et al.* 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277- 288.
- BOCKELMANN A.C. *et al.* 2003. Habitat differentiation vs. isolation-by-distance: the genetic population structure of *Elymus athericus* in European salt marshes. *Molecular Ecology* 12 (2): 505-515.
- BROCHMANN C. SOLTIS D.E. & SOLTIS P.S. (1992). Electrophoretic relationships and phylogeny of Nordic polyploids in *Draba* (Brassicaceae). *Plant Syst Evol* 182: 35–70.
- BUCHMANN S.L. 1983. Buzz pollination in Angiosperms. *In Handbook of experimental pollination biology* (C.E. Jones & R.J. Little, eds.). Van Nostrand Reinhold, New York, p.73-113.
- BYRNE M. *et al.* 2008. Microsatellite markers isolated from a polyploid saltbush, *Atriplex nummularia* Lindl. (Chenopodiaceae). *Molecular Ecology Resources* 8 (6): 1426-1428.
- CADDAH M.K. *et al.* 2009. Microsatellite markers isolated from *polyploid Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (Clusiaceae) from an enriched genomic library. *Conservation Genetics* 10 (5): 1533-1535.
- CHARLESWORTH D., & CHARLESWORTH B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 237–268.
- DE SILVA H.N., HALL A.J., RIKKERINK E., MCNEILAGE M.A. & FRASER, L.G. 2005. Estimation of allele frequencies in polyploids under certain patterns of inheritance. *Heredity* 95, no. 4 (online): 327-334.
- ELLSTRAND, N.C.1992. Gene Flow by Pollen: Implications for Plant Conservation Genetics. *Oikos* 63 (1): 77-86.
- EVANNO G., REGNAUT S. & GOUDET J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8): 2611-20.

- EXCOFFIER L., LAVAL G. & SCHNEIDER S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- FAEGRI K. & VAN DER PIJL L. 1979. *The principles of pollination ecology*. Pergamon Press, Oxford.
- GEORGE T. *et al.* 2001. Analysis of phenotypic and genetic variations among populations of *Oryza malampuzhaensis* show evidence of altitude-dependent genetic changes. *Canadian Journal of Botany* 79: 1090-1098.
- GUIMARÃES P.J.F. & MARTINS A.B. 1997. *Tibouchina* sect. *Pleroma* (D.Don) Cogn. (Melastomataceae) no estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 2(1): 11-33.
- HALL P., CHASE M.R. & BAWA K.S. 1994. Low Genetic Variation but High Population Differentiation in a Common Tropical Forest Tree Species *Conservation Biology* 8(2): 471-482.
- HARDY O.J., MAGGIA L., BANDOUE E. *et al.* 2006. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Molecular Ecology* 15: 559–571.
- KÖPPEN W. 1948. *Climatologia*. Fondo de Cultura Económica, México.
- LEGENDRE P. & LEGENDRE L. 1998. *Numerical Ecology*. Elsevier Science. Amsterdam.
- LORENZI H. 1992. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Editora Plantarum Ltda, Nova Odessa.
- LOVELESS M.D. & Hamrick J.L. 1984. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15(1): 65-95.
- MORAES P.L.R. *et al.* 1999. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 22 (2): 237-248.
- MORELLATO L.P. *et al.* 2000. Phenology of Atlantic Rain Forest Trees: A Comparative Study. *Biotropica* 32 (4b): 81 1-823.

- OBBERD D.J., HARRIS S.A. & PANNELL J.R. 2006. Simple allelic-phenotype diversity and differentiation statistics for allopolyploids. *Heredity* 97(4): 296-303.
- OTTO S.P. & WHITTON J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Ann Rev Genet* 34: 401–437.
- PERRIER X. & JACQUEMOUD-COLLET J.P. 2006. DARwin software. <http://darwin.cirad.fr/darwin>
- PRITCHARD J.K., STEPHENS M. & DONNELLY P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959
- REIS M.S. 1996. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmitero (*Euterpe edulis* Martius). Tese de doutorado. ESALZ/USP. Piracicaba, Brasil.
- SAITOU M. & NEI M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
- SEBBEN A.M., SIQUEIRA, A.C.M.F. & GURGEL GARRIDO, L.M.A. 2000. Interação progênies x locais e variabilidade genética em Jequitibá-Rosa - *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze. *Rev. do Inst. Flor. SP*, 12(1): 13-23.
- SLATKIN M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236 (4803): 787-792.
- SEMAGN K. *et al.* 2000. Comparison of multivariate methods for the analysis of genetic resources and adaptation in *Phytolacca dodecandra* using RAPD. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 101 (7): 1145-1154.
- MARTINS E. 1997. Revisão taxonômica do gênero *Trembleya* DC. (Melastomataceae). Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- RENNER S.S. 1993. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. *Nordic Journal of Botany* 13: 519-540.
- TABARELLI M. & MANTOVANI W. 1999. A riqueza da floresta Atlântica de encosta no estado de São Paulo (Brasil). *Revista Brasileira de Biologia* 59 (2): 239-250

- TODZIA C.A. & ALMEIDA F. 1991. A revision of *Tibouchina* sect. *Lepidotae* (Melastomataceae:Tibouchinae). Proceedings of the California Academy of Sciences 47 (6): 175-206.
- VELOSO H.P., RANGEL-FILHO A.L.R. & LIMA J.C.A. 1991. Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro.
- WASER N.M. & PRICE M.V. 1989. Optimal Outcrossing in *Ipomopsis aggregata*: Seed Set and Offspring Fitness. Evolution 43(5): 1097-1109.
- YAN X.B. *et al.* 2009. Intra-population genetic diversity of two wheatgrass species along altitude gradients on the Qinghai-Tibetan Plateau: its implication for conservation and utilization. Conservation Genetics 10 (2): 359-367.
- ZHAO N. *et al.* 2006. RAPD diversity of *Stipa grandis* populations and its relationship with some ecological factors. Acta Ecologica Sinica 26 (5): 1312-1318.

**Tabela 1.** Caracterização de 12 microssatélites de *Tibouchina pulchra* do Núcleo Santa Virgínia - NSV e Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba - NDP. T<sub>an</sub> – Temperatura de anelamento; N<sub>t</sub> – Número de bandas totais; N<sub>i</sub> – Número de bandas por indivíduo.

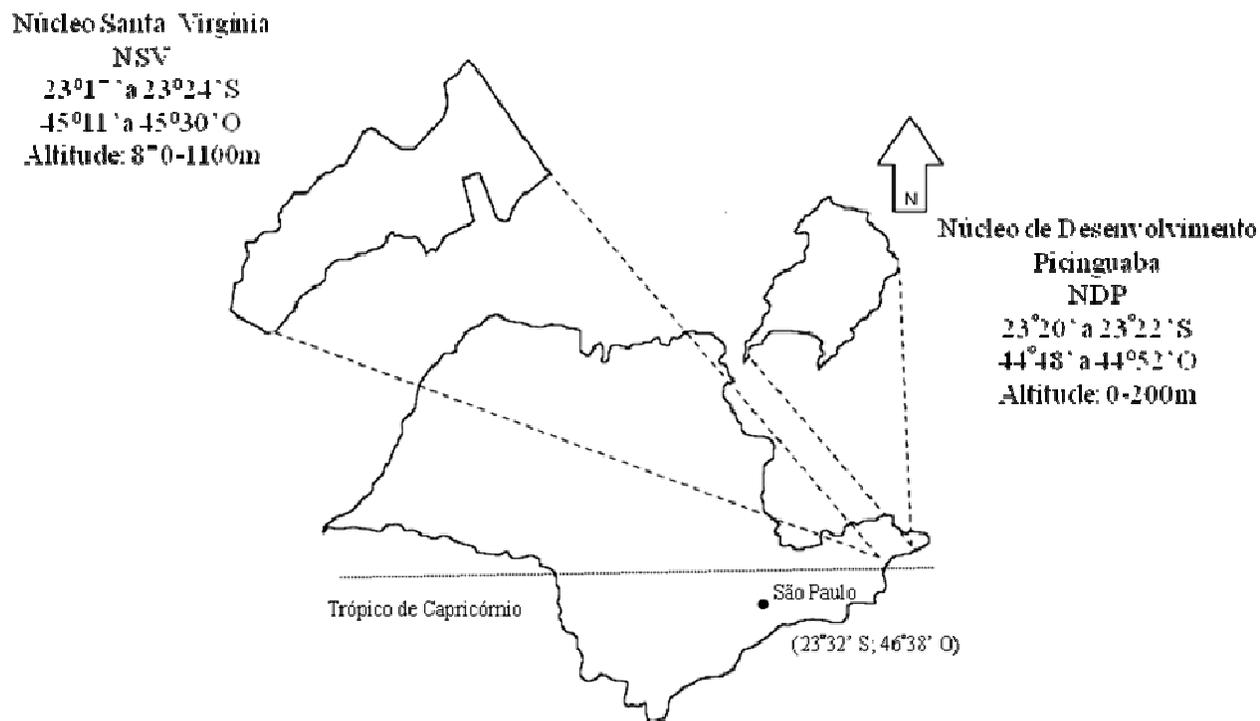
Locos	Repetição	Tamanho (pb)	Faixa de amplificação (pb)	T <sub>an</sub>	N <sub>t</sub>	N <sub>i</sub>
TP01	(CA) <sub>2</sub> AG(CA) <sub>8</sub>	160	157-180	60	14	1 - 4
TP03	(TC) <sub>10</sub> C(TC) <sub>7</sub> (AC) <sub>8</sub> (AT) <sub>2</sub> (AC) <sub>4</sub>	208	262-185	60	31	1 - 6
TP05	(TTA) <sub>3</sub> (ATT) <sub>3</sub>	248	261-171	60	10	1 - 3
TP10	(AC) <sub>6</sub>	166	166-170	60	4	1 - 2
TP12	(GTT) <sub>6</sub>	258	281-241	60	17	1 - 4
TP20	(CGT) <sub>3</sub>	251	250-233	50	4	1 - 2
TP23	(TG) <sub>9</sub>	151	160-147	60	11	1 - 4
TP25	(GT) <sub>8</sub>	168	181-165	60	7	1 - 3
TP27	(CTT) <sub>5</sub>	167	188-166	60	5	1 - 3
TP28	(TGGGA) <sub>3</sub>	162	169-197	60	5	1 - 3
TP29	(TG) <sub>6</sub> (ATT) <sub>3</sub>	220	225-200	60	8	1 - 2
TP33	(CTT) <sub>9</sub> ...(TTTTCC) <sub>3</sub>	239	247-228	60	14	1 - 4

**Tabela 2.** Comparação entre as medidas de diversidade genética calculadas pelo programa FDASH para as populações de *Tibouchina pulchra* do Núcleo Santa Virgínia - NSV e Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba - NDP.

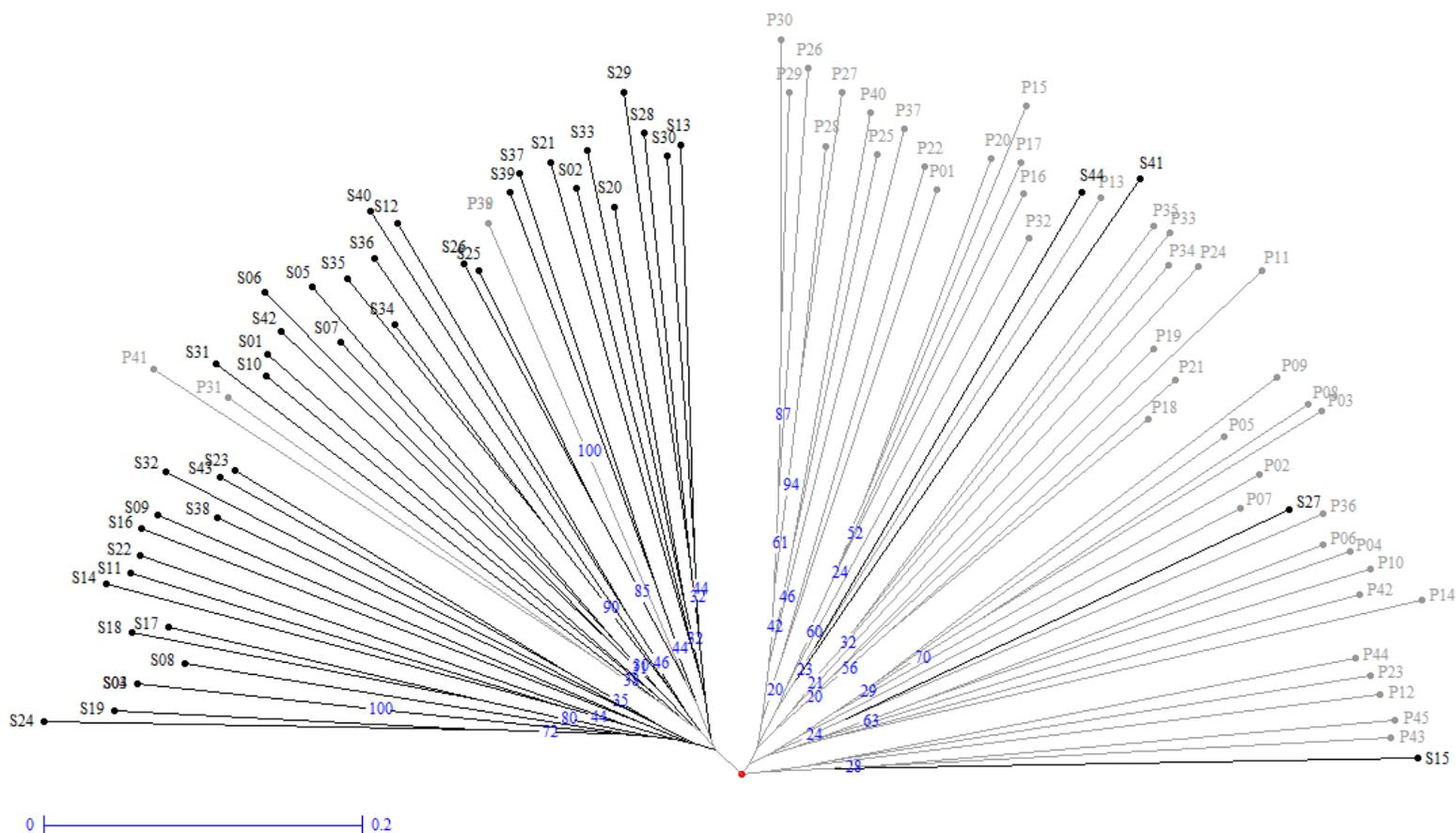
	Ambas populações	NSV	NDP	z	p-valor (Wilcoxon)
Número total de alelos	12,002	8,475	9,507	-1,429	0,153
Número total de fenótipos	28,773	15,744	18,869	-2,553	0,011
Número total de alelos não compartilhados entre pares de indivíduos	2,46	2,327	2,581	-1,804	0,071
Diversidade fenotípica média de Shannon-Weaver	2,371	2,267	2,469	-1,726	0,084
Número médio de alelos diferentes carregados por cada indivíduo	2,068	2,06	2,076	-0,169	0,866
Número de alelos compartilhados entre pares de indivíduos	1,104	1,155	1,06	0,706	0,48

**Tabela 3.** Resultados para a Análise de Variância Molecular (AMOVA) para duas populações de *Tibouchina pulchra* situadas no Núcleo Santa Virgínia (NSV) e Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba (NDP), no Parque Estadual da Serra do Mar. g. l. – graus de liberdade.  $p < 0,001$ .

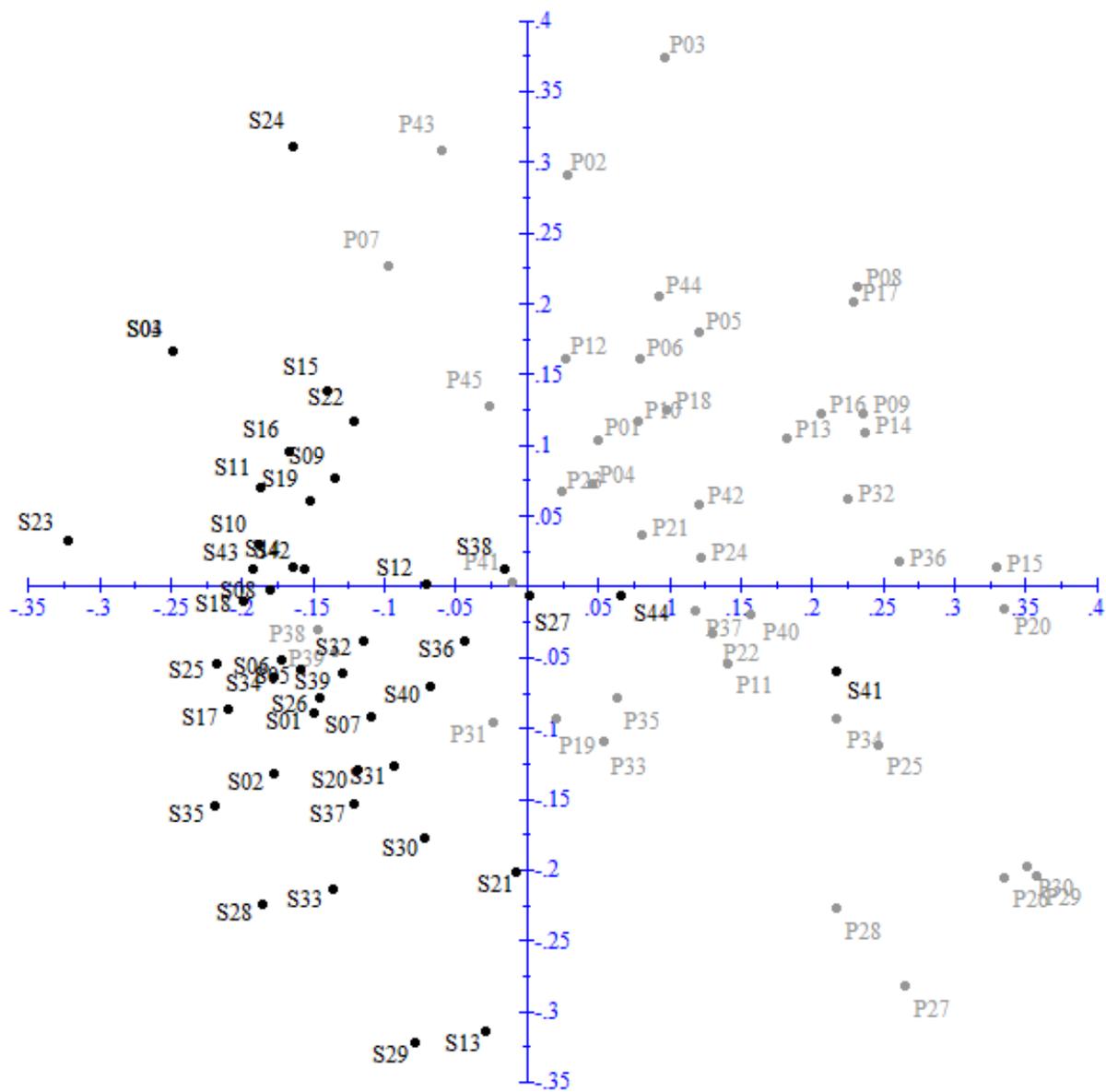
<b>Fonte de Variação</b>	<b>g.l.</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Componentes de Variância</b>	<b>Porcentagem de Variação</b>
<b>Entre populações</b>	1	63,531	1,18577 Va	9,92
<b>Dentro das Populações</b>	87	937,109	10,77137 Vb	90,08
<b>Total</b>	88	1000,640	11,95714	100,00



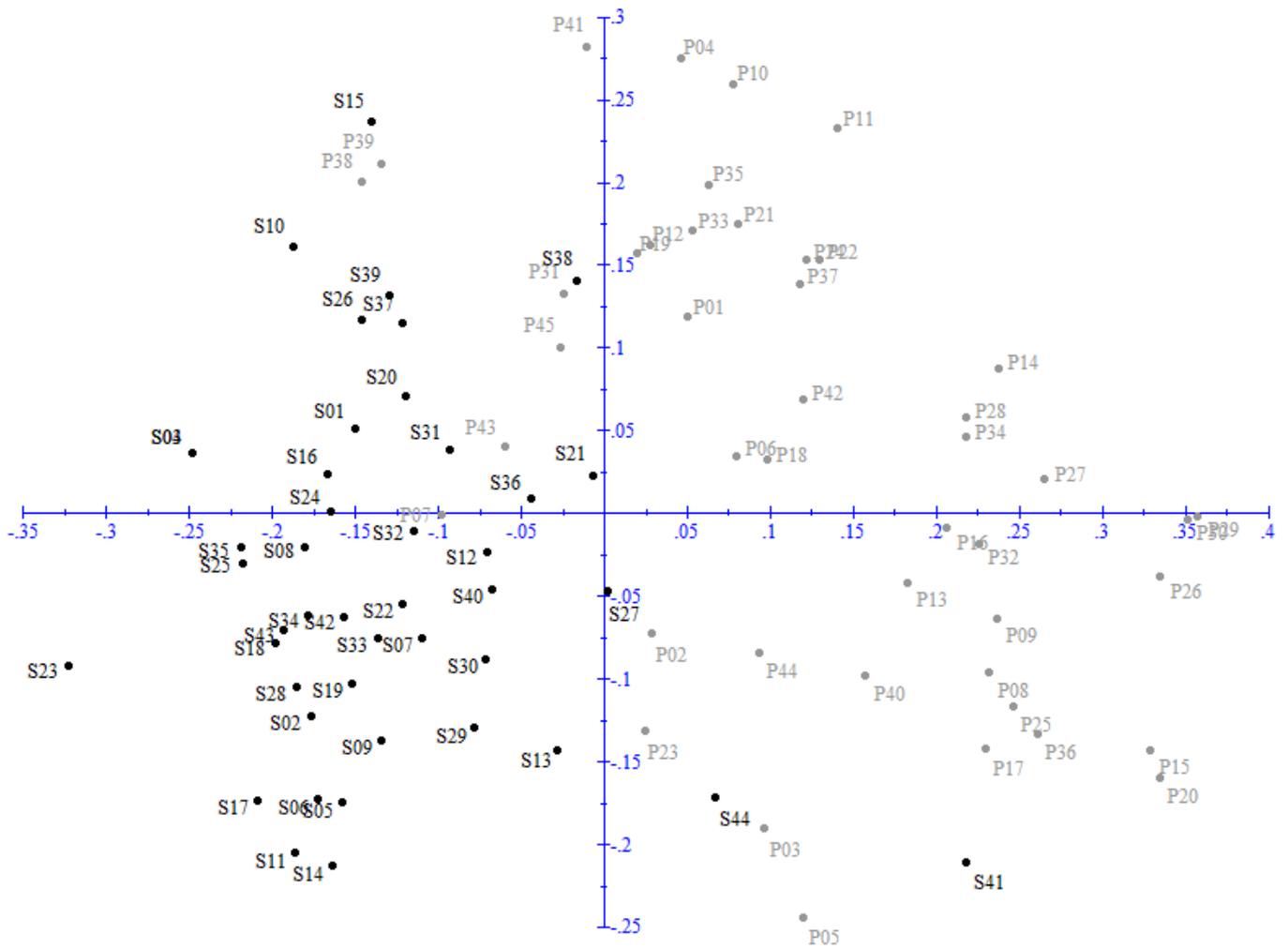
**Figura 1.** Mapa de localização das duas áreas de coleta de *Tibouchina pulchra* no no Parque Estadual da Serra do Mar - SP. Ver texto para detalhes. (adaptado de Moraes *et al.* 1999).



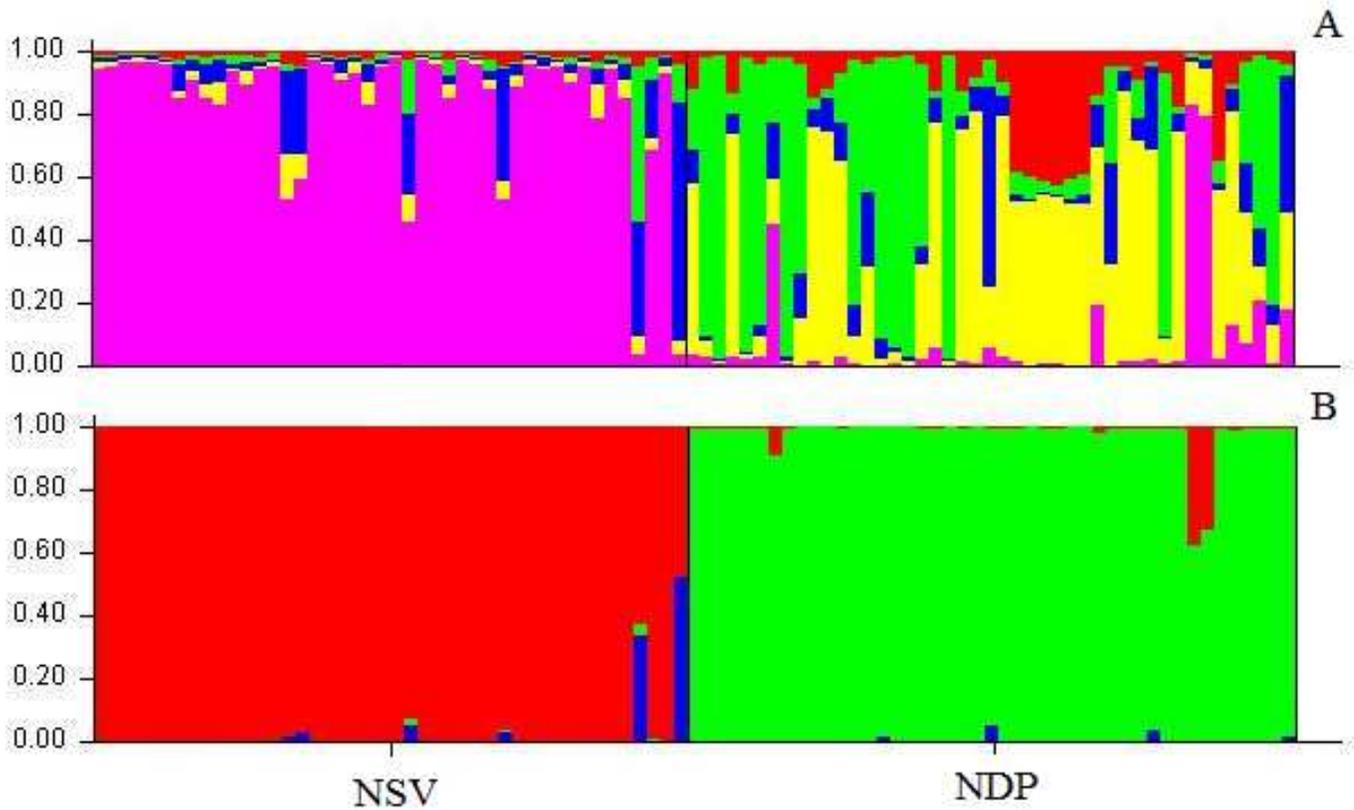
**Figura 2.** Árvore produzida pelo método de neighbor joining não ponderado a partir da matriz de dissimilaridade de Jaccard . Indivíduos de *Tibouchina pulchra* do Núcleo Santa Virgínia - NSV são mostrados como ramos pretos e do Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba - NDP como ramos cinzas. Valores de bootstrap maiores que 20% são mostrados nos ramos com números azuis (1000 repetições). Linha azul indica a escala do índice de dissimilaridade de Jaccard.



**Figura 3.** Análise de Coordenadas Principais (PCoA) mostrando o gráfico de dispersão com os eixo 1 (horizontal: 8,61% de inércia) e 2 (vertical: 5,97% de inércia) a partir da matriz de dissimilaridade de Jaccard. Pontos pretos = indivíduos coletados no Núcleo Santa Virgínia - NSV; pontos cinza = indivíduos coletados no Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba - NDP.



**Figura 4.** Análise de Coordenadas Principais (PCoA) mostrando o gráfico de dispersão com os eixo 1 (horizontal: 8,61% de inércia) e 3 (vertical: 4,89% de inércia) a partir da matriz de dissimilaridade de Jaccard. Pontos pretos = indivíduos coletados no Núcleo Santa Virgínia - NSV; pontos cinza = indivíduos coletados no Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba - NDP.



**Figura 5.** Análise realizada pelo software STRUCTURE 2.2. Agrupamento obtido usando modelo de ancestralidade com mistura e frequência de alelos correlacionada entre as populações (A) sem a população de cada indivíduo informada *a priori* para  $K=5$  e (B) com a população de cada indivíduo informada *a priori* para  $K=3$ . Cada um dos 89 genótipos analisados é representado por uma barra vertical. Os indivíduos são mostrados na ordem das coletas. Cada cor representa um grupo (K). Barras que apresentam duas ou mais cores indicam indivíduos que pertencem a mais de um grupo. O tamanho de cada segmento representa a probabilidade do indivíduo pertencer àquele grupo. Neste gráfico os indivíduos estão agrupados de acordo com a localidade em que foram coletados (Núcleo Santa Virgínia - NSV à esquerda e Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba - NDP à direita). A escala à esquerda indica a probabilidade do indivíduo pertencer à determinado grupo.

**Anexo 1:**  
**Protocolo de extração de DNA em *Tibouchina pulchra***

Solução CTAB 2%:

Componente adicionar	Para cada 10mL
H <sub>2</sub> O	5,78mL
Tris-HCl 1M pH7,5	1mL
NaCl 5M	2,8mL
EDTA 0,5M pH8,0	400 µL
PVP 40	0,1g
CTAB	0,2g
B – mercaptanol	20 µL

- 1) macerar aproximadamente 0,4g de folha em 3mL de CTAB 2%;
- 2) adiciona 5µL de proteinase K (20 mg/ ml) e 3µL de RNase (10mg/mL);
- 3) deixar em banho maria 50°C por 3-4h;
- 4) adicionar 500µL de SEVAG (Clorofórmio: Álcool Isoamílico 24:1);
- 5) centrifugar por 4min a 10.000rpm;
- 6) separar sobrenadante e lavar com 500µL de SEVAG (Clorofórmio: Álcool Isoamílico 24:1) novamente;

- 7) separar 750 $\mu$ L de sobrenadante em um tubo de 1,5mL;
- 8) adicionar 510 $\mu$ L de isopropanol 100% gelado e 30 $\mu$ L de acetato de sódio 3M pH8,0;
- 9) deixar overnight;
- 10) centrifugar por 20min (15 + 5) a 15.000 rpm;
- 11) descartar sobrenadante e lavar duas vezes com 1mL de etanol 70% (não é necessário centrifugar);
- 12) deixar secar;
- 13) adicionar 80 $\mu$ L de tampão TE (100mM TrisHCl pH8,0, 10mM EDTA pH8,0), agitar e colocar em banho maria a 65°C por 15min.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- *Tibouchina pulchra* é uma planta pioneira, arbórea, tem ampla distribuição e ocorre em todo o gradiente altitudinal da Serra do Mar na região norte do Estado de São Paulo. Suas flores são hermafroditas e possuem anteras poricidas que restringem o acesso ao pólen e todo o processo de polinização a abelhas capazes de vibrá-las (buzz-pollination).
- Na região do NSV, *T. pulchra* interage com uma comunidade de abelhas que é menos rica e menos abundante que no NDP. Isso implica numa menor retirada de grãos pólen das anteras poricidas e menor deposição na superfície dos estigmas ao longo do dia na região mais alta. Assim, a produção natural de frutos também é menor no NSV, apesar da florada mais intensa.
- Nas duas populações a viabilidade do pólen é alta, os tubos polínicos crescem com velocidades semelhantes (independente do tratamento) e não há diferenças no sistema reprodutivo (auto-compatível, dependente dos polinizadores) como prevê a hipótese da segurança reprodutiva. Porém, na região mais alta algumas características parecem balancear a falta de polinizadores e a maior limitação de pólen como a florada mais intensa, produção de menor quantidade de grãos de pólen e maior proporção de sementes fertilizadas produzidas por polinização cruzada.
- As duas populações, apesar de geneticamente muito semelhantes, foram separadas por diferentes análises. Isso indica que as diferenças na riqueza e abundância de polinizadores e, conseqüentemente, na dinâmica de pólen entre as duas áreas pode influenciar a estrutura destas populações. Alguns indivíduos foram agrupados no outro grupo e existe uma região de contato entre as duas populações. Isso pode indicar a existência de certa taxa de migração entre as populações, considerando que *T. pulchra* possui as altas taxas de produção e germinação de sementes e, quando adulta, se reproduz todos os anos (padrão de florada anual).
- As análises genéticas também indicam que na área mais alta os indivíduos são mais semelhantes entre si. A falta de polinizadores e visitas concentradas em poucos indivíduos devem contribuir para este padrão, porém para testar a ocorrência de

depressão endogâmica, estudos com coletas mais abrangentes devem ser realizados nas regiões altas da Serra do Mar.

- Estudos que integram observações acerca da fenologia, biologia floral, biologia reprodutiva e polinização com os métodos de marcadores moleculares, como o aqui apresentado, podem contribuir de forma significativa para o melhor entendimento da ecologia e evolução das características associadas à reprodução de plantas que ocorrem em um gradiente de altitude.