APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE ANÁLISE MULTIVARIADA E ELETROFORESE DE ISOENZIMAS EM ESTUDOS DE RELAÇÕES FENÉTICAS NO GÊNERO *Laelia* seção *Parviflorae*

ROSANGELA MARIA SIMEÃO RESENDE

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Piracicaba
Estado de São Paulo - Brasil
Abril 1991

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE ANÁLISE MULTIVARIADA E ELETROFORESE DE ISOENZIMAS EM ESTUDOS DE RELAÇÕES FENÉTICAS NO GÊNERO *Laelia* seção *Parviflorae*

ROSANGELA MARIA SIMEÃO RESENDE
Bióloga

Orientador: Prof. Dr. PAULO SODERO MARTINS

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Piracicaba
Estado de São Paulo - Brasil
Abril 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Resende, Rosangela Maria Simeão

R433a Aplicação de técnicas de análise multivariada e eletroforese de isoenzimas em estudos de relações fenéticas no gênero Laelia seção Parviflorae. Piracicaba, 1991.

130p. ilus.

Diss. (Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Análise multivariada 2. Eletroforese aplicada 3. Estatística matemática aplicada 4. Isoenzima de orquidácea - Eletroforese 5. Orquidácea - Fenótipo - Análise multivariada 6. Orquidácea - Fenótipo - Eletroforese 7. Orquidácea - Taxonomia numérica I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 584.15

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE ANÁLISE MULTIVARIADA E ELETROFORESE DE ISOENZIMAS EM ESTUDOS DE RELAÇÕES FENÉTICAS NO GÊNERO *Laelia* seção *Parviflorae*

ROSANGELA MARIA SIMEÃO RESENDE

Aprovada em: 07 de junho de 1991.

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Paulo Sodero Martins	ESALQ/USP
Prof. Dr. Roland Vencovsky	ESALQ/USP
Prof. Dr. George John Shepherd	UNICAMP

Prof. Dr. Paulo Sodero Martins

Orientador

Aos meus pais José e Luzia

e aos meus irmãos Roseli, José Ronaldo e Ramiris

OFEREÇO.

Ao querido MARCOS

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. PAULO SODERO MARTINS, pela orientação, apoio e amizade.
- Ao Departamento e Instituto de Genética da ESALQ/USP, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. Geraldo Antônio Tosello, pelas facilidades concedidas.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.
- Aos Docentes do Departamento de Genética, pelos ensinamentos.
- Ao Marcos Deon Vilela de Resende, pelo apoio nas análises estatísticas, pela compreensão e incentivo constantes.
- Aos funcionários do Departamento de Genética, José L. Zem e Elizabete A.L. Rodrigues, pelo apoio na parte de tabulação dos dados e às bibliotecárias Terezinha J.L. Barrete e Rosmary dos Santos, pela colaboração e amizade.
- À Carmen M.S. Fernandes, na qualidade de Secretária do Departamento de Genética, pelas contribuições e amizade.
- Ao funcionário Ronaldo J. Rabello, pela colaboração prestada na condução de análises em laboratório e amizade.
- Aos funcionários do Departamento de Genética responsáveis pelo orquidário, Srs. Benedito Correa, Alaor de Oliveira, Nelson Vieira, Josue Pontes, Armando Ficher e em especial

à Sra. Yvette de Toledo, pela amizade e incentivo.

- A Sônia Maria de Souza pelo apoio na digitação e impressão deste trabalho e pela amizade.
- A todos os colegas de pós- graduação, em especial aos amigos Bernadete, Levi, Roberto, Benedita, Mônica, Claudinha, Rosângela, Ido, Silvana, Francisco e Cláudia, pela convivência, apoio e incentivo durante todo o período do curso.

SUMÁRIO

RESUMO ix

SUMMARY xi

1-INTRODUÇÃO 01

2-REVISÃO DE LITERATURA 04

2.1.Gênero Laelia seção Parviflorae 04

2.1.1.Caracterização morfológica 04

2.1.2.Caracterização citológica 10

2.2.Principais métodos estatísticos aplicados à taxonomia numérica 13

2.2.1. Medidas de dissimilaridade baseados em morfologia 16

2.2.1.1.Coeficiente de semelhança racial ou morfológica 16

2.2.1.2.Distância Euclideana 17

2.2.1.3.Distância Generalizada de Mahalanobis 19

2.2.1.4.Análises de componentes principais..... 21

2.2.1.5.Variáveis canônicas 24

2.2.2.Medidas de dissimilaridade aplicadas à quimiossistemática 26

2.2.2.1.Coeficientes de distância e similaridade Genética 29

2.2.3.Análises de agrupamento ("cluster")..... 34

3. MATERIAL E MÉTODOS 38

3.1. Material 38

3.2. Métodos 42

3.2.1. Análises de variância e covariância..... 42

3.2.2. Cálculos das distâncias generalizadas de Mahalanobis 43

3.2.3. Análise de componentes principais 44

3.2.4. Variáveis canônicas 48

3.2.5. Análise de agrupamento 49

3.2.6. Inferência da divergência genética entre as espécies e descarte de variáveis redundantes 51

3.2.7. Operacionalização das análises 52

3.2.8. Análise eletroforética de isoenzimas 52

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 60

4.1. Relações fenéticas entre espécies baseadas em dados morfológicos 60

4.1.1. Análise de variância 60

4.1.2. Distância generalizada de Mahalanobis e agrupamentos 60

4.1.3. Componentes principais 66

4.1.4. Variáveis canônicas 69

4.1.5. Descarte de variáveis 73

4.2. Relações fenéticas baseadas em dados isoenzimáticos 78

5. CONCLUSÕES 89

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 92

TABELAS 102

FIGURAS 114

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE ANÁLISE MULTIVARIADA E ELETROFORESE DE ISOENZIMAS EM ESTUDOS DE RELAÇÕES FENÉTICAS NO GÊNERO *Laelia* seção *Parviflorae*

Autor: ROSANGELA MARIA SIMEAO RESENDE

Orientador: Prof. Dr. PAULO SODERO MARTINS

RESUMO

Neste trabalho foram utilizados alguns métodos de análise multivariada, aplicados à taxonomia numérica, e análise eletroforética de isoenzimas com o objetivo de estabelecer as relações fenéticas entre onze espécies do gênero *Laelia* seção *Parviflorae*.

Os estudos relativos à divergência morfológica entre as 11 espécies para os treze caracteres avaliados permitiram concluir que, dos procedimentos multivariados utilizados, as medidas de dissimilaridade baseadas na distância generalizada de Mahalanobis e agrupamento pelo método do "vizinho mais próximo", e análises de variáveis canônicas foram os mais eficientes no estabelecimento de grupos e subgrupos e da relação entre estes. Desta forma, o primeiro grupo subdividiu-se em 4

subgrupos, sendo o primeiro formado pelas espécies *L. crispilabia*, *L. caulescens*, *L. flava* e *L. milleri*; o segundo, pelas espécies *L. lucasiana* e *L. esalqueana*; o terceiro, pelas espécies *L. longipes*, *L. briegeri* e *L. crispata* e o quarto, pela espécie *L. mixta*. O segundo grupo constituiu-se apenas pela espécie *L. cinnabarina*, notadamente isolada das demais em todas as análises multivariadas.

O processo de descarte de caracteres redundantes permitiu a indicação dos caracteres comprimento do labelo, comprimento da sépala dorsal, largura da sépala dorsal, comprimento da sépala lateral, comprimento da coluna e espessura da coluna, como os mais importantes para divergência genética interespecífica e dentre estes, o comprimento do labelo, como o que mais contribuiu para divergência.

Padronizou-se a técnica de eletroforese de isoenzimas para os sistemas glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), esterase (EST) e malato deidrogenase (MDH), para as espécies do gênero em estudo. A avaliação de sete espécies, para estes sistemas , revelaram um monomorfismo intraespecífico para GOT e EST e um polimorfismo intraespecífico para MDH, bem como, uma grande homologia interespecífica quanto aos fenótipos isoenzimáticos, concordando com os resultados obtidos pela análise multivariada de caracteres morfológicos.

Estes resultados permitiram reforçar a hipótese do processo evolutivo recente destas espécies. Foram sugeridos trabalhos futuros à partir de algumas inferências sobre a origem e processos evolutivos atuantes nestas espécies.

APPLICATION OF MULTIVARIATE ANALYSIS TECHNIQUES AND ISOZYME ELECTROPHORESIS IN STUDIES OF PHENETIC RELATIONSHIPS IN THE GENUS *Laelia* section *Parviflorae*

Author: ROSANGELA MARIA SIMEAO RESENDE

Adviser: Prof. Dr. PAULO SODERO MARTINS

SUMMARY

This work used multivariate methods applied to numerical taxonomy, and isozyme electrophoretical analysis to determine the phenetics relationships among eleven species of the genus *Laelia* section *Parviflorae*.

The studies of morphological divergence among the 11 species for the thirteen traits evaluated indicate that, among the multivariate procedures used, the dissimilarity measures based on Mahalanobis distance with clustering by single-linkage method, as well as canonical analysis were the most efficient methods to determine groups and sub-groups, and the relationships among them. The first group was divided in four subgroups: one composed by *L. crispilabia*, *L. caulescens*, *L. flava* and *L. milleri*;

other by *L. esalqueana* and *L. lucasiana*; another by *L. longipes*; *L. briegeri* and *L. crispata*; and the last by *L. mixta*. The second group comprised by only *L. cinnabarina* that was markedly isolated of the others in all the multivariate analysis.

The procedure to discard redundant traits indicated that labellum length, sepal length, sepal width, lateral sepal length, column length and column width, to be most important for interspecific genetic divergence, labellum length being the most important of all.

Isozyme electrophoresis techniques was standardized for glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), esterase (EST) and malate dehydrogenase (MDH) for the species of the genus in study. The evaluation of seven species for this systems revealed a intraspecific monomorphism for GOT and EST, and a intraspecific polymorphism in MDH, as well a great interspecific homology to isozyme phenotypes, in agreement with results obtained by multivariate analysis of morphological traits.

The results support the hypothesis of recent evolution in this section. Future research on inferences of origin and evolutionary processes in these species are suggested.

1- INTRODUÇÃO

A taxonomia numérica foi definida por SNEATH & SOKAL (1973) como o "agrupamento, por métodos numéricos, de unidades taxonômicas em taxa com base nos estados dos caracteres avaliados". Esse termo inclui uma série de metodologias matemáticas e estatísticas que foram desenvolvidas, principalmente, nas três últimas décadas e têm como princípio fundamental a repetibilidade e a objetividade.

Em relação aos métodos convencionais, a taxonomia numérica apresenta a vantagem de utilizar diversas fontes de dados morfológicos, fisiológicos, isoenzimáticos, entre outros. A análise desses dados, pelos métodos disponíveis em taxonomia numérica, tem permitido uma maior discriminação entre taxa. Este processo tem levado à obtenção de melhores chaves de identificação e classificação (SNEATH & SOKAL, 1973; CRAWFORD, 1983).

Vários passos devem ser seguidos afim de que se possa aplicar a taxonomia numérica. Os primeiros envolvem a amostragem adequada de unidades taxonômicas, bem como dos caracteres a serem empregados. O segundo passo

consiste em determinar a medida de similaridade (ou dissimilaridade) mais adequada ao conjunto de caracteres, bem como seus estados. O terceiro passo envolve a determinação adequada de como representar os resultados dos coeficientes obtidos, se por agrupamento ou outro método, evitando a simples avaliação visual dos mesmos. Os passos seguintes envolvem a avaliação e a aplicação dos resultados obtidos (CANNINGS & HOPPENSTEADT, 1982).

A utilização, em taxonomia numérica, de dados referentes a caracteres morfológicos e eletroforéticos de isoenzimas bem como a comparação dos resultados obtidos por esses métodos, tem sido bastante ampliada nestes últimos anos (SNEATH & SOKAL, 1973; HAMRICK, 1979; BUTH, 1984). Isto tem permitido um grande número de inferências sobre o nível de diversificação, tanto fenética quanto filogenética, em muitos grupos taxonômicos.

Um grupo de espécies do gênero Laelia seção Parviflorae tem atraído a atenção de pesquisadores há alguns anos. Estas espécies formam um grupo bastante distinto das outras seções do gênero, principalmente por apresentarem, em sua maioria, o hábito rupícola, num gênero onde o epifitismo é predominante. Entretanto, estas espécies não apresentam uma distinção clara entre si, sendo que os taxonomistas que delas mais se ocuparam relatam a dificuldade de estabelecimento de uma chave de

identificação para seu pronto reconhecimento (HOEHNE, 1952; PABST, 1978).

BLUMENSCHEIN (1957; 1960a e b), estudando estas espécies a nível citológico, fez inferências sobre seu processo evolutivo. Contudo, algumas relações fenéticas e filogenéticas foram deduzidas de forma subjetiva, permanecendo ainda indefinidas.

Baseado no exposto anteriormente, realizou-se o presente trabalho, utilizando alguns métodos de análise multivariada para taxonomia numérica e a análise do polimorfismo intraespecífico através da eletroforese de isoenzimas, com os seguintes objetivos:

- estabelecer as relações fenéticas entre onze espécies do gênero Laelia seção Parviflorae;
- comparar métodos de análise multivariada no estudo das relações fenéticas entre onze espécies do gênero Laelia seção Parviflorae.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero Laelia seção Parviflorae

2.1.1 Caracterização morfológica

O gênero Laelia Lindley é um dos mais importantes dentro da família Orchidaceae, não apenas por abranger um grande número de espécies, mas também pelo valor ornamental que elas apresentam.

Atualmente, a classificação proposta por SCHLECHTER (1917), dividindo o gênero em sete seções, ainda é aceita. Destas, quatro ocorrem no Brasil (Cattleyodes, Hadrolaelia, Microlaelia e Parviflorae) e três ocorrem na América Central e México (Podalaelia, Calolaelia e Eulaelia). A chave seguinte define as sete seções:

1a- labelo sem cristas ou carinas internamente ---------- Cattleyodes

1b- labelo com cristas ou carinas internamente ---------- 2

2a- haste floral sem articulações e sem bainhas --------- 3

2b- haste floral com articulações e com bainhas --------- 5

3a- pétalas nitidamente mais largas e sem bainhas ------- 4

3b- pétalas e sépalas pouco diferentes entre si, com mais

ou menos igual largura ---------- Microlaelia

4a- pseudobulbos constituídos de apenas um entre-nó -------
---------- Hadrolaelia

4b- pseudobulbos constituídos de vários entre-nós ---------
---------- Eulaelia

5a- sépalas e pétalas pouco diferentes entre si; rácimos emergentes de uma grande espata ---------- Parviflorae

5b- pétalas maiores e mais largas que as sépalas; haste floral não emergente de espata ---------- 6

6a- pseudobulbos com duas folhas; labelo com carinas não denteadas ---------- Podalaelia

6b- pseudobulbos com duas folhas; labelo com cristas altas e denteadas ---------- Calolaelia

A seção Parviflorae, na classificação acima, recebeu o nome mais antigo proposto por Lindley em substituição a Cyrtolaelia, proposto por Schlechter (PABST & DUNGS, 1974). Esta seção compreende mais da metade das espécies do gênero Laelia, com cerca de 40 espécies (MIRANDA, 1990).

Todas as espécies, excetuando L. harpophylla, têm hábito rupícola, sendo encontradas presas nas saliências e reentrâncias de formações rochosas das serras que se estendem pelos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (BLUMENSCHEIN, 1960a e b; PABST, 1978). Estas espécies, entre outras, compõem a flora característica dos campos rupestres.

As espécies da seção Parviflorae formam um grupo bastante distinto das demais espécies de outras seções do gênero Laelia, apresentando entretanto uma grande semelhança entre si, o que torna a sua identificação bastante difícil. Apresentam ainda uma grande continuidade quanto à forma e tamanho dos orgãos vegetativos e uma semelhança ainda maior entre a forma e tamanho das peças florais, como demonstrou BLUMENSCHEIN (1960b).

Quanto ao tamanho e forma dos pseudobulbos os extremos são as espécies L. crispata e L. lucasiana com 215.4 ± 62.40mm e 24.6 ± 7.37mm de comprimento, respectivamente e com a forma variando de cilíndrica a piriforme. As demais espécies apresentam dimensões e formas intermediárias.Na dimensão das folhas ocorre uma situação semelhante, sendo também os extremos L. crispata e L. lucasiana com 224.2 ± 41.99mm e 39.2 ± 10.05mm de comprimento, respectivamente. As demais espécies apresentam dimensões intermediárias (BLUMENSCHEIN, 1960b).

Em relação ao tamanho das flores, sem que sejam consideradas as peças florais isoladamente, observa-se que as espécies L. esalqueana e L. lucasiana possuem as menores, enquanto que a espécie L. cinnabarina possui a maior e as demais possuem flores de tamanhos intermediários (BLUMENSCHEIN, 1960b).

Quando são considerados os caracteres morfológicos isoladamente é possivel a formação de grupos

entre estas espécies. Assim, para o caráter forma da folha podem ser considerados os seguintes grupos: i- L. esalqueana, L. lucasiana, L. longipes e L. briegeri; ii- L. flava, L. mixta, L. milleri, L. caulescens e L. crispilabia; e finalmente, dois grupos isolados de L. crispata e L. cinnabarina (BLUMENSCHEIN, 1960b).

Para o caráter forma das peças florais, grupos diferentes podem ser formados, tendo sido observado por BLUMENSCHEIN (1960b) uma grande semelhança entre L. esalqueana, L. lucasiana, L. longipes e L. briegeri e entre L. milleri, L. mixta e L. flava. Entretanto, esta forma de agrupar espécies é bastante subjetiva, pois baseia-se apenas na análise visual.

A coloração das flores e peças florais são caracteres bem variáveis nestas espécies e são considerados essenciais para distinção destas, sendo possível a consideração de três grupos: i- espécies com flores amarelas, L. flava, L. esalqueana, L. briegeri e L. mixta; ii- espécies com flores roxas, L. crispata, L. crispilabia, L. caulescens, L. lucasiana e L. longipes e finalmente, iii-espécies com flores vermelho-cinabrino, L. milleri e L. cinnabarina (BLUMENSCHEIN, 1960b). São conhecidas ainda variedades albinas de L. flava e L. lucasiana que não serão consideradas neste estudo.

CUNHA FILHO (1966), utilizando a Distância Generalizada de Mahalanobis como medida de dissimilaridade

e com base em 18 caracteres morfológicos vegetativos e florais de 13 espécies da seção Parviflorae foi capaz de reuní-las em oito grupos. Os grupos são os seguintes: i- L. cinnabarina; ii-L. harpophylla; iii- L. mixta; iv- Laelia sp.; v- L. milleri e L. flava; vi- L. caulescens e L. crispilabia; vii- L. lucasiana e L. esalqueana e, viii- L. briegeri, L. longipes e L. crispata. Entretanto, não foi analisada a relação intergrupos por métodos estatísticos de agrupamento.

Podem ser observadas as diferenças dos resultados obtidos pela formação de grupos de forma subjetiva (BLUMENSCHEIN, 1960b) em comparação com os resultados obtidos de forma considerada objetiva (CUNHA FILHO, 1966). Quando comparamos os grupos sugeridos por BLUMENSCHEIN (1960b), considerando apenas os caracteres forma da folha e forma das peças florais,com os grupos sugeridos por CUNHA FILHO (1966), baseado em dezoito caracteres, observa-se que L. cinnabarina isola-se em um grupo para os dois autores. Entretanto, para BLUMENSCHEIN (1960b) L. crispata também isola-se, o que não ocorre no agrupamento de CUNHA FILHO (1966) no qual esta espécie, juntamente com L. briegeri e L. longipes formam um grupo. Para CUNHA FILHO (1966) L. mixta forma um grupo isolado dos grupos formados pelas espécies L. flava e L. milleri e pelas espécies L. caulescens e L. crispilabia, o que não ocorre no agrupamento sugerido por (BLUMENSCHEIN, 1960b).

Empregando métodos estatísticos na comparação de 4 caracteres vegetativos e 8 florais e também baseado na simples observação da variação na forma dos diversos orgãos e cor das flores de populações de 5 espécies da seção Parviflorae, BLUMENSCHEIN (1960b) foi capaz de detectar diferenças intraespecíficas em algumas delas. A análise estatística de duas populações de L. crispilabia demonstrou ausência de variação significativa para os caracteres analisados. O mesmo resultado foi obtido a partir da análise de duas populações de L. longipes. Entretanto, para esta espécie foi observada diferença de ordem citológica que poderia ser uma indicação do desenvolvimento de um mecanismo de isolamento.

BLUMENSCHEIN (1960b) analisou também quatro populações de L. flava. Neste caso as diferenças foram significativas, sendo este fato, aliado à variação na época de florescimento entre as diversas origens, considerado pelo autor como um forte indício de desenvolvimento de um mecanismo de isolamento entre as populações.

Populações de L. crispata e L. briegeri também apresentaram diferenças significativas, sendo que para esta última foi detectada ainda uma diferença intrapopulacional quanto à cor das flores, tamanho das peças florais e aspecto da inflorescência, sendo também detectadas diferenças ao nível de ploidia. Neste último caso, BLUMENSCHEIN (1960b) considerou que os grupos

intrapopulacionais já estavam completamente isolados, podendo até mesmo serem considerados espécies diferentes.

A grande semelhança entre as espécies da seção Parviflorae pode ser resultado de hibridações interespecíficas ou resultado de uma evolução paralela destas espécies sujeitas às mesmas pressões de seleção. BLUMENSCHEIN (1960b) considerou a primeira hipótese mais provável, pois vários argumentos serviam para reforçá-la: i- distribuição simpátrica; ii- mecanismos de isolamento nem sempre muito rígidos; iii- alta frequência de poliplóides e presença de formas aneuplóides em L. briegeri e L. longipes.

2.1.2. **Caracterização citológica**

A grande maioria dos gêneros de orquídea apresentam pouca variação no número de cromossomos, sendo que os números básicos mais frequentes são n=19 ou 20 (CHASE & OLMSTEAD, 1988). Entretanto, acredita-se que o número básico não tenha sido este durante o processo evolutivo desta família. Esse número possivelmente deve ter sido de 10 ou 5, de forma que a maioria das espécies hoje existentes são consideradas poliplóides (BLUMENSCHEIN, 1957).

A análise citológica de um grande número de espécies da seção Parviflorae foi realizada por

BLUMENSCHEIN (1957 e 1960a e b) e seus resultados indicaram uma alta frequência de espécies poliplóides. Esta alta frequência de poliploidia pode representar o processo que permitiu a exploração rápida de novas condições ambientais encontradas por estas espécies ao passarem de epífitas para rupícolas, bem como, um processo que possibilitou a fixação de produtos de hibridações nesta seção. Além disso pode ter funcionado como mecanismo de isolamento reprodutivo em espécies com distribuição simpátrica e com épocas de florescimento coincidentes.

Como pode ser visto na Tabela 1 a análise revelou os números de cromossomos e algumas variações encontradas para L. longipes e L. briegeri em diferentes locais de origem. Baseando-se nestes dados, BLUMENSCHEIN (1960b) considerou três níveis diferentes de desenvolvimento de ploidia como mecanismo de isolamento entre estas espécies: i- um nível mais adiantado nas espécies L. crispata, L. crispilabia e L. caulescens, que são consideradas tetraplóides já fixados, não sendo possível reconhecer atualmente seus ancestrais diplóides; ii- um nível pouco mais recente em L. briegeri, por apresentar indivíduos com 2n=80 e por apresentar indivíduos aneuplóides, possivelmente descendentes de triplóides, que estão sendo selecionados para maior proximidade da diploidia, não tendo portanto fixado ainda o número de cromossomos e, iii- L. longipes com um nível mais recente,

onde a partir de um diplóide originou-se o tetraplóide e do cruzamento destes, o triplóide. Neste caso, a poliploidia não se tornou ainda um mecanismo de isolamento completo entre as populações.

Para o caso de L. briegeri, BLUMENSCHEIN (1960b) considerou como seu possível ancestral diplóide a L. esalqueana dada a grande semelhança entre elas. Esta grande semelhança também foi observada por CUNHA FILHO (1966).

BLUMENSCHEIN & VENCOVSKY (1961) discutiram a possibilidade da origem híbrida de L. mixta a partir do cruzamento de L. flava e L. cinnabarina, considerando que esta espécie apresenta características intermediárias entre seus possíveis parentais. CUNHA FILHO (1966) confirmou esta possibilidade, baseado em um diagrama espacial que coloca L. mixta em uma posição intermediária.

BLUMENSCHEIN (1960b) sugeriu a origem híbrida de L. lucasiana a partir de L. esalqueana e L. longipes e de L. milleri a partir de L. flava e L. cinnabarina. CUNHA FILHO (1966) confirmou esta possibilidade.

WITHNER & ADAMS (1960) reuniram L. flava, L. cinnabarina e L. harpophylla em um único grupo e L. longipes e L. crispilabia em outro. Consideraram também que estes grupos eram resultantes da diferenciação de um complexo original. Esses resultados não foram confirmados

por CUNHA FILHO (1966) devido a grande distância entre as espécies do primeiro grupo e uma relação não muito estreita entre as do segundo.

2.2. Principais métodos estatísticos aplicados à taxonomia numérica

O termo taxonomia numérica é definido como o agrupamento, por métodos numéricos, de unidades taxonômicas em taxa, com base nos estados dos caracteres avaliados. Um caráter , neste contexto, significa qualquer propriedade que possa variar entre unidades taxonômicas e os valores que lhes são atribuídos chamam-se estados daquele caráter (SNEATH & SOKAL, 1973; CANNINGS & HOPPENSTEADT, 1982).

Desde o início do século, pesquisadores vêm aplicando métodos numéricos à taxonomia. Neste processo, um dos primeiros métodos estatísticos de interesse para sistemática foi o "Coeficiente de Semelhança Racial" elaborado por PEARSON (1926). Este coeficiente consiste em um tipo de coeficiente de similaridade, tendo sido desenvolvido, posteriormente, por MAHALANOBIS (1936) na forma de "Distância Generalizada". A partir destes trabalhos vários outros foram sendo desenvolvidos, sendo que SNEATH & SOKAL (1973) consideraram que a fase moderna da taxonomia numérica teve seu início no final dos anos 50. Com a publicação dos "Princípios de Taxonomia Numérica" de

SOKAL & SNEATH (1963) houve um grande incremento nesta área, tanto com o desenvolvimento de novos métodos quanto na aplicação destes.

As medidas de similaridade entre unidades taxonômicas (referidas como unidades taxonômicas operacionais, OTU's, por taxonomistas numéricos) dependerão do tipo do caráter estudado e da forma que esta informação está sendo codificada. Assim, as medidas de similaridade consideram se os caracteres são binários, utilizando para este caso o coeficiente de Jaccard por exemplo; se os caracteres são qualitativos com mais de dois estados e, finalmente se os caracteres são quantitativos.

O complemento da similaridade entre duas unidades taxonômicas constituem a sua dissimilaridade e em muitos casos este último é que é realmente medido.

Inúmeras medidas de dissimilaridade satisfazem as propriedades matemáticas conhecidas como métricas. Assim, considerando a dissimilaridade dij entre as OTU's i e j, essas propriedades são as seguintes, segundo CANNINGS & HOPPENSTEADT (1982):

a) simetria:

$dij = dji \geqslant 0$, ou seja, a dissimilaridade entre i e j é igual independentemente da direção em que é medida, devendo ser positiva quando as duas OTU's não são idênticas ou ter valor zero quando são idênticas.

b) distinção entre OTU's não idênticas:

se $d_{ij} \neq 0$, então $i \neq j$, ou seja, i e j não são a mesma OTU.

c) não distinção entre OTU's idênticas:

$d_{ij} = 0$, ou seja, quando i e j são idênticas a dissimilaridade d_{ij} é zero.

d) desigualdade triangular:

dadas 3 OTU's i,j e k, as dissimilaridades entre elas devem satisfazer a "desigualdade", assim $d_{ik} \leqslant d_{ij} + d_{jk}$. Quando os coeficientes de dissimilaridade satisfazem essas propriedades eles são chamados de distâncias. A medida de distância mais amplamente utilizada em taxonomia numérica é a Distância Euclideana, por ser mais familiar e amplamente difundida, já que é derivada do Teorema de Pitágoras (SNEATH & SOKAL, 1973).

Com a finalidade de separar os organismos em grupos, os taxonomistas numéricos empregam métodos estatísticos que permitem o cálculo das medidas de dissimilaridade ou distâncias entre OTU's e métodos que permitem o agrupamento das diferentes OTU's em grupos homogêneos. Tais técnicas foram amplamente desenvolvidas nas três últimas décadas e neste trabalho serão discutidas as mais empregadas em estudos taxonômicos.

2.2.1. Medidas de dissimilaridade baseadas em morfologia

2.2.1.1. Coeficiente de semelhança racial ou morfológica

O coeficiente de semelhança racial (CSR) foi desenvolvido por PEARSON (1926) para medir a semelhança entre amostras de crânios de várias origens. Este coeficiente considera a variabilidade intraespecífica, de forma que médias e variâncias de caracteres contínuos (comprimento, largura, etc) são calculados para cada amostra. VENCOVSKY (1960) preferiu chamar este coeficiente de "coeficiente de semelhança morfológica (CSM)" por considerá-lo como indicador da distância morfológica entre grupos.

Este coeficiente pode ser definido como:

$$CSR = \left[\frac{1}{p} \sum_{k=1}^{p} \left(\frac{(\bar{X}_{kI} - \bar{X}_{kJ})^2}{(s^2_{kI}/t_I) + (s^2_{kJ}/t_J)} \right) \right]^{1/2} - \frac{2}{p}$$

onde I e J são as OTU's que estão sendo comparadas, $\bar{X}_{kI}$ é a média do k-ésimo caráter da amostra I, s^2_{kI} a variância do mesmo, t_I é o tamanho da amostra de I e p é o número de caracteres estudados.

VENCOVSKY (1960) empregou este coeficiente no estudo de três espécies do gênero <u>Hormidium</u> e duas do gênero <u>Brassavola</u>, sendo que em <u>Brassavola perrinii</u> foram consideradas três populações. Concluiu que uma maior

dessemelhança morfológica isolava as espécies Hormidium fragans e Brassavola cebolleta em cada gênero, bem como apresentavam uma associação maior H. glumaceum e H. almasyi de um lado e as três populações de B. perrinii de outro. Considerou ainda que estas últimas, por apresentarem transgressão das épocas de florescimento, ainda não haviam se isolado completamente.

O conceito do coeficiente de semelhança racial foi mais tarde reconsiderado por MAHALANOBIS (1936) de uma maneira mais exata e com fundamentos matemáticos mais sólidos.

2.2.1.2. **Distância Euclideana**

A medida de distância mais comumente empregada é a distância Euclideana simples porque considera o universo Euclideano, o que é vantajoso em taxonomia numérica (CANNINGS & HOPPENSTEADT, 1982).

Como já foi dito anteriormente, a distância Euclideana obedece as propriedades métricas e também ao teorema de Pitágoras, assim, a distância entre a OTUi e a OTUj, em relação a dois caracteres, a e b, será dada pela expressão:

$$d_{ij} = [(X_{ja} - X_{ia})^2 + (X_{jb} - X_{ib})^2]^{1/2}$$

Essa expressão pode ser generalizada para uma situação em que p caracteres são observados em cada OTU:

$$d_{ij} = \left[\sum_{k=1}^{p} (X_{ik} - X_{jk})^2 \right]^{1/2}$$

Neste caso, assume-se que p caracteres são representados por eixos ortogonais (ou seja, formando ângulos retos um em relação ao outro). Entretanto, na prática, devido à correlação entre caracteres, isto não se justifica e a distância Euclideana não medirá a distância real entre as OTU's. Esse problema poderá ser contornado utilizando-se a distância generalizada de Mahalanobis ou a análise de componentes principais (CANNINGS & HOPPENSTEADT, 1982).

Deve-se considerar também que a distância Euclideana aumenta com o número de caracteres usados. Para contornar este problema utiliza-se a distância Euclideana Média, dada por:

$$\bar{d}_{ij} = \sqrt{\frac{d_{ij}^2}{p}} = \frac{d_{ij}}{\sqrt{p}}$$

Deve-se ressaltar que um dos inconvenientes da distância Euclideana é o fato dela ser alterada com a mudança da escala de medição das variáveis. Em função disso os estados de caráter devem ser padronizados antes de calculá-la (CANNINGS & HOPENSTEADT, 1982; CRUZ, 1987). A padronização é obtida por: $Z_{ik} = \frac{X_{ik}}{s(X_k)}$

onde: $s(X_k)$ é o desvio padrão dos dados do caráter k.

2.2.1.3. Distância Generalizada de Mahalanobis

A distância Generalizada desenvolvida por MAHALANOBIS (1936) E RAO (1948) não foi considerada nos primeiros estudos em taxonomia numérica. Várias razões existiam para explicar esta posição tomada por taxonomistas, as quais serão relatadas a seguir.

Os primeiros trabalhos em taxonomia numérica não consideravam os níveis taxonômicos específicos ou infraespecíficos e, consequentemente, as OTU's eram indivíduos ou exemplares e não amostras de populações. Segundo, o cálculo de distâncias generalizadas para um grande número de caracteres e/ou amostras requeria recursos computacionais não disponíveis na época. A terceira objeção era que a distância generalizada empregava caracteres contínuos e não caracteres discretos, usualmente utilizados em taxonomia numérica. Atualmente estas três objeções são irrelevantes e a distância generalizada tem se mostrado bastante útil para taxonomistas numéricos (SNEATH & SOKAL, 1973).

O cálculo da distância generalizada pressupõe a normalidade multivariada, ou seja, uma distribuição multinormal J dimensional (onde J é o número de caracteres) e a homogeneidade da matriz de covariância

das unidades amostrais (CRUZ, 1987), o que restringe seu uso. Quando estas suposições não são extremamente violadas a distância generalizada torna-se uma ferramenta útil para taxonomistas numéricos (SNEATH & SOKAL, 1973).

As distâncias generalizadas maximizam a diferença entre pares de médias para uma combinação de caracteres que apresentam uma variância máxima entre pares de grupos. Assim, a distância generalizada, D^2, pode ser calculada:

$$D^2_{IJ} = \delta'_{IJ} \; W^{-1} \; \delta_{IJ}$$

onde W^{-1} é a inversa da matriz de variância-covariância (dispersão residual) dentro de OTU's (dimensão p x p, onde p é o número de caracteres) e δ_{IJ} é um vetor de diferenças entre médias das OTU's I e J para todos os caracteres. Quando as correlações entre caracteres são pequenas (tendendo a zero), D^2 será semelhante ao quadrado da distância Euclideana considerando as variáveis padronizadas (CANNINGS & HOPPENSTEADT, 1982). Isso também é verdadeiro quando todas as correlações são iguais (SNEATH & SOKAL, 1973).

Os valores de D^2_{IJ}, obtidos para cada par de OTU's são considerados como tendo distribuição de qui-quadrado com p graus de liberdade. Assim, a significância de D^2 pode ser avaliada comparando a estimativa com o valor tabelado do qui-quadrado ao nível considerado (SING & CHAUDHARY, 1979).

A distância D^2 é muito importante quando existem repetições dentro das unidades amostrais, isto é, quando a unidade amostral é um conjunto de indivíduos e, principalmente, quando os caracteres são correlacionados (RIBOLDI, 1986).

2.2.1.4. Análises dos componentes principais

A utilização de medidas de distância, como a Euclideana, considera que os caracteres são representados por eixos ortogonais, o que é raro pois muitos dos caracteres são correlacionados.

CANNINGS & HOPPENSTEADT (1982) sugerem que, nos casos em que muitos caracteres são correlacionados deve-se tentar encontrar os não correlacionados pelo método de componentes principais, reduzindo assim o número de caracteres sem perda significativa de informação.

A idéia básica da análise de componentes principais é combinar um grupo de caracteres que resultarão em um grupo menor de caracteres principais que possam resumir as informações contidas nos dados iniciais (CRUZ, 1987). Os grupos de caracteres originados da análise, denominados componentes principais, são independentes e suas importâncias são avaliadas por meio da porcentagem da variância total que cada um deles explica. Esses componentes são arranjados em ordem decrescente de

variância, de forma que o primeiro componente é definido como aquele de maior importância, por reter a maior parte da variação total encontrada nos dados originais. Nos casos em que os primeiros componentes comportam uma percentagem relativamente alta da variação total (acima de 80%), a variabilidade entre os indivíduos avaliados pode ser explicada satisfatoriamente apenas por esses primeiros componentes, simplificando a interpretação (CRUZ, 1990).

Em geral, o primeiro e o segundo componentes principais são representados em gráficos quando os primeiros componentes envolvem cerca de 70 a 80% da variação total. Quando este limite não é atingido, a análise é complementada pela dispersão gráfica em relação ao terceiro e quarto componentes.

Algumas vezes a representação gráfica não fornece informações adequadas sobre o grau de similaridade dos indivíduos estudados. Nestes casos, os primeiros componentes são utilizados para o cálculo da distância Euclideana, pela propriedade de independência desses componentes.

A utilização da distância Euclideana complementa as informações da dispersão gráfica e permite, desta forma, o estabelecimento de grupos menos subjetivos do que os verificados por exames visuais (CRUZ, 1990).

Em sistemática, a análise de componentes principais pode então ser usada com os seguintes

propósitos: promover a redução de um grande conjunto de caracteres em outro menor e de sentido biológico, e, examinar e promover o agrupamento taxonômico de unidades, com base na dispersão dessas unidades em gráficos cujas coordenadas são os componentes principais.

No cálculo dos componentes principais, podem-se usar variáveis reduzidas (isto é, divididas pelos respectivos desvios padrões) ou não. A utilização dos dados não reduzidos tem sido aconselhável nos casos em que os caracteres estudados têm a mesma unidade e dimensão não muito discrepantes (CRUZ, 1987).

Existe uma série de métodos que podem ser utilizados na eliminação de caracteres redundantes, visando selecionar apenas aqueles que mais contribuem para a variação total. Entretanto, de maneira geral, o sinal e a magnitude dos coeficientes das variáveis que constituem um componente indicam a direção e a importância da i-ésima variável sobre o j-ésimo componente (CRUZ, 1987; PEREIRA,1989). Segundo AFIF & CLARK (1984), as correlações entre cada variável e o componente evidenciam mais explicitamente a importância de cada variável para o componente. Essas correlações são determinadas pela seguinte expressão:

$$r_{ij} = \frac{a_{ij}\sqrt{\text{var } C_i}}{\sqrt{\text{var } X_j}}$$

onde a_{ij} é o coeficiente da variável X_j para o i-ésimo

componente (C_i).

Segundo MARDIA et alii (1979), na análise de componentes principais, tem-se adotado como critério de avaliação da importância dos caracteres, os coeficientes de ponderação (autovetores) das variáveis associados aos últimos componentes que, por construção, retém proporção mínima da variação total.

JOLLIFFE (1972) estudou uma série de métodos de avaliação da importância dos caracteres para os componentes, concluindo que resultados mais satisfatórios são obtidos quando o número de caracteres rejeitados for igual ao número de componentes cuja variância é inferior a 0.7, nos casos em que utilizam-se dados padronizados.

De acordo com RAM & PANWAR (1970) e PETER & RAI (1976), as variáveis que apresentam os mais altos coeficientes nas duas primeiras variáveis canônicas, têm mais impacto sobre a diversidade observada.

2.2.1.5. **Variáveis canônicas**

A análise multivariada com base em variáveis canônicas foi relatada por RAO (1952). Este método é bastante semelhante, em alguns aspectos, à análise de componentes principais. Porém neste processo são consideradas tanto a matriz de covariância residual quanto a de covariância entre médias fenotípicas dos caracteres

avaliados (CRUZ, 1990).

Esta técnica, em estudos de divergência genética, além de possibilitar a identificação de grupos similares no espaço bi ou tri dimensional, a semelhança da técnica dos componentes principais, apresenta ainda a vantagem de manter o princípio de conglomeração com base na distância D^2 de Mahalanobis, considerando as correlações residuais existentes entre médias das OTU's.

Quando se utiliza esse procedimento, é comum a transformação das variáveis originais em variáveis padronizadas e não correlacionadas, de modo que a matriz de dispersão residual se iguala à identidade. Para esta transformação, tem sido extensivamente utilizado o processo de condensação pivotal. Uma vez realizada a transformação, o processo de estimação equivale ao descrito para componentes principais.

HUSSAINI et alii (1977) referem-se a análise por variáveis canônicas como uma sequência de transformações ortogonais que visam maximizar a razão entre grupos e variação dentro de grupos.

Desta forma o primeiro eixo transformado terá a direção da maior variabilidade entre as médias de diferentes taxa. A segunda, deverá ser ortogonal a primeira e ter inclinação na direção da segunda maior variabilidade; o mesmo ocorre com a terceira e subsequentes (CANNINGS & HOPPENSTEADT, 1982). A análise da coordenada principal da

matriz D^2 de Mahalanobis é idêntica a obtida por análise de variáveis canônicas (SNEATH & SOKAL, 1973).

CANNINGS & HOPPENSTEADT (1982) concluíram que a identificação de OTU's desconhecidas, ou seja, a distribuição de especimens desconhecidos em taxon conhecido, pode ser realizada de duas maneiras: i- uso de chaves de identificação, através de análise sequencial de estados de caráter ou, ii- análise simultânea de estados de caráter, através do uso de uma função discriminante ou análise de variáveis canônicas. O uso deste último método provavelmente levará a resultados mais corretos e empregará um número menor de caracteres.

2.2.2. Medidas de dissimilaridade aplicadas à quimiossistemática

As técnicas experimentais empregadas em quimiossistemática abordam as variações dos marcadores empregados como caracteres, tanto ao nivel bioquimico (fisiológico, análises de isoenzimas, serologia, entre outros) quanto a nível molecular (sequenciamento de DNA nuclear e de organelas, polimorfismo de fragmentos de restrição, entre outros) (HARBORNE, 1980; HILLIS, 1987).

Neste ítem serão considerados apenas os métodos estatísticos aplicados a marcadores isoenzimáticos obtidos à partir da técnica de eletroforese de isoenzimas.

O termo isoenzima foi introduzido por MARKERT & MOLLER (1959) e pode ser definido como "as diferentes formas moleculares nas quais proteínas existem com a mesma especificidade enzimática".

Os dados eletroforéticos vêm sendo intensamente aplicados em estudos taxonômicos e filogenéticos em plantas por fornecerem uma relação mais direta entre genótipo e fenótipo, o que não ocorre quando são empregados dados morfológicos ou compostos secundários. Outras vantagens e algumas limitações da técnica são amplamente discutidas por GOTTLIEB (1977), HURKA (1980) e CRAWFORD (1983).

Os dados resultantes de análises isoenzimáticas são, geralmente, obtidos a partir de análises genéticas. Em muitos casos esta análise é relativamente simples, pois as bandas enzimáticas são, geralmente, codominantes e apresentam segregação mendeliana simples (SCANDALIOS, 1969; GOTTLIEB, 1977), isto quando são consideradas espécies diplóides. Desta forma, através de cruzamentos entre indivíduos de diferentes fenótipos, examinando a progênie F_1 e a segregação na F_2 pode-se determinar, para um dado sistema enzimático, o número de locos e o número de alelos por loco. Noutros casos, como para sistemas enzimáticos complexos, análises mais formais devem ser realizadas (GOTTLIEB, 1977).

Considerando as frequências alélicas como

parâmetro básico em genética de populações, pode-se, a partir deste, realizar medidas de variabilidade (BROWN & WEIR, 1983) e coeficientes que estimam o grau de divergência genética dos taxa (GOTTLIEB, 1977).

As principais unidades de medida de variabilidade são: i- a percentagem de locos polimórficos por população (P), considerando um loco polimórfico quando o alelo mais frequente tem frequência menor que 0.95 ou 0.99; ii- o número médio de alelos por loco (A) e o número médio de alelos por loco polimórfico (Ap), como a mais simples estimativa do potencial adaptativo nas alterações evolutivas das populações; iii- heterozigose média de todos os locos (GOTTLIEB, 1975; SCACCHI et alii,1987).

Entre os coeficientes desenvolvidos para determinar o grau de divergência dos taxa alguns serão discutidos no ítem 2.2.2.1.

GOTTLIEB (1977) sumarizou os resultados obtidos em vários outros estudos, em plantas, e concluiu que a variabilidade genética intrapopulacional está intimamente correlacionada com seu modo de reprodução. O autor estimou que o número médio de alelos por loco polimórfico era de 1.88 ± 0.12 para espécies autógamas e de 2.86 ± 0.24 para alógamas. A proporção média de locos polimórficos por indivíduo era de 0.032 ± 0.013 para autógamas e 0.133 ± 0.026 para alógamas.

HAMRICK et alii (1979) examinaram a relação

entre doze parâmetros da história vital e os níveis de variação genética intrapopulacional de 113 taxa de plantas, concluindo que espécies com alta fecundidade, alógamas, polinizadas pelo vento, com longo tempo de geração e de habitats representando os últimos estágios sucessionais têm maior variação genética que espécies com outras combinações de características.

2.2.2.1. Coeficientes de distância e similaridade genética

A análise eletroforética, de poucos locos isoenzimáticos, gera dados para os quais uma simples comparação baseada na presença e ausência de alelos seria suficiente para mostrar populações semelhantes ou dessemelhantes em um grupo (ROGERS, 1972). Entretanto, quando são analisados um grande número de locos por população, os dados devem ser sumarizados na forma de frequências alélicas. Estes dados devem ser analisados estatisticamente, afim de que sejam determinadas a similaridade e/ou dissimilaridade das populações (GOTTLIEB, 1977; ALFENAS et alii, 1991).

Entre as muitas medidas de distância que existem em literatura, dois coeficientes predominam em estudos de sistemática (BUTH,1984). O primeiro é o coeficiente de distância genética (D) de NEI (1972), que baseia-se na identidade de genes entre populações e mede as

diferenças alélicas acumuladas por loco, a partir de um ancestral comum, por isso é conhecida como uma medida biológica. O segundo é o coeficiente de similaridade (S) de ROGERS (1972) que mede a distância geométrica entre frequências alélicas e possui as propriedades métricas já descritas.

O coeficiente D de Nei é determinado a partir da identidade normalizada (I) dos genes, que mede a proporção de genes que são comuns nas duas OTU's que estão sendo comparadas. Assim, considerando x_i e y_i as frequências do i-ésimo alelo nas populações X e Y, respectivamente, a probabilidade de identidade de dois genes ao acaso é $j_x = \Sigma x_i^2$ na população X e $j_y = \Sigma y_i^2$ na população Y. Considerando ainda que $j_{xy} = \Sigma x_i y_i$ é a probabilidade de identidade de um gene de x e um gene de y, a identidade de genes entre X e Y, para um loco é definida como:

$$I_j = \frac{j_{xy}}{\sqrt{j_x \cdot j_y}}$$

Para todos os locos será definida como:

$$I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}}$$

onde J_{xy}, J_x e J_y são as médias aritméticas de j_{xy}, j_x e j_y, respectivamente, para todos os locos inclusive os monomórficos.

A distância entre X e Y é definida como:

$$D = -\ln I$$

Como as definições de I e D dependem apenas das frequências gênicas, e não das genotípicas, estes coeficientes podem ser aplicados tanto a espécies autógamas quanto alógamas, sejam elas diplóides ou tetraplóides e também em organismos haplóides. Entretanto esta medida de distância não obedece o triângulo da desigualdade, o que pode fornecer resultados de pouco sentido biológico para um coeficiente que é usado na reconstrução de filogenias (BUTH, 1984).

ROGERS (1972) empregou o teorema de Pitágoras para calcular a distância geométrica entre as frequências alélicas, para cada loco, dos organismos que estão sendo comparados. Este autor baseou-se na distância Euclideana (ALFENAS et alii, 1991), conforme segue:

$$D = \frac{1}{L} \sum_{j=1}^{L} \sqrt{\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{Aj} (P_{ijx} - P_{ijy})^2}$$

onde:- P_{ijX} e P_{ijY} são as frequências do i-ésimo alelo no loco j nas populações X e Y, respectivamente;

-L é o número de locos;

-A é o número de alelos no loco j.

Neste coeficiente, determina-se inicialmente a distância e calcula-se a similaridade diretamente, subtraíndo o valor da distância de 1.

HEDRICK (1971) propôs um método diferente para medir a similaridade entre OTU's, a "probabilidade de identidade genotípica" ($I_{X.Y}$) , que baseia-se nas

frequências genotípicas e não nas frequências gênicas como os anteriores. Podendo ser definido como:

$$I_{xy} = \frac{\sum_{j=1}^{n} P_{j.x} \; P_{j.y}}{\frac{1}{2}\left(\sum_{j=1}^{n} P_{j.x}^2 + \sum_{j=1}^{n} P_{j.y}^2 \right)}$$

onde:-n é o número total de genótipos identificados;

-$P_{j.x}$ e $P_{j.y}$ são as frequências do genótipo j nas populações X e Y, respectivamente.

Este método é bastante útil em situações nas quais as frequências gênicas são desconhecidas ou difíceis de serem determinadas. Devem ser considerados fatores como taxas de autofecundação que causam diferenças nas frequências genotípicas sem afetar as frequências gênicas.

Além destes coeficientes descritos, outros também foram propostos para determinar o grau de divergência genética entre taxa (CAVALLI-SFORZA & EDWARDS, 1967; STEWART citado por SELANDER, 1970; SNEATH & SOKAL, 1973).

ROGERS (1972), empregando os mesmos dados de frequência aos vários coeficientes de similaridade e distância, concluiu que a diferença entre eles não é muito grande na prática, embora tenham abordagens biológicas ou matemáticas diferentes. Isto mostra que muitos deles são altamente correlacionados uns com os outros (AVISE, 1974).

GOTTLIEB (1977) reuniu dados eletroforéticos de várias espécies de plantas, afim de estudar a divergência genética entre populações da mesma espécie e

entre espécies do mesmo gênero. Empregando o coeficiente de identidade genética I de NEI (1972), determinou que: primeiro, populações de plantas da mesma espécie são extremamente semelhantes, com uma identidade genética média de 0.95 ± 0.02 (numa escala de 0 a 1). Isto é importante, pois demonstra que dados eletroforéticas de uma ou poucas populações, em uma espécie, são suficientes em termos de amostragem , para que esta possa ser estudada. Segundo, espécies de um mesmo gênero têm identidade genética média reduzida, com $\bar{I}$ = 0.67 ±0.07. Em alguns casos de espécies do mesmo gênero, este valor pode ser bem alto, o que permite estudos mais profundos sobre o processo de especiação destes taxa.

SCACCHI et alii (1987) estudaram sete populações de três espécies do gênero Epipactis (Orchidaceae), determinando os coeficientes de identidade de Nei. A identidade média entre populações foi de 0.99 e entre espécies foi de 0.672, valores estes bem próximos aos obtidos por GOTTLIEB (1977).

SCHLEGEL et alii (1989) aplicaram a identidade genotípica de Hedrick num estudo de dez espécies de orquídeas, sendo 7 do gênero Orchis, 2 de Dactylorhiza e 1 de Gymnadenia, analisadas por eletroforese de isoenzimas. Os resultados diferem dos obtidos utilizando dados morfológicos, alterando significativamente as relações filogenéticas entre estas espécies. A utilização de dados

isoenzimáticos tem se mostrado bastante útil na resolução de problemas taxonômicos e filogenéticos na família Orchidaceae (SCACCHI et alii, 1987; CHASE & OLMSTEAD, 1988; STEINBRUCK et alii,1986; SCACCHI et alii, 1990).

2.2.3. **Análises de agrupamento ("cluster")**

Os métodos de agrupamento têm por finalidade reunir, por algum critério de classificação, as OTU's em vários grupos, de forma que exista homogeneidade dentro e heterogeneidade entre grupos (SNEATH & SOKAL,1973). Alternativamente, alguns métodos podem subdividir um grupo de OTU's em vários subgrupos (SNEATH & SOKAL,1973; CRUZ, 1990).

O uso de métodos de agrupamento tornou-se frequente a partir do desenvolvimento da informática, que possibilitou o surgimento de algoritmos, para agrupar elementos, através de critérios de otimização, até então inviáveis, dadas as dificuldades de cálculo (RIBOLDI, 1986).

Em estudos de divergência genética são estimadas medidas de similaridade e/ou dissimilaridade para cada par de OTU's. O número dessas estimativas pode ser relativamente grande (n(n-1)/2) quando o número de OTU's (n) é elevado,o que torna impraticável o reconhecimento de grupos pelo simples exame visual das mesmas. Para realizar

esta tarefa faz-se uso dos métodos de agrupamento (CRUZ, 1990).

Entre os métodos de agrupamento mais empregados em taxonomia numérica destacam-se as técnicas hierárquicas. Estas se subdividem em métodos aglomerativos, os quais procedem uma série de fusões sucessivas de n OTU's em grupos, e em métodos divisivos, que separam um grupo de n OTU's sucessivamente em grupos menores (CANNINGS & HOPPENSTEADT, 1982).

Nos métodos hierárquicos aglomerativos, que são os mais empregados em taxonomia numérica (SNEATH & SOKAL, 1973), as OTU's são agrupadas por um processo que se repete em vários níveis até que seja estabelecido um dendrograma. As técnicas disponíveis diferem nos métodos de cálculo da proximidade entre uma única OTU e um grupo já formado ou entre dois grupos de OTU's.

Entre os vários métodos de agrupamento hierárquicos aglomerativos, os mais empregados em taxonomia numérica são: do vizinho mais próximo ("single linkage method"); do vizinho mais distante ("complete linkage method") e da ligação média ("average linkage"), o qual pode ser determinado por média aritmética ponderada (WPGMA) e não ponderada (UPGMA) (SNEATH & SOKAL, 1973; CRUZ, 1990).

O método do vizinho mais próximo (SLM) pode empregar tanto a matriz de similaridade quanto a de distância entre as OTU's. Este método consiste em

reconhecer as OTU's mais próximas, as quais serão conectadas para formarem o grupo inicial. Calcula-se então a distância entre este grupo e as demais OTU's ou a distância em relação a outros grupos, num estágio mais avançado. Cada estágio irá operar com uma matriz de similaridade ou distância de dimensão reduzida, até que finalmente todos os indivíduos estejam agrupados. Neste método, a relação entre a OTU e um grupo ou entre dois grupos formados, será dada sempre pela menor distância ou maior similaridade entre eles (CRUZ, 1987). Exemplos de como chegar ao agrupamento, por esse método, são dados por SNEATH & SOKAL (1973), CANNINGS & HOPPENSTEADT (1982) e RIBOLDI (1986).

O método de agrupamento pelo vizinho mais distante (CLM) é a antítese exata do SLM. Desta forma, a similaridade entre uma OTU e um grupo será igual a sua similaridade em relação ao membro mais distante do grupo, ou seja, terá o valor da maior dissimilaridade (ou menor similaridade). O resultado final é uma expansão do dendrograma quando comparado com o método de SLM (SNEATH & SOKAL, 1973).

Outros métodos de agrupamento foram desenvolvidos afim de que sejam evitados os extremos propostos pelo SLM ou CLM. Desses, o mais comum é o de ligação média não ponderada (UPGMA -unweighted pair-group method using arithmetic average). Este algoritmo foi

desenvolvido por SOKAL & MICHENER (1958) e determina a similaridade ou dissimilaridade média de uma OTU em relação a um grupo, dando um "peso" igual para cada OTU daquele grupo, independentemente da sua subdivisão estrutural (SNEATH & SOKAL, 1973).

NEI et alii (1983) compararam cinco métodos de determinação de distância genética e três métodos de agrupamento, usando dados simulados. Concluíram que a melhor combinação era o uso do coeficiente de distância de Nei agrupados usando UPGMA.

Para empregar a distância de Nei e o agrupamento UPGMA deve-se assumir uma taxa evolutiva constante e que os comprimentos das ramificações do dendrograma de UPGMA refletem o tempo de divergência (BUTH et alii, 1984; PAMILO,1990).

Apesar desses métodos serem os mais comumentes usados também na análise de dados de frequência alélica obtidos através da eletroforese de isoenzimas, novos métodos mais apropriados para análises filogenéticas têm surgido nestes últimos anos (PAMILO, 1990).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

No presente trabalho utilizaram-se 11 espécies do Gênero Laelia seção Parviflorae, pertencentes a coleção do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". São elas: L. flava Lindl., L. cinnabarina Batem. ex Lindl., L. longipes Rchb. F., L. mixta Hoehne, L. briegeri Blum., L. milleri Blum., L. esalqueana Blum., L. crispilabia A.Rich. ex Warner, L. caulescens Lindl., L. crispata (Thunb.) Garay (indiferente de L. rupestris Lindl. e L. tereticaulis Hoehne) e L. lucasiana Rolfe.

Estas espécies foram coletadas em seu ambiente natural (campos rupestres de Minas Gerais) e estão sendo mantidas sob as condições de ripado em Piracicaba - SP.

Os locais de coleta e o número de indivíduos analisados, por espécie foram os seguintes:

1- L. crispilabia - Serra dos Ingleses, Serra do Curral, Mineração Hannaco - MG - 48

2- L. esalqueana - Entre Gouveia e Curvelo - MG - 52

3- L. lucasiana - Santa Bárbara - MG - 32

4- L. caulescens - São João Del Rei - MG - 34

5- L. longipes - Serra do Cipó - MG - 30

6- L. briegeri - Lapinha, Serro, Cabeça do Bernardo - MG - 35

7- L. cinnabarina - Serra do Cipó - MG - 16

8- L. flava - São Tomé das Letras, Serra do Curral, Cambuquira - MG - 71

9- L. crispata - Serra do Cabral, Serra do Cipó, Diamantina-Datas - MG - 40

10- L. milleri - Serra dos Ingleses - MG - 77

11- L. mixta - Serra do Cipó - MG - 29

Total- 464

Nas análises foram considerados os seguintes caracteres morfológicos florais, medidos em centimetros, para cada indivíduo:

1- comprimento do labelo - CL

2- largura do labelo - LL

3- comprimento da sépala dorsal - CSD

4- largura da sépala dorsal - LSD

5- comprimento da sépala lateral - CSL

6- largura da sépala lateral - LSL

7- comprimento do pedúnculo - CPe

8- comprimento da pétala - CP

9- largura da pétala - LP

10- comprimento da coluna - CC

11- largura da coluna - LC

12- espessura da coluna - EC

13- comprimento do ovário - CO

Esses caracteres foram utilizados por estarem disponíveis em número suficiente para uma amostragem adequada de cada espécie. Os dados referentes a cada caráter foram obtidos de fichas disponíveis na coleção do Instituto de Genética. Estas fichas contém as peças florais de cada indivíduo por espécie, sendo que, no processo de montagem destas as medidas eram sempre tomadas a partir do material fresco. Não foram empregados caracteres morfológicos vegetativos (pseudobulbos e folhas) por não haver coincidência, em sua maioria, entre as plantas ainda vivas no ripado e sua respectiva ficha.

Visando padronizar a técnica de eletroforese de isoenzimas para orquídeas da seção Parviflorae e estudar a variabilidade genética intraespecífica, realizou-se a análise das seguintes espécies, com seus respectivos locais de coleta e número de indivíduos analisados:

Laelia flava - Serra do Curral-MG - 4

Laelia crispata - Serra do Cipó-MG - 6

Laelia longipes - Serra do Cipó-MG - 5

Laelia briegeri -Lapinha-Serro, Datas-Diamantina-MG - 6

Laelia mixta - Serra do Cipó-MG - 7

Laelia esalqueana - Gouveia e Curvelo-MG - 4

Laelia cinnabarina - Serra do Cipó-MG - 18

3.2- MÉTODOS

3.2.1. Análises de variância e covariância

Visando avaliar as diferenças existentes entre espécies para os 13 caracteres analisados, bem como gerar dados para obtenção da matriz de variâncias e covariâncias residuais, foram realizadas análises de variância para cada caráter. Considerando que não foram instalados experimentos, tais análises foram realizadas utilizando-se o esquema apresentado na Tabela abaixo, com as fontes de variação (F.V.) e respectivas esperanças de quadrados médios (E(QM)).

Tabela - Esquema da análise da variância e respectivos quadrados médios

F.V.	E(QM)
Entre espécies	$\sigma^2 + n\sigma_s^2$
Dentro de espécies(resíduo)	σ^2

onde: σ^2 - variância residual

n - número de indivíduos por espécie

σ_s^2 - variância entre espécies.

Tal esquema é similar ao utilizado por PEREIRA (1989), que também não dispunha de repetições.

Verificando que todos os caracteres apresentaram valor F significativo entre espécies, todos foram considerados na obtenção da matriz de variâncias e covariâncias residuais, para aplicação do método de Mahalanobis. Assim, as variâncias residuais (σ^2) obtidas para cada caráter foram empregadas diretamente na diagonal da matriz 13 x 13 de covariâncias residuais.

Para obtenção das covariâncias residuais, realizaram-se análises de covariância, empregando-se um esquema de análise similar ao descrito na Tabela , simplesmente substituindo-se as fontes de variação por fontes de covariação e esperanças de quadrados médios por esperanças de produtos médios.

3.2.2. **Cálculos das distâncias generalizadas de Mahalanobis**

A medida de distância genética utilizada baseou-se no fato de que a Distância Generalizada de Mahalanobis apresenta vantagens sobre outras, tais como a Distância Euclideana, Euclideana Média e Quadrado da Distância Euclideana. Em relação a essas, a estatística de Mahalanobis apresenta a vantagem de considerar a variação intraespecífica bem como levar em consideração as

correlações entre as características avaliadas (SNEATH & SOKAL, 1973; CANNINGS & HOPENSTEADT, 1982; RIBOLDI, 1976).

As variâncias e covariâncias residuais estimadas foram empregadas na obtenção da matriz de dispersão residual, conforme indicado por CRUZ (1987). A estatística D^2 de Mahalanobis foi obtida através da seguinte expressão, conforme SNEATH & SOKAL (1973), CANNINGS & HOPPENSTEADT (1982), RIBOLDI (1986) e CRUZ (1987; 1990) :

$$D^2ii' = [\ d_1 \quad d_2 \quad \ldots . d_J\ ]\ S^{-1} \begin{bmatrix} d_1 \\ d_2 \\ \vdots \\ d_J \end{bmatrix}$$

onde:

D^2ii' - distância genética entre os indivíduos i e i';

d_J - diferença entre médias do caráter J para os genótipos i e i';

S^{-1} - inversa da matriz de dispersão residual.

3.2.3. **Análise de componentes principais**

A metodologia da análise de Componentes Principais, utilizada no presente trabalho, encontra-se descrita detalhadamente nas publicações de RAO (1952), MARDIA et alii (1979), KENDALL (1980) E MORRISON (1981), sendo que CRUZ (1987) realiza uma abordagem mais prática da

mesma.

Fundamentalmente, a técnica consiste em transformar um conjunto de p variáveis X_1 , X_2 .....X_p, pertencentes a n indivíduos (espécies, populações, genótipos, etc), em um novo conjunto de variáveis Y_1 , Y_2 , ...Y_p , as quais são função linear das X's e independentes entre si. Para isso, tem-se que:

a- cada Y_i é uma combinação linear das X_i

$$Y_i = a_1 X_1 + a_2 X_2 + \ldots\ldots + a_p X_p .$$

b- se Y_i representa outra combinação linear das X_i

$$Y_i = b_1 X_1 + b_2 X_2 + \ldots\ldots + b_p X_p .$$

Assim são necessárias as restrições:

$$\sum_i a_i^2 = \sum_i b_i^2 = 1$$

$$\sum_i a_i b_i = 0$$

Esta última condição garante que os Y_i 's sejam não correlacionados entre si.

c- Entre todas as combinações possíveis para Y, tem-se que Y_1 apresenta a maior variância, Y_2 a segunda maior e assim sucessivamente (MORRISON, 1981).

Para obtenção dos componentes principais são necessárias as etapas descritas a seguir.

A- Padronização dos dados:

Considerando que no presente trabalho as variáveis analisadas apresentam a mesma unidade de medição (cm) e magnitudes não muito discrepantes, não realizou-se a padronização dos dados,conforme recomendado por CRUZ(1987).

B- Obtenção da matriz de covariância das variáveis:

No presente caso, ou seja, com variáveis não padronizadas, obtiveram-se a matriz de covariância das variáveis da seguinte maneira:

$$S = \begin{bmatrix} S_{11} & S_{12} & \cdots & S_{1p} \\ S_{21} & S_{22} & & \\ \vdots & \vdots & & \\ S_{p1} & S_{p2} & \cdots & S_{pp} \end{bmatrix}$$

em que $S_{ii} = \hat{\sigma}_i$ - variância do caráter X_i

$S_{ij} = \hat{\sigma}_{ij}$ - covariância entre os caracteres X_i e X_j.

C- Obtenção das raízes características da matriz R:

De acordo com GOMES (1985) e CRUZ (1987) a estimação das raízes características (auto-valores) é de fundamental importância na obtenção dos componentes principais, uma vez que as mesmas correspondem a variância amostral de cada componente e os elementos do vetor característico (auto-vetores) associados a cada auto valor correspondem a combinação linear das variáveis X_i que resultam no componente Y_j.

O sistema matricial para estimação das raízes características é

$$|S - \lambda I| = 0$$

onde λ são as raízes características da matriz de covariância S.

D- Obtenção dos componentes principais

Matricialmente o vetor característico para o componente K, não normalizado foi obtido por:

$$[S - \lambda I]\ [h_{ij}\ ] = \emptyset \qquad \forall I$$

onde h_{ij} , após a normalização, corresponde aos coeficientes do primeiro componente principal.

O vetor hn normalizado é obtido por:

$$h_n = \frac{1}{\sqrt{[h'_{ij}] - [h_{ij}]}}\ [h_{ij}]$$

De maneira análoga obtiveram-se os demais componentes principais.

E- Importância relativa de um componente:

A importância de um componente Y_i foi avaliada por meio da porcentagem da variância total (α_j) que ele explica, ou seja:

$$\alpha_j = \frac{Var\,(Y_i)}{\sum S_{ii}}$$

F- Correlação entre o componente Y_j e a variável X_i :

A correlação entre o i-ésimo componente principal e a j-ésima variável foi calculado por:

$$r_{ij} = \frac{a_{ij}\sqrt{Var\ C_i}}{\sqrt{Var\ X_j}}$$

onde a_{ij} é o coeficiente da variável X_j para o i-ésimo componente.

G- Dispersão das espécies em um sistema de coordenadas:

A dispersão das espécies em gráficos cujas

coordenadas são os componentes principais foi realizada para avaliar o grau de similaridade entre as mesmas. Tendo sido determinado o número de componentes principais que explicavam um mínimo de 80% da variação total disponível, estimaram-se os respectivos escores associados a cada espécie. A partir destes escores, calculou-se a distância Euclideana média, como medida representativa da divergência entre as espécies, da seguinte maneira:

$$\bar{d}_{ij} = \frac{d_{ij}}{\sqrt{p}}$$

onde: - p é o número de caracteres;

- d_{ij} é a distância euclideana, entre a OTUi e a OTUj para p caracteres, dada pela expressão:

$$d_{ij} = \left[\sum_{k=1}^{p} (x_{ik} - x_{jk}) \right]^{\frac{1}{2}}$$

3.2.4. Variáveis canônicas

A análise multivariada com base em variáveis canônicas foi utilizada como um processo alternativo para avaliação do grau de similaridade entre as espécies, levando em consideração tanto a matriz de covariância residual quanto a de covariância entre médias fenotípicas dos caracteres avaliados.

Na utilização desse procedimento, inicialmente transformaram-se as variáveis originais em padronizadas e não correlacionadas pelo processo de

condensação pivotal descrito por RAO (1952) e utilizado por SINGH & CHAUDARY (1979) e CRUZ (1990).

As funções de transformação por esse processo são estabelecidas de modo que as novas variáveis apresentem covariâncias residuais nulas e variâncias iguais a 1 (um). Dessa forma o processo de estimação equivale ao descrito para componentes principais.

Os escores também foram estimados para cada espécie, relativos às variáveis canônicas que envolviam um mínimo de 80% da variação total disponível. Com base nesses escores, estimou-se a distância Euclideana média pelo processo descrito anteriormente para componentes principais.

3.2.5. **Análise de agrupamento**

Técnicas de agrupamento empregadas sobre os valores de D^2, além da distância Euclideana média obtida a partir dos escores dos primeiros componentes principais e primeiras variáveis canônicas foram empregadas na delimitação dos grupos de espécies. Foram utilizadas três técnicas conglomerativas hierárquicas: "vizinho mais próximo", "vizinho mais distante" e "ligações médias não ponderadas".

No método do "vizinho mais próximo", a distância entre um grupo e um indivíduo é dado por (CRUZ,

1987):

$$d_{(ij)K} = \min \{d_{iK} ; d_{jK}\}$$

isto é, a distância entre um grupo formado pelos indivíduos i e j e o indivíduo k é dada pelo menor elemento do conjunto das distância dos pares de indivíduos (i e k) e (j e k). Analogamente, a distância entre dois grupos é dada por:

$$d_{(ij)(ke)} = \min \{d_{iK} ; d_{ie} ; d_{jK} ; d_{je}\}$$

O método do "vizinho mais distante", segundo CRUZ (1987), apresenta a mesma sistemática de agrupamento do método do "vizinho mais próximo". Porém, ao contrário do método anterior, identifica-se na matriz de distância os indivíduos mais distantes, assim:

$$d_{(ij)K} = \max \{d_{iK}\}$$

$$d_{(ij)(ke)} = \max \{d_{iK} ; d_{ie} ; d_{jK} ; d_{je}\}$$

O método de "ligações médias não ponderadas" (UPGMA) é um algoritmo que estima a similaridade ou dissimilaridade média de uma OTU em relação a um grupo, ponderando cada OTU daquele grupo igualmente, independente da sua subdivisão estrutural. Assim, a partir de uma matriz de distância, a dissimilaridade $d_{(ij)K}$ será dada por:

$$d_{(ij)K} = 1/2 \{d_{iK} + d_{jK}\}$$

E a dissimilaridade entre dois grupos será:

$$d_{(ij)(ke)} = 1/4 \{d_{iK} + d_{ie} + d_{jK} + d_{je}\}$$

3.2.6. Inferência da divergência genética entre as espécies e descarte de variáveis redundantes

A divergência genética entre as espécies foi estudada pela dispersão de escores em gráficos, cujos eixos eram representados pelos primeiro e segundo componentes principais e pelas primeira e segunda variáveis canônicas, e quantificada pela distância Euclideana média, obtida a partir dos escores dos primeiros componentes principais e das primeiras variáveis canônicas. A divergência foi também quantificada com base nos grupos formados através de técnicas de agrupamento aplicadas sobre os valores D^2.

O descarte de variáveis foi baseado na magnitude dos coeficientes de ponderação (auto-vetores) das variáveis associadas às últimas variáveis canônicas que, por construção retém proporção mínima da variação total, conforme recomendação de MARDIA et alii (1979). E também considerando as variáveis com os mais altos coeficientes de ponderação nas duas primeiras variáveis canônicas, como recomendado por RAM & PANWAR (1960) e PETER & RAI (1976). Assim foram descartadas as variáveis com maiores coeficientes na 13ª variável canônica e com menores coeficientes nas duas primeiras.

A eficiência do descarte foi avaliada calculando-se novamente distâncias Euclideanas médias a partir das variáveis canônicas estimadas apenas para as

variáveis não descartadas.

3.2.7. **Operacionalização das análises**

Todas as análises e estimativas, de estatística simples e multivariada foram realizadas através de procedimentos computacionais, no setor de processamento de dados do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP. Foram empregados os programas: "GENES", em desenvolvimento pelo Prof. Dr. Cosme Damião Cruz da UFV-MG e o "Sistema de Análise Estatística e Genética - SAEG-2", desenvolvido pela UFV-MG.

3.2.8. **Análise eletroforética de isoenzimas**

a- **Sistemas enzimáticos utilizados**

A escolha dos sistemas enzimáticos que apresentavam melhores resoluções para o material em estudo foi precedida de um grande número de testes considerando que estas espécies nunca foram analisadas por esta metodologia.

Pela facilidade de obtenção em grande quantidade e por estarem sempre disponíveis, foram estudados os tecidos de folha e ponta de raiz, sendo totalmente descartados os estudos em tecidos florais.

Os sistemas enzimáticos testados, com seus respectivos números dados pela Enzyme Commission (E.C.) e abreviação do locus, foram:

Álcool deidrogenase	E.C.1.1.1.1-ADH
Malato deidrogenase	E.C.1.1.1.37-MDH
Fosfatase ácida	E.C.3.1.3.2-ACP
Glutamato oxaloacetato transaminase	E.C.2.6.1.1-GOT
Catalase	E.C.1.11.1.6-CAT
Esterase	E.C.3.1.1-EST
Leucina aminopeptidase	E.C.3.4.11.1-LAP
Peroxidase	E.C.1.11.1.7-PER

b- **Géis de amido**

O amido empregado neste estudo foi hidrolisado no próprio laboratório, a partir de fécula de batata, segundo a técnica proposta por SMITH (1955). Para cada 600g de fécula de batata foram acrescentados 1200ml de acetona (Merck) e 12ml de HCl, a uma temperatura de hidrólise variando de 38.5° a 39°C.

Testes realizados, comparando este amido hidrolisado com amido da marca Sigma e a combinação Penetrose 30 e amido Sigma, na proporção 2:1, demonstram claramente que o amido hidrolisado apresenta qualidade e resoluções para enzimas equivalentes ao do amido Sigma e superiores aos obtidos pela mistura Penetrose 30 e amido

Sigma. Portanto, o amido hidrolisado foi utilizado por apresentar um custo inferior e por ser confiável em seus resultados.

O gel de amido foi feito a uma concentração de 12%, empregando dois sistemas tampões de acordo com a enzima a ser revelada. Para os sistemas MDH e ADH foram empregados o tampão H do gel e o tampão H da cuba (SOLTIS et alii, 1983). Para os sistemas PER, EST e GOT foram empregados os tampões A+B, na proporção 1:9, para o gel e o tampão A para a cuba (SCANDALIOS, 1969). Todos são descritos abaixo:

a) Tampão H para gel (pH 7.0):

Histidina - L (-) ----------1.055g

Tris ----------1.60g

Ácido cítrico ----------0.90g

H_2O q.s.p. ----------1000ml

b) Tampão H para cuba (pH 7.0):

Tris ---------- 16.10g

Ácido cítrico ---------- 8.25g

H_2O q.s.p.----------1000ml

c) Tampão A (pH 8.3):

Hidróxido de lítio ---------- 2.098g

Ácido bórico ---------- 11.748g

H_2O q.s.p. ---------- 1000ml

d) Tampão B (pH 8.3):

Tris ---------- 6.178g

Ácido cítrico ---------- 1.68g

H_2O q.s.p. ---------- 1000ml

O gel era preparado em um kitassato sobre o fogo, em seguida retiravam-se as bolhas com auxílio de uma bomba de vácuo. Posteriormente o mesmo era colocado em uma placa de vidro com as dimensões 17x15x0.2cm e resfriado a uma temperatura de 4°C, 30 minutos antes de receber as amostras.

c- **Extração e aplicação das amostras**

As amostras de tecido eram coletadas no ripado no mesmo dia da análise, sempre mantidas a uma temperatura de 4°C.

Os tecidos eram macerados em uma placa de acrílico grande, capaz de receber todas as amostras ao mesmo tempo, com auxílio de um bastão de vidro. Cada amostra, de 1 x 1cm, recebia cerca de 0.5ml de tampão de extração.

Em orquídeas, como na maioria das plantas, o processo de homogeneização permite a interação entre proteínas e compostos secundários. A adição de diversos compostos em tampões de extração reduzem a interação entre esses compostos (principalmente fenóis) e proteínas, ou seus produtos de reação (KEPHART, 1990). Assim, para as espécies, objetos deste estudo, o tampão de extração

empregado foi:

Tris 0.1M pH 7.5 ---------- 200ml

Sacarose 0.2M ---------- 6.892g

PVP 0.6% ---------- 1.20g

EDTA 1mM ---------- 0.06724g

BSA 0.1% ---------- 0.2g

ß - mercaptoetanol (adicionado pouco antes da extração)--------0.1%.

Alguns desses aditivos têm seu modo de ação conhecidos, outros são praticamente desconhecidos. Para uma revisão completa ver KEPHART (1990).

Após a maceração, os homogenados eram absorvidos em papel filtro 3 x 2mm. As amostras, geralmente 22, eram inseridas no gel perfurado com um pente.

Excetuando-se a peroxidase, todos os outros sistemas apresentaram apenas bandas anódicas, sendo aplicadas a 7 e 5cm do início do gel, respectivamente.

Em todos os géis a amostra controle foi o indivíduo 5022 de Laelia flava. Nas duas extremidades do gel era colocada uma solução de azul de bromofenol para marcar a linha de frente durante a migração.

d- **Condições de corrida, coloração e fixação dos géis**

Os géis, com as amostras, eram colocados em cubas horizontais para migração (corrida) eletroforética e

mantidas em geladeira a uma temperatura de 4°C. Para cada eletrodo da cuba era colocado 150ml de tampão A (SCANDALIOS, 1969) quando os sistemas a serem revelados eram EST, PER e GOT e tampão H (SOLTIS et alii, 1983), quando os sistemas eram ADH e MDH. A corrida era feita com uma amperagem constante de 10mA por gel, para tampão A e a 8mA por gel, para o tampão H.

A migração era interrompida após cinco horas. Com este tempo a linha de frente atingia 7 e 9cm de migração com tampão A e H, respectivamente.

Após a eletroforese, os géis eram corados imediatamente para as enzimas específicas, como será descrito abaixo:

a) Sistema Esterase , segundo SCANDALIOS (1969), modificado:

H_2O ---------- 20ml

tampão C ---------- 25ml

tampão D ---------- 10ml

Fast Garnet GBC ---------- 40mg

α -naftil acetato(1%)------ 1.5ml

Tampão C - pH 4.3 - 0.2M

NaH_2PO_4 ---------- 27.8g

H_2O q.s.p. ---------- 1000ml

Tampão D - pH 9.2 - 0.2M

Na_2HPO ---------- 53.63g

H_2O q.s.p. ---------- 1000ml

O gel era incubado nesta solução por 45 a 60 minutos a 37°C no escuro.

b) Sistema Malato deidrogenase, segundo SOLTIS et alii (1983):

tampão Tris-HCl 1.0M, pH 8.0 -------- 5ml

Ácido DL-málico 2.0M, pH 8.0 -------- 5ml

H_2O ---------- 40ml

NAD ---------- 5.0mg

NBT ---------- 5.0mg

PMS ---------- 1.0mg

O gel era mantido nesta solução por 12 horas, no escuro, a uma temperatura de 30°C.

c) Sistema Glutamato oxaloacetato transaminase, segundo BREWBAKER et alii (1968), modificado:

tampão C ---------- 8ml

tampão D ---------- 42ml

BSA ---------- 60mg

PVP ---------- 250mg

Ácido L-aspártico ---------- 226mg

Ácido α -cetoglutárico ------ 36.5mg

Fast Blue BB ---------- 150mg

Piridoxal-5-fosfato -------- 1mg

O gel era mantido nesta solução por 60 minutos, no escuro, a uma temperatura de 37°C.

Não serão descritos os métodos para catalase,

fosfatase ácida, peroxidase e álcool deidrogenase, por motivos que serão discutidos posteriormente.

Após a coloração, os géis eram lavados em água destilada e fixados em uma solução de água destilada, metanol e ácido acético, na proporção de 5:5:1, por 15 minutos. Posteriormente eram secados com papel absorvente e guardados, envoltos em plásticos, a uma temperatura de 4°C, até serem analisados e fotografados.

e- **Análise dos zimogramas**

A análise dos géis foi feita baseado na migração relativa (RM) das bandas em relação ao padrão utilizado, no caso, o indivíduo 5022 de Laelia flava (ALFENAS et alii, 1991).

Os géis foram posteriormente fotografados com filme ISO 100/21 - Kodak.

O estudo da variabilidade intraespecífica baseou-se na análise visual dos zimogramas.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Relações fenéticas entre espécies baseadas em dados morfológicos

4.1.1. Análises de variância

Os resultados das análises de variância univariadas para os treze caracteres avaliados em onze espécies encontram-se na Tabela 2.

Verifica-se pela Tabela 2 a existência de diferenças significativas entre espécies para todos os caracteres. O mesmo foi constatado por CUNHA FILHO (1966) para os caracteres coincidentes com os avaliados neste estudo.

Desta forma, todos os caracteres foram empregados nos passos seguintes de estimação da diversidade genética baseados em diferentes técnicas multivariadas.

4.1.2. Distância Generalizada de Mahalanobis e agrupamentos

Na Tabela 3 são apresentadas as medidas de

dissimilaridade entre todas as espécies utilizando a distância generalizada de Mahalanobis (D^2).

Como pode-se observar as espécies com menor dissimilaridade morfológica são L. longipes e L. briegeri com D^2= 2.43 e as espécies com maior são L. cinnabarina e L. esalqueana com D^2= 95.72. Estes resultados são similares aos obtidos por CUNHA FILHO (1966) para relações de menor e maior dissimilaridade interespecífica envolvendo o gênero, diferindo apenas nas magnitudes das medidas de distância. Isto ressalta a repetibilidade esperada quando são empregados métodos numéricos em estudos taxonômicos.

Deve-se ressaltar que CUNHA FILHO (1966), empregou 18 caracteres em seu estudo, sendo que nove deles coincidem com os empregados neste trabalho. A repetibilidade obtida empregando um número menor de caracteres e ainda, excluíndo caracteres vegetativos (pseudobulbo e folha), fornece uma indicação da pequena importância destes últimos na dissimilaridade interespecífica.

As relações entre estas espécies são mais claras quando apresentadas na forma de dendrogramas (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5). Foram empregados três métodos de agrupamento hierárquico aglomerativo, sendo eles: "vizinho mais distante" (CLM) (Figura 1); "vizinho mais próximo" (SLM) (Figuras 3 e 4) e "ligações médias não ponderadas" (UPGMA) (Figuras 2 e 5).

Nas Figuras 1, 2 e 3 são apresentados dendrogramas para os métodos CLM, UPGMA e SLM, respectivamente. Nestes três dendrogramas a espécie L. mixta (11) foi excluída tanto do cálculo de D^2 quanto dos agrupamentos. Este procedimento teve a finalidade de observar as relações entre as outras espécies, visto que a presença de L. mixta, que apresenta uma posição intermediária conforme evidenciado por CUNHA FILHO (1966), poderia alterar as relações entre os grupos que provavelmente iriam se formar.

Um problema comum a todos os métodos de agrupamento é a dificuldade de decidir quanto ao número de grupos presentes nos dados (RIBOLDI, 1986). Métodos informais para tal propósito, como o sugerido por FRIEDMAN & RUBIN (1967), baseiam-se na análise do dendrograma e verificação do ponto de alta mudança de nível, considerando isto como indicativo do número correto de grupos.

Este procedimento foi realizado neste trabalho, de forma que nas três Figuras (1, 2 e 3), independentemente do método empregado, observa-se a formação de dois grandes grupos. Pelos dendrogramas observa-se que o maior salto, isto é, o maior acréscimo de distância, ocorre no ponto em que a espécie 7 (L. cinnabarina) une-se ao que consideramos como sendo o outro grupo, composto pelo restante das espécies analisadas. Desta forma, o primeiro grande grupo compôs-se de 3

subgrupos e o segundo foi representado apenas pela espécie L. cinnabarina. Isto revela uma grande distância genética ou isolamento da espécie 7, em relação às demais.

Verifica-se que os três subgrupos formados são os mesmos para os três métodos de agrupamento. Sendo que o primeiro inclui as espécies L. crispilabia (1), L. caulescens (4), L. flava (8) e L. milleri (10). O segundo inclui as espécies L. esalqueana (2) e L. lucasiana (3). E finalmente, o terceiro é composto pelas espécies L. longipes (5), L. briegeri (6) e L. crispata (9).

Os dendrogramas indicam uma grande concordância na relação entre estes subgrupos quando são construídos pelos métodos de CLM (Figura 1) e UPGMA (Figura 2). O que não ocorre com o dendrograma obtido pelo método de SLM (Figura 3), que altera as relações entre subgrupos, aproximando o primeiro (espécies 1, 4, 8 e 10) do terceiro (5, 6 e 9) e não o primeiro e o segundo (2 e 3), conforme o CLM e UPGMA.

Baseados nestas evidências de repetibilidade dos agrupamentos, os dendrogramas incluindo a espécie L. mixta foram determinados apenas pelos métodos de SLM (Figura 4) e UPGMA (Figura 5).

Nestes dendrogramas observa-se que, mesmo com a inclusão de L. mixta não se alteram a formação de 2 grupos, sendo que esta espécie inclui-se no primeiro. Entretanto, as relações entre os subgrupos são alteradas,

de forma que pelo método de UPGMA (Figura 5) o segundo (espécies 2 e 3) e o terceiro (espécies 5, 6 e 9) subgrupos apresentam-se interligados pela espécie 11 (L. mixta).

No dendrograma obtido por SLM (Figura 4) as relações entre os subgrupos aproximam-se das obtidas pelos métodos de CLM (Figura 1) e UPGMA (Figura 2) sem a espécie L. mixta. Sendo que, para SLM (Figura 4) a espécie L. mixta (11) forma um quarto subgrupo que serve como ponto de ligação para união de todos os subgrupos.

Este resultado confirma L. mixta como uma espécie intermediária entre as outras componentes do primeiro grupo, tendo sido este fato evidenciado inicialmente por CUNHA FILHO (1966).

Sobre as possibilidades de origem híbrida de algumas destas espécies, como L. mixta e L. milleri a partir de L. flava e L. cinnabarina; L. briegeri a partir de L. esalqueana; e de L. lucasiana a partir de L. longipes e L. esalqueana sugeridas por BLUMENSCHEIN (1960b) e BLUMENSCHEIN & VENCOVSKY (1961), os resultados obtidos nos dendrogramas não reforçam nem anulam as hipóteses. A posição intermediária ou próxima a um dos ancestrais não pode ser utilizada como evidência para reforçar estas hipóteses como sugerido por CUNHA FILHO (1966). Principalmente pela evidência de íntima relação entre todas as espécies do primeiro grupo.

As evidências de especiação híbrida

geralmente baseiam-se em estudos morfológicos quantitativos,em compostos secundários, em citogenética, em dados isoenzimáticos, entre outros. Estas abordagens apresentam suas vantagens, sendo que a mais comumente usada, os estudos de caracteres morfológicos quantitativos, têm muitas limitações (CRAWFORD, 1985). Desta forma, consideramos aqui que apenas à partir de evidências morfológicas e relações fenéticas, principalmente no caso destas espécies, não podemos reforçar ou anular as hipóteses de origem híbrida.

BLUMENSCHEIN (1960b) considerou que as espécies L. lucasiana, L. longipes e L. esalqueana eram muito semelhantes, sendo que L. lucasiana apresentava características intermediárias entre as outras duas.

Esta relação de maior proximidade entre as três espécies não foi totalmente confirmada pela distância de Mahalanobis (Tabela 3) e pelos dendrogramas (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5). Observou-se uma maior proximidade entre L. lucasiana e L. esalqueana, visto que estão inclusive no mesmo subgrupo. A espécie L. longipes, entretanto, não apresentou esta mesma proximidade, estando incluída em outro subgrupo.

CUNHA FILHO (1966) baseando-se na distribuição destas espécies sobre um elipsóide imaginário propôs que as mesmas deveriam ser reunidas em 8 grupos. O resultados obtidos por esse autor são similares aos do

presente trabalho, se considerarmos os subgrupos aqui sugeridos, como grupos e se dividirmos o subgrupo 1 em dois (1 e 4; 8 e 10). Os resultados demonstram a repetibilidade obtida por métodos numéricos.

Baseados nos resultados obtidos a partir dos dendrogramas por SLM (Figura 4) e UPGMA (Figura 5), podem ser definidos os seguintes grupos e subgrupos:

1º grupo:

1º subgrupo: L. crispilabia, L. caulescens, L. flava e L. milleri.

2º subgrupo: L. esalqueana e L. lucasiana.

3º subgrupo: L. longipes, L. briegeri e L. crispata.

2º grupo: L. cinnabarina.

Sendo que L. mixta formará um 4º subgrupo dentro do 1º grupo pelo método SLM (Figura 4) ou entrará no 2º subgrupo do 1º grupo se considerarmos o método UPGMA (Figura 5). As relações de proximidade morfológica entre os subgrupos já definidos ocorrem na sequência exposta acima.

4.1.3. Componentes principais

A utilização dos componentes principais teve por finalidade simplificar os dados originais, de forma que as relações interespecíficas, inicialmente influenciadas por um conjunto p-dimensional (p = nº de caracteres iniciais), pudessem ser avaliadas em um complexo bi ou tri-

dimensional de fácil interpretação. Desta forma o método de componentes principais permite reduzir o número inicial de caracteres sem que haja perda significativa de informação.

A eficácia do método depende da quantidade de variação total disponível contida nos n (sendo n<p) primeiros componentes. A importância de cada componente é avaliada pela porcentagem da variância total por ele explicada, sendo arranjados em ordem decrescente de variância. Assim o primeiro componente é definido como aquele de maior importância por reter a maior parte da variação total encontrada nos dados originais.

A Tabela 4 apresenta as estimativas dos coeficientes de ponderação e variância acumulada, em porcentagem, para o primeiro, segundo e décimo terceiro componentes principais. Observa-se que os dois primeiros componentes exploram 94.12% da variância total disponível. Baseados apenas nestes dois primeiros componentes pode-se explicar satisfatoriamente a variabilidade entre as espécies avaliadas.

Como os dois primeiros componentes envolveram a maior parte da variação total (94.12%) seus respectivos escores, para cada espécie (Tabela 5), foram dispersos em gráfico (Figura 6).

Pela Figura 6 observa-se que as espécies L. crispilabia (1), L. esalqueana (2), L. lucasiana (3), L. caulescens (4), L. longipes (5), L. briegeri (6), L. flava

(8), L. crispata (9), L. milleri (10) e L. mixta (11) tenderam a uma maior proximidade formando um grupo no qual há uma tendência de aproximação entre algumas das espécies que compõem alguns dos subgrupos sugeridos no ítem 4.1.2. Entretanto, não há definição do subgrupo, sugerido anteriormente, formado pelas espécies L. esalqueana (2) e L. lucasiana (3). Observa-se também que a espécie L. longipes (5) mantém-se numa posição próxima às espécies L. crispata (9) e L. briegeri (6), mas não definida totalmente neste subgrupo, contrariamente ao obtido pela distância de Mahalanobis no ítem anterior. Observa-se, entretanto, a posição nitidamente intermediária da espécie L. mixta (11) dentro deste grupo.

Outro ponto que não deixa dúvidas é a posição da espécie L. cinnabarina (7) que isolou-se do 1º grupo formando o que consideramos um outro grupo.

Com a finalidade de obter uma melhor dispersão gráfica das espécies do primeiro grupo foi retirada a espécie 7 e realizado um segundo cálculo de componentes principais. Nesta segunda análise o primeiro e segundo componentes explicaram 93.65% da variância total disponível e seus escores (Tabela 6) foram dispersos graficamente (Figura 7).

Observa-se na Figura 7 que, mesmo sem a espécie L. cinnabarina, não houve alteração visual entre esta dispersão e a obtida para todas as espécies juntas

(Figura 6).

Em síntese, na análise de componentes principais, em relação a distância de Mahalanobis, a posição intermediária de L. mixta é mantida, como pode ser evidenciado pela dispersão gráfica dos escores (Figuras 6 e 7). Altera-se, entretanto, a sua relação com os subgrupos, ou seja, há uma maior aproximação desta com as espécies do primeiro (1, 4, 8 e 10) e terceiro (5, 6 e 9) subgrupos, diferentemente do obtido pelos dendrogramas de SLM (Figura 4) e UPGMA (Figura 5). Também a espécie 7 manteve-se em um grupo isolado. As demais espécies dentro do 1º grupo não se definiram nitidamente em subgrupos como ocorreu para D^2.

Os resultados não coincidentes com o método de Mahalanobis podem ser atribuídos ao fato de que a técnica de componentes principais não leva em consideração as correlações residuais existentes entre as variáveis, o que ocorre na distância de Mahalanobis.

4.1.4. Variáveis canônicas

Em estudos de divergência genética, o emprego de variáveis canônicas apresenta uma vantagem sobre o método de componentes principais, que é a de considerar as correlações residuais existentes entre as médias das OTU's, mantendo o princípio de conglomeração com base na distância de Mahalanobis.

A estimativa dos coeficientes de ponderação (auto-vetores) e a porcentagem da variância acumulada para a primeira, segunda e décima terceira variável canônica são mostradas na Tabela 7. Por esta tabela observa-se que as duas primeiras variáveis canônicas exploram 80.31% da variância total disponível.

Há uma certa concordância entre os resultados obtidos por componentes principais (Tabela 4) e variáveis canônicas (Tabela 7). Ambas exploram acima de 80% da variância total disponível utilizando as duas primeiras raízes características.

A dispersão gráfica dos escores das duas primeiras variáveis canônicas para as onze espécies (Tabela 8) é mostrada na Figura 8. Esta dispersão evidencia resultados de distribuição das espécies mais semelhantes aos obtidos pelos métodos de agrupamento com base na distância de Mahalanobis (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5), do que aos obtidos pelo método de componentes principais.

O isolamento da espécie L. cinnabarina mostrou-se acentuado, em relação as outras espécies, como evidenciado nos dendrogramas (Figuras 1 a 5) e dispersão gráfica para componentes principais (Figura 6).

Observa-se que a espécie L. mixta, certamente intermediária, coloca-se entre o primeiro (espécies 1, 4, 8 e 10) e o segundo subgrupos (espécies 2 e 3). Pelo exposto, verifica-se uma maior aproximação destes

resultados com os obtidos pelo dendrograma de SLM para as onze espécies, com base na distância de Mahalanobis (Figura 4), do que com o dendrograma de UPGMA (Figura 5).

Baseados nestes resultados pode-se inferir que o agrupamento pelo método do "vizinho mais próximo" (SLM) a partir da distância generalizada de Mahalanobis e a análise de variáveis canônicas são as metodologias mais adequadas para estabelecer a divergência genética e relações interespecíficas para as onze espécies avaliadas.

Desta forma sugere-se a definição dos seguintes grupos e subgrupos, complementando o anterior (ítem 4.1.2.):

1º grupo:

1º subgrupo: L. crispilabia, L. caulescens, L. flava e L. milleri

2º subgrupo: L. esalqueana e L. lucasiana

3º subgrupo: L. longipes, L. briegeri e L. crispata

4º subgrupo: L. mixta

2º grupo: L. cinnabarina

A definição da relação interespecífica baseada em grupos e subgrupos difere da sugerida por CUNHA FILHO (1966) em alguns aspectos. O autor não considerou a subdivisão de grupos e não estabeleceu a relação entre os grupos sugeridos, tendo também separado as espécies L. flava e L. milleri das espécies L. caulescens e L. crispilabia, o que não ocorreu neste trabalho.

O agrupamento aqui sugerido, também difere dos agrupamentos considerados por BLUMENSCHEIN (1960b) para forma das peças florais e cor das flores, obtidos de maneira subjetiva.

BLUMENSCHEIN & VENCOVSKY (1961) sugeriram a origem híbrida de L. mixta a partir de L. flava e L. cinnabarina pela constatação de caracteres intermediários entre estas em L. mixta. CUNHA FILHO (1966) também evidenciou a posição intermediária de L. mixta e seus possíveis parentais. Entretanto, esta posição não pode ser reforçada visto que L. mixta não apresenta uma posição intermediária entre seus possíveis parentais pelos resultados de distância de Mahalanobis e variáveis canônicas.

A posição intermediária, baseada em caracteres morfológicos, de L. lucasiana em relação a L. longipes e L. esalqueana, sugerida por BLUMENSCHEIN (1960b) não foi confirmada pela disposição gráfica destas espécies baseada em variáveis canônicas (Figura 8) e distância de Mahalanobis (Tabela 3). Desta forma, a hipótese de origem híbrida de L. lucasiana a partir de L. longipes e L. esalqueana, baseada apenas em sua posição entre as possíveis espécies parentais, não pode ser reforçada.

A mesma consideração pode ser feita para L. milleri, considerada por BLUMENSCHEIN (1960b) como intermediária entre L. flava e L. cinnabarina.

Outros estudos, empregando outras metodologias, são necessários afim de que estas hipóteses sejam reforçadas ou anuladas, pois as inferências iniciais, de uma posição intermediária como evidência de hibridação, não foram confirmadas.

4.1.5. **Descarte de variáveis**

A eliminação de caracteres redundantes visa selecionar aqueles que mais contribuem para a variação total. Desta forma, identificando os caracteres mais importantes determinam-se os que mais contribuem na divergência genética interespecífica.

Na identificação destes caracteres adotaram-se os critérios sugeridos por MARDIA et alii (1979) e RAM & PANWAR (1960) e PETER & RAI (1976) para os coeficientes de ponderação (autovetores) obtidos na análise de variáveis canônicas. Não foram utilizados os coeficientes obtidos por componentes principais, pelo fato deste método não ter se mostrado o mais adequado ao estudo da divergência entre as espécies avaliadas.

Assim, na eliminação dos caracteres redundantes foram considerados os coeficientes de ponderação das variáveis associadas ao último componente (Y_{13}) (Tabela 7), que por construção retém proporção mínima da variação total (MARDIA et alii, 1978), e mantidos os de

menor valor. Posteriormente, foram selecionadas as variáveis cujos coeficientes apresentavam os maiores valores nas duas primeiras variáveis canônicas (Y_1 e Y_2) (Tabela 7), que, por contrução, têm maior impacto sobre a diversidade observada (RAM & PANWAR, 1970; PETER & RAI, 1976).

Sobrepondo-se os caracteres que foram mantidos na 13ª variável com aqueles que foram selecionados nas duas primeiras variáveis canônicas, chegou-se a indicação de um grupo de caracteres que realmente contribuem mais para a variação total.

Com o objetivo de demonstrar a importância destes caracteres na divergência interespecífica foram estimados os coeficientes de correlação de Pearson entre a distância Euclideana média, calculada a partir da média por espécie para os caracteres 1 e 4 separadamente (visto que pelo método de descarte utilizado, esses demonstraram ser os mais importantes para a diversidade total) e a distância Euclideana média obtida a partir dos escores das duas primeiras variáveis canônicas, considerando todos os 13 caracteres.

Obteve-se que a distância Euclideana média para o caráter 1 (comprimento do labelo) apresentou a mais alta correlação (0.82) com a distância Euclideana média calculada pelos escores das primeiras variáveis canônicas com os 13 caracteres, evidenciando que o caráter 1 é mais

importante para a diversidade que o 4.

A partir deste resultado foram calculadas as variáveis canônicas com a inclusão sucessiva dos outros caracteres selecionados. Os escores das duas primeiras variáveis canônicas, para cada inclusão de caráter (Tabela 10), foram dispersos em gráficos, como pode ser visualizado nas Figuras 9, 10, 11, 12 e 13.

Em cada uma das novas estimativas de variáveis canônicas (quando da incorporação de um caráter a mais) foi calculada a distância Euclideana média, para as onze espécies, a partir dos escores das duas primeiras variáveis. Essas distâncias obtidas foram correlacionadas com a distância Euclideana média resultante da primeira análise de variáveis canônicas, para todos os caracteres (Tabela 9).

Deve-se ressaltar que a inclusão sucessiva de caracteres baseou-se na análise de suas importâncias relativas dentre os que foram selecionados, conforme a metodologia utilizada para descarte.

As altas correlações obtidas em cada passo (inclusão) (Tabela 9) reforçam a análise visual dos gráficos, nos quais desde os primeiros dois caracteres (1 e 4) dispersos (Figura 9), já se evidencia uma tendência ao agrupamento das espécies semelhantes ao obtido com todos os caracteres (Figura 8). Por outro lado, manteve-se indefinida apenas a espécie 4 (*L. caulescens*) cuja posição

vai se definindo, ou seja, juntando-se ao seu subgrupo, a medida que os caracteres vão sendo incluídos.

Desta forma, observou-se que a dispersão gráfica (Figura 13), praticamente se igualou a obtida com todos os caracteres (Figura 8), quando foram empregados nas análises apenas os 6 primeiros caracteres selecionados. A partir destes resultados pode-se indicar os caracteres comprimento do labelo (CL, caráter 1), comprimento da sépala dorsal (CSD, caráter 3), largura da sépala dorsal (LSD, caráter 4), comprimento de sépala lateral (CSL, caráter 5), comprimento da coluna (CC, caráter 10) e espessura da coluna (EC, caráter 12) como sendo responsáveis pela quase totalidade da divergência genética existente entre as 11 espécies. Isto significa que as espécies em questão, provavelmente podem ser identificadas apenas por esses 6 caracteres.

Os resultados revelaram ainda a eficiência do processo adotado no descarte de variáveis, bem como o grande auxílio da metodologia de variáveis canônicas na identificação destas espécies.

Segundo BLUMENSCHEIN (1960b) as espécies do gênero <u>Laelia</u> seção <u>Parviflorae</u> encontram-se num estado ativo de evolução, causado possivelmente pela mudança de ambiente (de epífita para rupícola) e por hibridações relativamente frequentes entre elas. Neste contexto, o autor sugere a importância de alguns mecanismos de

isolamento reprodutivo no processo evolutivo destas espécies, dando ênfase ao isolamento por poliploidia e ao isolamento estacional, devido a diferenças na época de florescimento.

Os resultados obtidos através do descarte de variáveis e principalmente a alta correlação (0.82) entre a distância euclideana média determinada a partir dos escores das duas primeiras variáveis canônicas considerando todos os caracteres e a distância euclideana média obtida a partir de um único caráter (comprimento do labelo) indicam um outro aspecto não considerado anteriormente.

A evolução da diversidade na família Orchidaceae é bastante complexa, mas no processo de especiação a maior parte da diversidade é atribuída aos mecanismos de polinização (ACKERMAN, 1989). Os sistemas de polinização em orquídeas devem ter evoluído consideravelmente em resposta à competição por polinizadores (BENZING & ATWOOD, 1984).

Considerando a elevada contribuição para a diversidade entre estas espécies, de uma estrutura tão importante no processo de atração de polinizadores que é o comprimento do labelo, pode-se inferir sobre a possibilidade de uma forte pressão de seleção neste caráter, refletindo na diversidade interespecífica.

Estudos referentes aos agentes polinizadores destas espécies, bem como da biologia floral e de

polinização permitirão uma maior compreensão de outros mecanismos de isolamento que podem estar atuando no processo de especiação no gênero Laelia seção Parviflorae.

4.2. Relações fenéticas baseadas em dados isoenzimáticos

Os padrões eletroforéticos obtidos para 3 sistemas enzimáticos (MDH - malato deidrogenase, GOT - glutamato oxaloacetato transaminase e EST - esterase) para algumas das espécies analisadas são mostrados nas Figuras 14, 15 e 16. Foram descartados os sistemas catalase, fosfatase ácida, álcool deidrogenase e peroxidase, pela baixa resolução apresentada por estes.

Todas as enzimas foram testadas empregando os tecidos de folha e ponta de raiz. Foram detectadas diferenças, entre os tecidos,na intensidade, bem como na atividade de bandas (presentes em um tecido e ausente no outro) para todos os sistemas analisados. Baseando-se nestes testes, foi possível determinar que o sistema EST apresentava melhor resolução em tecido de ponta de raiz e os sistemas GOT e MDH apresentavam melhor resolução em tecidos de folhas jovens.

A Figura 14, referente ao sistema GOT, demonstra a análise das seguintes espécies, na sequência da esquerda para a direita: L. esalqueana (1-4); L. briegeri (5); L. mixta (6, 8-10 e 15-18); L. longipes (12) e L.

flava (19-22). A análise visual mostra a ausência de variação intraespecífica, no caso de espécies representadas por mais de um indivíduo. Podem ser visualizadas duas regiões de atividade no gel que podem ser interpretadas como correspondentes a dois locos: o primeiro, mais distante da origem, chamado GOT 1 e o segundo, mais próximo da origem, chamado GOT 2.

Mesmo não tendo sido realizadas análises de progênies de cruzamentos específicos, tecidos haplóides ou outros procedimentos necessários para identificação de locos e alelos, pode ser feita a inferência sobre a existência de dois locos, baseado em dados de literatura (SCHELEGEL et alii, 1989; ALFENAS et alii, 1991).

No caso da espécie L. crispata, comprovadamente tetraplóide (2n = 80) (BLUMENSCHEIN, 1960), não foram encontradas diferenças entre os 6 indivíduos analisados em termos de regiões de migração, bem como não foram encontradas diferenças entre as bandas de cada região.

O fator determinante do número de bandas é o número de alelos diferentes por loco e a maneira como seus produtos podem ser combinados entre si na formação de uma enzima dimérica, no caso GOT (ALFENAS et alii, 1991; KEPHART, 1990). Isto permite supor que, para esta espécie, não existem diferenças detectáveis entre os alelos de cada loco (GOT 1 e GOT 2), mesmo considerando a existência de

quatro alelos por loco, pelo fato da espécie ser tetraplóide.

As espécies L. flava, L. mixta e L. esalqueana, diplóides (2n = 40) também apresentaram duas regiões de migração para o sistema GOT, como pode ser evidenciado na Figura 14. Não foram encontradas variações intraespecíficas nos dois locos, GOT 1 e GOT 2, para as três espécies. Casos como os apresentados pelos indivíduos 8 e 15 de L. mixta e o indivíduo 22 de L. flava (Figura 14), nos quais verifica-se a ausência da banda referente ao loco de GOT 2, são resultantes de prováveis falhas durante a coloração do gel, pela baixa atividade da enzima decorrentes de condições do gel ou por problemas durante a extração. Esta considerações são feitas visto que em repetições de ensaios, envolvendo a análise destes três indivíduos resultaram em duas regiões de migração e aparecimento da referida banda.

A espécie L. cinnabarina, que morfologicamente apresenta-se isolada das outras espécies estudadas, apresentou o mesmo padrão de migração para o sistema GOT, com duas regiões de migração no gel e com uma única banda por loco.

Os 5 indivíduos da espécie L. longipes que foram analisados apresentaram o mesmo padrão de migração para o sistema GOT. As duas regiões de atividade no gel também foram consideradas como sendo dois locos, GOT 1 e

GOT 2. Entre os indivíduos analisados, 3 são comprovadamente triplóides (2n = 60) e um tetraplóide (2n = 80). Na Figura 14 está representado apenas o indivíduo tetraplóide, na posição 12 no gel.

Em L. longipes, como em L. crispata, não foram encontradas diferenças detectáveis entre os alelos de cada loco, mesmo considerando a existência de quatro alelos por loco nos tetraplóides e três nos triplóides.

Na espécie L. briegeri, os 6 indivíduos analisados apresentaram o mesmo padrão de migração para o sistema GOT, com duas regiões de atividade no gel, GOT 1 e GOT 2. Dos 6 indivíduos analisados, apenas dois tinham seu número de cromossomos conhecido, com 2n = 42 e 2n = 44. Considerando que esta espécie apresenta várias formas aneuplóides e alguns indivíduos tetraplóides, não foi possível realizar uma ampla análise da variação intraespecífica. Entretanto, deve-se considerar o fato de ausência de variação, para este sistema, entre as duas formas aneuplóides analisadas. Isto pode ter ocorrido por dois motivos: i- estes indivíduos não apresentam mais de uma cópia de cada gene ou, ii- na possível presença dessa cópia, não havia diferença entre os alelos de cada loco, não sendo possível identificá-los.

Para o sistema Esterase (EST), as seis espécies analisadas apresentaram apenas uma região de atividade no gel (Figura 15), com um nítido monomorfismo

intraespecífico. Na Figura 15 estão representadas as espécies L. crispata (1-6); L. flava (7); L. longipes (8-12); L. briegeri (13-17); L. mixta (19-20) e L. esalqueana (21-22). A espécie L. cinnabarina também apresentou este monomorfismo intraespecífico.

A ausência da banda nos indivíduos 5 e 13 e a baixa intensidade no indivíduo 19, provavelmente ocorreram por problemas na atividade da enzima, visto que, em outras análises, estes indivíduos apresentaram a banda.

No indivíduo 14, da espécie L. briegeri, foram detectadas duas bandas bem próximas (Figura 15). Esta observação pode ser resultado da degradação de produtos de alozimas, frequentemente encontrados em alguns sistemas enzimáticos, como é o caso da esterase (KEPHART, 1990). Este processo já foi observado em outras análises realizadas com este sistema e estavam estritamente relacionadas com problemas técnicos.

Os resultados das análises das 7 espécies, baseado em GOT e EST, mostram um monomorfismo intraespecífico. Considerando o pequeno tamanho da amostra em cada espécie, bem como, a ausência de amostragem entre populações dentro de espécies, na realização destas análises, deve-se ter uma grande cautela ao discutir esses resultados. Entretanto, baseados em dados de literatura algumas hipóteses podem ser formuladas em relação às espécies L. crispata, L. longipes e L. briegeri.

Em relação a L. crispata, o monomorfismo observado para os sistemas GOT e EST, numa espécie tetraplóide, poderia ser resultante de vários processos. Um deles seria em relação a sua origem, na qual progenitores diplóides seriam monomórficos para um mesmo alelo. Assim, o tetraplóide, ainda recente, não teria sofrido um processo de divergência para estes locos, apresentando o mesmo padrão fenotípico dos parentais diplóides (KEPHART, 1990).

Uma outra hipótese, complementar à primeira, trata da superposição de bandas no zimograma (GOTTLIEB, 1982). Em muitos casos, enzimas diméricas como GOT e algumas esterases, são capazes de formar moléculas hibridas entre locos, que coincidem com outras quanto a posição no gel. Isto ocorre quando estes locos apresentam alelos comuns, bastante frequentes em genomas de organismos poliplóides, que nem sempre formam zimogramas em zonas de atividade distintas.

No caso das espécies L. briegeri e L. longipes a análise dos resultados indica um monomorfismo entre indivíduos aneuplóides na primeira e entre indivíduos triplóides e tetraplóides na segunda. Além das hipóteses já discutidas anteriormente para L. crispata, uma outra poderia ser aplicada a estas duas espécies. Trata-se da ausência de multiplicidade isoenzimática, para estes locos, nestas duas espécies. Neste caso, estas espécies não teriam se originado a partir de hibridação e poliploidia com

posteriores reduções aneuplóides (BLUMENSCHEIN, 1960b), mas a partir de um ancestral com um número de cromossomos elevado, não poliplóide, do qual foram ocorrendo reduções do número de cromossomos. Neste caso espera-se uma constância no número de genes estruturais, independentemente do número de cromossomos apresentado nos diferentes indivíduos.

Na literatura são encontrados diversos relatos sobre esta hipótese, em diversas espécies da subtribo Oncidiinae (Orchidaceae) (CHASE & OLMSTEAD, 1988); na tribo Astereae (Compositae) (GOTTLIEB, 1981); em Crepis (ROOSE & GOTTLIEB, 1978), entre outros. Em todos estes trabalhos, as diferenças no número de cromossomos são encontradas em espécies diferentes.

No caso de L. briegeri, a diferença no número de cromossomos ocorre a nível de populações, o que a torna um excelente material para futuras investigações, afim de reforçar ou não a hipótese formulada. Deve-se enfatizar que para a realização destes estudos deverão ser empregados um grande número de sistemas enzimáticos, para que se tenha uma amostragem adequada do genoma da espécie.

Para a espécie L. cinnabarina, morfologicamente isolada das outras espécies estudadas, não foi observado um padrão eletroforético que indicasse esta divergência, para os sistemas GOT e EST. CRAWFORD (1985) discutiu, baseado em vários estudos, que a divergência

morfológica pode ocorrer sem uma divergência em genes que especificam isoenzimas. Considerando a hipótese de BLUMENSCHEIN (1960b) sobre a evolução recente destas espécies, pode-se inferir sobre a possibilidade de tal processo ter ocorrido na especiação deste grupo.

As espécies analisadas mostraram um certo polimorfismo intraespecífico para o sistema malato deidrogenase (MDH), como pode ser visualizado na Figura 16. Nesta figura estão representadas as espécies L. crispata (1-6), L. flava (7), L. longipes (8, 10-12), L. briegeri (13-18), L. mixta (19-20) e L. esalqueana (21-22).

Para o sistema MDH foram consideradas duas regiões de migração no gel, tratando-se possivelmente de dois locos, sendo o primeiro mais distante da origem (MDH 1) e o segundo mais próximo da origem (MDH 2). Esta duas regiões estavam presentes em todos os indivíduos representantes das espécies analisadas.

Observa-se um monomorfismo para o loco MDH 1 de L. crispata e nos dois indivíduos representantes de L. mixta. Para a primeira existe uma visível diferença na intensidade das bandas de MDH 1. Esta alteração na intensidade poderia ser um indicativo da falta de divergência detectável nos alelos deste loco, considerando que esta espécie é tetraplóide.

Para L. mixta esse monomorfismo se repetiu em outras análises nas quais foram incluídos um número

maior de indivíduos. Entretanto, esta espécie é diplóide e pode ter fixado, na população analisada, o alelo referente à banda visível.

Foi observado um polimorfismo intraespecífico nas espécies L. esalqueana, L. briegeri e L. longipes, sendo mais intenso na população analisada desta última. O indivíduo de número 9 (Figura 16), que apresentou três bandas no loco de MDH 1 foi identificado, posteriormente, como um possível híbrido de espécies parentais desconhecidas, isto explicaria o padrão obtido.

A espécie L. cinnabarina apresentou as duas regiões de migração (MDH 1 e 2) evidenciadas nas outras espécies, tendo sido observado um polimorfismo intraespecífico no loco MDH 1.

No presente trabalho não foram realizadas medidas de diversidade genética intrapopulacionais para nenhuma das espécies. Alguns fatores foram considerados para a não realização destas medidas. O primeiro deveu-se a impossibilidade de determinação do número de alelos para cada loco, nas enzimas estudadas, para cada espécie. O segundo refere-se ao pequeno tamanho da amostra intraespecífica, que no caso destas espécies deveria ter sido maior, para gerar medidas confiáveis. Assim, no presente trabalho, optou-se por não fazer inferências mais profundas, deixando aqui apenas sugestões para trabalhos futuros.

Pelos mesmos fatores citados no parágrafo anterior não foram realizadas comparações interespecíficas. Entretanto podem ser feitas algumas inferências quando observamos os resultados das análise para os três sistemas enzimáticos.

A primeira trata das regiões de migração nos géis para os três sistemas. Não podemos afirmar que duas bandas, pertencentes a espécies diferentes e com a mesma posição no zimograma sejam idênticas, ou seja, tenham a mesma sequência de aminoácidos. Entretanto, observa-se que todas as espécies apresentam as mesmas regiões de migração no zimograma para os 3 sistemas, indicando uma elevada homologia, concordando com os resultados obtidos anteriormente pela análise multivariada que indicam uma grande proximidade entre estas espécies.

Uma segunda inferência, complementar a primeira, deve ser colocada. Estas espécies não podem ser caracterizadas empregando os sistemas enzimáticos aqui analisados. Não existem diferenças entre as migrações relativas (RM) ou simplesmente, em regiões de migração no gel, que possam ser utilizadas no pronto reconhecimento de cada espécie. Este fato torna-se mais evidente quando comparamos o padrão eletroforético da espécie *L. cinnabarina* com o das outras espécies, pois a primeira, mesmo estando morfologicamente isolada das outras, apresentou as mesmas regiões de migração.

Estes resultados reforçam a hipótese de BLUMENSCHEIN (1960b) sobre a evolução recente destas espécies, bem como indicam a pequena divergência por elas apresentada.

5. CONCLUSÕES

As interpretações dos resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir:

a) Existe variabilidade interespecífica para todos os 13 caracteres utilizados neste estudo.

b) A análise de agrupamento pelo método do "vizinho mais próximo", com base na estimativa da distância generalizada de Mahalanobis, permitiu a distribuição das 11 espécies em grupos e subgrupos:

   1º grupo:

   1º subgrupo: L. crispilabia, L. caulescens, L. flava e L. milleri.

   2º subgrupo: L. esalqueana e L. lucasiana

   3º subgrupo: L. longipes, L. briegeri e L. crispata

   4º subgrupo: L. mixta

   2º grupo: L. cinnabarina

c) As análises realizadas pela técnica dos componentes principais revelaram a posição nitidamente intermediária da espécie L. mixta em relação às espécies do primeiro grupo e definiram a espécie L. cinnabarina em um grupo isolado. Por outro lado, não revelaram uma divisão clara

das espécies do primeiro grupo em subgrupos.

d) A divergência entre as 11 espécies, com base nos 13 caracteres avaliados, pode ser quantificada apenas com base nas duas primeiras variáveis canônicas, que explicaram 80.31% da variação total disponível. Isto permitiu a distribuição das espécies num sistema de coordenadas e a visualização de grupos e subgrupos aproximadamente coincidentes com os obtidos pelo método de distância de Mahalanobis.

e) As hipóteses de origem híbrida de determinadas espécies não puderam ser confirmadas pelas ditribuições destas em grupos e subgrupos, com base nos resultados obtidos por distância de Mahalanobis e variáveis canônicas.

f) O descarte de variáveis redundantes permitiu a indicação dos caracteres: comprimento do labelo, comprimento da sépala dorsal, largura de sépala dorsal, comprimento da sépala lateral, comprimento da coluna e espessura da coluna, como os mais importantes para divergência genética interespecífica. Assim, as espécies estudadas podem ser perfeitamente identificadas com base nestes 6 caracteres.

g) As análises e interpretações revelaram que, entre os caracteres avaliados, o mais importante para a diversidade interespecífica é o comprimento do labelo.

h) A padronização da técnica de eletroforese de isoenzimas, para as espécies do gênero <u>Laelia</u> seção <u>Parviflorae</u>, foi

possível para os sistemas glutamato oxaloacetato transaminase, esterase e malato deidrogenase.

i) Os resultados obtidos para os três sistemas isoenzimáticos permitem algumas inferências, para trabalhos futuros, envolvendo estudos de origem por hibridação e processos evolutivos atuantes nestas espécies.

j) A análise eletroforética, nos indivíduos estudados, revelou um monomorfismo intraespecífico para os sistemas GOT e EST, e um polimorfismo intraespecífico para o sistema MDH.

k) A impossibilidade de utilização de fenótipos isoenzimáticos (bandas) na caracterização das espécies analisadas revela a grande homologia entre elas, reforçando as evidências obtidas com base na distância de Mahalanobis e agrupamentos, componentes principais e variáveis canônicas. Reforça-se ainda a hipótese de um processo evolutivo recente destas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, J.D. Limitations to sexual reproduction in Encyclia krugii (Orchidaceae). Systematic Botany, Oshkosh, 44:101-9, 1989.

AFIFI, A.A. & CLARK, V. Computer-aided multivariate analysis. California, Lifetime Learning Publications, 1984. 458p.

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essencias florestais. Viçosa, Imprensa Universitária, 1991. (no prelo).

ARCHIE, J.W.; SIMON, C.; MARTIN, A. Small sample size does decrease the stability of dendrograms calculated from allozyme-frequency data. Evolution, Lancaster, 43: 678-83, 1989.

AVISE, J.C. Systematic value of electrophoretic data. Systematic Zoology, Washington, 23: 465-81, 1974.

BENZING, D.H. & ATWOOD, J.T. Orchidaceae: ancestral habitats and current status in forest canopies. Systematic Botany, Oshkosh, 9:155-65, 1984.

BLUMENSCHEIN, A. Estudos citológicos na família

Orchidaceae. Piracicaba,1957. 70p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

BLUMENSCHEIN, A. Três novas espécies da Laelia Lindl. Publicação Cientifica do Instituto de Genética/ESALQ, Piracicaba,(1): 33-44, 1960a.

BLUMENSCHEIN, A. Estudo sobre a evolução no subgênero Cyrtolaelia (Orchidaceae). Piracicaba, 1960b. 71p. (Livre-Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

BLUMENSCHEIN, A. & VENCOVSKY, R. Emprego de métodos estatísticos no estudo da taxonomia de algumas Cyrtolaelia. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BOTÂNICA DO BRASIL, 12., São Paulo, 1961. Anais. São Paulo, 1961.p.1-2.

BREWBAKER, J.K.; UPADHYA, M.D.; MAKINEN, Y; MacDONALD, T. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. III gel electrophoretic methods and applications. Physiologia Plantarum, Kobenhaun, 21: 930-40, 1968.

BROWN, A.H.D. & WEIR, B.S. Measuring genetic variability in plant populations. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON,T.J.,ed., Isozymes in plant genetics and breeding,Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V., 1983. pt A. p.219-39.

BUTH, D.G. The application of electrophoretic data in systematic studies. Annual Review of Ecology and Systematics, Palo Alto, 15: 501-22, 1984.

CANNINGS, C. & HOPPENSTEADT, F. An introduction to mathematical taxonomy. Cambridge, Cambridge University Press, 1982. 152p.

CAVALLI-SFORZA, L.L. & EDWARDS, A.W.F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. Evolution, Lancaster, 21: 550-70, 1967.

CHASE, M.W. & OLMSTEAD, R.G. Isozyme number in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae): an evaluation of polyploidy. American Journal of Botany, New York, 75: 1080-5, 1988.

CRAWFORD, D.J. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J.,ed., Isozymes in plant genetics and breeding, Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V.,1983. ptA p.257-87.

CRAWFORD, D.J. Electrophoretic data and plant speciation. Systematic Botany, Oshkosh, 10: 405-16, 1985.

CRUZ, C.D. Algumas técnicas de análise multivariada no melhoramento de plantas. Piracicaba, ESALQ/USP, 1987. 75p. (Monografia).

CRUZ, C.D. Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas. Piracicaba, 1990. 188p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

CUNHA FILHO, L.A. Contribuição ao estudo da evolução do subgênero Cyrtolaelia (Orchidaceae) com base na determinação das distâncias generalizadas de

Mahalanobis. Piracicaba, 1966. 58p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

FRIEMAN, H.P. & RUBIN, J. On some invariant criteria for grouping data. Journal of the American Statistical Association, Boston, 62: 1159-78, 1967.

GOMES, M.B. Determinação de componentes principais. Ciência e Cultura, São Paulo, 37: 2071-74, 1985.

GOTTLIEB, L.D. Allelic diversity in the outcrossing annual plant Stephanomeria exigua ssp. carotifera (Compositae). Evolution, Lancaster, 29: 213-25, 1975.

GOTTLIEB, L.D. Electrophoretic evidence and plant systematics. Annals of the Missouri Botanical Garden, Saint Louis , 64: 161-80, 1977.

GOTTLIEB, L.D. Gene number in species of Astereae that have different chromosome numbers. Proceedings of the National Academy of Science USA, Washington, 78: 3726-29, 1981.

HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B.; MITTON, J.B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. Annual Review of Ecology and Systematics, Palo Alto, 10: 173-200, 1979.

HARBORNE, J.B. New experimental approaches to plant chemossystematics. In: BISBY, F.A.; VAUGHAN, J.G.; WRIGHT, C.A.,ed., Chemossystematics: principles and practice. London, Academic Press, 1980. p.39-70.

HEDRICK, P.W. A new approach to measuring genetic similarity. Evolution, Lancaster, 25: 276-80, 1971.

HILLIS, D.M. Molecular versus morphological approaches to systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, Palo Alto, 18: 23-42, 1987.

HOEHNE, F.C. Algo concernente ao gênero Laelia Ldl. das orquídeas e uma nova espécie para ele do Estado de Minas Gerais. Arquivo de Botânica do Estado de São Paulo, São Paulo, II(6): 157-67, 1952.

HURKA, H. Enzymes as a taxonomic tool: a botanist's view. In: BISBY, F.A.; VAUGHAN, J.G.; WRIGHT, C.A., ed., Chemossystematic : principles and practice. London, Academic Press Inc. LTD., 1980. p.103-21.

HUSSAINI, S.H.; GOODMAN, M.M.; TIMOTHY, D.H. Multivariate analysis and the geographical distribuition of the world collection of finger millet. Crop Science, Madison, 17: 257-63, 1977.

JOLLIFFE, I.T. Discarding variables in a principal component analysis. I. artificial data. Applied Statistics, London, 21: 160-73, 1972.

KENDALL, M. Multivariate analysis. High Wycombe, Charles Griffin and Co. LTD., 1980. 209p.

KEPHART, S.R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. American Journal of Botany, New York, 77: 693-712, 1990.

MAHALANOBIS, P.C. On the generalized distance in

statistics. Proceedings of the National Institute Science India, New Delhi, 2: 49-55, 1936.

MARDIA, K.V.; KENT, J.T.; BIBBY, J.M. Multivariate analysis. London, Academic Press, 1979. 521p.

MARKETT, C.L. & MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue ontogenetic and species-specific patterns. Proceedings of the National Academy Science USA, Washington , 45: 753-63,1959.

MIRANDA, F.E. Brazilian Laelias - PartIII: section Parviflorae. American Orchid Society Bulletin, Washington, 59: 462-72, 1990.

MORRISON, D.F. Multivariate statistical methods. 2 ed. Tokyo, MacGraw Hill, 1981. 415p.

NEI, M. Genetic distance between populations. The American Naturalist, Lancaster, 106: 283-92, 1972.

NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. gene frequency data. Journal of Molecular Evolution, New York,19: 153-70, 1983.

PABST, G.F.J. & DUNGS, F. Orchideen, die seltsamsten blutenpflanzen der natur. Die Orchidee, Hildesheim, 25: 212-22, 1974.

PABST, G.F.J. Die gattung Laelia -IV. die sektion Parviflorae. Die Orchidee, Hildesheim, 29:215-20, 1978.

PAMILO, P. Statistical tests of phenograms based on genetic distances. Evolution, Lancaster, 44: 689-97,

1990.

PEARSON, K. On the coefficient of racial likeness. Biometrika, London, 18:105-17, 1926.

PEREIRA, A.V. Utilização de análise multivariada na caracterização de germoplasma de mandioca (Manihot esculenta Crantz). Piracicaba, 1989. 180p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

PETER, K.V. & RAI, B. Genetic divergence in tomato. Indian Journal of Genetics & Plant Breeding, New Delhi, 36: 379-83, 1976.

RAM, J. & PANWAR, D.V.S. Intrespecific divergence in rice. The Indian Journal of Genetics & Plant Breeding, New Delhi, 30: 1-10, 1970.

RAO, C.R. The utiliation of multiple measurements in problems of biological classification. Journal of Royal Statistic Society, ser.B, London, 10:159-93, 1948.

RAO, C.R. Advanced statistical methods in biometric research. New York, Wiley, 1952. 390p.

RIBOLDI, J. Análise de agrupamento "cluster analysis" e suas aplicações, Piracicaba, Departamento de Estatística/ESALQ, 1986. 33p.

ROGERS, J.S. IV. Measures of genetics similarity and genetic distance. University Texas Publication, Texas, 7213: 145-53, 1972.

ROOSE, M.L. & GOTTLIEB, L.D. Stability of structural gene number in diploid species with different amounts of

nuclear DNA and different chromosome numbers. Heredity, London, 40: 159-63, 1978.

SCACCHI, R.; LANZARA, P.; DE ANGELIS, G. Study of electrophoretic variability in Epipactis helleborine (L.) Crantz, E. pallustris (L.) Crantz and E. microphylla (Ehrh.) Swartz (fam. Orchidaceae). Genetica, Netherlands, 72: 217-24, 1987.

SCACCHI, R.; DE ANGELIS, G.; LANZARA, P. Allozyme variation among and within eleven Orchis species (fam. Orchidaceae) with special reference to hybridizing aptitude. Genetica, Netherlands, 81: 143-50, 1990.

SCANDALIOS, J.C. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. Biochemical Genetics, New York, 3: 37-79, 1969.

SCHLECHTER, R. Die einteilung der gattung Laelia und die geographische verbreitung ihrer gruppen. Orchis, 11(5): 87-96, 1917.

SCHLEGEL, M.; STEINBRUCK, G.; HAHN, K.; ROTTGER, B. Interspecific relationship of ten Europen orchid species as revealed by enzyme electrophoresis. Plant Systematic and Evolution, New York, 163: 107-19, 1989.

SELANDER, R.K. Biochemical polymorphism in populations of the house mouse and old-field mouse. Symposium of Zoology Society London, London, 26: 73-91,1970.

SHAW, C.R. & PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. Biochemical

Genetics, New York, 4: 297-320, 1970.

SING, R.K. & CHAUDHARY, B.D. Biometrical methods in quantitative genetic analysis. New Delhi, Kalyani Publishers. 1979. 304p.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. Biochemical Journal, London, 61: 629-41, 1955.

SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R. Numerical taxonomy. San Francisco, W.H. Freeman and Company, 1973. 573p.

SOKAL, R.R. & MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. University of Kansas Science Bulletin, Lawrence, 38: 1409-38, 1958.

SOKAL, R.R. & SNEATH, P.H.A. Principles of numerical taxonomy. San Francisco, W.H. Freeman and Company, 1963. 359p.

SOLTIS, D.E.; HAUFLER, C.H.; DARROW, D.C.; GASTONY, G.J. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. American Fern Journal, Burlington, 73: 9-27, 1983.

STEINBRUCK, G.; SCHLEGEL, M.; DAHLSTROM, I.; ROTTGER, B. Characterization of interspecific hybrids between Orchis mascula and O. pallens (Orchidaceae) by enzyme electrophoresis. Plant Systematics and Evolution, New York, 153: 229-41, 1986.

VENCOVSKY, R. Aplicação de alguns métodos estatísticos à

sistemática. Piracicaba, 1960. 61p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

WITHNER, C.L. & ADAMS, H.H. Generic relationships and evolution among the Cattleyas and their relatives. In: WORLD ORCHID CONFERENCE, 3., London, 1960. Proceedings. London, The Royal Horticultural Society, 1960. p.136-53.

TABELAS

Tabela 1 - Número de cromossomos somáticos observados em espécies da seção *Parviflorae*.

Espécies	Número de cromossomos (2n=)
L. flava	40
L. milleri	40
L. mixta	40
L. lucasiana	40
L. esalqueana	40
L. longipes (Serra do Cipó)	40, 60, 80
L. briegeri (Cabeça do Bernardo)	80
L. briegeri (Lapinha I)	42, 44, 48
L. briegeri (Lapinha II)	80
L. crispata	80
L. caulescens	80
L. crispilabia	80

Fonte: BLUMENSCHEIN (1960b)

Tabela 2 - Resumo da análise de variância de treze caracteres florais em onze espécies de *Laelia* seção *Parviflorae*.

		Quadrado Médio						
FV	GL	CL	LL	CSD	LSD	CSL	LSL	CPe
Entre**	10	4.657	1.930	6.765	0.608	6.155	0.655	6.279
Dentro	453	0.035	0.021	0.092	0.009	0.069	0.010	0.355
Total	463							

		Quadrado Médio					
FV	GL	CP	LP	CC	LC	EC	CO
Entre**	10	7.791	0.784	0.532	0.180	0.158	0.368
Dentro	453	0.079	0.011	0.014	0.004	0.003	0.062
Total	463						

** - todos significativos ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 3- Matriz de distância generalizada de Mahalanobis para onze espécies do gênero *Laelia* seção *Parviflorae*.

	1	2	3	4	5	6
1-*crispilabia*	-					
2-*esalqueana*	34.95	-				
3-*lucasiana*	30.98	8.99	-			
4-*caulescens*	4.29	27.01	17.94	-		
5-*longipes*	24.60	17.36	27.97	26.26	-	
6-*briegeri*	23.05	23.35	31.48	27.39	2.43	-
7-*cinnabarina*	31.52	95.72	73.64	33.26	86.34	84.61
8-*flava*	7.18	26.75	25.21	8.68	15.14	15.68
9-*crispata*	15.71	30.35	30.14	17.19	5.92	5.89
10-*milleri*	13.22	23.14	24.01	15.01	15.98	18.65
11-*mixta*	22.23	10.67	7.41	14.77	18.24	21.91

continuação da Tabela

	7	8	9	10	11
7-*cinnabarina*	-				
8-*flava*	43.36	-			
9-*crispata*	63.92	10.75	-		
10-*milleri*	46.42	4.04	14.94	-	
11-*mixta*	54.07	13.07	21.57	11.37	-

Tabela 4 - Estimativa dos coeficientes de ponderação (autovetores), autovetores e variância acumulada em porcentagem para o primeiro, segundo e décimo terceiro componentes principais, para treze caracteres em onze espécies do gênero *Laelia* seção *Parviflorae*.

	Coeficientes de Ponderação	Autovetores (Variância Acumulada(%))
Y_1	$+0.3806x_1 +0.1685x_2 +0.4848x_3 +0.0469x_4 +$ $+0.4704x_5 +0.0597x_6 +0.2534x_7 +0.4905x_8 +$ $+0.0544x_9 +0.1116x_{10} +0.0516x_{11} +$ $+0.0431x_{12} +0.1997x_{13}$	0,9625 (79,34)
Y_2	$-0.1120x_1 +0.2015x_2 -0.1959x_3 +0.1874x_4 -$ $-0.1425x_5 +0.1620x_6 +0.8485x_7 -0.2052x_8 +$ $+0.1994x_9 +0.1086x_{10} +0.0753x_{11} +$ $+0.0781x_{12} +0.0381x_{13}$	0,1793 (94,12)
Y_{13}	$+0.0761x_1 -0.3010x_2 +0.0328x_3 +0.2597x_4 -$ $-0.1560x_5 -0.2823x_6 +0.0105x_7 +0.1204x_8 +$ $+0.2045x_9 +0.0123x_{10} +0.7320x_{11} -$ $-0.3673x_{12} -0.0615x_{13}$	$9,79 \times 10$ (100.0)

Tabela 5 - Escores dos dois primeiros componentes principais para onze espécies do gênero *Laelia* seção *Parviflorae*.

Espécies	Escores	
	Y_1	Y_2
crispilabia	6.041	2.035
esalqueana	3.668	1.685
lucasiana	4.175	2.290
caulescens	5.347	1.941
longipes	4.991	2.530
briegeri	5.525	3.024
cinnabarina	7.438	1.902
flava	5.673	2.036
crispata	5.547	2.825
milleri	5.666	1.835
mixta	4.928	2.204

Tabela 6 - Escores dos dois primeiros componentes principais para dez espécies do gênero *Laelia* seção *Parviflorae*, sem a espécie *L. cinnabarina*.

	Escores	
Espécies	Y_1	Y_2
crispilabia	6.286	0.935
esalqueana	3.904	1.002
lucasiana	4.456	1.582
caulescens	5.574	0.986
longipes	5.374	1.572
briegeri	5.965	1.992
flava	5.949	0.970
crispata	5.950	1.794
milleri	5.908	0.770
mixta	5.192	1.345

Tabela 7 - Estimativa dos coeficientes de ponderação (autovetores), autovalores e porcentagem da variância acumulada para a primeira, segunda e décima terceira variável canônica, para treze caracteres em onze espécies do gênero *Laelia* seção *Parviflorae*.

	Coeficientes de Ponderação	Autovalores (Variância Acumulada(%))
Y_1	$+0.6820x_1 -0.1947x_2 +0.1028x_3 -0.4054x_4 +$	
	$+0.1747x_5 -0.0638x_6 -0.1516x_7 +0.1845x_8 -$	
	$-0.3590x_9 +0.0711x_{10} +0.0928x_{11} +$	71,116
	$+0.0523x_{12} -0.1304x_{13}$	(54,87)
Y_2	$+0.4681x_1 +0.5951x_2 -0.0573x_3 +0.3865x_4 -$	
	$-0.0206x_5 +0.1526x_6 -0.0585x_7 -0.1000x_8 +$	
	$+0.0983x_9 +0.3650x_{10} +0.2328x_{11} +$	32,972
	$+0.1509x_{12} -0.1304x_{13}$	(80,31)
Y_{13}	$+0.1888x_1 -0.5587x_2 +0.0915x_3 +0.0797x_4 -$	
	$-0.1169x_5 +0.2509x_6 +0.2208x_7 +0.1925x_8 +$	
	$+0.2966x_9 +0.1693x_{10} +0.4126x_{11} -$	1,81x10
	$-0.1859x_{12} -0.3912x_{13}$	(100.00)

Tabela 8 - Escores das duas primeiras variáveis canônicas para onze espécies do gênero *Laelia* seção *Parviflorae*, para os treze caracteres avaliados.

	Escores	
Espécies	Y_1	Y_2
crispilabia	7.756	10.367
esalqueana	3.038	7.238
lucasiana	4.597	6.374
caulescens	7.445	8.917
longipes	3.446	11.179
briegeri	3.703	11.676
cinnabarina	12.474	9.166
flava	6.548	10.349
crispata	5.122	11.744
milleri	6.254	9.817
mixta	5.404	7.637

Tabela 9 - Correlação de Pearson entre a distância Euclideana média determinada pelos escores da duas primeiras variáveis canônicas para todos os caracteres e a distância Euclideana média determinada a partir dos escores das duas primeiras variáveis canônicas, resultantes da inclusão sucessiva dos caracteres selecionados.

Correlação	Caracteres selecionados [a]
0.9724	CL, LSD
0.9764	CL,LSD, CSD
0.9726	CL, LSD, CSD, CSL
0.9857	CL, LSD, CSD, CSL, CC
0.9838	CL, LSD, CSD, CSL, CC, EC

[a] CL-comprimento do labelo; LSD-largura da sépala dorsal; CSL-comprimento da sépala lateral; CC-comprimento da coluna; EC-espessura da coluna.

Tabela 10- Escores das duas primeiras variáveis canônicas (Y_1 e Y_2) para onze espécies do gênero *Laelia* seção *Parviflorae*, resultantes da inclusão sucessiva dos caracteres selecionados, a partir de CL-comprimento do labelo e LSD-comprimento da sépala dorsal.

	CL e LSD		CL, LSD e CSD	
Espécies	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2
1-*crispilabia*	7.338	7.670	7.358	7.461
2-*esalqueana*	3.291	5.808	3.316	5.484
3-*lucasiana*	4.755	5.166	4.743	5.056
4-*caulescens*	6.999	6.288	6.964	6.247
5-*longipes*	4.409	8.690	4.143	8.540
6-*briegeri*	4.840	9.280	4.481	9.099
7-*cinnabarina*	11.410	6.643	11.493	6.724
8-*flava*	7.107	7.957	8.119	6.624
9-*crispata*	5.952	8.938	5.502	9.095
10-*milleri*	7.060	8.204	6.825	8.240
11-*mixta*	5.493	6.374	5.431	6.255

continuação da Tabela 10.

	CL,LSD, CDS e CSL		CL,LSD,CSD, CSL e CC		CL,LSD,CSD, CSL,CC e EC	
Espécies	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2
1-	7.003	7.511	7.043	9.011	7.377	9.157
2-	3.060	5.512	3.089	6.612	3.317	6.676
3-	4.453	5.092	4.476	5.788	4.667	5.737
4-	6.672	6.291	6.706	7.618	7.024	7.932
5-	4.008	8.563	4.049	9.851	4.428	10.185
6-	4.363	9.129	4.408	10.589	4.786	10.774
7-	11.553	6.763	11.587	7.888	11.880	7.866
8-	6.624	8.153	6.658	8.985	6.967	8.981
9-	5.264	9.129	5.306	10.383	5.719	10.779
10-	6.595	8.279	6.625	8.708	6.903	8.568
11-	5.529	6.268	5.554	6.816	5.793	6.826

FIGURAS

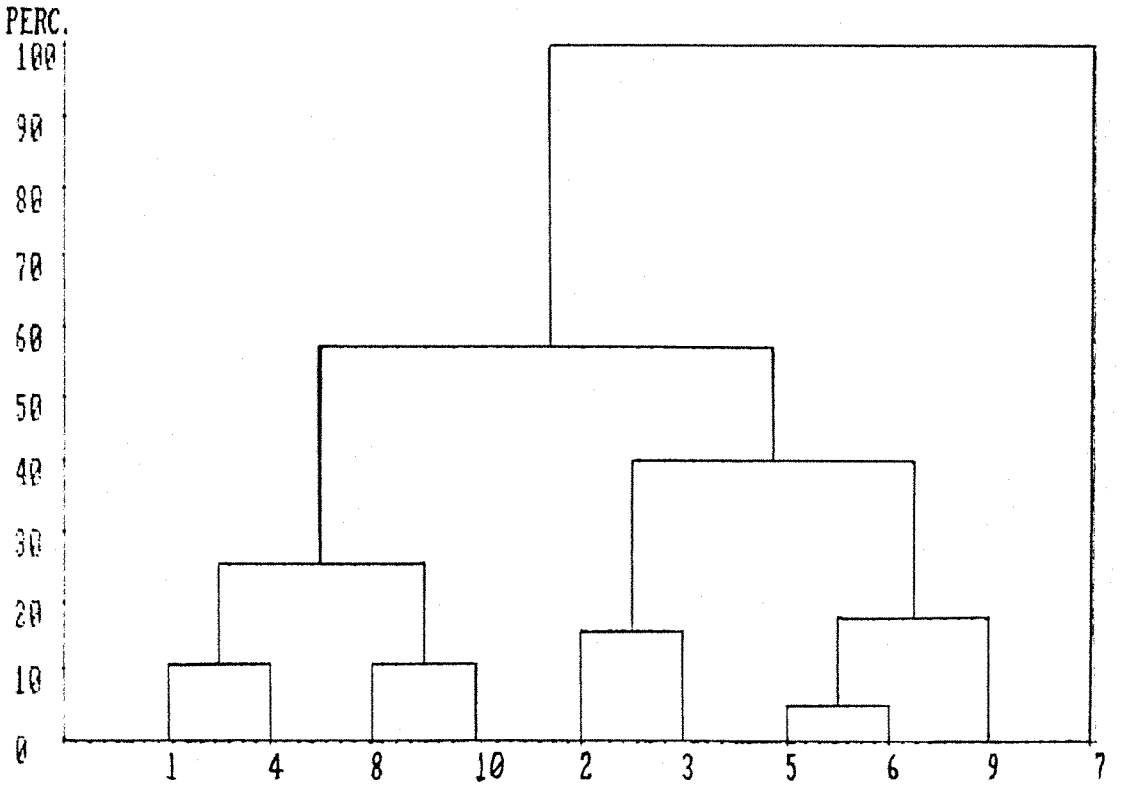

Figura 1 - Agrupamento de dez espécies do gênero Laelia seção Parviflorae pelo método do "vizinho mais distante" (CLM). L. crispilabia (1), L. esalqueana (2), L. lucasiana (3), L. caulescens (4), L. longipes (5), L. briegeri (6), L. cinnabarina (7), L. flava (8), L. crispata (9) e L. milleri (10).

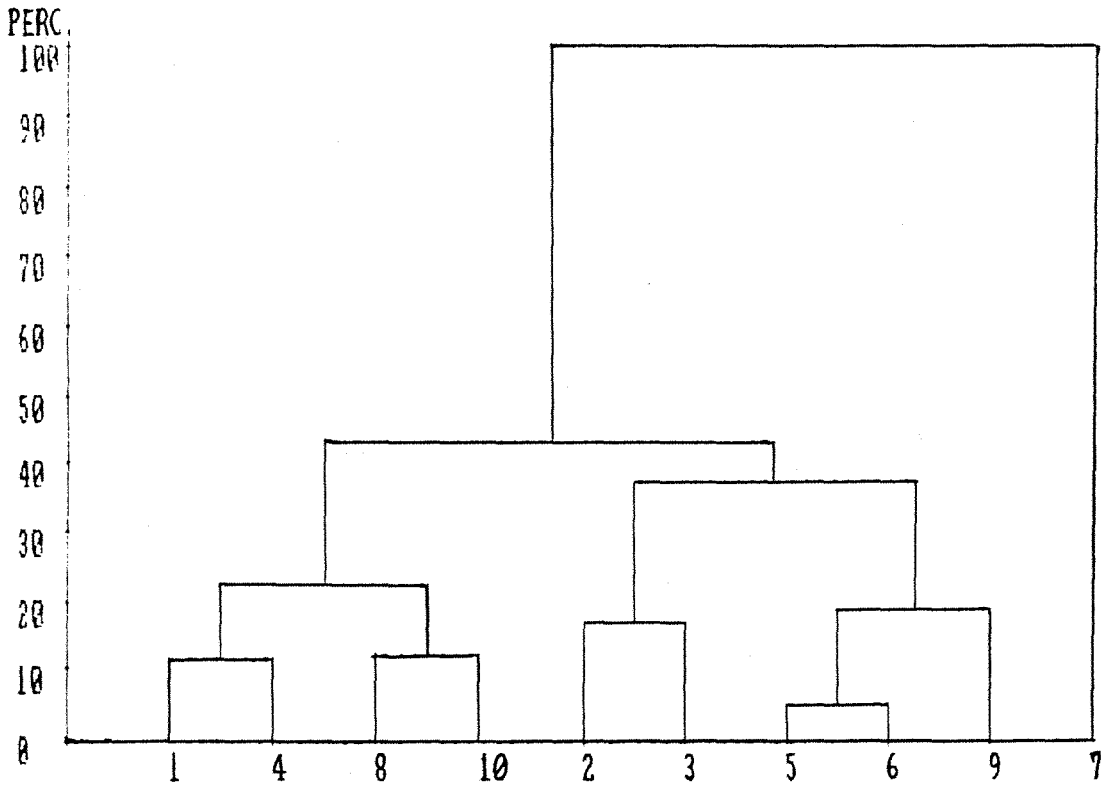

Figura 2 - Agrupamento de dez espécies do gênero Laelia seção Parviflorae pelo método de "ligações médias não ponderadas" (UPGMA). L. crispilabia (1), L. esalqueana (2), L. lucasiana (3), L. caulescens (4), L. longipes (5), L. briegeri (6), L. cinnabarina (7), L. flava (8), L. crispata (9), L. milleri (10).

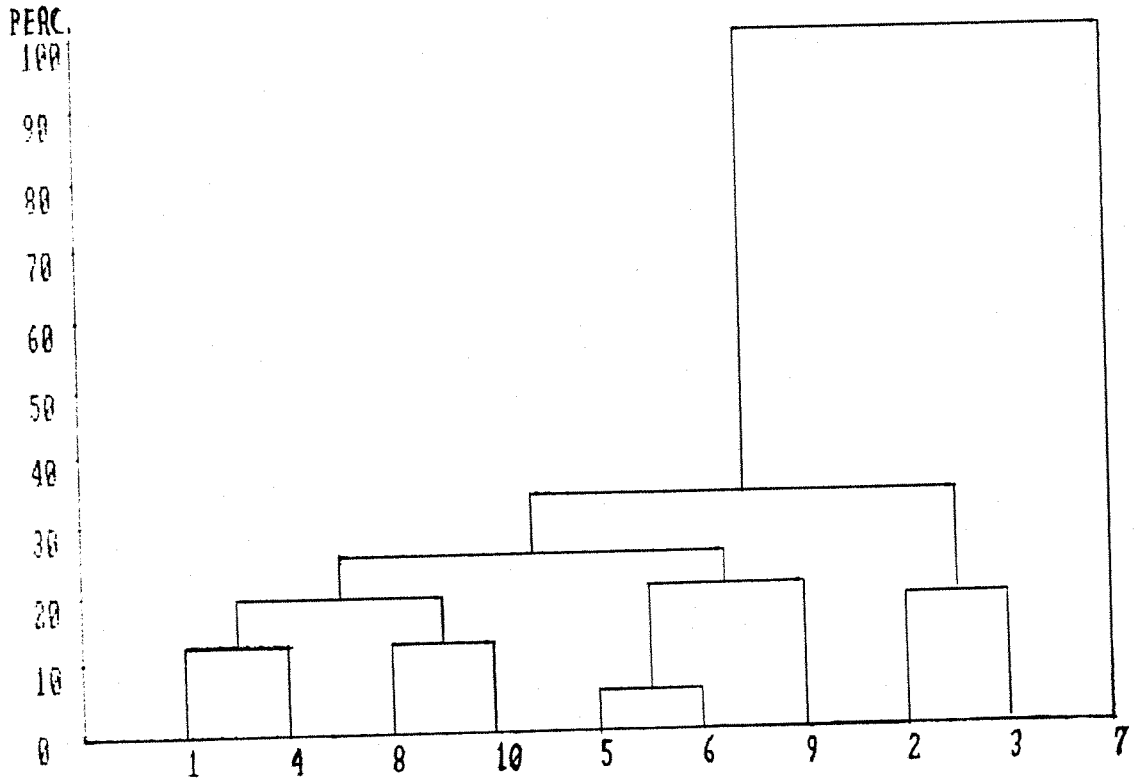

Figura 3 - Agrupamento de dez espécies do gênero Laelia seção Parviflorae pelo método do "vizinho mais próximo" (SLM). L. crispilabia (1), L. esalqueana (2), L. lucasiana (3), L. caulescens (4), L. longipes (5), L. briegeri (6), L. cinnabarina (7), L. flava (8), L. crispata (9) e L. milleri (10).

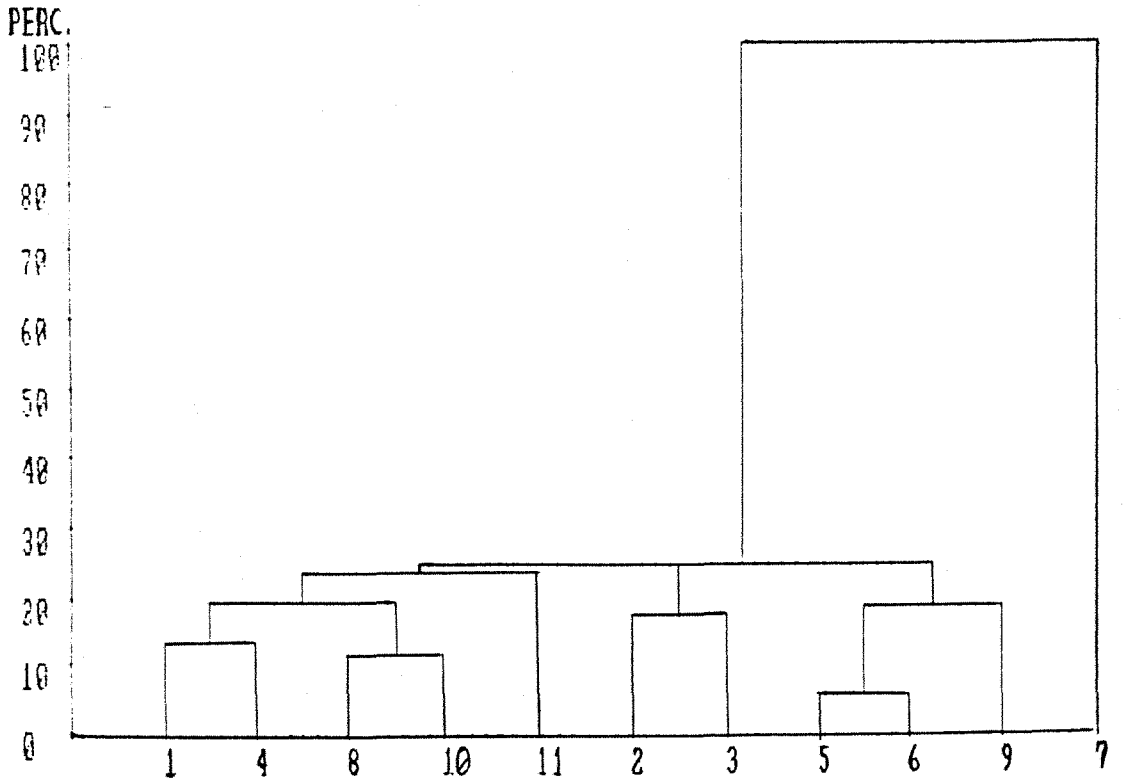

Figura 4 - Agrupamento de onze espécies do gênero Laelia seção Parviflorae pelo método do "vizinho mais próximo" (SLM). L. crispilabia (1), L. esalqueana (2), L. lucasiana (3), L. caulescens (4), L. longipes (5), L. briegeri (6), L. cinnabarina (7), L. flava (8), L. crispata (9), L. milleri (10) e L. mixta (11).

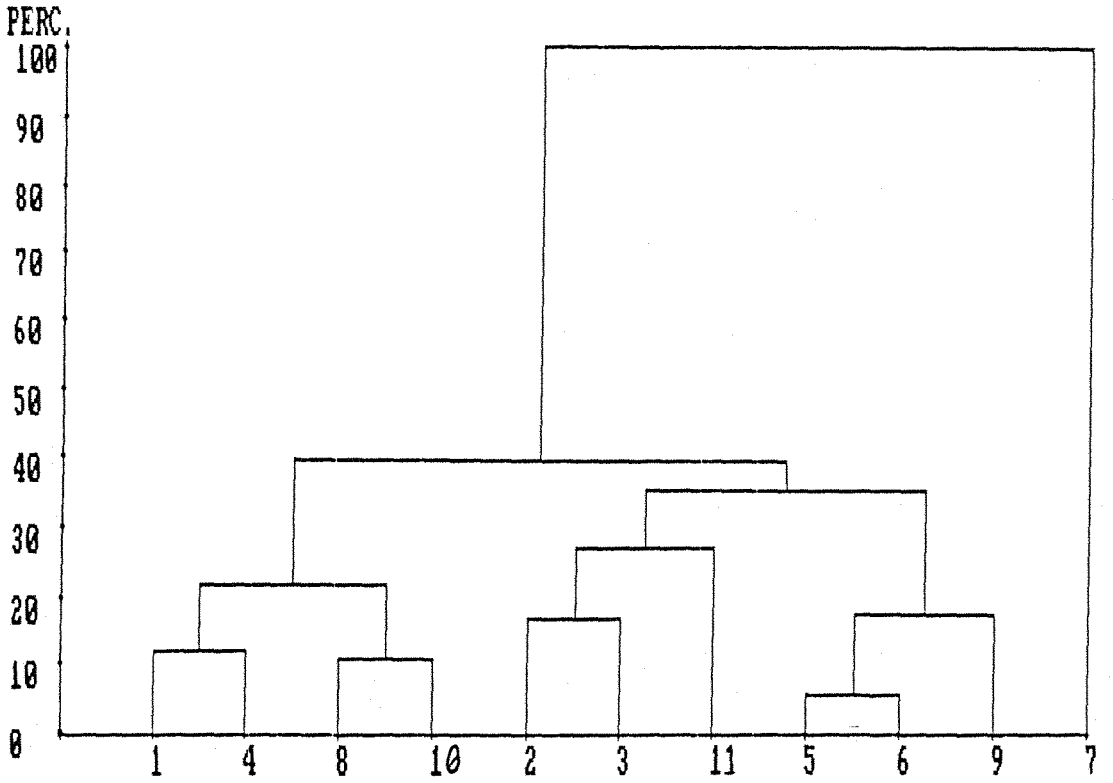

Figura 5 - Agrupamento de onze espécies do gênero Laelia seção Parviflorae pelo método de "ligações médias não ponderadas" (UPGMA). L. crispilabia (1), L. esalqueana (2), L. lucasiana (3), L. caulescens (4), L. longipes (5), L. briegeri (6), L. cinnabarina (7), L. flava (8), L. crispata (9), L. milleri (10) e L. mixta (11)

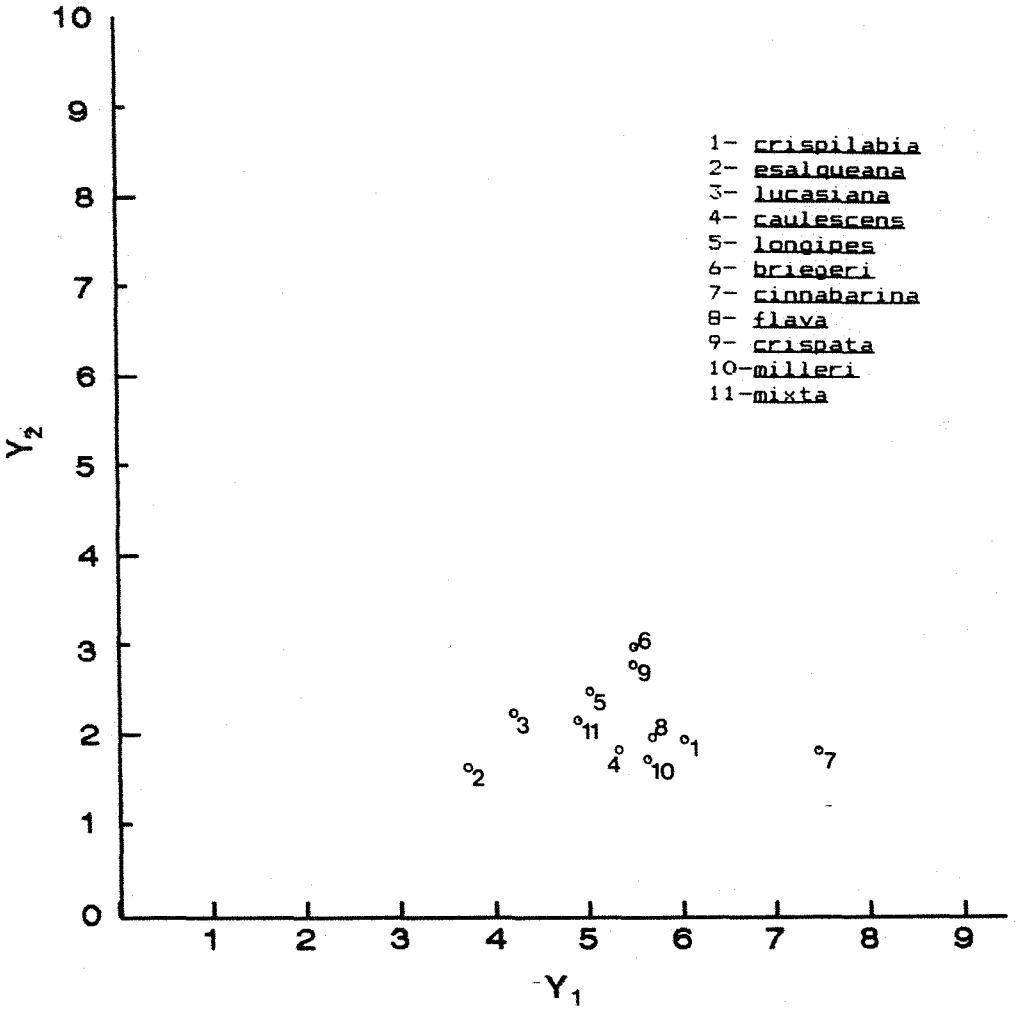

Figura 6 - Dispersão do escores dos dois primeiros componentes principais para onze espécies do gênero Laelia seção Parviflorae.

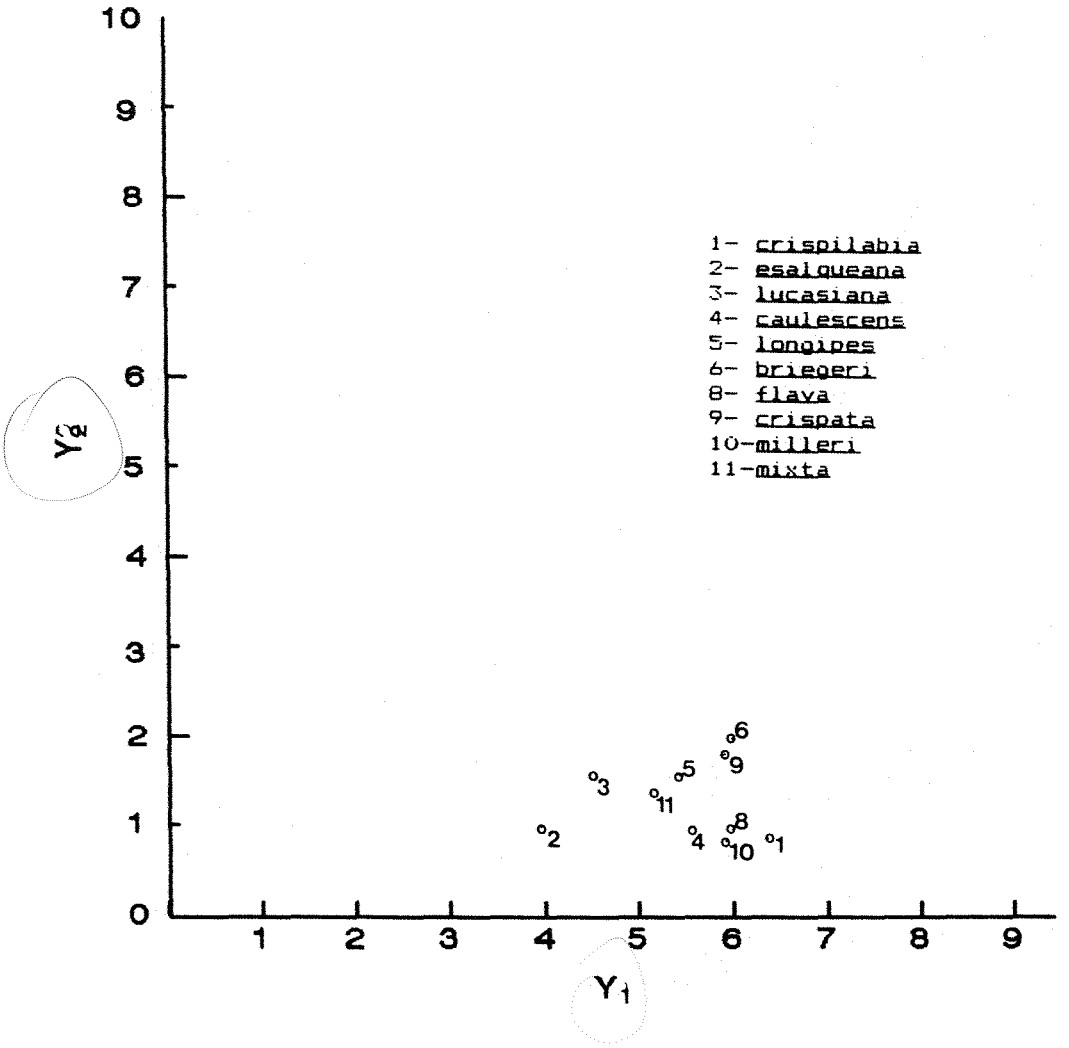

Figura 7 - Dispersão dos escores dos dois primeiros componentes principais para dez espécies do gênero Laelia seção Parviflorae.

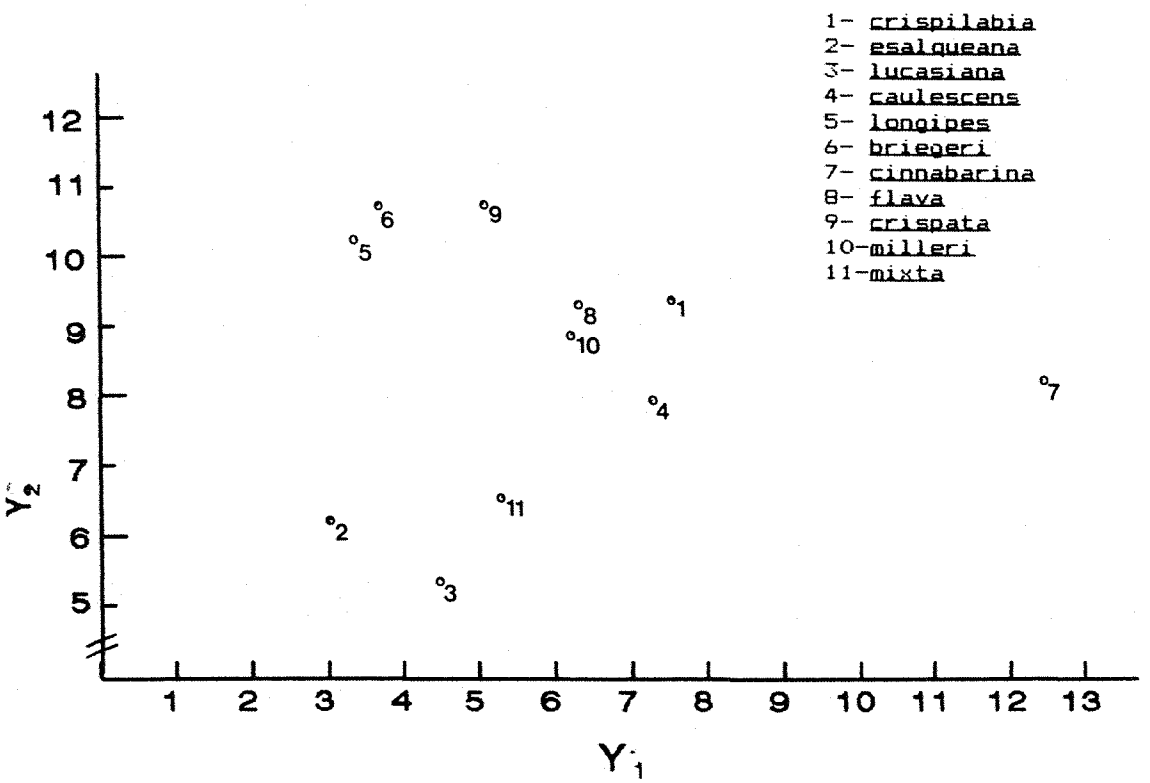

Figura 8 - Dispersão dos escores das duas primeiras variáveis canônicas para onze espécies do gênero Laelia seção Parviflorae.

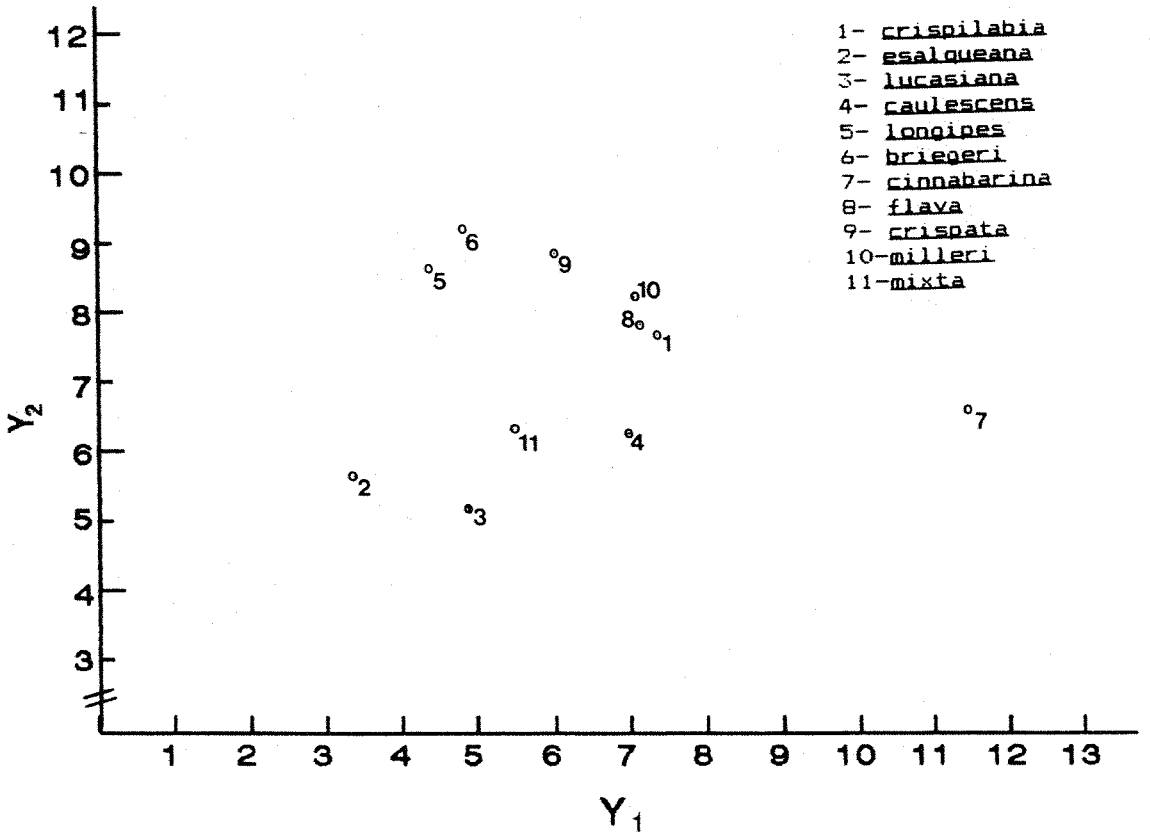

Figura 9 - Dispersão dos escores das duas primeiras variáveis canônicas para dois caracteres* : CL e LSD.(* - caracteres definidos na página 39).

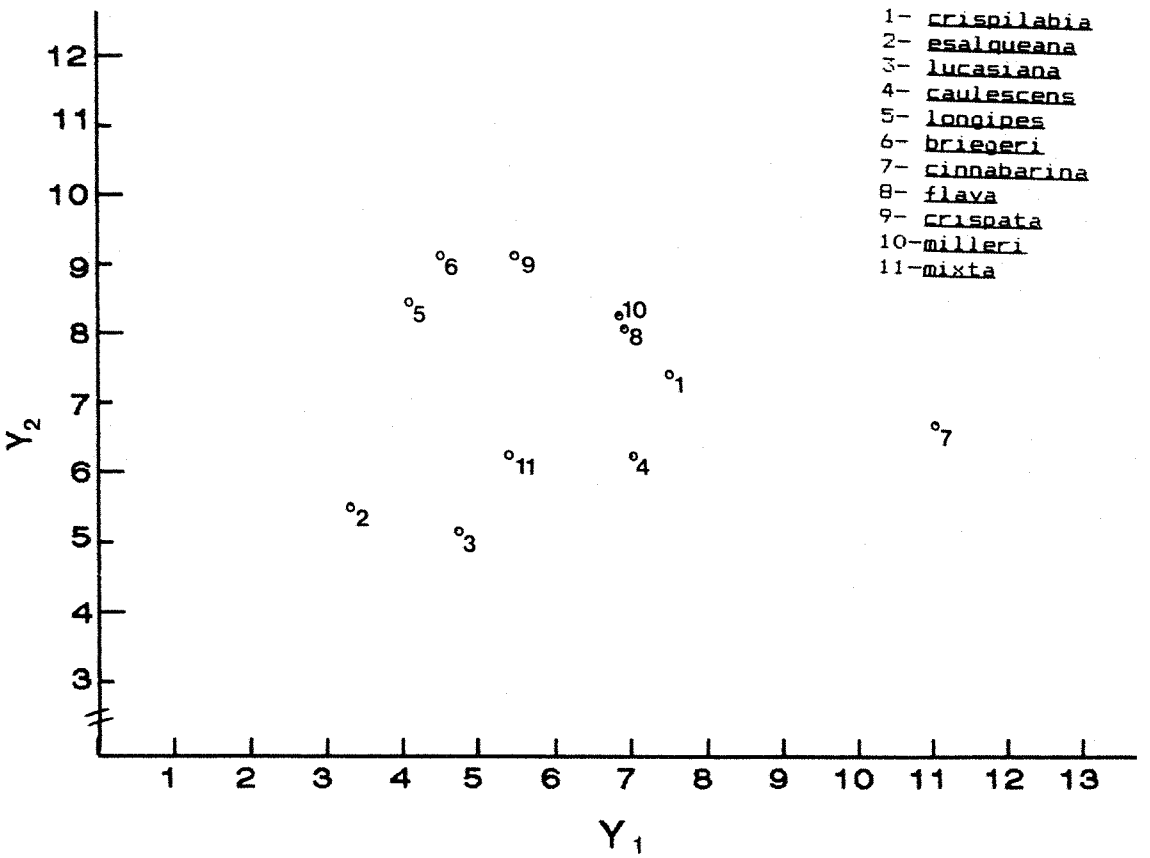

Figura 10 - Dispersão dos escores das duas primeiras variáveis canônicas para os caracteres* : CL, LSD e CSD. (* - caracteres definidos na página 39).

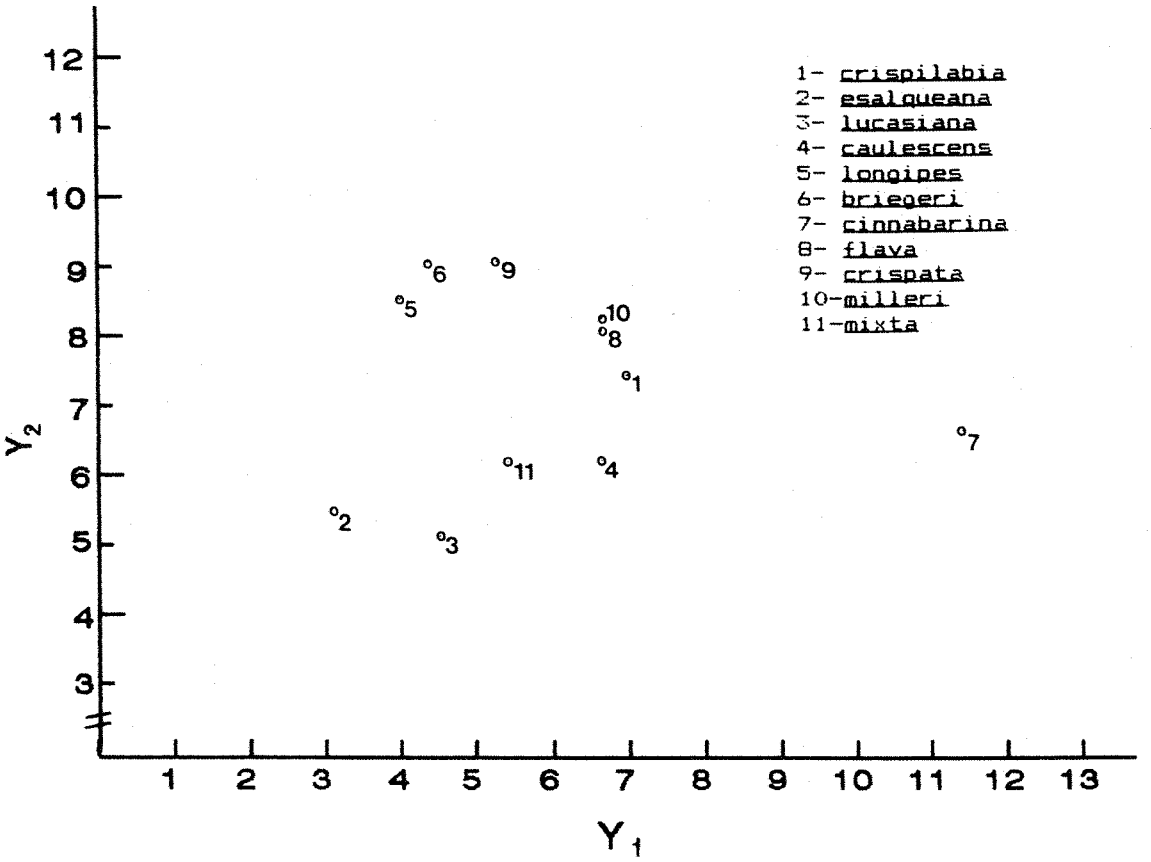

Figura 11 - Dispersão dos escores das duas primeiras variáveis canônicas para os caracteres* : CL, LSD, CSD e CSL (* - caracteres definidos na página 39).

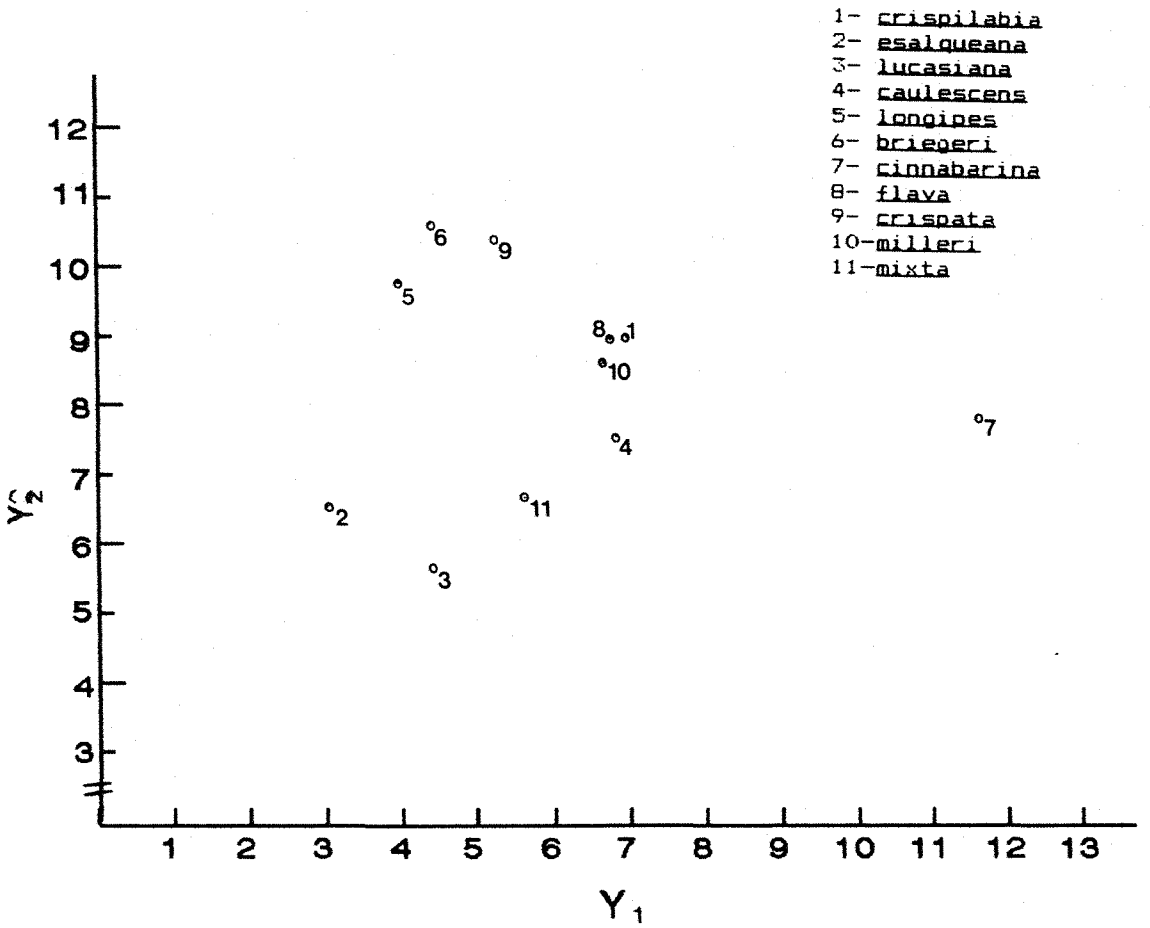

Figura 12 - Dispersão dos escores das duas primeiras variáveis canônicas para os caracteres* ; CL, LSD, CSD, CSL e CC. (* - caracteres definidos na página 39).

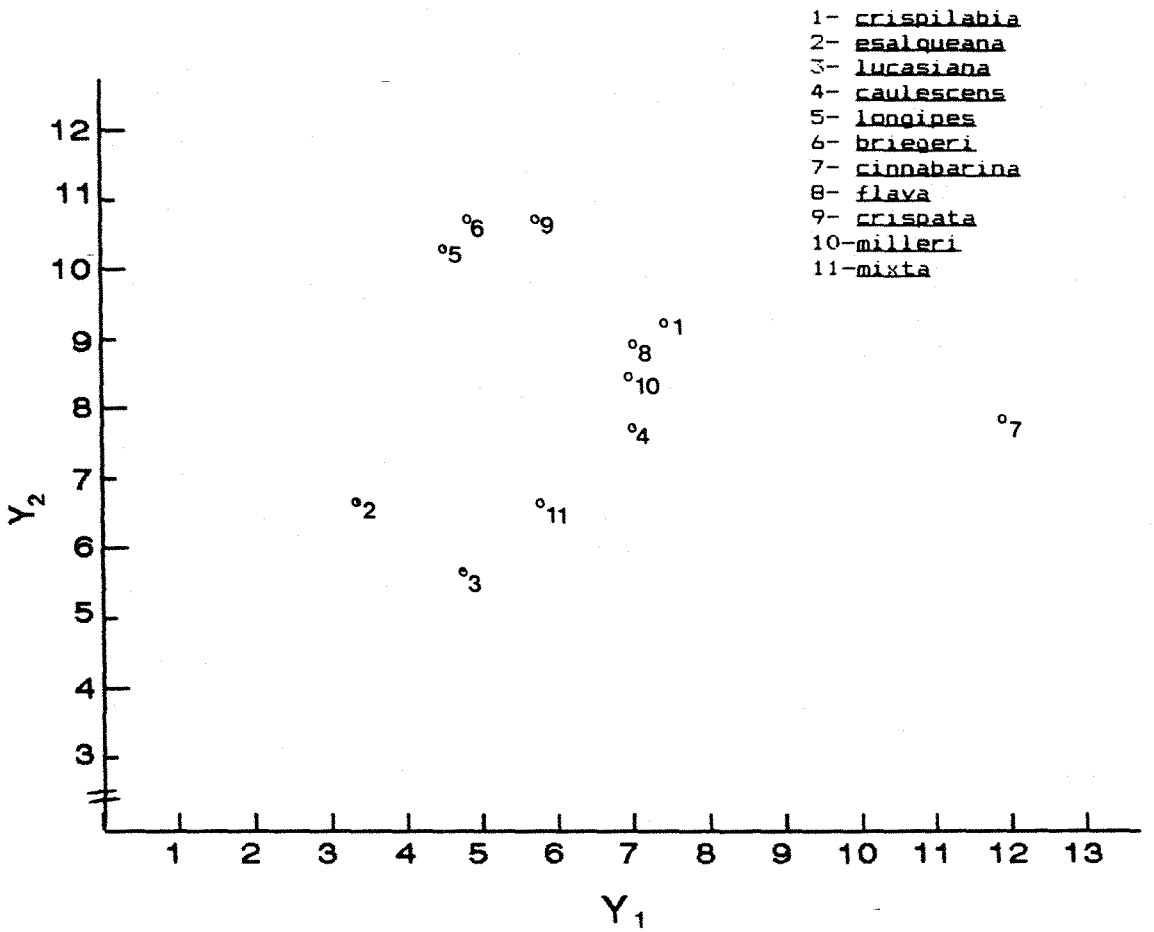

Figura 13 - Dispersão dos escores das duas primeiras variáveis canônicas para os caracteres*: CL,LSD, CSD, CSL, CC e EC. (* - caracteres definidos na página 39).

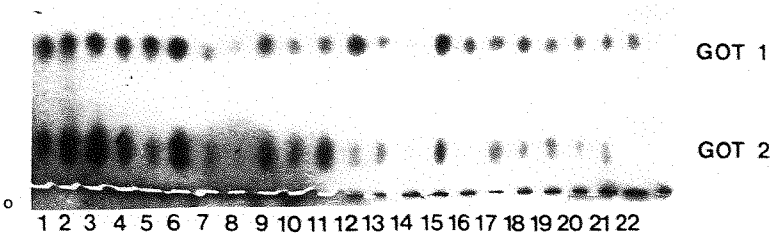

Figura 14 – Padrão eletroforético das espécies *L. esalqueana* (1-4), *L. briegeri* (5), *L. mixta* (6, 8-10, 15-18), *L. longipes* (12) e *L. flava* (19-22) para o sistema GOT.

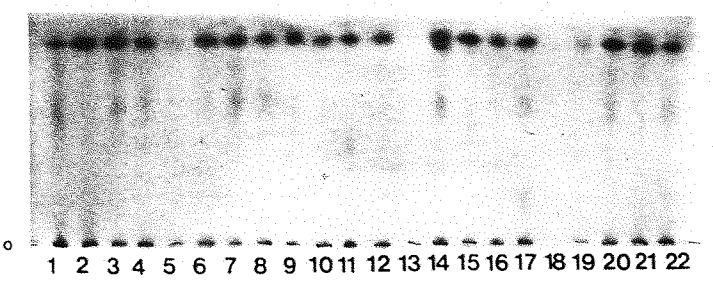

Figura 15 - Padrão eletroforético das espécies L. crispata (1-6), L. flava (7), L. longipes (8-12), L. briegeri (13-17), L. mixta (19-20) e L. esalqueana (21-22) para o sistema EST.

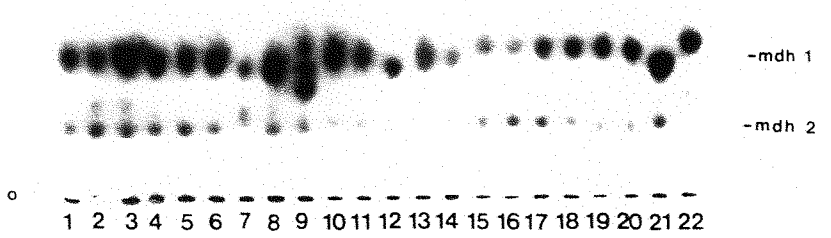

Figura 16 - Padrão eletroforético das espécies L. crispata (1-6), L. flava (7), L. longipes (8-12), L. briegeri (13-18), L. mixta (19-20) e L. esalqueana (21-22) para o sistema MDH.