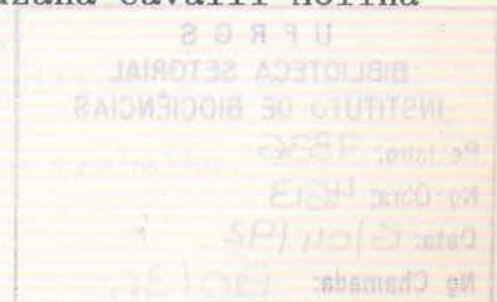


RELACIONAMENTO ISOENZIMÁTICO
ENTRE ENTIDADES TAXONÔMICAS
DO GÊNERO *PASPALUM* (GRAMINEAE)

TATIANA TEIXEIRA DE SOUZA-CHIES

Dissertação apresentada ao
Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas
- ênfase Genética da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Dr^a Suzana Cavalli Molina



RELACIONAMENTO ISOMÉRICO
ENTRE ENTIDADES TAXONÔMICAS
DO GÊNERO PASTALUM (GRAMINEAE)

TATIANA TRIXEIRA DE SOUZA-CHIES

Dissertação apresentada ao
Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Dr.ª Suzana Garcia

U F R G S
BIBLIOTECA SETORIAL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
Registro: 7336
Nº. Obra: 4613
Data: 6/04/92
Nº Chamada: B0136

B10
Bio/36

AGRADECIMENTOS

- Agradeço á minha orientadora Suzana Cavalli-Molina por sua ótima orientação e amizade.
- A Martina da Silva por seu apoio técnico, companheirismo e amizade.
- Aos colegas do laboratório de eletroforese por todo o carinho dispensados.
- A Tamir Calcagnoto pela ajuda magnífica na impressão deste trabalho.
- A Marise Basso Amaral pela ajuda na versão inglês do resumo.
- A Sandro Bonatto pela orientação na análise cladística.
- A Eliana Maria Assmann por todo o companheirismo e amizade.
- Ao meu marido Zêca pela ajuda, orientação e companheirismo durante a execução do presente trabalho.
- Aos meus pais Dercy e Neida por todo o amor e carinho.
- Ao CNPq - Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de iniciação científica e de aperfeiçoamento concedidas para a execução deste trabalho.

INTRODUÇÃO

O gênero *Paspalum* representa um importante taxon da familia Gramineae, sendo o que apresenta maior importância econômica dentro da tribo Paniceae (Barreto, 1974). Segundo Parodi (citado por Barreto, 1974), o gênero *Paspalum* pertence à tribo Paniceae, subfamilia Panicoideae e familia Gramineae ou Poaceae. Ocupa um lugar de destaque entre as gramíneas brasileiras por reunir o maior número de espécies nativas e o maior número de espécies com bom valor forrageiro (Valls, 1987). No entanto, a falta de estudos taxonômicos torna difícil estimar o número total das espécies de *Paspalum*. Este número varia, segundo diferentes autores, entre 200 a mais de 400 (Chase, 1929; Burkart, 1969; Barreto, 1974; Moraes-Fernandes e cols., 1974; Burson, 1983; Burson, 1985; Stebbins, 1985; Quarin e Norrmann, 1987a).

O gênero é encontrado em regiões de clima tropical, subtropical e temperado quente (Barreto, 1974), sendo a maioria nativa do Novo Mundo subtropical e regiões tropicais do hemisfério ocidental (Quarin e Norrmann, 1987b). Na América, encontram-se desde às regiões Andinas até às costas

do Atlântico e desde o norte tropical dos Estados Unidos à região norte da Patagônia, no sul da Argentina (Quarin e Norrmann, 1987b). O gênero *Paspalum* é particularmente abundante no Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai. Pode-se dizer que praticamente 3\4 das espécies conhecidas ocorrem no Brasil, em diferentes condições ecológicas e nas mais variadas formações vegetais.

As diferentes espécies podem estar adaptadas a ambientes diversos, podendo ser encontradas em diferentes habitats, tais como: junto aos grandes rios da Amazônia e nas regiões pantanosas próximas às margens destes rios (espécies tipicamente hidrófilas), nas regiões do Cerrado (espécies xerófilas), nos estratos inferiores das formações selváticas (espécies esciófilas), nos campos (espécies heliófilas), fazendo parte como componente das primeiras etapas da sucessão vegetal litorânea (espécies psamófilas), como representantes dos xeroseres (espécies casmófilas) e nas terras altas próximas à Cordilheira dos Andes (Barreto, 1974; Quarin e Norrmann, 1987b). Muitas destas especializações podem ser de grande importância em programas de melhoramento genético no sentido de serem aproveitadas características relevantes para regiões específicas. Neste

sentido, há um grande interesse no melhoramento genético do grupo Plicatula do gênero *Paspalum* para sua utilização como forragem na região do cerrado brasileiro, pois as espécies deste grupo são resistentes à seca, ao frio, alagamento, fogo e desfolha (Batista e cols, 1987).

Praticamente todas as formações vegetais brasileiras apresentam pelo menos uma espécie de *Paspalum* entre seus componentes (Barreto, 1974).

No Estado do Rio Grande do Sul, as espécies de *Paspalum* distribuem-se por todas as regiões fisiográficas e fazem parte de todas as formações campestres. Das possíveis 400 espécies conhecidas, constatou-se distribuição ampla e também particularizadas de 70 entidades taxonômicas. Praticamente 60% do Estado é recoberto por pastagens naturais, sendo que os gêneros *Panicum* e *Paspalum* são responsáveis pela maior parte.

O gênero *Paspalum* apresenta um valor apreciável, suas sementes servem de alimento para um grande número de pássaros e a planta em si é o principal alimento para o gado. Comparando-se com outras gramíneas nativas do Rio Grande do Sul, observou-se que espécies de *Paspalum* apresentavam melhor desempenho quanto à resistência ao frio;

melhor produção anual; melhor produção de matéria seca; uma melhor produção de proteína bruta; maior quantidade de matéria orgânica digestível e carboidatos solúveis totais (Prestes, 1976). Espécies do gênero também apresentam importância na indústria de fabrico de papel dado ao elevado teor de celulose.

São plantas perenes, raras anuais; cespitosas; de pequeno porte ou robustas; decumbentes; estolhosas ou rizomatosas (importantes para a fixação do solo, principalmente em zonas litorâneas); com folhas tenras ou duras.

Algumas características do gênero *Paspalum* são notáveis para a distinção de seus afins, todas elas relacionadas com a inflorescência, a qual apresenta de um a vários racemos; as espiguetas são plano convexas, em geral obtusas, subsésseis e posicionadas com a gluma e lema fértil de encontro ao ráquis do racemo; a primeira gluma é sempre ausente; e a textura do antécio com lema e pálea coriáceos (Barreto, 1974).

Conforme Quarin e Norrmann (1987b), cerca de 80% das espécies deste gênero são poliplóides e destas, aproximadamente a metade são tetraplóides. Os diferentes



Figura 1: Planta mantida na casa de vegetação - UFGRS.
Identificação = V12018 - *P.dilatatum* anteras roxas.

taxons demonstram uma uniformidade quanto ao número básico, pois a grande maioria das espécies apresentam o número cromossômico múltiplo de 10, com algumas exceções: complexo *P.hexastachyum-P.almum* com $x=6$; *P.contractum* com $x=9$ e *P.convexum* com $x=16$, para esta última também encontra-se $n=10, 20$ e 30 .

A poliploidia e a reprodução por apomixia são fatores importantes na evolução do gênero *Paspalum*. Essas duas características estão altamente correlacionadas, pois a maioria das espécies poliplóides reproduzem-se por apomixia (Quarin e Norrmann, 1987a; Campbell & Dickinson, 1990). As espécies poliplóides sexuais auto-compatíveis comportam-se citologicamente como alopoliplóides. Organismos diplóides e alopoliplóides auto-compatíveis são propensos à homozigose, apesar de que os alopoliplóides podem apresentar heterozigose fixada pela presença de mais de dois genomas.

Segundo Quarin & Norrmann (1987a), os tetraplóides apomíticos podem ter se originado por autopoliploidia. Os autotetraplóides podem ser gerados por duplicação cromossômica espontânea de diplóides alógamos ou via gametas femininos não reduzidos ($2n$) fertilizados por gametas masculinos reduzidos (n) para formar um indivíduo triplóide.

Este triplóide pode produzir gametas femininos não reduzidos ($2n=3x$), os quais, se fertilizados por gametas masculinos reduzidos de uma população diplóide originam organismos autotetraplóides ($4x$). Se os ancestrais diplóides são alógamos, os autotetraplóides apomíticos poderão apresentar um alto grau de heterozigose. A variação existente decorre de eventual reprodução sexual. A origem do tetraplóide também pode ser obtida através da fertilização de gametas femininos diplóides não reduzidos ($2n$) por gametas masculinos reduzidos de tetraplóides apomíticos ($2n$).

As forrageiras, em geral, são plantas poliplóides e apomíticas (Di Renzo e cols, 1990). Na reprodução apomítica, a meiose é substituída pelo desenvolvimento de células somáticas não reduzidas em sacos embrionários. Não há redução meiótica nem fecundação, de modo que a plântula originada a partir de uma célula somática da planta mãe é geneticamente idêntica à mesma e os indivíduos de sua progênie são igualmente idênticos entre si. Em algumas espécies, para o embrião se desenvolver, há necessidade dos núcleos polares do saco embrionário serem fecundados por um núcleo do grão de pólen levando à formação do endosperma num processo denominado pseudogamia que não envolve fecundação

na formação do embrião (Bashaw, 1980; Savidan, 1987).

Existem algumas plantas que apresentam apomixia facultativa. Suas progênes além de apresentarem o padrão materno predominante, apresentam algumas plantas que diferem do padrão, as quais resultam de processo sexual normal. Entretanto, devido às baixas taxas de sexualidade e ao fraco vigor das plantas resultantes de cruzamento sexuais, as progênes produzidas são homogêneas (Savidan, 1987).

No gênero *Paspalum*, as espécies que se reproduzem sexualmente, o fazem predominantemente por auto-polinizado (Burson, 1979).

Desde a década de 30, há interesse por germoplasmas de *Paspalum* no Brasil. Atualmente existem distribuídos por todo o país muitos bancos ativos de germoplasma de plantas forrageiras, especialmente de espécies de *Paspalum*, distribuídos desde a região norte até a região sul.

Em geral, os germoplasmas de *Paspalum* são mantidos em bancos ativos em canteiros estabelecidos a partir de mudas coletadas na natureza. Uma pequena parte dos acessos só está disponível por sementes.

Hoje estão disponíveis mais de 800 acessos de germoplasma envolvendo aproximadamente 110 espécies de *Paspalum*, sendo

que o grupo Dilatata é o melhor representado quanto à área de ocorrência no Brasil, número de espécies amostradas e média de acessos por espécies (Valls e Pozzobon, 1987).

O gênero *Paspalum* apresenta um total de 20 grupos (Barreto, 1974), sendo que o grupo Dilatata é o objeto de estudo do presente trabalho já que as espécies estudadas pertencem ou são relacionadas a ele.

O grupo Dilatata é um grupo de grande interesse para a área subtropical e apresenta três espécies: *P.dilatatum*, *P.urvillei* e *P.pauciciliatum*, as quais podem ser sexuais ou apomíticas. Segundo Valls (1987), pode-se encontrar a formação de híbridos entre estas espécies, podendo ser de duração efêmera ou vigorosos, estes últimos apresentam aproveitamento agrônômico pelo seu aparente potencial produtivo e boa qualidade forrageira. Burson (1979) também cita a ocorrência de hibridização natural entre espécies intimamente relacionadas do gênero *Paspalum*, inclusive as do grupo Dilatata.

A espécie *P.dilatatum* consiste de pelo menos seis biótipos nativos da América do Sul (Burson, 1991) e apresenta no mínimo três formas sexuais, com ocorrência em áreas distintas no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e

Paraguai. Essas formas apresentam anteras amarelas e 40 cromossomos, com diferenças morfológicas e comportamentais distintas quanto à formação de híbridos naturais em ocorrência simpátrica com *P.urvillei*.

Uma das formas intermediárias que ocorrem é entre *P.dilatatum* antera amarela de Vacaria e *P.urvillei*. Essas formas são geralmente encontradas em ambientes modificados pelo homem, especialmente em beira de estradas (Valls e Pozzobon, 1987). Parece que a hibridação, associada com a apomixia, pode ter sido o principal fator evolutivo envolvido na origem dos diferentes biótipos de *P.dilatatum* (Moraes-Fernandes e cols, 1974).

P.dilatatum comum apresenta anteras roxas, 50 cromossomos, reprodução apomítica e representa uma forrageira amplamente adaptada às condições ecológicas do sul da América do Sul. No entanto este biótipo apresenta uma qualidade de semente pobre, muito suscetível ao ataque do fungo *Claviceps paspali*, apomixia obrigatória com formação de sacos embrionários múltiplos, ao número de ploidia impar (pentaplóide), meiose irregular e baixa viabilidade do pólen (Burson, 1991). Todos estes fatores são causas da fraca qualidade das sementes.

Neste biótipo, ocorre a formação de sacos embrionários apospóricos com produção de pró embriões anteriores á antese, no entanto, há a necessidade de polinização para o desenvolvimento do endosperma. A apomixia obrigatória levou ao fracasso os programas de cruzamentos convencionais para uma produção significativamente melhor na qualidade das sementes.

A barreira apomítica não tem sido alterada através de métodos de radiação ou hibridação interespecífica. Para evitar esta barreira, realizaram-se investigações filogenéticas á busca dos progenitores de *P.dilatatum*, objetivando ressintetizar as espécies e permitir sucesso nos cruzamentos (Bennett e Bashaw, 1960). Acredita-se que a apomixia em *P.dilatatum* comum possa ser controlada por genes nos cromossomos univalentes. A identificação da origem destes cromossomos pode ser extremamente importante para estabelecer a filogenia deste biótipo (Burson, 1991).

Pesquisadores australianos citam que *P.dilatatum* comum é fortemente suscetível ao fungo *Ascochyta paspali*, o qual provoca a doença denominada PLB (ferrugem nas folhas de *Paspalum*) e que biótipos de *P.dilatatum* com anteras amarelas demonstraram uma alta resistêcia a este fungo . Diante

destes resultados, os autores sugerem que a resistência ao fungo pode estar relacionada com a cor da antera (Williams, 1990).

Um dos biótipos citados anteriormente, um tetraplóide sexual de anteras amarelas, parece que está intimamente relacionado com o biótipo de *P.dilatatum* comum, pois todos os cromossomos do tetraplóide são homólogos a 40 dos 50 cromossomos do pentaplóide.

Sendo assim, o biótipo de anteras amarelas foi utilizado como um substituto citológico de *P.dilatatum* comum em um programa filogenético e foi cruzado com duas espécies diplóides de *Paspalum*, *P.intermedium* Munro ex.Morong e *P.juergensii* Hackel. Estas demonstraram que tinham o genoma homólogo a cada um dos genomas de *P.dilatatum* anteras amarelas. Aplicaram-se a estas espécies as seguintes fórmulas genômicas: II para *P.intermedium*, JJ para *P.juergensii* e IIJJ para *P.dilatatum*, evidenciando desta maneira que *P.intermedium* e *P.juergensii* são os possíveis progenitores de *P.dilatatum* (Burson e bennett, 1972; Burson e cols, 1973; Burson, 1979; Burson, 1983).

Paspalum x torrense ou *P.dilatatum* de Torres apresenta anteras roxas, 60 cromossomos e reprodução apomítica. Habita

Áreas úmidas e sombreadas do litoral norte do Rio Grande do Sul. Ocorre em simpatria com *P.dilatatum* Poir, *P.urvillei* Steud e *P.virgatum* L., podendo ter sido originado por combinações de algumas destas espécies. Provavelmente, trata-se de um híbrido natural promissor para produção de forragem em zonas de climas tropicais e subtropicais. É uma espécie assináptica, o qual apresenta 60 univalentes na meiose (Barreto, 1974). Este biótipo diferencia-se em *P.dilatatum* Torres típico e Torres armado, sendo que Torres armado apresenta a inflorescência mais armada que Torres típico, sua espiguetta apresenta um formato diferente e sua distribuição geográfica localiza-se mais ao norte (estado de Santa Catarina) em relação à Torres típico (J.F.M.Valls, comunicação pessoal).

Paspalum x uruguaianense ou *P.dilatatum* de Uruguaiana, constitui-se um híbrido natural bem mais vigoroso que *P.dilatatum* comum, apresenta anteras roxas, 60 cromossomos e reproduz-se por apomixia. Burson (1991) cita que este biótipo e um tetraplóide anteras amarelas possam ter dado origem ao *P.dilatatum* comum. Ocorre na campanha sul-riograndense em condições de solos férteis e rasos, associados com diferentes espécies de baixo e médio porte

(Barreto, 1974).

Paspalum x riograndense é um provável híbrido entre *P.urvillei* e *P.conspersum* por apresentar uma grande afinidade morfológica e ecológica com estas espécies. Habita solos úmidos na região da Encosta Inferior do Nordeste do Rio Grande do Sul. É uma espécie tetraplóide ($2n=40$), evidenciando comportamento meiótico irregular (Barreto, 1974).

P.dilatatum ssp *flavescens* Rosengurtt, Arr. e Izag, reproduz-se sexualmente, é predominantemente autógama, apresenta anteras amarelas e 40 cromossomos que pareiam na meiose formando 20 bivalentes. Esta planta pode ser utilizada como progenitora feminina em cruzamentos com outras espécies, formando gametas citologicamente reduzidos ($n=20$), o que indica que se reproduz sexualmente. Verificou-se que 40% de suas espiguetas formam cariopses em condições de autopolinização, indicando autocompatibilidade (Caponio e Quarin, 1987). Esta subespécie foi descrita para o Uruguai e para a região de Itaqui no Rio Grande do Sul e caracteriza-se por apresentar um excelente potencial como forrageira (Barreto, 1974).

P.dilatatum de Vacaria apresenta 40 cromossomos, é um

alotetraplóide e reproduz-se sexualmente. Este biótipo predomina no planalto catarinense e nos Campos de Cima da Serra no Rio Grande do Sul, próximo à borda da Serra Geral. Como citado anteriormente, produz formas morfológicamente intermediárias com *P.urvillei*. Segundo Burson (1978), sua constituição genômica é IIJJ.

P.dilatatum de Virasoro caracteriza-se por uma distribuição restrita que envolve a área de Governador Virasoro na Argentina e a região das Missões no Rio Grande do Sul. Este biótipo, ao contrário de *P.dilatatum* antera amarela de Vacaria, não forma híbridos com *P.urvillei* em zonas de simpatria (Valls, comunicação pessoal), apresenta 40 cromossomos e reprodução sexual (Hickenbick & cols., no prelo).

Uma das hipóteses para explicar a ausência de hibridação seria o fato de não ser *P.intermedium* e *P.juergensii* os genitores do biótipo Virasoro, no entanto, Caponio e Quarín (1990) ao cruzarem artificialmente *P.urvillei* e *P.dilatatum* antera amarela de Virasoro, encontraram um elevado grau de homologia cromossômica nos híbridos obtidos.

P.urvillei Steud é comumente aproveitado em cultivo para o corte e produção de feno. Esta espécie pode estar

envolvida na origem de quatro formas híbridas de *P.dilatatum* que são: *P.dilatatum* var.*pauciciliatum*, *P. x riograndense*, *P.dilatatum* comum e *P.dilatatum* de Uruguaiana (Moraes-Fernandes e cols, 1974). *P.urvillei* ocorre com frequência na América do Sul subtropical e tropical, sendo nativa do sul do Brasil e norte da Argentina (Chase, 1929). No Rio Grande do Sul, encontra-se em locais de solos úmidos em todas as regiões fisiográficas. Seu período de florescimento varia de novembro/dezembro a abril, esta espécie foi introduzida em outros países para ser utilizada como forrageira ou na produção de feno (Barreto, 1974). *P.urvillei* reproduz-se sexualmente, apresenta anteras amarelas, 40 cromossomos e é alotetraplóide (Barreto, 1974; Burson, 1979; Moraes-Fernandes e cols, 1974; Caponio e Quarin, 1990).

P.pauciciliatum era considerado uma variedade de *P.dilatatum* (Burton & Jackson, 1962; Moraes-Fernandes e cols, 1974 e Burson, 1979) e mais tarde foi elevado à espécie *P.pauciciliatum* por Parodi. É uma importante forrageira cultivada em solos úmidos nos EUA, Austrália, África do Sul e Ásia. É tetraplóide com 40 cromossomos e comportamento meiótico anormal, reproduzindo-se por apomixia (Burton e Jackson, 1962). Segundo Barreto (1974), foi

posicionado no grupo Livida por comodidade de caracterização, baseado em seu hábito vegetativo.

Habita regiões de clima temperado e subtropical na América do Sul. É comum em todas as regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul, preferindo solos úmidos e férteis e é bastante freqüente em áreas modificadas. É uma espécie adaptada a condições de pastoreio, costuma formar um tapete denso, dominando as demais espécies. Verificou-se em suas sementes, uma menor incidência ao ataque do fungo *Claviceps paspali*, o que possibilita que suas sementes sejam mais viáveis que as de *P.dilatatum*. Floresce de novembro a março (Barreto, 1974).

P.juergensii Hackel pertence ao grupo Paniculata e, como citado anteriormente é um dos possíveis genitores de *P.dilatatum* e *P.urvillei* por mostrar o genoma (JJ) homólogo a *P.dilatatum* antera amarela de Vacaria. É uma espécie diplóide, com comportamento meiótico normal, é sexual e apresenta 20 cromossomos. Ocorre no Paraguai e estados do sul do Brasil. No Rio Grande do Sul é encontrada em condições de solos úmidos e sombreados nos Campos de Cima da Serra, Encosta Superior e Inferior do Nordeste, Depressão Central e Litoral (Burson e Bennett, 1972; Burson e cols,

1973; Barreto, 1974; Burson, 1978; Burson, 1983).

P.intermedium Munro pertence ao grupo *Quadrifaria* (Barreto, 1974), e constitui o segundo progenitor de *P.dilatatum* e *P.urvillei* por apresentar o genoma (II) homólogo a um dos genomas das espécies citadas (IIJJ). É comum em banhados e locais úmidos da Depressão Central, Campanha e Litoral do Rio Grande do Sul. Distribui-se também pelo Paraguai, Uruguai e Argentina. É uma espécie diplóide com 20 cromossomos, reproduz-se sexualmente e sua meiose é regular (Burson e cols, 1973; Moraes-Fernandes e cols, 1974; Burson, 1978; Burson, 1979; Burson, 1983; Norrmann e cols, 1989; Caponio e Quarin, 1990).

O presente trabalho tem por objetivos:

- Avaliar o grau de relacionamento isoenzimático entre diferentes entidades taxonômicas do gênero *Paspalum* através da técnica de eletroforese horizontal de isoenzimas;
- Obter informações sobre a regulação gênica através da diferenciação tissular obtidos por padrões isoenzimáticos;
- Realizar inferências filogenéticas para obtermos dados sobre a evolução neste grupo de espécies e seus biótipos.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

As entidades do grupo Dilatata foram escolhidas para a execução do presente trabalho, por apresentarem boas características forrageiras e boa produtividade associada a uma ampla distribuição geográfica no sul do Brasil.

De cada entidade taxonômica analisada, procurou-se abranger uma distribuição geográfica mais ampla possível, com o objetivo de detectar uma maior variação isoenzimática entre os indivíduos de uma mesma entidade. As coletas foram realizadas nas regiões da serra, litoral e outras do estado do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul. A identificação das entidades taxonômicas a campo foi realizada pelo engenheiro agrônomo José Montenegro Valls.

Foram estudados um total de oitenta e quatro indivíduos para o sistema das peroxidases e oitenta e três para o sistema das superóxido dismutases.

Procurou-se analisar dez indivíduos de cada espécie ou biótipo, no entanto para aquelas de ocorrência mais rara nas regiões onde realizamos a coleta do material, tais como:

P.intermedium e *P.juergensii*, não foi possível coletar o número de indivíduos desejado.

As plantas analisadas estão listadas na tabela 1, onde constam os dados de classificação, número do coletor, e local de coleta. Esta tabela está listada nas páginas 21-23.

2.2 Métodos

2.2.1 Manutenção do material

As mudas das plantas coletadas a campo, foram posteriormente mantidas em casa de vegetação. O plantio foi realizado em vasos de barro com terra de mato e cascalho colocado ao fundo para evitar a umidade excessiva da planta.

Cada indivíduo foi identificado com a inicial do nome e o número do coletor e cada vaso continha uma placa de acrílico com sua identificação. Os vasos foram mantidos dentro de uma bacia plástica, onde era colocada água ao nível de três ou quatro centímetros aproximadamente, com uma freqüência de uma a duas vezes por semana, dependendo da necessidade de hidratação da planta.

Tabela 1: Tabela dos indivíduos amostrados no presente trabalho. As abreviaturas dos nomes das entidades taxonômicas serão as apresentadas nas demais tabelas e figuras do presente trabalho. É indicado o município de origem de cada planta.

ENTIDADE	NºCOLETOR	LOCAL ORIGEM MUNICÍPIO
<i>P. dilatatum</i>	V11958	Lages/SC
anteras	V11961	Lages/SC
roxas	V11967	São Joaquim/SC
	V11995	Bom Retiro/SC
DIAR	V11996	Bom Retiro/SC
	V12018	Alfredo Wagner/SC
	V12030	Lages/SC
	V12031	Lages/SC
	V12037	Lages/SC
	V12040	Passo Fundo/RS

<i>P. dilatatum</i>	V12044	Lages/SC
Tores	V11146	Quatro Barras/PR
típico	V4019	Osório/RS
	V4020	Osório/RS
DITT	V4032	Torres/RS
	V8262	Lages/SC

<i>P. dilatatum</i>	V12000	Alfredo Wagner/SC
Torres	V12003	Alfredo Wagner/SC
armado	V12005	Alfredo Wagner/SC
	V12020	Alfredo Wagner/SC
DITA	V12021	Alfredo Wagner/SC
	V12023	Rancho Queimado/SC
	V8120	Alfredo Wagner/SC
	V4441	São Joaquim/SC
	V11103	Balsa Nova/PR

<i>P. dilatatum</i>	V12066	Passo Fundo/RS
de Virasoro	V12068	Passo Fundo/RS
	V12058	Passo Fundo/RS
DIVI	V12062	Passo Fundo/RS
	V12063	Passo Fundo/RS
	V10717	Passo Fundo/RS
	V10652	Passo Fundo/RS
	V9809	São Borja/RS
	V12060	Passo Fundo/RS
	V12061	Passo Fundo/RS
<i>P. dilatatum</i>	V11966	São Joaquim/SC
de Vacaria	V11974	São Joaquim/SC
	V11987	Bom Jardim da Serra/SC
DIAA	V11977	São Joaquim/SC
	V11989	Bom Jardim da Serra/SC
	V11997	Bom Retiro/SC
	V12015	Alfredo Wagner/SC
	V12032	Lages/SC
	V12035	Lages/SC
	V12051	Lages/SC
	V10811	Bom Jesus/RS
Forma morfo	V11955	Lages/SC
logicamente	V11959	Lages/SC
intermediária	V11962	Lages/SC
entre	V11964	São Joaquim/SC
<i>P. dilatatum</i>	V11965	São Joaquim/SC
e	V11968	São Joaquim/SC
<i>P. urvillei</i>	V11978	São Joaquim/SC
	V11980	São Joaquim/SC
DIUR	V11991	Bom Jardim da Serra/SC
	V12019	Alfredo Wagner/SC
	V12046	Lages/SC
<i>P. urvillei</i>	V11960	Lages/SC
	V11970	São Joaquim/SC
URVI	V12001	Alfredo Wagner/SC
	V12004	Alfredo Wagner/SC
	V12011	Alfredo Wagner/SC
	V12017	Alfredo Wagner/SC
	V12028	Lages/SC
	V12048	Lages/SC

	V12057	Passo Fundo/RS	
	V12067	Passo Fundo/RS	continuação
	V12079	Passo Fundo/RS	

Forma morfo-	V12016	Alfredo Wagner/SC	
logicamente	V12014	Alfredo Wagner/SC	
intermediária	V12040	Vacaria/RS	
entre	V12007	Alfredo Wagner/SC	
<i>P. urvillei</i>	V12047	Lages/SC	
e	V12064	Passo Fundo/RS	
<i>P. juergensii</i>	V12008	Alfredo Wagner/SC	
	V11234	Ponta Grossa/PR	
URJU	V12075	Passo Fundo/RS	

<i>P. juergensii</i>	V11963	Lages/SC	
	V12054	Lages/SC	
JUER	V12065	Passo Fundo/RS	
	V4383	Ivoti/RS	
	V12043	Lages/SC	

<i>P. intermedium</i>	V11840	Novirai/MS	
INTE	V11849	Iguatemi/MS	
=====			

2.2.2 Coleta do material para a análise eletroforética

A primeira coleta de folhas adultas para a análise eletroforética foi realizada em março de 1989 (ver tabela 2), realizamos diferentes coletas para os diferentes sistemas enzimáticos com o objetivo de evitar que o material ficasse estocado por muito tempo. Retirou-se três folhas de cada indivíduo, procurando sempre pegar o mesmo tipo de folha nos diferentes indivíduos. Para isso coletou-se as

folhas mais periféricas e evitando aquelas com pontas queimadas. As folhas eram enroladas separadamente e colocadas em potes plásticos com a identificação do indivíduo e data de coleta, e imediatamente colocadas em um isopor com gelo seco para o congelamento a -90°C .

Na tabela 2 constam a data de coleta dos indivíduos e também a data de análise para os dois sistemas enzimáticos. Os indivíduos seguem a mesma ordem apresentada na tabela 1.

Em laboratório, as plantas foram armazenadas em freezer a -16°C .

2.2.3 Sistemas enzimáticos-testes e escolha

Previamente, tínhamos como proposta a análise de três sistemas isoenzimáticos, mas a análise só foi possível com dois sistemas devido ao fato de não termos conseguido outro com condições de migração e resolução satisfatórios para uma análise segura.

Foram realizados vários testes com as folhas adultas congeladas ou vivas, envolvendo os seguintes sistemas: peroxidase (PER); amilase (AMI); glutamato oxalacetato transaminase (GOT); álcool desidrogenase (ADH); leucina amino peptidase (LAP); esterase (EST); malato desidrogenase

(MDH); superóxido dismutase (SOD) e glutamato desidrogenase (GDH).

Tabela 2: Apresentação da data de coleta e de análise de cada indivíduo amostrado. A ordem apresentada é a mesma da tabela 1.

DATA DE COLETA		DATA DE ANÁLISE	
PER	SOD	PER	SOD
28.03.89	10.10.90	02.05.89	27.12.90
28.03.89	10.10.90	16.05.89	20.12.90
28.03.89	10.10.90	30.05.89	12.12.90 e 30.01.91
28.03.89	10.10.90	11.09.89	05.12.90 e 12.12.90
28.03.89	10.10.90	11.09.89	20.12.90
28.03.89	10.10.90	25.09.89	20.12.90
28.03.89	10.10.90	03.10.90	21.11.90
28.03.89	10.10.90	03.10.90	21.01.91 e 30.01.91
28.03.89	10.10.90	06.11.89	16.01.91 e 21.01.91
28.03.89	10.10.90	21.11.89	05.02.91

28.03.89	10.10.90	10.10.89	20.12.90 e 07.02.91
28.03.89	10.10.90	06.11.89	12.12.90 e 30.01.91
28.03.89	10.10.90	06.11.89	27.12.90
28.03.89	10.10.90	06.11.89	30.01.91
28.03.89	--	21.11.89	--
10.10.90	10.10.90	25.01.91	05.02.91

28.03.89	10.10.90	11.09.89	25.01.91
28.03.89	10.10.90	25.09.89	05.02.91
28.03.89	10.10.90	11.09.89	16.01.91 e 21.01.91
28.03.89	10.10.90	25.09.89	07.02.91
28.03.89	10.10.90	25.09.89	17.12.90
28.03.89	10.10.90	25.09.89	12.12.90 e 30.01.91
28.03.89	10.10.90	06.11.89	05.12.90
28.03.89	10.10.90	27.11.89	09.11.90
10.10.90	10.10.90	16.01.91	21.11.90

28.03.89	10.10.90	03.10.89	27.12.90
28.03.89	10.10.90	10.10.89	12.12.90 e 30.01.91

28.03.89	10.10.90	23.10.89	05.12.90
28.03.89	10.10.90	23.10.89	05.02.91 e 07.02.91
28.03.89	10.10.90	23.10.89	27.12.90, 16.01.91 e 21.01
10.10.90	10.10.90	16.01.91	05.12.90 e 12.12.90
10.10.90	10.10.90	16.01.91	21.01.91 e 30.01.91 cont.
10.10.90	10.10.90	25.01.91	17.12.90
10.10.90	10.10.90	30.01.91	17.12.90
10.10.90	10.10.90	30.01.91	07.12.90

28.03.89	10.10.90	30.05.89	21.01.91 e 30.01.91
28.03.89	10.10.90	17.08.89 e 11.09.89	05.02.91
28.03.89	10.10.90	22.08.89	07.02.91
28.03.89	10.10.90	22.08.89	27.12.90
28.03.89	10.10.90	22.08.89 e 05.09.89	27.12.90
28.03.89	10.10.90	11.09.89	17.12.90
28.03.89	10.10.90	25.09.89	25.01.91
28.03.89	10.10.90	03.10.89	20.12.90
28.03.89	10.10.90	06.11.89	05.12.90, 12.12 e 17.12 90
28.03.89	10.10.90	06.11.89	17.12.90 e 27.12.90
28.03.89	10.10.90	27.11.89	20.12.90

28.03.89	10.10.90	02.05.89	28.11.90, 05.12 e 12.12.90
28.03.89	10.10.90	02.05.89	25.01.91
28.03.89	10.10.90	16.05.89	09.11.90
28.03.89	10.10.90	16.05.89	07.02.91
28.03.89	10.10.90	16.05.89	05.02.91
28.03.89	10.10.90	30.05.89 e 17.08.89	09.11.90
28.03.89	10.10.90	22.08.89	25.01.91
28.03.89	10.10.90	22.08.89	05.02.91
28.03.89	10.10.90	11.09.89	05.02.91
28.03.89	10.10.90	25.09.89	09.11.90
28.03.89	10.10.90	23.10.89	16.01.91 e 21.01.91

28.03.89	—	02.05.89	—
28.03.89	10.10.90	30.05.89 e 17.08.89	27.12.90
28.03.89	10.10.90	11.09.89	05.02.91
28.03.89	10.10.90	11.09.89	05.12.90 e 12.12.90
28.03.89	10.10.90	25.09.89	05.12.90
28.03.89	10.10.90	25.09.89	27.12.90
28.03.89	10.10.90	03.10.89	09.11.90
28.03.89	10.10.90	10.10.89	21.11.90
28.03.89	10.10.90	06.11.89	17.12.90
28.03.89	10.10.90	06.11.89	17.12.90
28.03.89	—	21.11.89	—

28.03.89	10.10.90	02.05.89	05.12.90	
28.03.89	10.10.90	25.09.89	20.12.90	
28.03.89	10.10.90	10.10.89	05.02.91	
28.03.89	10.10.90	11.09.89	27.12.90	continuação
28.03.89	10.10.90	21.11.89	20.12.90	
10.10.90	10.10.90	25.01.91	05.12.90	
10.10.90	10.10.90	30.01.91	17.12.90	
10.10.90	10.10.90	30.01.91	20.12.90	
10.10.90	10.10.90	30.01.91	30.01.91	

28.03.89	10.10.90	16.05.89	25.01.91	
28.03.89	10.10.90	10.10.89	16.01.91 e 21.01.91	
28.03.89	10.10.90	23.10.89, 27.11 e 4.12	21.01.91	
28.03.89	10.10.90	06.11.89	28.11.90	
28.03.89	10.10.90	04.12.89	12.12.90 e 30.01.91	

10.10.90	10.10.90	16.01.91	21.01.91	
10.10.90	10.10.90	25.01.91	20.12.90	

Apesar da análise de isoenzimas por eletroforese em plântulas apresentar padrões de resolução mais satisfatórios, escolhemos a análise de folhas adultas para a execução desse trabalho para termos maior certeza da classificação da planta que estávamos trabalhando. A análise de plântulas poderia nos levar a erros de classificação uma vez que poderíamos ter sementes resultantes de cruzamentos entre aquelas entidades que apresentam fecundação cruzada como modo de reprodução.

Para cada sistema testado, foram utilizados diferentes tampões, diferentes concentrações de gel e diferentes

condições de coloração.

Para os sistemas GOT, LAP, EST, ADH e GDH não obtivemos atividade em nenhuma das condições testadas. MDH apresentou atividade, mas uma migração muito difusa em várias condições testadas não permitindo uma análise segura. Em AMI, apenas pequena parte dos indivíduos apresentaram atividade desta enzima. Sendo assim, somente PER e SOD puderam ser analisados.

2.2.4 Análise eletroforética

Para o sistema das peroxidases, foram analisados trinta e sete géis, com um total de setecentas e quarenta aplicações, e para superóxido dismutases, analisamos quarenta e três géis com oitocentos e sessenta aplicações.

a) Preparo dos géis:

A análise de ambos os sistemas foi feita por eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida. Os géis eram preparados, em geral, com dezoito horas de antecedência.

Para o sistema das peroxidases, utilizamos os tampões descritos por Scandalios (1969) modificado. No gel foram utilizadas uma parte do tampão A e nove partes do tampão B,

e nas cubas utilizou-se somente o tampão A (1 litro).

Tampão A: tampão borato de lítio 0,2 M pH 8,3

hidróxido de lítio.....1,20 g
ácido bórico (anidro).....11,89g
água destilada.....1000ml

Tampão B: tampão tris-citrato 0,06M pH 8.3

tris.....6,20g
ácido cítrico.....1,60g
água destilada.....1000ml

Para melhor análise das bandas, utilizamos duas concentrações dos géis, 6% e 8%. Na preparação de cada gel utilizava-se soluções estoques detalhadas a seguir:

solução estoque para gel a 6%:

tampão de Scandalios 1A:9B.....1000ml
acrilamida.....57g
bisacrilamida.....3g
diamina de N,N,N,N'tetra-metiletileno (TMED).....1ml

solução estoque para gel de 8%:

tampão de Scandalios 1A:9B.....1000ml
acrilamida.....76g
bisacrilamida.....4g

TMED.....1ml

Para cada gel, utilizava-se 75ml da solução estoque, a qual adicionava-se 1% de persulfato de amônia (AP 10%) que correspondia à 0,75 ml. Agitava-se esta solução e colocava-se em uma canaleta de vidro de dimensões 17cm x 15cm x 0,2cm e tampava-se com uma tampa de vidro, na qual adicionava-se silicone para evitar a aderência do gel na tampa quando polimerizado. Esperava-se aproximadamente vinte minutos para que o gel polimerizasse e levava-se à câmara de 4°C.

Para o sistema das superóxido dismutases, utilizou-se as concentrações de 6% e 7% para os géis e tampões descritos por Roose e Gottlieb (1970).

Tampão para as cubas: citrato de sódio 0,4M.....117,64g/l

água destilada.....1000ml

O pH era somente medido, sem necessidade de ajustá-lo; em geral, media 8,3.

Tampão de Roose e Gottlieb (R-G) para os géis:

histidina 0,005M.....0,7758g/l

água destilada.....1000ml

pH 8,0 (ajustado com NaOH)

Para o gel na concentração de 6%, utilizou-se as mesmas

substâncias e medidas citadas para o sistema das peroxidases, substituindo-se somente o tampão de Scandalios pelo tampão de Roose e Gottlieb. Para o gel a 7% utilizava-se a seguinte solução estoque:

solução estoque para gel a 7%:

Tampão R-G.....1000ml
acrilamida.....66,5g
bisacrilamida.....3,5g
TMED.....1ml

Os demais procedimentos foram os mesmos relatados para o sistema das peroxidases.

b) Preparo das amostras e distribuição nos géis:

A homogeneização das amostras sempre foi realizada em contato com o gelo, para evitar a degradação das enzimas. Para tanto, utilizou-se placas de acrílico com orifícios, as quais eram colocadas sobre gelo mantido em caixas de isopor. Os potes de plástico que continham as amostras a serem analisadas ficavam imersos em gelo. Em cada gel, foram feitas vinte aplicações, sendo que o controle era aplicado nas posições 1, 2, 9, 19 e 20 e eram amostrados mais quatro

indivíduos com três aplicações para cada um, correspondendo à ponta, meio e base da folha, mantendo sempre esta ordem.

Cada amostra de folha media aproximadamente 2mm^2 , e a cada uma, adicionava-se 0,01 ml de tampão de homogeneização:

1,211 g de tris HCl 50 mM, pH 7,6
0,21 ml de β mercaptoetanol 14 mM (este produto era utilizado para evitar a oxidação)
0,149 g de KCl 10 mM
0,406 g de cloreto de magnésio 10 mM
0,67 g de EDTA 1 mM
completava-se até 200 ml de água destilada

A homogeneização era feita com um bastão de vidro até se obter uma substância líquida. Após isso, colocava-se, acima do homogeneizado, um disco de papel "Plumatex" previamente tratado e acima deste colocava-se dois papéis Whatman número 3 com dimensões de 4 mm x 1 mm, os quais ficavam embebidos com o homogeneizado. O disco de papel funcionava como filtro para evitar que resíduos sólidos ainda presentes no homogeneizado ficassem aderidos nos papéis de aplicação, levando à formação de rastros na migração de cada amostra. Este papel era previamente tratado para retirar possíveis impurezas que prejudicassem a migração eletroforética.

tratamento:

- lavagem em solução de bicarbonato de sódio a 0,1 N durante duas horas;
- lavagem em água destilada;
- lavagem em ácido acético 0,05 M + EDTA 0,01 M durante duas horas;
- lavagem em água destilada três vezes;
- secagem ao ar ou estufa.

Nas aplicações 1, 9 e 20 adicionava-se uma gota de azul de bromofenol para proporcionar o acompanhamento da migração da linha de frente no gel.

Após a preparação deste material, perfurava-se os géis com um pente de alumínio. Para o sistema das peroxidases, perfurava-se a uma distância de aproximadamente dois centímetros da borda do gel e para o sistema das superóxido dismutases, perfurava-se o gel a cinco centímetros da borda.

Feitas as aplicações das amostras em cada orifício, cobria-se o gel com plástico tipo "zap" para evitar a evaporação e o contato com sujeira.

c) Migração:

As cubas em que se colocava os géis já estavam no balcão

refrigerado a uma temperatura de no máximo 4°C. Em geral colocava-se os dois géis na mesma cuba, com duas pontes de papel filtro por gel fazendo o contato dos géis com o tampão das cubas. As pontes de papel sofriam o mesmo tratamento dado ao papel usado na filtragem do homogeneizado.

Para o sistema das peroxidases, a ponte catódica ficava a um centímetro do ponto de aplicação e para as superóxido dismutases, a quatro centímetros do ponto de aplicação. A distância mantida entre as duas pontes foi sempre de doze centímetros. Aplicava-se uma diferença de potencial de 10 V/cm e deixava-se a amostra migrar até que a linha de frente atingisse nove centímetros (para as peroxidases) ou oito centímetros e meio (para as superóxido dismutases).

d) Sistema de Revelação e Fixação dos Géis:

Ao atingir a migração desejada, desligava-se a fonte de corrente contínua e preparava-se a coloração para a revelação das isoenzimas.

A revelação das bandas isoperoxidásicas foi feita segundo a técnica descrita por Gottlieb (1973):

0,065 g de 3 amino 9 etil carbazola dissolvido em 5 ml de dimetil formamida

2 ml de cloreto de cálcio 0,1 M

4 gotas de peróxido de hidrogênio 30%

95 ml de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0.

A mistura desta coloração era agitada manualmente para evitar a precipitação do material.

Retirava-se o gel do balcão refrigerado e da canaleta de vidro. Colocava-se o mesmo em um prato de vidro sobre o qual derramávamos a solução de coloração. Deixávamos incubar em temperatura ambiente durante uma hora e depois fixávamos o gel no fixador descrito por Ayala durante quinze minutos.

Fixador de Ayala: 900 ml álcool metílico

220 ml ácido acético

completar até 2 l água destilada

Para o sistema das superóxido dismutases, utilizava-se coloração descrita por Brewer (1970), modificada:

Tampão fosfato de sódio dibásico 0,125 M pH 8,2....100 ml

NAD.....0,04 g

NBT.....0,02 g

PMS.....0,013g

As drogas eram adicionadas em um becker, nesta ordem, e agitadas em um agitador magnético.

A solução de coloração era adicionada ao prato de vidro

que continha o gel, e incubava-se o mesmo por trinta minutos em estufa a 37°C. Após isso, deixava-se o gel durante uma hora sob luz intensa: duas lâmpadas de 15W cobertas por papel alumínio para concentrar a luz.

A fixação do gel foi a mesma descrita para o sistema das peroxidases.

e) Análise dos Géis:

Para o sistema das peroxidases, os géis eram fotografados e analisados no dia seguinte e para o sistema das superóxido dismutases, a fotografia e a análise eram realizadas, em geral, no mesmo dia da migração, apesar de que a precisão das bandas não modificava caso deixássemos para analisar mais tarde.

Foram feitos esquemas dos padrões isoenzimáticos para cada indivíduo. As distâncias migradas por cada banda eram medidas e procurou-se esquematizar fielmente a intensidade relativa de cada banda.

A Mr (Migração Relativa) de cada banda foi calculada a partir da distância migrada pela banda dividida pelo valor da banda de Mr 1,00, que é uma banda presente no controle e na maioria dos indivíduos, e de fácil detecção.

Quando havia dúvidas quanto à resolução e homologia das bandas de um indivíduo, repetia-se este indivíduo em outro gel, quantas vezes fosse necessário.

f) Análise Fenética e Cladística:

O grau de similaridade entre os indivíduos e as entidades taxonômicas analisadas foi estimado através do índice de similaridade de Jaccard. Também foram calculadas as distâncias Manhattan e Euclidiana.

A partir dos dados obtidos pelos índices de similaridades e distâncias genéticas, foram construídos fenogramas pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages), o qual é um método de agrupamento bastante utilizado para taxonomia numérica.

Para o sistema das peroxidases, quando comparamos indivíduos, utilizamos estes como OTUs e a presença e ausência de bandas como caracteres binários. Foram construídos fenogramas a partir do índice de similaridade de Jaccard e das distâncias Manhattan e Euclidiana. Para a comparação entre diferentes entidades taxonômicas, cada taxon foi utilizado como OTU e a frequência de cada banda na entidade foi utilizada como caracter. Foram calculados os

coeficientes de similaridade de Jaccard entre diferentes espécies e biótipos e construídos fenogramas utilizando as distâncias Manhattan e Euclidiana.

Para o sistema das superóxido dismutases, foi utilizada a mesma metodologia e o mesmo foi feito para os dados gerais, incluindo os dois sistemas enzimáticos analisados.

Realizamos uma análise cladística, através do método de parcimônia de Wagner, utilizando o programa HENNIG86 (S.J.Farris, 1989).

Para esta análise, utilizamos os caracteres de presença e ausência de bandas nas diferentes entidades taxonômicas, como resultou mais de uma árvore, utilizamos o método de consenso de Nelson.

Também foram construídas árvores filogenéticas, utilizando a distância Manhattan com o método de agrupamento Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), sendo que a presença e ausência de bandas e também a frequência de cada banda na entidade foram utilizadas como caracter.

RESULTADOS

3.1. Peroxidases

Para o sistema das peroxidases, foram analisadas somente bandas anódicas, pois as poucas catódicas que eventualmente surgiram apresentavam um padrão bastante indefinido.

Como já citado, utilizamos diferentes partes da folha (ponta, meio e base) para a análise isoenzimática, as quais foram analisadas separadamente, pois conforme será discutido mais adiante, as bandas presentes em cada parte da folha variaram de indivíduo para indivíduo. Assim, analisando estas três partes, acreditamos ter detectado todos os loci ativos na folha, evitando diferenças individuais conseqüentes de regulação tissular.

Para este sistema isoenzimático, foram detectadas um total de 34 bandas, das quais 28 estavam presentes nas duas condições de migração e as demais só foram detectadas em uma das condições. Não se detectou bandas claramente secundárias para nenhum tecido analisado.

Na figura 2 é apresentado um gel de poliacrilamida revelado para o sistema das peroxidases. Neste gel, foram utilizados seis indivíduos pertencentes a diferentes entidades taxonômicas do gênero *Paspalum*. Ao lado direito do

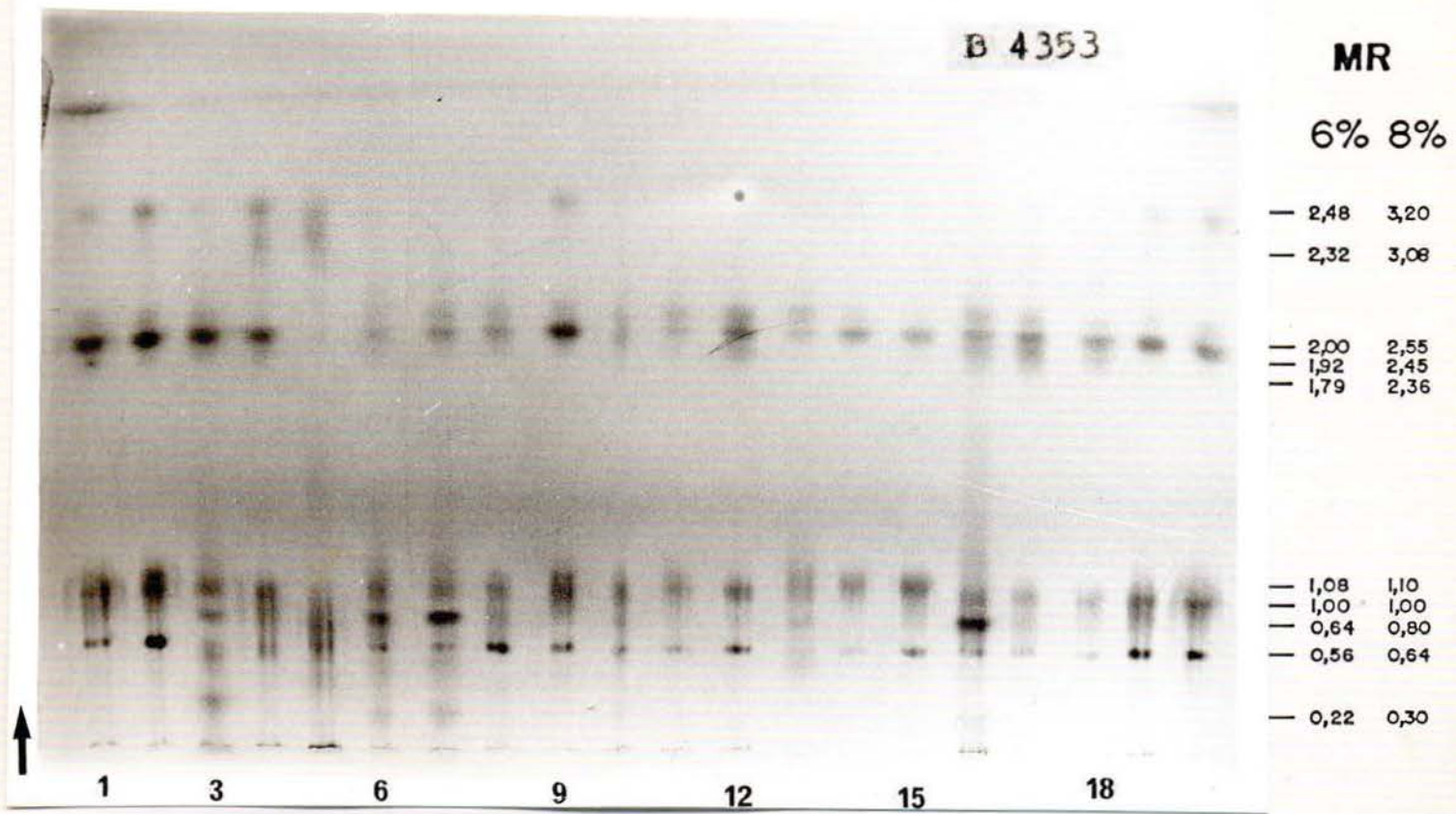


Figura 1) Isoenzimas de peroxidases de seis individuos do gênero *Paspalum*: V12028 = *P.urvillei* (aplicações 3-4-5), V12030 = *P.dilatatum* anteras roxas (6-7-8), V12031 = *P.dilatatum* anteras roxas (10-11-12), V12032 = *P.dilatatum* Vacaria (13-14-15), V12066 = *P.dilatatum* de Virasoro (16-17-18). As aplicações 1-2-9-19-20 correspondem ao controle(c): V12016 = forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii*.

A ordem das três aplicações de cada individuo é ponta, meio e base da folha. Migração em gel de poliacrilamida 8% e tampões descritos por Scandalios (1969) pH 8,3. Ao lado direito do gel estão indicadas as Mrs (migração relativa) das bandas detectadas nas duas condições de migração.

gel estão indicadas as Mrs (migração relativa) das bandas detectadas. Pode-se verificar as diferenças regulatórias marcantes entre as três partes analisadas de um mesmo indivíduo e o alto grau de similaridade no padrão isoenzimático entre os indivíduos, mesmo pertencendo a espécies distintas. Podemos também, comparar dois indivíduos, V12030 (aplicações 6-7-8) e V12031 (aplicações 10-11-12) diferentes pertencentes ao mesmo biótipo: *P.dilatatum* anteras roxas.

3.1.1. Variação Intrataxonômica

Nas figuras 3 a 12 estão representados, para cada espécie ou biótipo separadamente, os padrões peroxidásicos de cada indivíduo. Ao lado de cada banda está indicado o(s) tecido(s) em que a mesma foi detectada. As Mrs de cada banda, nas duas condições de migração em que a análise foi realizada, estão indicadas à esquerda de cada figura. Foi construído o padrão geral para cada entidade taxonômica analisada, reunindo todas as bandas presentes em seus indivíduos, não importando a parte da folha em que a mesma foi detectada nem sua frequência. O padrão geral e a

freqüência em que cada banda ocorreu estão indicados à direita da figura. A partir dos padrões apresentados nestas figuras foram calculados os coeficientes de similaridade de Jaccard (S_J) entre os indivíduos comparados dois a dois. Esses coeficientes são apresentados nas tabelas 3 a 12 junto com o coeficiente médio para cada entidade taxonômica.

P.dilatatum anteras roxas e *P.dilatatum* Torres armado foram as entidades taxonômicas que apresentaram os maiores níveis de similaridade entre seus indivíduos ($\bar{S}_J=0.70$; tabela 3). Isto significa que, em média, cada dois indivíduos compartilham setenta por cento de suas bandas peroxidásicas. Um par de indivíduos de *P.dilatatum* anteras roxas (V11995 e V11996) apresentou, inclusive, coeficiente de similaridade igual a 1,00, ou seja, apresentaram uma similaridade total em seus padrões peroxidásicos. Cabe salientar que estes dois indivíduos foram coletados de pontos muito próximos de uma mesma localidade (Bom Retiro - SC), podendo assim ser plantas irmãs. Como *P.dilatatum* anteras roxas se reproduz por apomixia, é esperada a ocorrência de clones de indivíduos geneticamente idênticos coexistindo lado a lado.

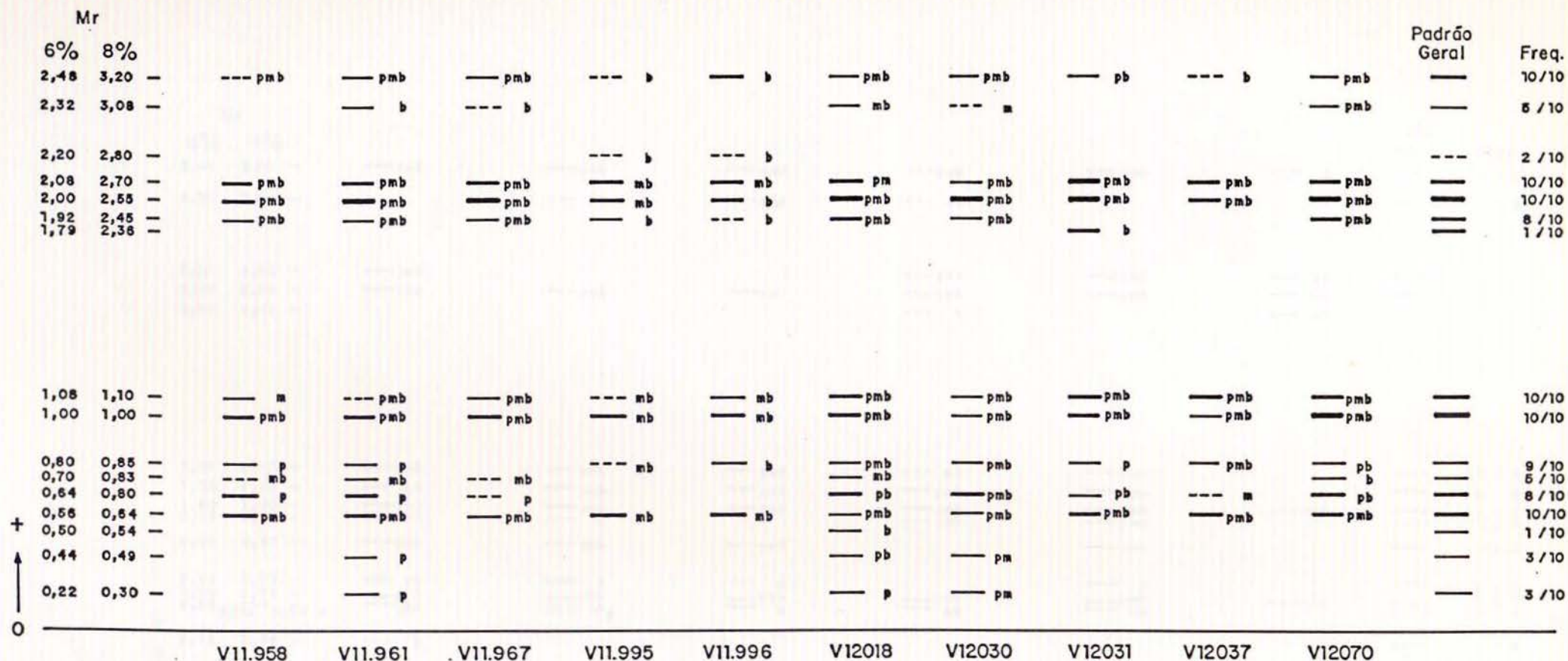


Figura 3: Padrões peroxidásicos dos indivíduos de *Paspalum dilatatum* anteras roxas. Ao lado de cada banda está indicada a parte da folha (p= ponta, m= meio, b= base) em que a mesma foi detectada. As Mrs de cada banda, nas duas condições de migração em que a análise foi realizada, estão indicadas à esquerda da figura. O padrão geral do biótipo, que consiste na reunião de todas as bandas ativas que o mesmo apresentou, e a frequência de cada banda no biótipo estão indicados à direita da figura. A largura de cada banda é proporcional à sua intensidade no gel: fraquíssima; — fraca, — média e — forte.

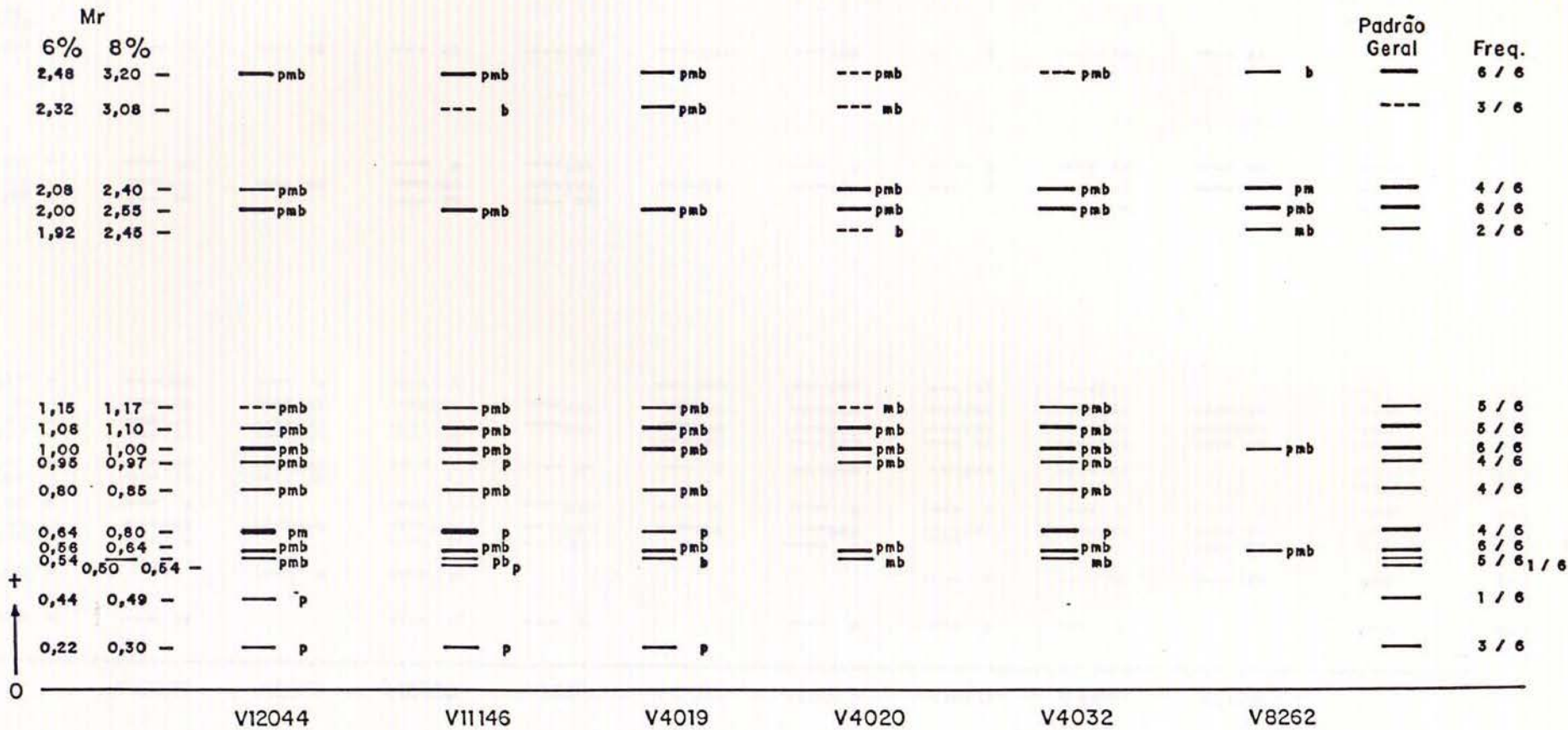


Figura 4: Padrões peroxidásicos dos indivíduos de *P.dilatatum* Torres típico. Detalhes: ver legenda da figura

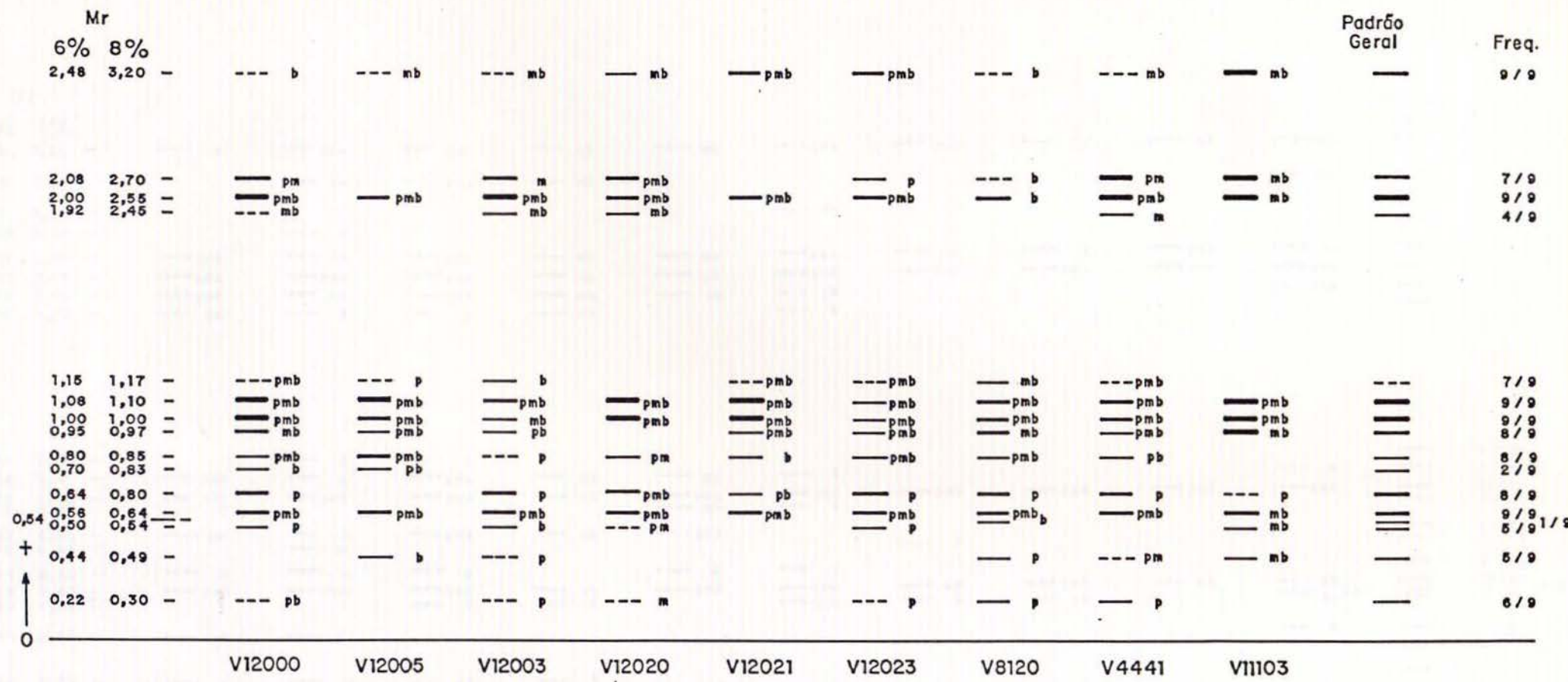


Figura 5: Padrões peroxidásicos dos indivíduos de *P.dilatatum* Torres armado. Detalhes: ver legenda da figura 3.

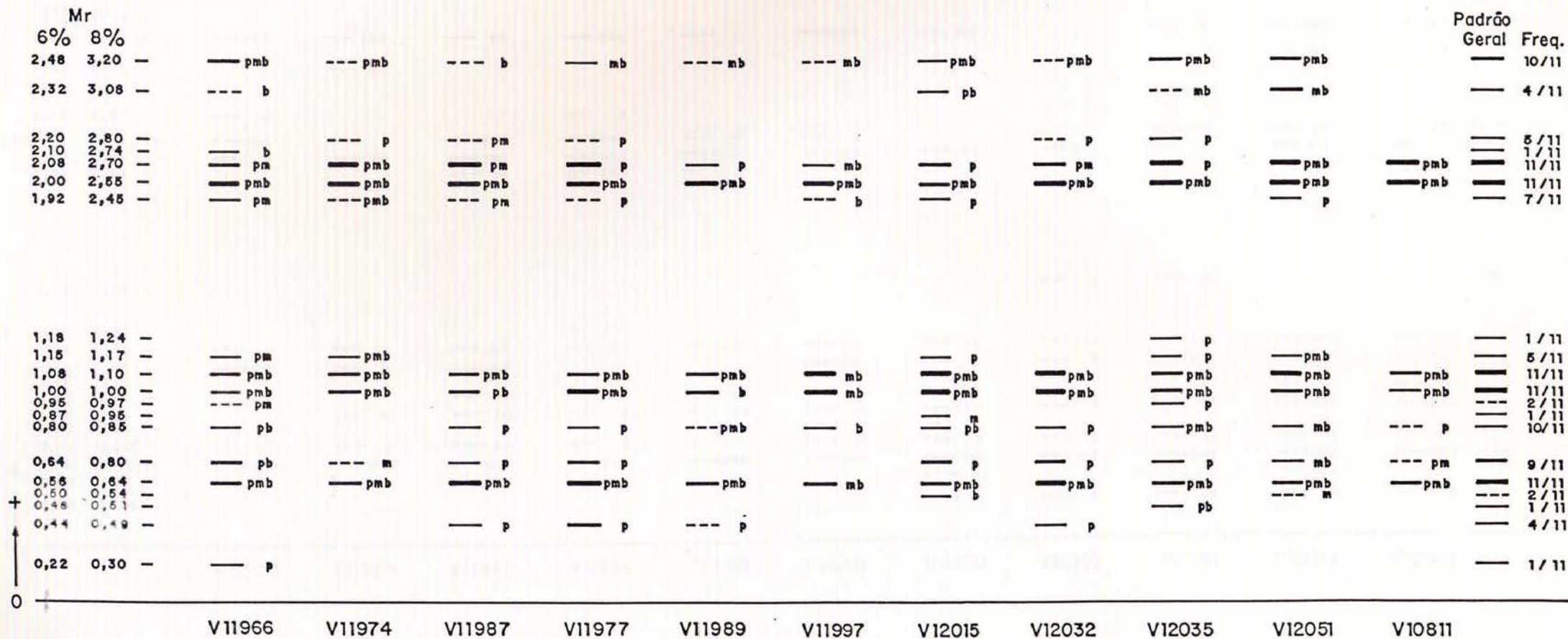


Figura 7: Padrões peroxidásicos dos indivíduos de *P. dilatatum* de Vacaria. Detalhes: ver legenda da figura 3.

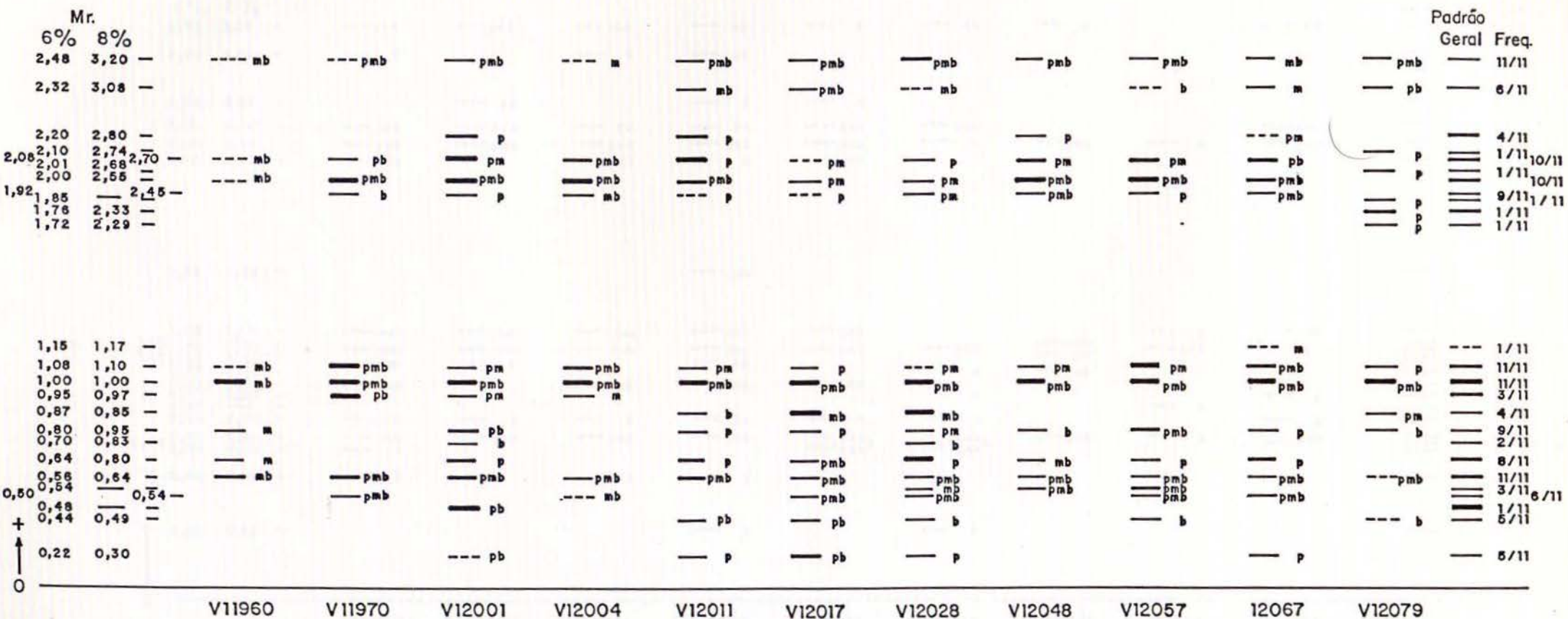


Figura 9: Padrões peroxidásicos dos indivíduos de *P.urvillei*. Detalhes: ver legenda da figura 3.

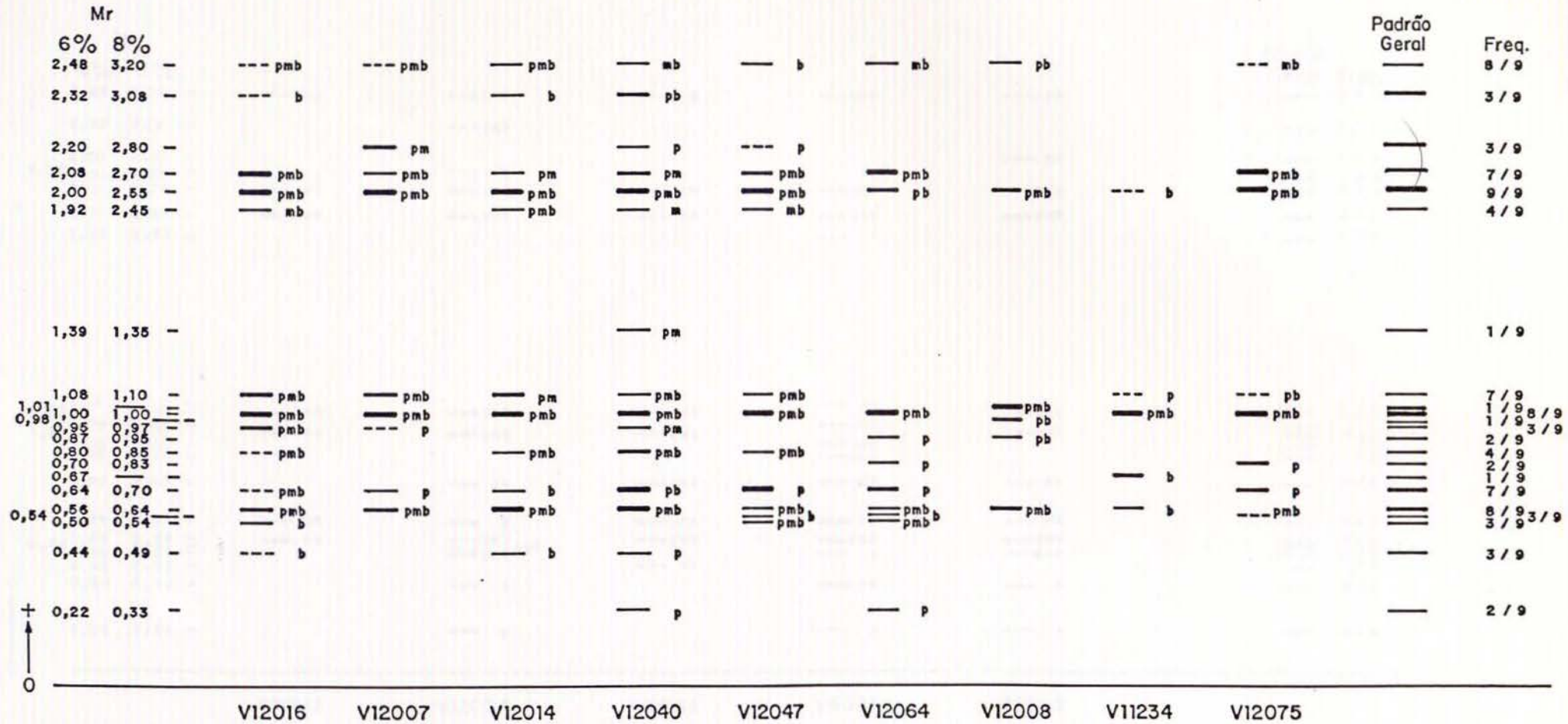


Figura 10: Padrões peroxidásicos dos indivíduos pertencentes à forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii*. Detalhes: ver legenda da figura 3.

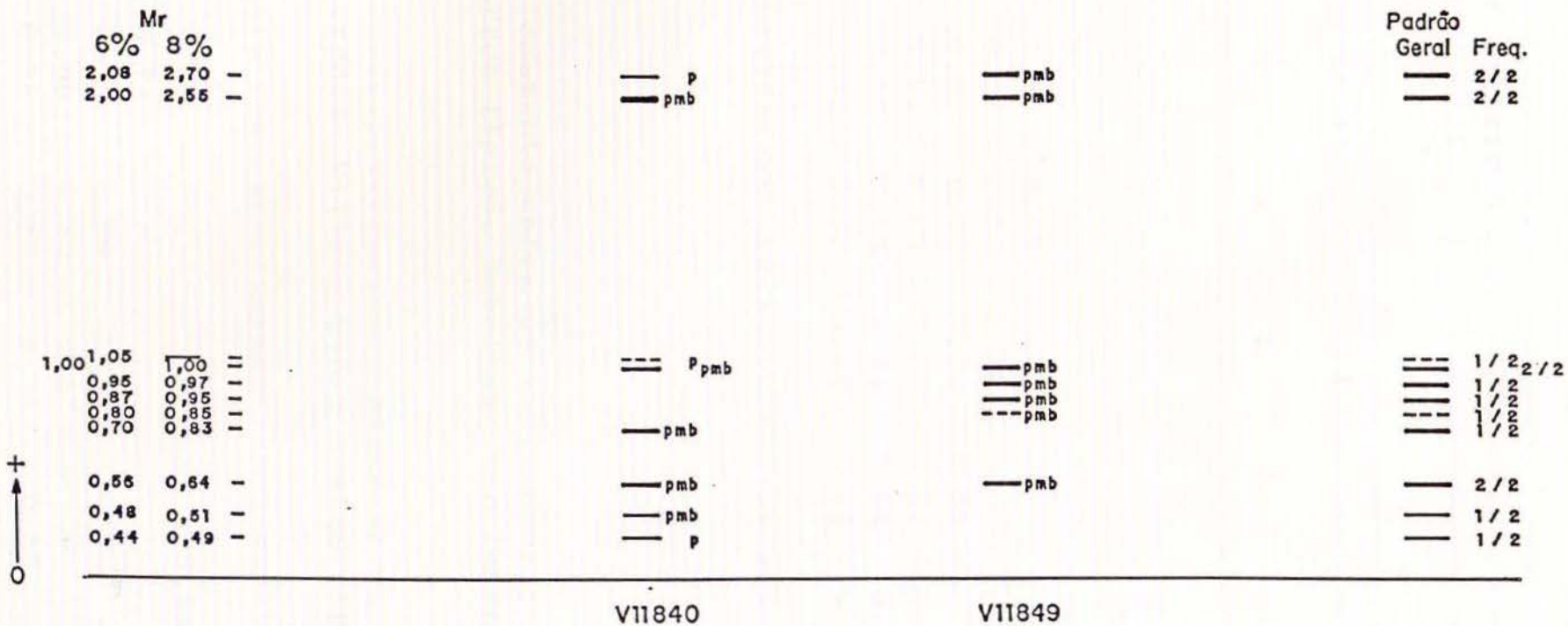


Figura 12: Padrões peroxidásicos dos indivíduos de *P.intermedium*. Detalhes: ver legenda da figura 3.

Tabela 3: Relacionamento dos indivíduos analisados de *P.dilatatum* anteras roxas baseado nos índices de similaridade de Jaccard a partir dos padrões peroxidásicos.
 \bar{S}_J = Índice médio de similaridade de Jaccard intrataxonômico.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1)V11958	-								
2)V11961	0,77	-							
3)V11967	0,82	0,77	-						
4)V11995	0,73	0,57	0,58	-					
5)V11996	0,73	0,57	0,58	1,00	-				
6)V12018	0,71	0,93	0,71	0,53	0,53	-			
7)V12030	0,69	0,92	0,69	0,62	0,62	0,86	-		
8)V12031	0,73	0,57	0,58	0,64	0,64	0,53	0,62	-	
9)V12070	0,83	0,92	0,83	0,62	0,62	0,86	0,85	0,62	-

$\bar{S}_J = 0,70$

Tabela 4: Relacionamento entre os indivíduos pertencentes a *P.dilatatum* Torres típico. Detalhes: ver legenda da tabela 3.

Tabela 4: Relacionamento entre os indivíduos pertencentes a *P.dilatatum* Torres típico. Detalhes: ver legenda da tabela 3.

	V12044	V11146	V4019	V4020	V8262
V12044	-				
V11146	0,73	-			
V 4019	0,71	0,85	-		
V 4020	0,60	0,60	0,57	-	
V 8262	0,36	0,27	0,31	0,55	-

$\bar{S}_J = 0,55$

Tabela 5: Relacionamento entre os indivíduos pertencentes à *P.dilatatum* Torres armado. Detalhes: ver legenda da tabela 3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1)V12000	-								
2)V12005	0,60	-							
3)V12003	0,87	0,60	-						
4)V12020	0,79	0,40	0,79	-					
5)V12021	0,64	0,73	0,64	0,54	-				
6)V12023	0,86	0,57	0,86	0,77	0,75	-			
7)V8120	0,69	0,64	0,80	0,60	0,69	0,79	-		
8)V4441	0,80	0,64	0,93	0,71	0,69	0,79	0,86	-	
9)V11103	0,60	0,54	0,71	0,62	0,58	0,69	0,64	0,64	-

$S_J = 0,70$

Tabela 6: Relacionamento entre os indivíduos de *P.dilatatum* de Virasoro. 1)V12066; 2)V12068; 3)V12058; 4)V12062; 5)V12063; 6)V10717; 7)V10652; 8)V9809; 9)V12060 e 10)V12061. Detalhes: ver legenda da tabela 3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1)	-									
2)	,71	-								
3)	,69	,76	-							
4)	,67	,65	,86	-						
5)	,77	,53	,60	,57	-					
6)	,56	,40	,53	,50	,69	-				
7)	,33	,35	,40	,46	,42	,46	-			
8)	,36	,29	,43	,50	,45	,50	,86	-		
9)	,38	,31	,36	,42	,50	,42	,71	,83	-	
10)	,50	,50	,56	,64	,50	,53	,50	,55	,45	-

$S_J = 0,53$

Tabela 7: Relacionamento entre os indivíduos pertencentes à *P.dilatatum* de Vacaria. 1)V11966; 2)V11974; 3)V11987; 4)V11977; 5)V11989; 6)V11997; 7)V12015; 8)V12032; 9)V12035; 10)V12051 e 11)V10811. Detalhes: ver legenda tabela 3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1) -											
2) ,60	-										
3) ,56	,75	-									
4) ,56	,75	1,0	-								
5) ,47	,50	,73	,73	-							
6) ,57	,64	,73	,73	,78	-						
7) ,69	,64	,60	,60	,50	,62	-					
8) ,50	,67	,91	,91	,80	,64	,53	-				
9) ,65	,60	,67	,67	,57	,47	,59	,71	-			
10) ,73	,69	,64	,64	,54	,67	,92	,57	,63	-		
11) ,50	,55	,64	,64	,67	,67	,54	,70	,50	,58	-	

$$\bar{S}_J = 0,65$$

Tabela 8: Relacionamento entre os indivíduos pertencentes à forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei*. 1)V11955; 2)V11959; 3)V11962; 4)V11964; 5)V11965; 6)V11968; 7)V11978; 8)V11980; 9)V11991; 10)V12019 e 11)V12046. Detalhes: ver legenda da tabela 3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1)	-										
2)	,60	-									
3)	,55	,73	-								
4)	,50	,54	,75	-							
5)	,42	,46	,67	,50	-						
6)	,46	,62	,57	,44	,57	-					
7)	,38	,54	,62	,47	,50	,53	-				
8)	,50	,54	,62	,57	,40	,44	,47	-			
9)	,64	,67	,62	,57	,40	,53	,57	,83	-		
10)	,50	,67	,62	,47	,50	,64	,83	,57	,69	-	
11)	,50	,54	,75	,57	,75	,53	,69	,57	,57	,69	-

$\bar{S}_J = 0,57$

Tabela 9: Relacionamento entre os indivíduos de *P.urvillei*. Detalhes: ver legenda da tabela 3.

	V11970	V12001	V12004	V12011	V12017	V12028	V12048	V12057	V12067
V11970	-								
V12001	0,53	-							
V12004	1,00	0,53	-						
V12011	0,56	0,67	0,56	-					
V12017	0,53	0,56	0,53	0,88	-				
V12028	0,47	0,58	0,47	0,78	0,88	-			
V12048	0,54	0,67	0,54	0,59	0,56	0,59	-		
V12057	0,57	0,50	0,57	0,71	0,80	0,81	0,71	-	
V12067	0,53	0,65	0,53	0,76	0,75	0,67	0,67	0,69	-

$\bar{S}_J = 0,64$

Tabela 10: Relacionamento os indivíduos pertencentes à forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii*. Detalhes: ver legenda da tabela 3.

=====

	V12016	V12007	V12014	V12040	V12047	V12064	V12008	V11234	V12075
V12016	-								
V12007	0,54	-							
V12014	1,00	0,54	-						
V12040	0,73	0,60	0,73	-					
V12047	0,64	0,62	0,64	0,59	-				
V12064	0,38	0,43	0,38	0,37	0,53	-			
V12008	0,21	0,25	0,21	0,17	0,20	0,31	-		
V11234	0,33	0,40	0,33	0,25	0,31	0,23	0,22	-	
V12075	0,46	0,55	0,46	0,35	0,54	0,58	0,17	0,30	-

=====

Tabela 11: Relacionamento entre os indivíduos pertencentes à *P.juergensii*. Detalhes: ver legenda da tabela 3.

```

=====
                V11963 V12054 V12065 V4383 V12043
=====
V11963          -
V12054    0,47      -            $\bar{S}_J = 0,52$ 
V12065    0,70     0,64      -
V4383     0,29     0,47     0,44      -
V12043    0,54     0,63     0,62     0,44      -
=====

```

Tabela 12: Relacionamento entre os indivíduos de *P.intermedium*. Detalhes: ver legenda da tabela 3.

```

=====
                V11840 V11849
=====
V11840          -            $\bar{S}_J = 0,23$ 
V11849    0,23
=====

```


O menor índice de similaridade entre pares de indivíduos deste biótipo foi de 0,53, que é ainda bastante alto se compararmos com os demais valores obtidos pelas entidades analisadas. Como pode ser visto na figura 3, *P.dilatatum* anteras roxas apresenta seis bandas (Mrs 0,56-0,70; 1,00-1,00; 1,08-1,10; 2,00-2,55; 2,08-2,70 e 2,48-3,20) que apareceram em todos os indivíduos analisados, sendo que estas mesmas aparecem, em geral, nos três tecidos analisados. Outras bandas (Mrs 0,64-0,70; 0,80-0,85 e 1,92-2,45) também aparecem em frequências altas, refletindo o alto grau de similaridade entre os indivíduos deste biótipo. *P.dilatatum* anteras roxas apresentou somente três bandas raras (Mrs 0,50-0,54 ; 1,79-2,36 e 2,20-2,80) dentre as dezessete analisadas.

P.dilatatum Torres armado, como já citado, também apresentou o maior índice médio de similaridade de Jaccard ($\bar{S}_J=0,70$; tabela 5), variando de $S_J=0,93$ a $S_J=0,40$ entre pares de indivíduos, sendo que estes índices contrariam a correlação que ocorre em geral, quanto à menor distribuição geográfica, maior a similaridade entre os organismos, pois $S_J=0,93$ ocorre entre V4441 e V12003, sendo que estes indivíduos são coletados de municípios

relativamente distantes e o índice 0,40 ocorre entre V12020 e V12005, indivíduos coletados no mesmo município (ver tabela 1). Como pode ser visto na figura 5, das dezesseis bandas analisadas para este grupo taxonômico, cinco (Mrs 0,56-0,64; 1,00-1,00; 1,08-1,10; 2,00-2,55 e 2,48-3,20) apresentaram uma freqüência de 100% entre seus indivíduos. Várias outras (Mrs 0,64-0,80; 0,80-0,85; 0,95-0,97; 1,15-1,17 e 2,08-2,70) também apresentaram freqüências bastante altas. Para este biótipo, somente duas bandas foram raras (Mrs 0,54-X e 0,70-0,83). Este dado aliado ao grande número de bandas bastante freqüentes, demonstra uma alta similaridade entre os indivíduos deste biótipo.

P.dilatatum de Vacaria apresentou um alto índice de similaridade de Jaccard ($S_J=0,65$; tabela 7). Conforme pode ser observado na figura 7, das vinte bandas detectadas para o grupo, cinco (Mrs 0,56-0,64; 1,00-1,00; 1,08-1,10; 2,00-2,55 e 2,08-2,70) apareceram em todos os indivíduos e outras três (Mrs 0,64-0,80; 0,80-0,85 e 2,48-3,20) também apresentaram uma freqüência alta. Este biótipo apresentou sete bandas raras (Mrs 0,22-0,30; 0,48-0,51; 0,50-0,54; 0,87-0,95; 0,95-0,97; 1,18-1,24 e 2,10-2,74), com exceção das bandas de Mrs 0,50-0,54 e 0,95-0,97, as demais aparecem

uma única vez, o que demonstra diferenças entre os indivíduos, apesar do alto índice de similaridade de Jaccard encontrado para este biótipo.

P. urvillei apresentou um índice de similaridade relativamente alto ($\bar{S}_J=0,64$). Dois indivíduos (V11970 e V12004) apresentaram padrões idênticos, mesmo sendo originários de municípios diferentes. O menor índice de similaridade encontrado entre os indivíduos foi de $S_J=0,47$. Quatro das vinte e cinco bandas analisadas para esta espécie apresentaram uma frequência total entre seus indivíduos (Mrs 0,56-0,70; 1,00-1,00; 1,08-1,10 e 2,48-3,20) e outras quatro ocorrem em altas frequências (Mrs 0,80-0,95; 1,92-2,45; 2,00-2,55 e 2,08-2,70). Oito bandas são raras (Mrs 0,48-X; 0,70-0,83; 1,15-1,17; 1,72-2,29; 1,76-2,33; 1,85-X; 2,01-2,68 e 2,10-2,74), sendo que cinco destas pertencem a um único indivíduo (V12079). Estes dados podem ser observados na tabela 9 e na figura 9.

A forma morfológicamente intermediária entre *P. dilatatum* e *P. urvillei* apresentou um índice médio de similaridade de Jaccard intermediário ($\bar{S}_J=0,57$; tabela 8), com uma variação de 0,83 a 0,38 entre pares de indivíduos. Conforme pode ser visto na figura 8, das onze bandas detectadas para este

grupo taxonômico, somente três (Mrs 0,56-0,64; 1,08-1,10 e 2,00-2,55) apareceram em todos os indivíduos, mas outras quatro bandas apresentaram uma alta frequência (Mrs 0,80-0,85; 1,00-1,00; 2,08-2,70 e 2,48-3,20), o que demonstra uma similaridade relativamente alta entre os indivíduos amostrados. Das dezenove bandas analisadas, seis foram raras (Mrs 0,50-0,54; 0,70-0,83; 0,95-0,97; 1,15-1,17; 1,39-1,35 e 2,10-2,74).

P.dilatatum Torres típico obteve um índice de similaridade de valor médio ($\bar{S}_J=0,55$; tabela 4), variando de 0,85 a 0,27 entre pares de indivíduos, sendo que o índice de 0,85 foi encontrado para os indivíduos V4019 e V11146, plantas coletadas em localidades diferentes. De dezesseis bandas analisadas, quatro (Mrs 0,56-0,64; 1,00-1,00; 2,00-2,55 e 2,48-3,20) estiveram presentes em todos os seus indivíduos e na maioria dos casos presentes em todos os tecidos e outras três (Mrs 0,54-X; 1,08-1,10; 1,15-1,17) apareceram em quase todos os indivíduos analisados. Apresentou duas bandas raras (Mrs 0,44-0,49 e 0,50-0,64). (Ver figura 4).

P.dilatatum de Virasoro apresentou um índice de similaridade de Jaccard de valor intermediário ($\bar{S}_J=0,53$;

tabela 6). Encontrou-se uma grande variação nas comparações entre as plantas, com os limites de 0,86 a 0,29. Como demonstra a figura 6, de vinte bandas analisadas para este grupo, cinco (Mrs 0,56-0,64; 1,00-1,00; 2,00-2,55; 2,08-2,70 e 2,48-3,20) apareceram em todos os indivíduos estudados. Este biótipo apresentou cinco bandas raras (Mrs 0,54-X; 0,70-0,83; 1,15-1,17; 2,20-2,80 e 2,26-3,00).

A forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii* apresentou um índice de similaridade também intermediário ($S_J=0,53$; tabela 10). Na comparação entre as plantas duas a duas, encontrou-se uma similaridade total nos padrões de V12014 e V12016, provenientes de uma mesma localidade, e apresentou similaridades muito baixas entre outros pares de indivíduos. Destaca-se a planta V12008 que apresentou baixos índices de similaridade com todos os outros indivíduos analisados ($S_J=0,31$ a $0,17$), inclusive com V12007 a qual pertence à mesma população. Conforme pode ser observado na figura 10, das vinte e duas bandas analisadas para este grupo, somente uma (Mrs 2,00-2,55) apareceu em todos os indivíduos e seis (Mrs 0,56-0,64; 0,64-0,80; 1,00-1,00; 1,08-1,10; 2,08-2,70 e 2,48-3,20) apareceram na maioria dos indivíduos analisados para esta entidade. O

biótipo apresentou quatro bandas que só apareceram em um único indivíduo (Mrs 0,67-X; 0,98-X; 1,05-X e 1,39-1,35), sendo que três delas só apareceram em uma condição de revelação, e outras três bandas também raras (Mrs 0,22-0,30; 0,70-0,83 e 0,87-0,95). Este menor número de bandas com freqüências altas e alto número de bandas raras retrata uma menor similaridade entre os indivíduos desta entidade taxonômica.

P. juergensii apresentou um índice de similaridade médio de ($\bar{S}_J=0,52$), com uma variação de 0,29 a 0,70 quando comparou-se os indivíduos dois a dois, como pode ser visto na tabela 11. Conforme demonstra a figura 11, das vinte e duas bandas analisadas para esta espécie, cinco (Mrs 0,56-0,70; 0,64-0,80; 2,01-2,68; 2,10-2,74 e 2,48-3,20) apresentaram-se em todos os indivíduos e outra três (Mrs 0,80-0,85; 1,05-X e 1,10-X) apresentaram uma alta freqüência entre os indivíduos. O biótipo apresentou o maior número de bandas raras, num total de 11 (Mrs 0,48-0,51; 0,54-X; 0,95-0,97; 1,00-1,00; 1,08-1,10; 1,15-1,17; 1,92-2,45; 2,20-2,80; 2,22-X; 2,26-3,00 e 2,32-3,12). Estes dados retratam uma alta variação gênica entre os indivíduos desta espécie.

P. intermedium apresentou o menor índice de similaridade

de Jaccard ($\bar{S}_J=0,23$; tabela 12), mas este resultado pode ser devido ao pequeno número de indivíduos da amostra analisada. Pelo mesmo motivo, não consideramos nenhuma banda rara para esta espécie, pois o aparecimento de uma banda em apenas um indivíduo implicaria em 50% da amostra. A divergência isoenzimática entre os dois indivíduos analisados foi bastante grande, pois das onze bandas analisadas para esta espécie, apenas quatro (Mrs 0,56-0,64; 1,00-1,00; 2,00-2,55 e 2,08-2,70) apareceram nos dois indivíduos. Estes dados podem ser observados na figura 12.

Para poder comparar melhor o grau de relacionamento entre os indivíduos de cada entidade taxonômica, foram construídos fenogramas. Para isto, além do coeficiente de similaridade de Jaccard, foram calculadas duas medidas de distância entre os indivíduos analisados: distância Manhattan e distância Euclidiana. Foram construídos três fenogramas, utilizando para cada um, uma destas medidas. A unidade operacional, OTU, foi o indivíduo, e os caracteres (binários) foram as bandas peroxidásicas com dois estados: presente (1) e ausente (0). Os agrupamentos foram feitos pelo método UPGMA. Como os fenogramas obtidos com as diferentes análises foram muito semelhantes, é apresentado apenas o fenograma obtido

com a distância Manhattan e os demais são citados em casos em que há interesse. Este fenograma foi escolhido para ser apresentado por ter sido o que promoveu maior número de agrupamentos entre indivíduos pertencentes á uma mesma entidade taxonômica. Mesmo assim, conforme pode ser visto na figura 13, observa-se uma grande dispersão entre indivíduos da mesma espécie ou biótipo.

P.dilatatum anteras roxas e *P.dilatatum* Torres armado, apresentaram o maior índice médio de similaridade de Jaccard ($\bar{S}_j = 0,70$), e apresentaram bastante agrupamentos entre seus indivíduos nos fenogramas. Entretanto, mesmo estas entidades não formam agrupamentos envolvendo apenas indivíduos de seu próprio taxon. *P.dilatatum* anteras roxas apresenta seus indivíduos concentrados em dois grandes agrupamentos. Um deles reúne três indivíduos deste biótipo junto com outros três de *P.dilatatum* de Vacaria, um de *P.dilatatum* de Virasoro e dois da forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei*. O segundo agrupamento reúne seis indivíduos de *P.dilatatum* anteras roxas e dois da forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii*. Confirmando os resultados do coeficiente de similaridade de Jaccard para o biótipo

anteras roxas, alguns pares de indivíduos apresentaram distância Manhattan e Euclidiana igual a zero, ou seja, apresentaram uma similaridade total em seus padrões peroxidásicos. *P.dilatatum* Torres armado formou um grande agrupamento de sete indivíduos, no total dos oito analisados, reunidos junto com um de *P.dilatatum* de Virasoro e um de *P.dilatatum* Torres típico.

P.juergensii, apesar de ter apresentado um baixo índice médio de similaridade de Jaccard ($\bar{S}_J = 0,52$), formou um agrupamento englobando quatro dos cinco indivíduos amostrados. Este agrupamento foi o último a se reunir aos demais grupos, indicando um maior afastamento de *P.juergensii* com relação às demais entidades analisadas.

Outros agrupamentos envolvendo um número considerável de indivíduos do mesmo biótipo foram formados por cinco indivíduos de *P.urvillei*, um outro formado por também cinco indivíduos da forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* e *P.dilatatum* anteras amarelas de Vacaria formou dois agrupamentos envolvendo três e quatro indivíduos. Entretanto, em nenhum destes houve a reunião exclusiva de indivíduos de uma mesma entidade taxonômica. O maior agrupamento de *P.dilatatum* de Virasoro envolveu quatro

indivíduos juntos com outros de diferentes entidades e as demais seis plantas analisadas ficaram dispersas no fenograma. Os indivíduos de *P.dilatatum* Torres típico, bem como da forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii*, praticamente não se agruparam. Também *P.intermedium* não agrupou seus dois indivíduos em nenhum dos fenogramas feitos, ficando os mesmos juntos com indivíduos morfológicamente intermediários entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* e entre *P.urvillei* e *P.juergensii*.

Os fenogramas construídos a partir da distância Euclidiana e pelo coeficiente de similaridade de Jaccard, apresentaram o mesmo padrão de agrupamentos entre os indivíduos amostrados, mantendo a característica de não agrupar somente indivíduos pertencentes a uma única entidade taxonômica.

3.1.2. Diferenciação Intertaxonômica

Para melhor avaliar as diferenças entre as espécies e biótipos analisados do gênero *Paspalum*, reunimos os padrões gerais de cada entidade taxonômica com a frequência de cada banda na figura 14.

No sistema isoenzimático das peroxidases, o número de bandas por entidade variou de onze a vinte e cinco, correspondendo respectivamente à *P.intermedium* e *P.urvillei*, com um total de trinta e quatro bandas no gênero, considerando as entidades analisadas.

A partir destes padrões foi elaborada a tabela 13, a qual caracteriza cada uma das entidades taxonômicas quanto à presença (+) ou ausência (-) de cada uma das bandas peroxidásicas detectadas neste estudo. Estão em destaque (*), as bandas que foram presentes em todas as entidades.

Como pode ser visto na tabela 13 e figura 14, dentre as 34 bandas existentes para o sistema das peroxidases, somente quatro bandas (Mrs 0,44-0,49; 0,56-0,64; 0,80-0,85 e 1,00-1,00) foram comuns a todas as entidades. No entanto, nenhuma destas bandas ocorreu em todos os indivíduos analisados. A única banda que apareceu em praticamente todos os indivíduos (com exceção de um) foi a banda de Mrs 0,56-0,64.

Algumas bandas como: Mrs 0,22-0,30; 0,50-0,54; 0,64-0,80; 0,95-0,97; 1,08-1,10; 1,92-2,45; 2,00-2,55; 2,08-2,70; 2,32-3,08 e 2,48-3,20 apresentaram uma alta freqüência entre as entidades taxonômicas, aparecendo em pelo menos oito

espécies ou biótipos analisados. (Vide tabela 13 e figura 14).

Do total de dez espécies, biótipos ou formas morfológicamente intermediárias estudadas, apenas cinco entidades mostraram bandas específicas. As bandas de Mrs 0,67-X e 0,98-X só ocorreram na forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii*; as bandas de Mrs 1,10-X e 2,22-X foram específicas de *P.juergensii*; as de Mrs 1,72-2,29 e 1,85-X só ocorreram em *P.urvillei*; a de Mrs 1,79-2,36 ocorreu em *P.dilatatum* anteras roxas e a de Mrs 1,18-1,24 em *P.dilatatum* de Vacaria (ver tabela 13 e figura 14). Entretanto essas bandas não caracterizam cada uma dessas entidades porque sempre ocorreram em apenas um único indivíduo da mesma. A única exceção é a banda de Mr 1,10-X que ocorreu em quatro dos cinco indivíduos de *P.juergensii*.

Outras bandas, tais como: Mrs 1,05-X; 1,39-1,35; 1,76-2,33; 2,01-2,68 e 2,26-3,00) também são bandas raras no gênero mas estas aparecem em pelo menos duas ou três entidades taxonômicas. Estes dados também podem ser observados na figura 14 e na tabela 13.

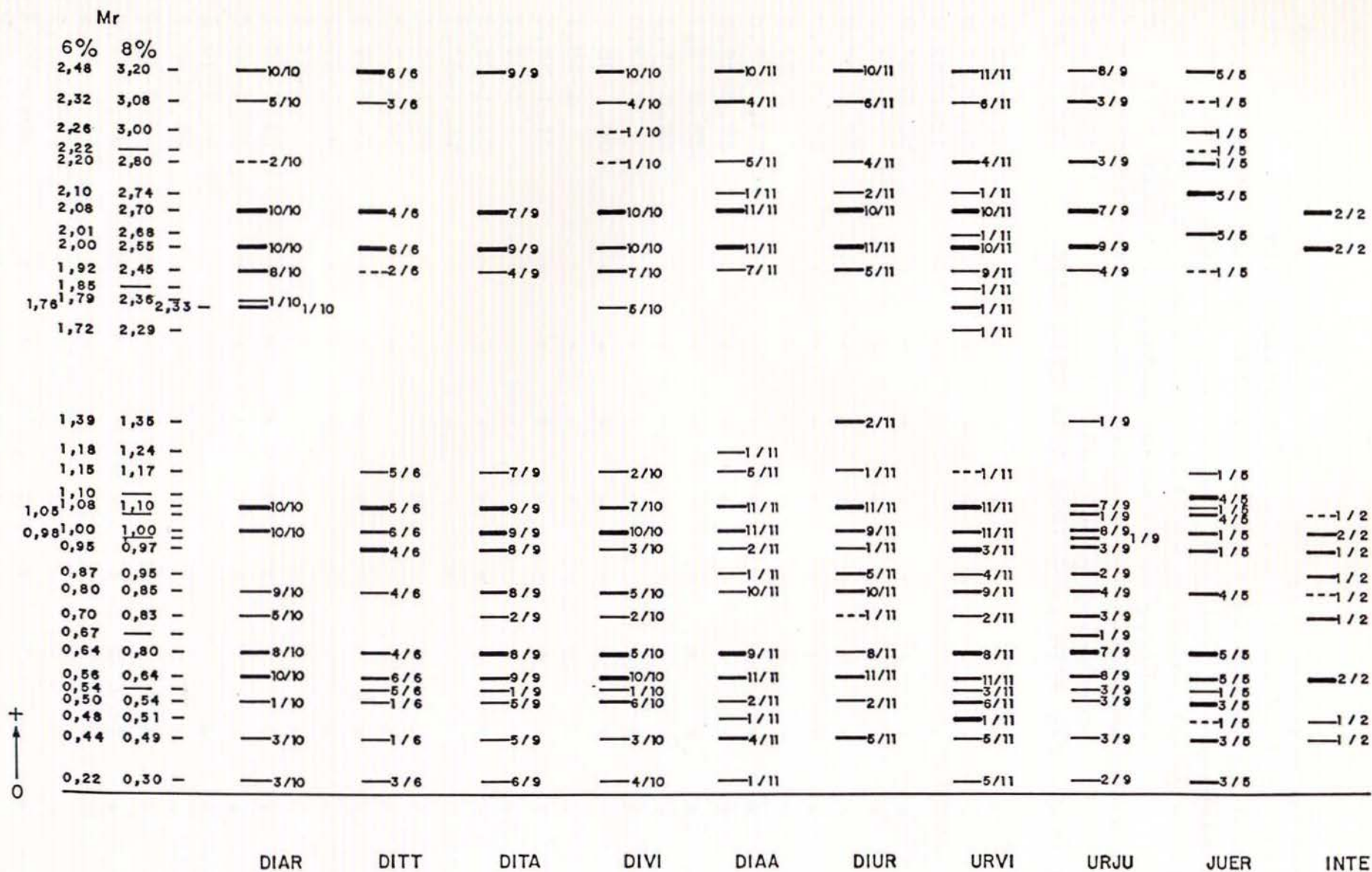


Figura 14: Padrões peroxidásicos gerais das espécies e biótipos analisados do gênero *Paspalum*. Ao lado de cada banda é dada a freqüência em que a mesma ocorreu em cada entidade taxonômica. A abreviatura das entidades estão conforme a tabela 1 e demais detalhes, ver legenda da figura 3.

Tabela 13: Caracterização das espécies e biótipos analisados do gênero *Paspalum* quanto à presença (+) ou ausência (-) das bandas peroxidásicas detectadas nas três partes da folha de indivíduos adultos de cada entidade taxonômica. A abreviatura dos nomes das entidades estão conforme a tabela 1. (*) = bandas presentes em todas as entidades.

Bandas(Mrs)		Entidades Taxonômicas										
6%	8%	DIAR	DITT	DITA	DIVI	DIAA	DIUR	URVI	URJU	JUER	INTE	
0,22-0,30		+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	
0,44-0,49		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*
0,48-0,51		-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	
0,50-0,54		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
0,54-X		-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	
0,56-0,64		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*
0,64-0,80		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
0,67-X		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
0,70-0,83		+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	
0,80-0,85		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*
0,87-0,95		-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	
0,95-0,97		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
0,98-X		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
1,00-1,00		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*
1,05-X		-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
1,08-1,10		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
1,10-X		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
1,15-1,17		-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
1,18-1,24		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
1,39-1,35		-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	
1,72-2,29		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
1,76-2,33		+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	
1,79-2,36		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1,85-X		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
1,92-2,45		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
2,00-2,55		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
2,01-2,68		-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	
2,08-2,70		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
2,10-2,74		-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	
2,20-2,80		+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	
2,22-X		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
2,26-3,00		-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	
2,32-3,08		+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	
2,48-3,20		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

Na tabela 14 são apresentados os coeficientes de similaridade médios de Jaccard (\bar{S}_J) entre as diferentes entidades taxonômicas analisadas, obtidos pela média dos coeficientes de similaridades entre pares de indivíduos de entidades taxonômicas distintas, duas a duas. O índice de similaridade médio entre os biótipos de *P.dilatatum* foi de $\bar{S}_J=0,56$, com uma variação de $S_J=0,50$ entre *P.dilatatum* de Virasoro e *P.dilatatum* Torres típico a 0,65 entre *P.dilatatum* de Vacaria e *P.dilatatum* anteras roxas.

A similaridade entre os dois biótipos de *P.dilatatum* de Torres (Torres típico e Torres armado) foi alta ($\bar{S}_J=0,59$), mas dentro dos limites encontrados para os demais biótipos de *P.dilatatum*.

O índice médio de similaridade de Jaccard intertaxonômico dos biótipos de *P.dilatatum* com as demais entidades estudadas é de $\bar{S}_J=0,44$ e o índice médio de todo o gênero é de $\bar{S}_J=0,45$. Como pode ser visto na tabela 14, todos os pares de espécies e biótipos apresentam índices de similaridade bastante altos, excetuando-se as duas espécies diplóides, *P.juergensii* e *P.intermedium* que são nitidamente as mais diferenciadas.

Estes dados foram reorganizados na tabela 15, na qual são

apresentados, para cada espécie, em ordem decrescente, os três maiores e os três menores coeficientes de similaridades, além do coeficiente médio (\bar{S}_J) que cada entidade apresenta com todas as demais analisadas do gênero.

Os maiores índices de similaridade obtidos entre pares de entidades taxonômicas analisadas envolvem o biótipo *P.dilatatum* anteras roxas, sendo que o maior \bar{S}_J foi entre este e *P.dilatatum* de Vacaria ($\bar{S}_J = 0,65$). O menor índice de similaridade de Jaccard foi entre *P.juergensii* e *P.intermedium* ($\bar{S}_J = 0,14$), seguido por $S_J = 0,24$ para *P.juergensii* e a forma morfológicamente intermediária entre este e *P.urvillei*.

Como pode ser visto na tabela 15, *P.dilatatum* anteras roxas apresentou o maior índice de similaridade médio intertaxonômico ($\bar{S}_J = 0,52$) e *P.juergensii* apresentou o menor ($\bar{S}_J = 0,26$). Também pode-se observar que *P.urvillei* apresenta altos índices de similaridade com praticamente todos os biótipos de *P.dilatatum*, sendo às vezes mais similar com eles do que alguns pares de biótipos da espécie *P.dilatatum* entre si. A forma intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* apresentou grande similaridade tanto com *P.dilatatum* de Vacaria (0,61) como com *P.urvillei*

(0,56).

A forma intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii* foi bastante similar à *P.urvillei* ($S_J=0,52$), mas foi com *P.juergensii* que apresentou o menor índice de similaridade ($S_J=0,24$).

Foram feitos fenogramas das diferentes entidades taxonômicas analisadas, utilizando como OTU, a espécie ou biótipo comparados pela frequência das bandas peroxidásicas detectadas em cada entidade. As medidas utilizadas foram distância Manhattan e distância Euclidiana.

Na figura 15 é apresentado o fenograma obtido através de distância Manhattan. Neste fenograma, *P.dilatatum* de Vacaria agrupou-se com a forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* e a este agrupamento ligou-se *P.dilatatum* anteras roxas, seguido por *P.urvillei*, a forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii*, *P.dilatatum* de Virasoro e o agrupamento já formado entre *P.dilatatum* Torres típico e Torres armado.

P.intermedium e *P.juergensii* foram os últimos a se ligarem a todo o grupo com distâncias genéticas bastante elevadas, como podemos verificar na figura 15.

Tabela 14: Coeficientes de similaridade médios de Jaccard (\bar{S}_J) intertaxonômico, obtidos pela média dos coeficientes entre pares de indivíduos pertencentes a entidades taxonômicas distintas para os dados das peroxidases. Em destaque, é dado o coeficiente de similaridade médio intertaxonômico para o gênero como um todo, o índice de similaridade médio entre os biótipos de *P.dilatatum*, e o índice de similaridade entre os mesmos e as demais espécies estudadas.

	DIAR	DITT	DITA	DIVI	DIAA	DIUR	URVI	URJU	JUER	INTE
DIAR	-									
DITT	0,53	-								
DITA	0,58	0,59	-							
DIVI	0,58	0,50	0,55	-						
DIAA	0,65	0,53	0,54	0,55	-					
DIUR	0,61	0,48	0,53	0,51	0,61	-				
URVI	0,63	0,54	0,60	0,57	0,60	0,56	-			
URJU	0,54	0,46	0,45	0,47	0,52	0,50	0,52	-		
JUER	0,28	0,27	0,32	0,25	0,29	0,28	0,30	0,24	-	
INTE	0,31	0,27	0,31	0,31	0,32	0,33	0,30	0,29	0,14	-

\bar{S}_J do gênero = 0,45										
=====										

$\bar{S}_{J(1)}$ = coeficiente de similaridade médio entre os biótipos de *P.dilatatum*.

$\bar{S}_{J(2)}$ = coeficiente de similaridade médio entre os biótipos de *P.dilatatum* e demais entidades do gênero.

Tabela 15: Relacionamento entre as espécies e biótipos de *Paspalum* baseado nos maiores e menores índices de similaridades apresentados na tabela 14. \bar{S}_J = coeficiente de similaridade médio global da entidade com todas as demais analisadas. As abreviaturas dos nomes das entidades taxonômicas estão conforme a tabela 1.

ENTIDADE	\bar{S}_J	ENTIDADES MAIS RELACION.	ENTIDADES MENOS RELACION.
DIAR	0,52	,65:DIAA ,63:URVI ,61:DIUR	,53:DITT ,31:INTE ,28:JUER
DITT	0,46	,59:DITA ,54:URVI ,53:DIAA	,46:URJU ,27:JUER ,27:INTE
DITA	0,50	,60:URVI ,59:DITT ,58:DIAR	,45:URJU ,32:JUER ,31:INTE
DIVI	0,48	,58:DIAR ,57:URVI ,55:DIAA	,47:URJU ,31:INTE ,25:JUER
DIAA	0,51	,65:DIAR ,61:DIUR ,60:URVI	,52:URJU ,32:INTE ,29:JUER
DIUR	0,49	,61:DIAA ,61:DIAR ,56:URVI	,48:DITT ,33:INTE ,28:JUER
URVI	0,51	,63:DIAR ,60:DIAA ,60:DITA	,52:URJU ,30:JUER ,30:INTE
URJU	0,44	,54:DIAR ,52:DIAA ,52:URVI	,45:DITA ,29:INTE ,24:JUER
JUER	0,26	,32:DITA ,30:URVI ,29:DIAA	,25:DIVI ,24:URJU ,14:INTE
INTE	0,29	,33:DIUR ,32:DIAA ,31:DIVI	,29:URJU ,27:DITT ,14:JUER

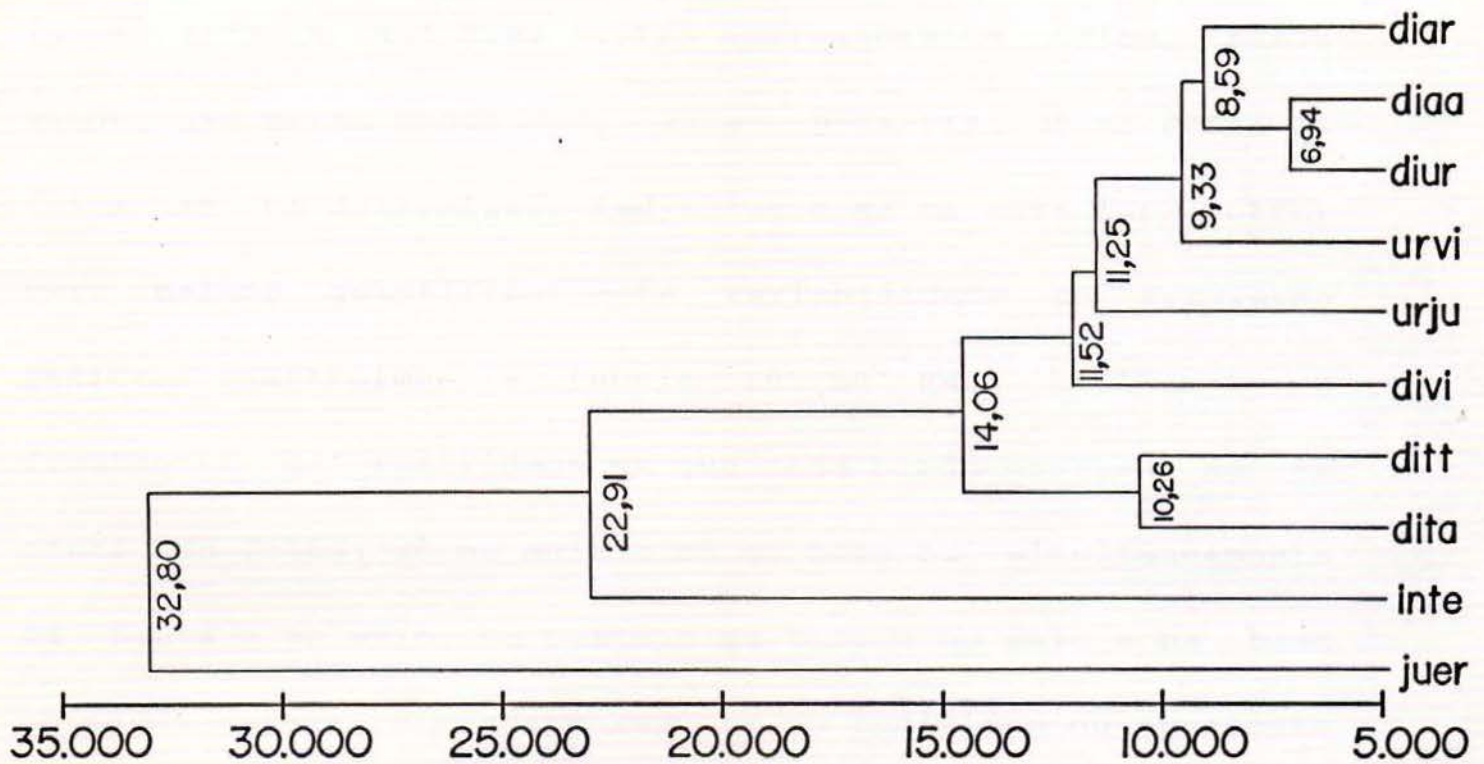


Figura 15: fenograma obtido através de freqüências de bandas isoperoxidásicas apresentadas pelas entidades taxonômicas analisadas do gênero *Paspalum*. Análise feita a partir de distância Manhattan e método de agrupamento UPGMA.

3.1.3 Regulação Tissular

Quanto à regulação tissular, observou-se uma grande variação no padrão de atuação dos loci que controlam as isoperoxidasas nas três partes analisadas da folha. Assim sendo, uma mesma banda pode estar presente só na ponta da folha em um determinado indivíduo e só na base de outro. Para melhor quantificar esta variabilidade na regulação gênica, construímos a tabela 16 na qual mostramos a freqüência de indivíduos em que cada banda ocorreu só na ponta da folha, só no meio e só na base ou simultaneamente na ponta e no meio, na ponta e na base e no meio e na base ou ainda estava totalmente ausente no indivíduo ou presente nos três tecidos simultaneamente. Como pode ser visto na tabela 16, a variação é muito grande. Cinco bandas (Mrs 0,56-0,64; 1,00-1,00; 1,08-1,10; 2,00-2,55 e 2,40-3,20) ocorreram simultaneamente nas três partes da folha em 50% ou mais dos indivíduos analisados. Mas mesmo nesses casos, alguns outros indivíduos apresentaram estas mesmas bandas restritas a um ou dois tecidos. Assim, por exemplo, a banda de Mrs 2,00-2,55, uma banda forte e de fácil detecção, ocorreu nas três partes da folha em 78% dos indivíduos

analisados, mas só ocorreu na base de 4% dos indivíduos, na ponta e meio de outros 4%, na ponta e base de 1%, no meio e base simultaneamente de 6% e não foi detectada em 7% dos indivíduos analisados.

Com exceção das bandas raras, as quais apareceram uma única vez, não obtivemos bandas que não tenham aparecido nos três tecidos pelo menos uma vez. Sendo assim, não foi possível detectar alguma banda específica de um determinado tecido, apesar de que as bandas 0,22-0,30; 0,44-0,49; 0,64-0,80 e 2,20-2,80 apareceram preferencialmente na ponta.

Tabela 16: Apresentação de todas as bandas isoperoxidásicas detectadas nas entidades taxonômicas analisadas do gênero *Paspalum* com suas respectivas frequências obtidas a partir do número de vezes que cada banda apareceu em determinado(s) tecido(s) pelo número total de indivíduos analisados. P = ponta; M =meio e B =base.

Banda	P	M	B	P-M	P-B	M-B	P-M-B	Ausente
0,22-0,30	0,24	0,01	0,01	0,01	0,05	-	-	0,68
0,44-0,49	0,17	0,01	0,09	0,04	0,07	0,01	-	0,61
0,48-0,51	-	-	-	-	0,04	-	0,01	0,95
0,50-0,54	0,05	0,02	0,08	0,01	0,01	0,04	0,13	0,65
0,54-X	-	-	0,05	-	0,01	0,04	0,07	0,83
0,56-0,64	-	-	0,01	-	-	0,12	0,86	0,01
0,64-0,70	0,43	0,05	0,02	0,07	0,08	0,04	0,05	0,26
0,67-X	-	-	0,01	-	-	-	-	0,99
0,70-0,83	0,04	-	0,06	-	0,02	0,05	0,01	0,82
0,80-0,85	0,17	0,01	0,06	0,05	0,13	0,05	0,30	0,24
0,87-0,95	0,01	0,04	0,02	0,01	0,01	0,04	0,02	0,84
0,95-0,97	0,04	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,12	0,69
0,98-X	-	-	-	-	0,01	-	-	0,99
1,00-1,00	-	0,01	0,04	0,01	0,01	0,07	0,77	0,08
1,05-X	0,01	-	-	-	-	0,01	0,05	0,93
1,08-1,10	0,05	0,02	0,01	0,08	0,01	0,08	0,60	0,14
1,10-X	-	-	-	-	-	0,01	0,04	0,95
1,15-1,17	0,06	0,01	0,01	0,01	-	0,04	0,13	0,74
1,18-1,24	0,01	-	-	-	-	-	-	0,99
1,39-1,35	0,01	-	-	0,01	0,01	-	-	0,97
1,72-2,29	0,01	-	-	-	-	-	-	0,99
1,76-2,33	0,02	-	0,02	0,01	-	0,01	-	0,94
1,79-2,36	-	-	0,01	-	-	-	-	0,99
1,85-X	0,01	-	-	-	-	-	-	0,99
1,92-2,45	0,09	0,04	0,08	0,06	0,01	0,11	0,17	0,44
2,00-2,55	-	-	0,04	0,04	0,01	0,06	0,78	0,07
2,01-2,68	0,01	-	-	0,01	-	0,01	0,04	0,93
2,08-2,70	0,13	0,02	0,01	0,21	0,02	0,08	0,36	0,15
2,10-2,74	0,01	-	0,04	0,01	-	0,01	0,04	0,89
2,20-2,80	0,14	0,02	0,04	0,04	-	-	-	0,76
2,22-X	-	0,01	-	-	-	-	-	0,99
2,26-3,00	-	-	-	0,01	0,01	-	-	0,98
2,32-3,08	-	0,05	0,09	-	0,04	0,14	0,06	0,61
2,48-3,20	0,02	0,02	0,09	0,04	0,04	0,23	0,50	0,06

3.2 Superóxido dismutases

Para o sistema das superóxido dismutases, analisamos bandas anódicas e catódicas. Foram detectadas um total de vinte e seis bandas, no entanto analisamos somente vinte e duas, pois as demais não permitiram uma definição segura de sua homologia, impossibilitando uma análise segura das mesmas. Vinte destas bandas, apresentaram-se nas duas condições de revelação do gel e as outras duas só se separavam na migração em gel de 6%. Assim como para o sistema das peroxidases, foram analisadas separadamente três partes da folha adulta (ponta, meio e base).

Na figura 16 é apresentado um gel de poliacrilamida revelado para o sistema de superóxido dismutases. Neste gel utilizamos quatro indivíduos pertencentes a duas entidades taxonômicas do gênero *Paspalum*. Ao lado direito do gel estão indicadas as Mrs das principais bandas detectadas neste gel. Pode-se observar algumas diferenças regulatórias entre os diferentes tecidos analisados, e poucas diferenças entre os indivíduos, mesmo fazendo parte de entidades taxonômicas diferentes.



Figura 16: Isoenzimas de superóxido dismutases de quatro indivíduos do gênero *Paspalum*: V12019 (controle) = forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* (aplicações 1-2-3-10-11-12-19-20); V11968 = forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* (4-5-6-13-14-15); V4383 = *P.juergensii* (7-8-9) e V11955 = forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* (16-17-18). A ordem das três aplicações de cada indivíduo é ponta, meio e base da folha. As Mrs das principais bandas analisadas neste gel encontram-se ao lado direito da figura. Migração em gel de poliacrilamida 7% e tampões descritos por Roose e Gottlieb (1970).

3.2.1 Variação Intrataxonômica

Nas figuras 17 a 26 estão representados para cada entidade taxonômica, os padrões de superóxido dismutases de cada indivíduo. Ao lado de cada banda está indicado o(s) tecido(s) em que a mesma foi detectada. As Mrs de cada banda, nas duas condições de migração estão indicadas à esquerda da figura e ao lado direito, estão presentes o padrão geral da entidade e a frequência da banda na mesma. A partir dos padrões apresentados nestas figuras, foram calculados os coeficientes de similaridade de Jaccard entre os indivíduos comparados dois a dois. Estes coeficientes são apresentados nas tabelas 17 a 26, mostrando em destaque o índice médio de similaridade de Jaccard intrataxonômico.

P.dilatatum de Vacaria apresentou o mais alto índice médio de similaridade de Jaccard ($\bar{S}_J=0,69$; tabela 21), com uma variação de 0,40 a 1,00, ou seja, comparando os indivíduos dois a dois, estes compartilham no mínimo 40% de suas bandas isoenzimáticas, houve um caso em que dois indivíduos (V12015 e V11987) compartilham todas as suas bandas. O índice 0,40 ocorreu entre V11974 e V11977, plantas coletadas no mesmo município. Conforme mostra a figura 21, das quinze bandas analisadas, três apareceram em

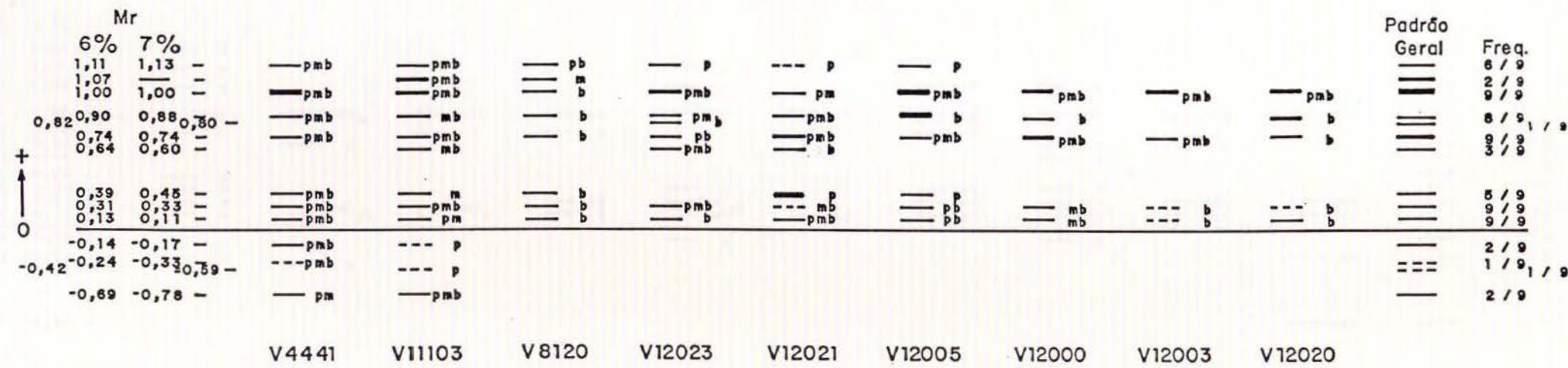


Figura 19: Padrões de superóxido dismutases dos indivíduos pertencentes à *P.dilatatum* Torres armado. Detalhes: ver legenda da figura 17.

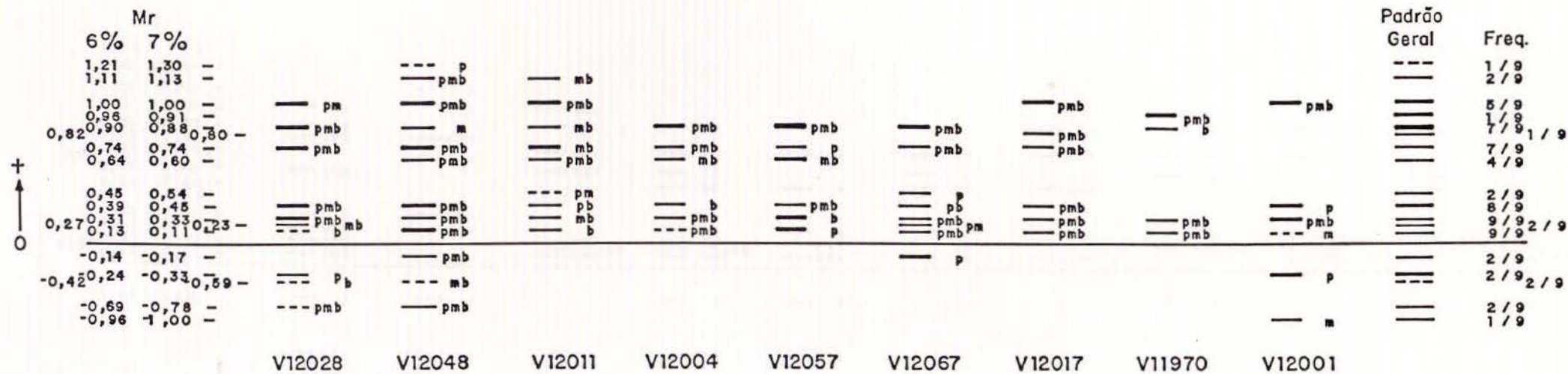


Figura 23: Padrões de superóxido dismutases dos indivíduos analisados de *P.urvillei*. Detalhes: ver legenda da figura 17.

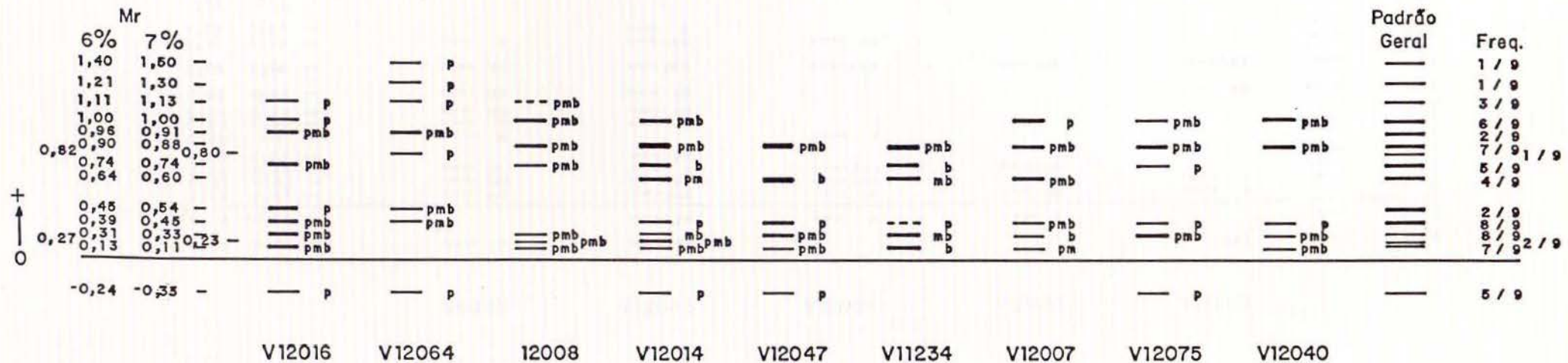


Figura 24: Padrões de superóxido dismutases dos indivíduos pertencentes à forma morfologicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii*. Detalhes: ver legenda da figura 17.

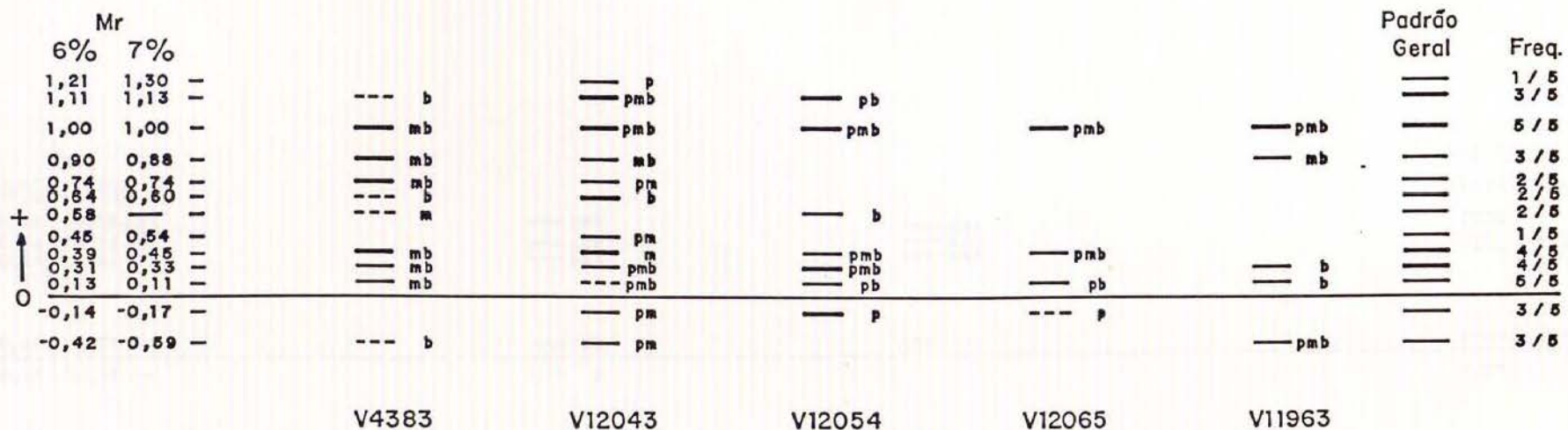


Figura 25: Padrões de superóxido dismutases dos indivíduos analisados de *P. juergensii*. Detalhes: ver legenda da figura 17.

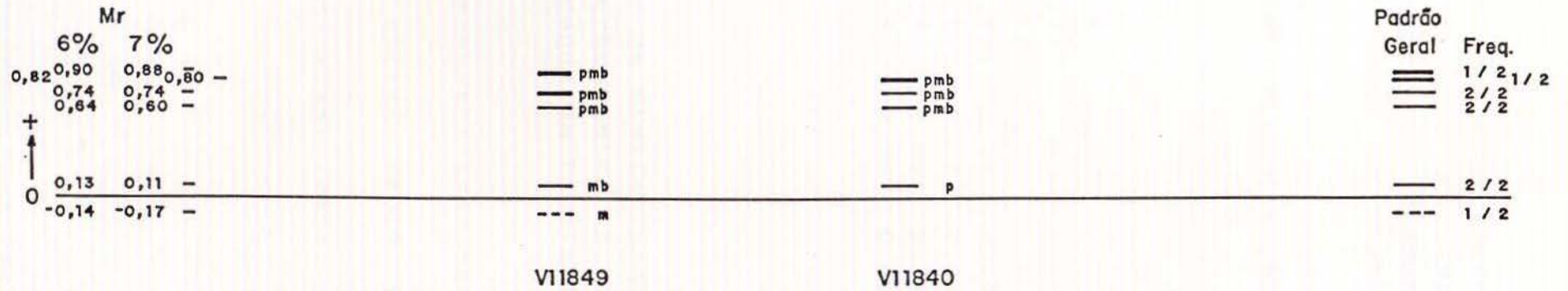


Figura 26: Padrões de superóxido dismutases dos indivíduos analisados de *P.intermedium*. Detalhes: ver legenda da figura 17.

Tabela 17: Coeficientes de similaridade de Jaccard (S_J) entre os indivíduos analisados de *P.dilatatum* anteras roxas baseados nos padrões de superóxido dismutases. Em destaque é apresentado o coeficiente médio do biótipo (S_J).

	V11958	V11961	V11967	V11995	V11996	V12018	V12030	V12031	V12070
V11958	-								
V11961	0,57	-							
V11967	0,43	0,29	-						
V11995	0,40	0,30	0,33	-					
V11996	0,71	0,38	0,67	0,40	-				
V12018	0,71	0,57	0,43	0,56	0,50	-			
V12030	0,50	0,60	0,40	0,22	0,29	0,50	-		
V12031	0,44	0,20	0,57	0,36	0,63	0,44	0,25	-	
V12070	0,63	0,50	0,57	0,36	0,63	0,44	0,43	0,40	-

$S_J = 0,46$

Tabela 18: Coeficientes de similaridade de Jaccard (S_J) entre os indivíduos pertencentes à *P.dilatatum* Torres típico. Detalhes: ver legenda da tabela 17.

	V12044	V11146	V4019	V4020	V8262
V12044	-				
V11146	0,36	-			
V 4019	0,55	0,27	-		
V 4020	0,58	0,33	0,75	-	
V 8262	0,58	0,45	0,75	0,78	-

$S_J = 0,54$

Tabela 19: Coeficientes de similaridade de Jaccard entre os indivíduos amostrados de *P.dilatatum* Torres armado.

Detalhes: ver legenda da tabela 17.

=====

	V12000	V12005	V12003	V12020	V12021	V12023	V8120	V4441	V11103
V12000	-								
V12005	0,71	-							
V12003	0,80	0,57	-						
V12020	1,00	0,71	0,80	-					
V12021	0,63	0,88	0,50	0,63	-				
V12023	0,63	0,67	0,50	0,63	0,78	-			
V 8120	0,63	0,88	0,50	0,63	0,78	0,60	-		
V 4441	0,50	0,70	0,40	0,50	0,64	0,50	0,64	-	
V11103	0,42	0,58	0,33	0,42	0,67	0,54	0,67	0,69	-

=====

$$\bar{S}_J = 0,63$$

Tabela 20: Coeficientes de similaridade de Jaccard entre os indivíduos pertencentes à *P.dilatatum* de Virasoro. 1)V12066; 2)V12068; 3)V12058; 4)V12062; 5)V12063; 6)V10717; 7)V10652; 8)V9809; 9)V12060 e 10)V12061. Detalhes: ver legenda da tabela 17.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1)	-									
2)	0,33	-								
3)	0,46	0,25	-							
4)	0,30	0,29	0,33	-						
5)	0,70	0,30	0,33	0,27	-					
6)	0,27	0,43	0,21	0,22	0,36	-				
7)	0,27	0,43	0,42	0,38	0,36	0,50	-			
8)	0,33	0,60	0,36	0,50	0,30	0,25	0,67	-		
9)	0,25	0,50	0,18	0,40	0,22	0,33	0,33	0,50	-	
10)	0,50	0,38	0,64	0,33	0,45	0,30	0,63	0,57	0,29	-

$\bar{S}_J = 0,38$

Tabela 21: Coeficientes de similaridade de Jaccard entre os indivíduos analisados de *P.dilatatum* de Vacaria. 1)V11966; 2)V11974; 3)V11987; 4)V11977; 5)V11989; 6)V11997; 7)V12015; 8)V12032; 9)V12035; 10)V12051 e 11)V10811. Detalhes: ver legenda da tabela 17.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1)	-										
2)	0,83	-									
3)	0,86	0,71	-								
4)	0,50	0,40	0,60	-							
5)	0,67	0,56	0,78	0,50	-						
6)	0,75	0,63	0,88	0,55	0,89	-					
7)	0,86	0,71	1,00	0,60	0,78	0,88	-				
8)	0,60	0,50	0,70	0,58	0,73	0,80	0,70	-			
9)	0,60	0,50	0,70	0,58	0,73	0,80	0,70	0,67	-		
10)	0,60	0,50	0,70	0,58	0,73	0,80	0,70	0,67	0,67	-	
11)	0,67	0,56	0,78	0,50	0,80	0,89	0,78	0,90	0,73	0,73	-

$$\bar{S}_J = 0,69$$

Tabela 22: Coeficientes de similaridade de Jaccard entre os indivíduos pertencentes à forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei*. 1)V11955; 2)V11959; 3)V11962; 4)V11964; 5)V11965; 6)V11968; 7)V11978; 8)V11980; 9)V11991; 10)V12019 e 11)V12046. Detalhes: ver legenda da tabela 17.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1)	-										
2)	0,75	-									
3)	0,33	0,38	-								
4)	0,75	1,00	0,38	-							
5)	0,75	1,00	0,38	1,00	-						
6)	0,64	0,60	0,47	0,60	0,60	-					
7)	0,88	0,86	0,36	0,86	0,86	0,70	-				
8)	0,60	0,75	0,43	0,75	0,75	0,64	0,67	-			
9)	0,67	0,86	0,46	0,86	0,86	0,70	0,75	0,88	-		
10)	0,62	0,46	0,47	0,46	0,46	0,77	0,54	0,62	0,54	-	
11)	0,67	0,63	0,46	0,63	0,63	0,70	0,75	0,67	0,75	0,54	-

$\bar{S}_J = 0,66$

Tabela 23: Coeficientes de similaridade de Jaccard dos indivíduos analisados de *P.urvillei*. Detalhes: ver legenda da tabela 17.

```

=====
V11970 V12001 V12004 V12011 V12017 V12028 V12048 V12057 V12067
=====
V11970      -
V12001    0,25      -
V12004    0,38    0,30      -
V12011    0,30    0,36    0,60      -
V12017    0,25    0,50    0,44    0,50      -
V12028    0,27    0,45    0,42    0,46    0,45      -
V12048    0,23    0,29    0,46    0,62    0,38    0,57      -
V12057    0,43    0,33    0,86    0,67    0,50    0,45    0,50      -
V12067    0,33    0,27    0,50    0,55    0,40    0,50    0,43    0,56      -
=====

```

$$\bar{S}_J = 0,44$$

Tabela 24: Coeficientes de similaridade de Jaccard entre os indivíduos pertencentes à forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii*. Detalhes: ver legenda da tabela 17.

```

=====
V12016 V12007 V12014 V12040 V12047 V12064 V12008 V11234 V12075
=====
V12016      -
V12007    0,36      -
V12014    0,50    0,67      -
V12040    0,40    0,83    0,56      -
V12047    0,36    0,71    0,67    0,57      -
V12064    0,42    0,08    0,13    0,08    0,17      -
V12008    0,45    0,44    0,60    0,50    0,30    0,07      -
V11234    0,36    0,71    0,67    0,57    0,71    0,08    0,44      -
V12075    0,50    0,50    0,67    0,57    0,50    0,17    0,44    0,50      -
=====

```

$$\bar{S}_J = 0,45$$

Tabela 25: Coeficientes de similaridade de Jaccard dos indivíduos analisados de *P.juergensii*. Detalhes: ver legenda da tabela 17.

```

=====
                V11963  V12054  V12065  V4383  V12043
=====
V11963          -
V12054    0,33      -            $\bar{S}_J = 0,44$ 
V12065    0,29    0,57      -
V 4383    0,50    0,55    0,27      -
V12043    0,42    0,46    0,33    0,69      -
=====

```

Tabela 26: Coeficientes de similaridade de Jaccard dos indivíduos analisados de *P.intermedium*. Detalhes: ver legenda da tabela 17.

```

=====
                V11840  V11849
=====
V11840          -            $\bar{S}_J = 0,50$ 
V11849    0,50      -
=====

```

todos os indivíduos (Mrs 0,13-0,11; 0,90-0,88 e 1,11-1,13), sendo que estas foram detectadas em geral nos três tecidos analisados. Outras quatro bandas também apresentaram uma alta freqüência entre os indivíduos (Mrs -0,14_-0,17; 0,31-0,33; 0,39-0,45 e 1,00-1,00). O biótipo apresentou sete bandas raras (Mrs -0,42_-0,53; 0,27-0,23; 0,45-0,54; 0,64-0,60; 0,82-0,80; 0,96-0,91 e 1,21-1,30).

A forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* apresentou um alto índice médio de similaridade de Jaccard intrataxonômico ($\bar{S}_J = 0,66$), sendo que três pares de indivíduos apresentaram similaridade total (estes dados são apresentados pela tabela 22 e figura 22). Pouco menos de 30% do total de bandas analisadas para este grupo taxonômico apareceram em todos os indivíduos (Mrs 0,31-0,33; 0,39-0,45; 0,90-0,88; 1,00-1,00 e 1,11-1,13) e apresentou uma outra banda também ocorreu em alta freqüência (Mrs 0,13-0,11). Foram presentes neste grupo, oito bandas raras (Mrs -0,42_-0,53; -0,24_-0,33; 0,27-0,23; 0,58-X; 0,64-0,60; 0,82-0,80; 1,21-1,30 e 1,40-1,50), sendo que quatro delas apareceram uma única vez.

P.dilatatum Torres armado também apresentou um alto índice médio de similaridade de Jaccard ($\bar{S}_J = 0,63$), sendo

que estes índices variaram de 0,33 a 1,00 entre pares de indivíduos (ver tabela 19). Conforme a figura 19, das quatorze bandas presentes nesta entidade, quatro apareceram em todas os indivíduos (Mrs 0,13-0,11; 0,31-0,33; 0,74-0,74 e 1,00-1,00) e uma outra banda também ocorreu com frequência alta (Mrs 0,90-0,88). O biótipo apresentou seis bandas raras (Mrs -0,69_-0,78; -0,42_-0,53; -0,24_-0,33; -0,14_-0,17; 0,82-0,80 e 1,07-X).

P.dilatatum Torres típico apresentou um índice médio de similaridade de Jaccard de valor intermediário ($\bar{S}_J = 0,54$), variando de 0,27 a 0,78 (ver tabela 18). Conforme demonstra a figura 18, das quinze bandas analisadas, somente duas apareceram em todos os indivíduos (Mrs 0,31-0,33 e 1,00-1,00), sendo que uma delas (Mrs 1,00-1,00) apareceu preferencialmente nos três tecidos analisados. O biótipo também apresentou duas bandas com frequências altas (Mrs 0,13-0,11 e 0,90-0,88). Encontrou-se um alto número de bandas raras: 8 (Mrs -0,69 --0,78; -0,24_-0,33; -0,14_-0,17; 0,27-0,23; 0,45-0,54; 0,64-0,60; 0,82-0,80 e 1,21-1,30).

P.intermedium apresentou um valor médio de 0,50 para o índice de similaridade de Jaccard, como pode ser visto na

tabela 26. Das seis bandas analisadas nesta espécie, a metade apareceu nos dois indivíduos analisados (Mrs 0,13-0,11; 0,64-0,60 e 0,74-0,74). Como só analisamos dois indivíduos, não consideramos nenhuma banda rara, pois o aparecimento em uma única planta significaria aparecer em 50% da amostra (ver figura 26).

P.dilatatum anteras roxas, ao contrário dos resultados obtidos para o sistema das peroxidases, apresentou um índice médio de similaridade de Jaccard relativamente baixo ($\bar{S}_J = 0,46$; tabela 17), mostrando uma variação bastante ampla entre os índices apresentados pelos pares de indivíduos ($S_J=0,20$ a $0,71$). De acordo com a figura 17, apresentou apenas uma banda (Mrs 0,13-0,11) que ocorreu em todos os indivíduos dentre as treze analisadas para este grupo taxonômico, sendo que esta apareceu, na maioria dos casos, em todos os tecidos analisados e apresentou duas bandas com freqüências altas (Mrs 0,31-0,33 e 0,90-0,88). Encontrou-se para este biótipo, cinco bandas raras (Mrs -0,96_-1,00; -0,69_-0,78; -0,14_-0,17; 0,58-X e 0,82-0,80).

A forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii* apresentou um baixo índice médio de similaridade de Jaccard ($\bar{S}_J = 0,45$), variando de 0,07 a

0,83, demonstrando uma alta variação isoenzimática entre os indivíduos (ver tabela 24). Conforme pode-se verificar na figura 24, a entidade não apresentou nenhuma banda que tenha aparecido em todos os indivíduos, dentre as quinze analisadas e apenas quatro bandas em frequências altas (Mrs 0,13-0,11; 0,31-0,33; 0,39-0,45 e 0,90-0,88). Apresentou seis bandas raras (Mrs 0,27-0,23; 0,45-0,54; 0,82-0,80; 0,96-0,91; 1,21-1,30 e 1,40-1,50).

P. urvillei obteve um baixo índice médio de similaridade de Jaccard ($\bar{S}_J = 0,44$), variando de 0,23 a 0,86, mostrando uma grande variabilidade entre seus indivíduos (ver tabela 23). Conforme a figura 23, dentre as dezoito bandas analisadas para esta espécie, somente duas apareceram em todos os indivíduos (Mrs 0,13-0,11 e 0,31-0,33) e três outras bandas ocorreram com frequências altas entre os indivíduos analisados (Mrs 0,39-0,45; 0,74-0,74 e 0,82-0,80). Encontrou-se para esta espécie, onze bandas raras (Mrs -0,96_-1,00; -0,69_-0,78; -0,42_-0,53; -0,24_-0,33; -0,14_-0,17; 0,27-0,23; 0,45-0,54; 0,82-0,80; 0,96-0,91; 1,11-1,13 e 1,21-1,30).

P. juergensii apresentou um baixo índice médio de similaridade de Jaccard intrataxonômico ($\bar{S}_J = 0,44$),

variando de 0,27 a 0,69 (ver tabela 25). Conforme a figura 25, das treze bandas analisadas para esta espécie, somente duas apareceram em todos os indivíduos (Mrs 0,13-0,11 e 1,00-1,00) e também outras duas bandas (Mrs 0,31-0,33 e 0,39-0,45) apresentaram frequências altas entre os indivíduos. A espécie apresentou duas bandas raras (Mrs 0,45-0,54 e 1,21-1,30).

P.dilatatum de Virasoro apresentou o mais baixo índice médio de similaridade de Jaccard ($\bar{S}_J = 0,38$), variando de 0,18 a 0,70, demonstrando uma grande variação nos padrões de superóxido dismutases entre os indivíduos (ver tabela 20). Segundo a figura 20, de dezessete bandas analisadas, somente duas apareceram em todos os indivíduos (Mrs 0,13-0,11 e 0,90-0,88). O biótipo apresentou oito bandas raras (Mrs -1,2_-1,4; -0,42_-0,53; -0,24_-0,33; -0,14_-0,17; 0,45-0,54; 0,58-X; 1,11-1,13 e 1,21-1,30).

Foram construídos fenogramas, utilizando o índice de similaridade de Jaccard, distância Manhattan e distância Euclidiana, utilizando cada indivíduo como um OTU. Os dados utilizados para a construção destes fenogramas foi a presença (1) e ausência (0) de bandas para o sistema de superóxido dismutases. Conforme nos mostra o fenograma

ilustrado na figura 27, este sistema quase não formou agrupamentos envolvendo indivíduos de uma mesma entidade taxonômica.

Os maiores agrupamentos de plantas da mesma entidade englobaram seis indivíduos da forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* e outros dois agrupamentos reuniram em cada um, quatro indivíduos de *P.dilatatum* de Vacaria. *P.dilatatum* Torres armado forma dois agrupamentos com três indivíduos em cada um. *P.juergensii* e a forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii* também formam dois agrupamentos envolvendo dois indivíduos em cada grupo, mas estes agrupamentos sempre envolveram indivíduos de outras entidades taxonômicas. Pode-se também verificar um certo agrupamento de plantas de *P.dilatatum* de Vacaria com as da forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei*. *P.dilatatum* Torres típico, *P.dilatatum* anteras roxas, *P.dilatatum* de Virasoro e *P.urvillei* praticamente não formaram nenhum agrupamento entre seus indivíduos.

O fenograma ilustrado na figura 27 foi construído a partir de distância Manhattan. Escolhemos este por ter apresentado um maior número de agrupamentos entre indivíduos

de uma mesma entidade taxonômica.

3.2.2 Diferenciação Intertaxonômica

Para se poder avaliar as diferenças entre as entidades taxonômicas analisadas, reunimos os padrões gerais de cada entidade e a frequência de cada banda na figura 28.

Para superóxido dismutases, o número de bandas por entidade variou de seis para *P.intermedium* a dezoito para *P.urvillei*, sendo que o total de bandas analisadas no gênero foi de vinte e duas.

A partir dos padrões apresentados na figura 28, foi elaborada a tabela 27, caracterizando cada entidade taxonômica quanto à ausência ou presença de cada banda analisada. Nesta tabela, estão em destaque (*) as bandas que apareceram em todas as entidades.

Como pode ser visto na figura 28 e na tabela 27, de vinte e duas bandas analisadas, quatro estiveram presentes em todas as entidades taxonômicas (Mrs 0,13-0,11; 0,64-0,60; 0,74-0,74 e 0,90-0,88), no entanto, nenhuma destas esteve presente em todos os indivíduos. A banda mais freqüente foi a de Mrs 0,13-0,11, a qual não apareceu em somente cinco indivíduos.

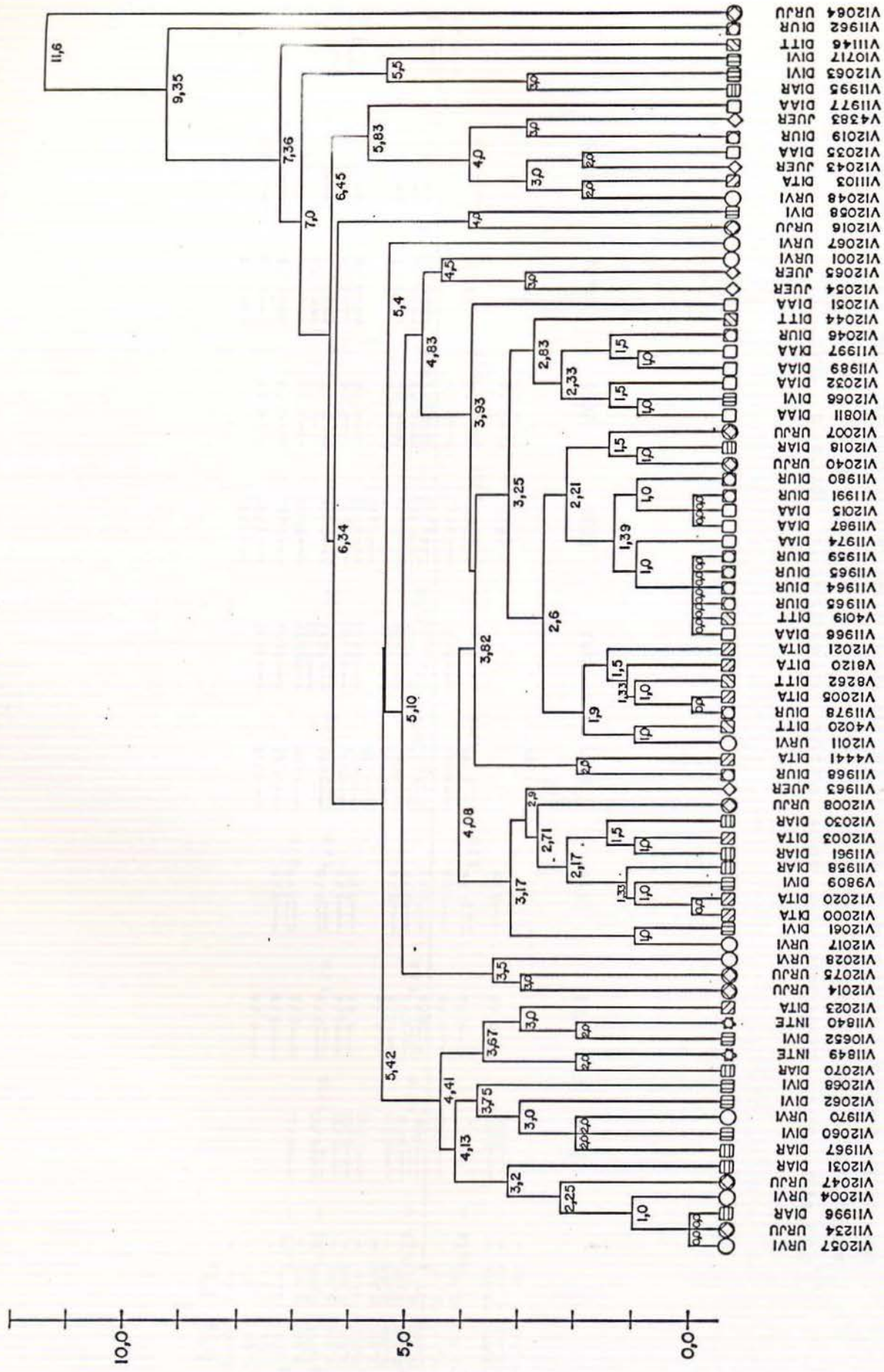


Figura 27: Fenograma formado a partir dos padrões de superóxido dismutases com distância Manhattan, através do método de agrupamento de UPGMA.

Tabela 27: Caracterização das espécies e biótipos analisados do gênero *Paspalum* quanto à presença (+) ou ausência (-) das bandas de superóxido dismutases detectadas nas três partes da folha de indivíduos adultos de cada entidade taxonômica. A abreviatura dos nomes das entidades estão conforme a tabela 1. (*) = bandas presentes em todas as entidades.

BANDAS	ENTIDADES									
	DIAR	DITT	DITA	DIVI	DIAA	DIUR	URVI	URJU	JUER	INTE
-1,20_-1,40	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
-0,96_-1,00	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
-0,69_-0,78	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
-0,42_-0,53	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
-0,24_-0,33	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
-0,14_-0,17	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
0,13-0,11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,27-0,23	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
0,31-0,33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
0,39-0,45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
0,45-0,54	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
0,58-X	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-
0,64-0,60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,74-0,74	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,82-0,80	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
0,90-0,88	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,96-0,91	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
1,00-1,00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1,07-X	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1,11-1,13	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1,21-1,30	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
1,40-1,50	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-

Outras bandas, tais como: Mrs -0,14_-0,17; 0,31-0,33; 0,39-0,45; 0,82-0,80; 1,00-1,00 e 1,11-1,13 foram bastante freqüentes, sendo detectadas por pelo menos oito entidades taxonômicas diferentes.

Dentre os dez grupos taxonômicos estudados, apenas dois biótipos apresentaram bandas específicas para este sistema isoenzimático: *P.dilatatum* Torres armado (Mr 1,07-X) e *P.dilatatum* de Virasoro (Mrs -1,20_-1,40), mas a banda de Mr 1,07-X apareceu em apenas dois indivíduos e a de Mrs -1,20_-1,40 uma única vez, não caracterizando o grupo taxonômico.

O sistema das superóxido dismutases, apresentou mais duas bandas raras no gênero, aparecendo em somente duas entidades taxonômicas distintas (Mrs -0,96_-1,00 e 1,40-1,50).

Todos os indivíduos analisados foram comparados dois a dois através do teste de similaridade de Jaccard e os coeficientes de similaridade médios de Jaccard obtidos pela média destas comparações são apresentados na tabela 28, onde cada entidade taxonômica é comparada com as demais. São dados em destaque o índice médio de similaridade de Jaccard intertaxonômico no gênero, entre os biótipos de *P.dilatatum* e entre estes e as demais espécies analisadas. Conforme

demonstrado na tabela, o índice médio de similaridade entre os biótipos de *P.dilatatum* e as demais entidades taxonômicas foi igual ao índice médio intertaxonômico do gênero.

Na tabela 29, estes coeficientes de similaridade médios de Jaccard foram reorganizados e apresentados em ordem decrescente, os três maiores e os três menores coeficientes de similaridade, além do coeficiente médio (\bar{S}_J) da entidade em relação às demais.

Os maiores coeficientes de similaridade médios de Jaccard obtidos entre pares de espécies ou biótipos são entre *P.dilatatum* de Vacaria e a forma morfológicamente intermediária entre este e *P.urvillei* ($\bar{S}_J = 0,67$); entre *P.dilatatum* de Vacaria e o biótipo Torres típico ($\bar{S}_J = 0,60$) e entre este último e a forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* ($\bar{S}_J = 0,60$).

Os menores índices médios de similaridade de Jaccard intertaxonômico foi entre *P.intermedium* e a forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* ($\bar{S}_J = 0,22$) e entre *P.intermedium* e *P.juergensii* ($\bar{S}_J = 0,24$). Estes dados podem ser observados nas tabelas 28 e 29.

Tabela 28: Coeficientes de similaridade médios de Jaccard (S_J) intertaxonômico, obtidos pela média dos coeficientes entre pares de indivíduos pertencentes a entidades taxonômicas distintas para os dados de superóxido dismutases. Em destaque, é dado o coeficiente de similaridade médio intertaxonômico para o gênero como um todo e o coeficiente médio entre os biótipos de *P.dilatatum*.

=====

	DIAR	DITT	DITA	DIVI	DIAA	DIUR	URVI	URJU	JUER	INTE
DIAR	-									
DITT	0,45	-								
DITA	0,50	0,59	-							
DIVI	0,42	0,41	0,43	-						
DIAA	0,44	0,60	0,59	0,42	-					
DIUR	0,44	0,60	0,59	0,40	0,67	-				
URVI	0,45	0,48	0,50	0,40	0,48	0,47	-			
URJU	0,47	0,49	0,49	0,39	0,47	0,48	0,46	-		
JUER	0,40	0,46	0,48	0,34	0,54	0,52	0,41	0,39	-	
INTE	0,33	0,25	0,33	0,34	0,26	0,22	0,31	0,26	0,24	-

$S_J(1) = 0,49$

$S_J(2) = 0,44$

S_J do gênero = 0,44

=====

$S_J(1)$ = coeficiente de similaridade médio entre os biótipos de *P.dilatatum*.

$S_J(2)$ = coeficiente de similaridade médio entre os biótipos de *P.dilatatum* e demais entidades do gênero.

Tabela 29: Relacionamento entre as espécies e biótipos de *Paspalum* baseado nos maiores e menores índices de similaridade de Jaccard intertaxonômico apresentados na tabela 28. As abreviaturas das entidades estão conforme a tabela 1.

```

=====
ENTIDADE  $\bar{S}_J$       ENTIDADES MAIS RELAC.(3)      ENTIDADES MENOS RELAC.(3)
=====
DIAR      0,43      ,50:DITA ,47:URJU ,45:DITT ,42:DIVI ,40:JUER ,33:INTE
DITT      0,48      ,60:DIAA ,60:DIUR ,59:DITA ,45:DIAR ,41:DIVI ,25:INTE
DITA      0,50      ,59:DITT ,59:DIAA ,59:DIUR ,48:JUER ,43:DIVI ,33:INTE
DIVI      0,39      ,43:DITA ,42:DIAR ,42:DIAA ,39:URJU ,34:JUER ,34:INTE
DIAA      0,50      ,67:DIUR ,60:DITT ,59:DITA ,44:DIAR ,42:DIVI ,26:INTE
DIUR      0,49      ,67:DIAA ,60:DITT ,59:DITA ,44:DIAR ,40:DIVI ,22:INTE
URVI      0,44      ,50:DITA ,48:DITT ,48:DIAA ,40:DIVI ,41:JUER ,31:INTE
URJU      0,43      ,49;DITT ,49:DITA ,48:DIUR ,39:DIVI ,39:JUER ,26:INTE
JUER      0,42      ,54:DIAA ,52:DIUR ,48:DITA ,39:URJU ,34:DIVI ,24:INTE
INTE      0,28      ,34:DIVI ,33:DIAR ,33:DITA ,25:DITT ,24:JUER ,22:DIUR
=====

```


O índice médio intertaxonômico entre os biótipos de *P.dilatatum* foi de $\bar{S}_J = 0,49$, variando de 0,41 para a comparação entre os biótipos de Virasoro e Torres típico a 0,60 entre os biótipos de Vacaria e Torres típico (ver tabela 28).

Como nos sistemas das peroxidases, também para as superóxido dismutases, os biótipos Torres típico e Torres armado apresentaram um alto grau de similaridade ($\bar{S}_J = 0,59$), mas não superior ao de outros pares de biótipos de *P.dilatatum*. O grau de similaridade de *P.urvillei* com todos os biótipos de *P.dilatatum* é tão alto quanto entre os referidos biótipos. Como pode ser visto nas tabelas 28 e 29, *P.intermedium* é a espécie mais diferenciada com um índice médio de similaridade com relação às demais entidades analisadas de apenas 0,28.

A forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* apresenta grande similaridade com *P.dilatatum* de Vacaria ($\bar{S}_J=0,67$) e uma similaridade baixa ($\bar{S}_J=0,48$) com *P.urvillei*. E a forma intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii* apresentou uma baixa similaridade com relação à *P.urvillei* ($\bar{S}_J=0,46$) e foi um pouco mais diferenciada de *P.juergensii* ($\bar{S}_J=0,39$). Ver tabelas 28 e 29.

Assim como para o sistema das peroxidases, foram feitos fenogramas para comparar as diferentes espécies e biótipos. A entidade taxonômica foi utilizada como OTU e a frequência das bandas nas entidades, como caracteres. Para a construção dos fenogramas, foram utilizadas as distâncias Manhattan e Euclidiana e os agrupamentos foram feitos pelo método de agrupamento UPGMA.

Na figura 29 é apresentado o fenograma obtido através de distância Manhattan. Como podemos observar neste fenograma, *P.dilatatum* Torres típico e o biótipo Torres armado estão intimamente relacionados e o mesmo ocorre com *P.dilatatum* de Vacaria e a forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei*. *P.intermedium* parece ser a espécie menos relacionada com as demais. Estes dados são confirmados no fenograma construído a partir de distância Euclidiana.

3.2.3 Regulação Tissular

As isoenzimas de superóxido dismutases, em geral, não atuaram especificamente em uma parte da folha. Dentre os oitenta e três indivíduos analisados, uma mesma banda pode ter sido detectada na ponta de um indivíduo, na base ou no

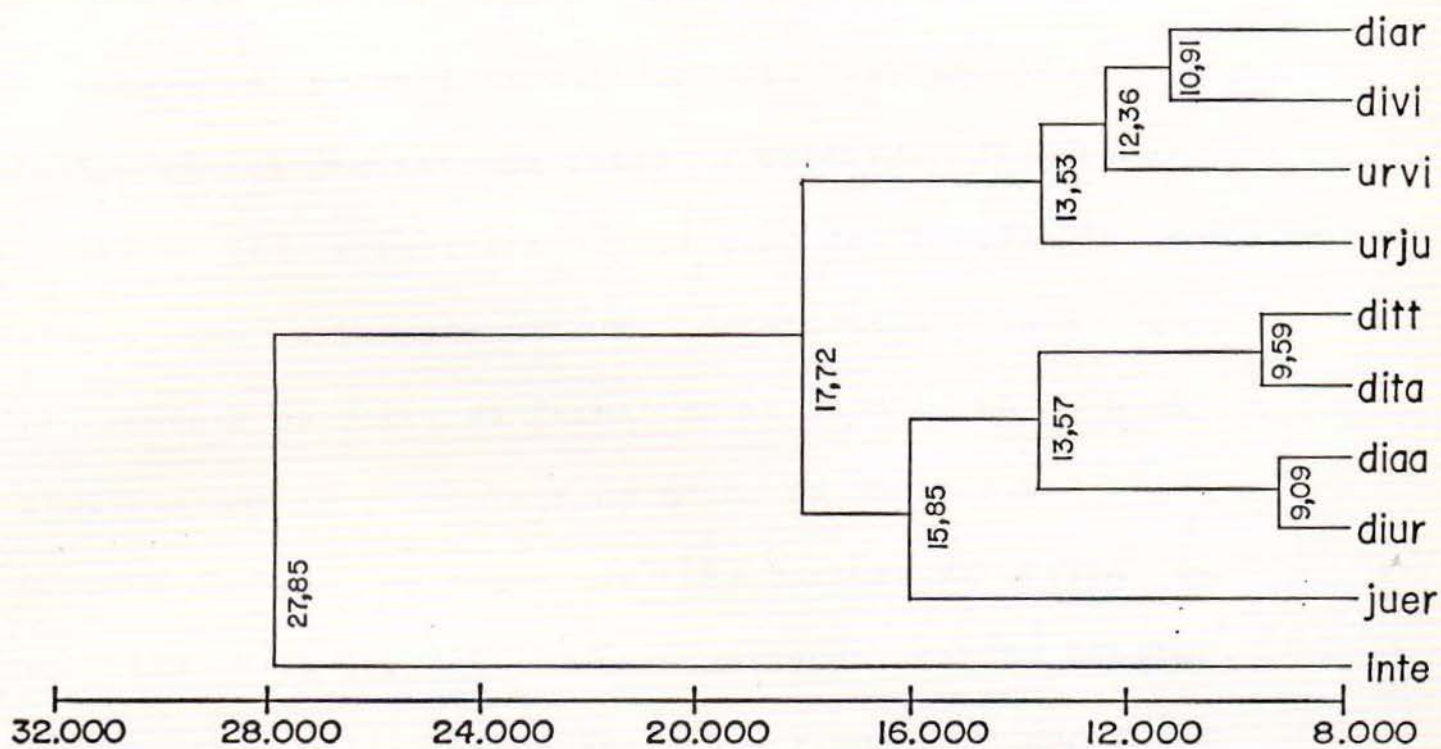


Figura 29: Fenograma obtido através dos dados de frequência de bandas de superóxido dismutases apresentadas pelas entidades taxonômicas analisadas do gênero *Paspalum*. Análise feita a partir de distância Manhattan e método de agrupamento UPGMA.

meio de outro, ou simultaneamente na ponta e meio, ou ponta e base, ou meio e base, ou nas três partes analisadas da folha, ou ainda pode ter sido ausente nos três tecidos.

Na tabela 30, podemos visualizar esta variabilidade na regulação gênica demonstrada pelas superóxido dismutases. Esta tabela foi construída a partir da frequência de indivíduos que apresentaram uma determinada banda que ocorreu somente na ponta da folha, só no meio ou só na base, ou simultaneamente na ponta e no meio, na ponta e na base, no meio e na base, ou ainda nas três partes da folha ou ausente nos três tecidos. Podemos destacar nesta tabela, três bandas (Mrs 0,13-0,11; 0,90-0,88 e 1,00-1,00) que foram detectadas na maioria das vezes, nos três tecidos analisados. Outras bandas (Mrs -0,24_-0,33; -0,14_-0,17 e 0,39-0,45) foram detectadas preferencialmente na ponta da folha e outras (Mrs 0,64-0,60 e 0,74-0,74) apareceram preferencialmente na base da folha.

Mas como pode ser observado na tabela 30, nenhuma banda apresentou um padrão de atuação tissular específico.

Tabela 30: Apresentação de todas as bandas de superóxido dismutases detectadas nas entidades taxonômicas analisadas do gênero *Paspalum* com suas respectivas freqüências obtidas a partir do número de vezes que cada banda apareceu em determinado(s) tecido(s) pelo número total de indivíduos analisados.

BANDA	P	M	B	P-M	P-B	M-B	P-M-B	AUSENTE
-1,20_-1,40	-	-	-	-	-	-	0,01	0,99
-0,96_-1,00	-	0,01	-	-	-	0,01	-	0,98
-0,69_-0,78	-	-	0,01	0,01	-	0,02	0,07	0,88
-0,42_-0,53	0,02	-	0,05	0,01	-	0,02	0,02	0,87
-0,24_-0,33	0,12	-	-	-	0,01	-	0,02	0,84
-0,14_-0,17	0,23	0,02	0,01	0,04	-	-	0,02	0,67
0,13 - 0,11	0,05	0,02	0,14	0,02	0,11	0,08	0,51	0,06
0,27 - 0,23	0,01	-	0,05	0,01	0,04	0,02	0,06	0,81
0,31 - 0,33	0,02	-	0,21	0,01	0,06	0,17	0,42	0,11
0,39 - 0,45	0,30	0,02	0,04	0,01	0,01	0,01	0,23	0,26
0,45 - 0,54	0,05	0,01	0,01	0,02	-	-	0,01	0,89
0,58 - X	-	0,01	0,04	-	0,02	-	-	0,93
0,64 - 0,60	0,02	0,01	0,10	0,01	0,01	0,08	0,08	0,67
0,74 - 0,74	0,04	-	0,25	0,04	0,01	0,05	0,23	0,38
0,82 - 0,80	0,04	0,02	0,04	-	0,01	-	0,04	0,85
0,90 - 0,88	-	0,01	0,08	0,01	0,01	0,06	0,69	0,13
0,96 - 0,91	-	-	-	-	-	-	0,05	0,95
1,00 - 1,00	0,07	-	0,01	0,05	-	0,02	0,60	0,24
1,07 - X	-	0,01	-	-	-	-	0,01	0,98
1,11 - 1,13	0,10	-	0,01	0,02	0,02	0,02	0,34	0,48
1,21 - 1,30	0,07	-	-	-	-	-	0,02	0,90
1,40 - 1,50	0,02	-	-	-	0,01	-	-	0,96

P = ponta; M = meio; B = base.

Tabela 30: Apresentação de todas as bandas de superóxido dismutases detectadas nas entidades taxonômicas analisadas do gênero *Paspalum* com suas respectivas freqüências obtidas a partir do número de vezes que cada banda apareceu em determinado(s) tecido(s) pelo número total de indivíduos analisados.

BANDA	P	M	B	P-M	P-B	M-B	P-M-B	AUSENTE
-1,20_-1,40	-	-	-	-	-	-	0,01	0,99
-0,96_-1,00	-	0,01	-	-	-	0,01	-	0,98
-0,69_-0,78	-	-	0,01	0,01	-	0,02	0,07	0,88
-0,42_-0,53	0,02	-	0,05	0,01	-	0,02	0,02	0,87
-0,24_-0,33	0,12	-	-	-	0,01	-	0,02	0,84
-0,14_-0,17	0,23	0,02	0,01	0,04	-	-	0,02	0,67
0,13 - 0,11	0,05	0,02	0,14	0,02	0,11	0,08	0,51	0,06
0,27 - 0,23	0,01	-	0,05	0,01	0,04	0,02	0,06	0,81
0,31 - 0,33	0,02	-	0,21	0,01	0,06	0,17	0,42	0,11
0,39 - 0,45	0,30	0,02	0,04	0,01	0,01	0,01	0,23	0,26
0,45 - 0,54	0,05	0,01	0,01	0,02	-	-	0,01	0,89
0,58 - X	-	0,01	0,04	-	0,02	-	-	0,93
0,64 - 0,60	0,02	0,01	0,10	0,01	0,01	0,08	0,08	0,67
0,74 - 0,74	0,04	-	0,25	0,04	0,01	0,05	0,23	0,38
0,82 - 0,80	0,04	0,02	0,04	-	0,01	-	0,04	0,85
0,90 - 0,88	-	0,01	0,08	0,01	0,01	0,06	0,69	0,13
0,96 - 0,91	-	-	-	-	-	-	0,05	0,95
1,00 - 1,00	0,07	-	0,01	0,05	-	0,02	0,60	0,24
1,07 - X	-	0,01	-	-	-	-	0,01	0,98
1,11 - 1,13	0,10	-	0,01	0,02	0,02	0,02	0,34	0,48
1,21 - 1,30	0,07	-	-	-	-	-	0,02	0,90
1,40 - 1,50	0,02	-	-	-	0,01	-	-	0,96

P = ponta; M = meio; B = base.

3 Análise Geral: Peroxidases e Superóxido dismutases

3.3.1 Variação Intrataxonômica

Para avaliarmos o grau de diferenças a nível dos dois sistemas enzimáticos analisados, calculamos os coeficientes de similaridade de Jaccard entre os indivíduos comparados dois a dois a partir dos sistemas das peroxidases e das superóxido dismutases. Os resultados são apresentados nas tabelas 31 a 40, onde é dado em destaque, o índice médio intrataxonômico de cada entidade.

P.dilatatum Torres armado apresentou o maior índice médio de similaridade de Jaccard ($\bar{S}_J=0,67$), sendo que os coeficientes entre pares de indivíduos variaram de 0,50 a 0,85, apresentando pouca variabilidade entre os indivíduos analisados (ver tabela 33). Este resultado foi o mesmo apresentado pelo sistema das peroxidases isolado; e também nos dados obtidos através do sistema de superóxido dismutases, este biótipo apresentou um dos mais altos coeficientes de similaridade de Jaccard intrataxonômico.

P.dilatatum de Vacaria, conforme a tabela 35, também apresentou um alto índice médio de similaridade de Jaccard ($\bar{S}_J=0,66$), variando de 0,52 a 0,83, mostrando que os

Tabela 31: Coeficientes de similaridade de Jaccard entre os indivíduos analisados de *P.dilatatum* anteras roxas a partir dos padrões de peroxidases e superóxido dismutases. \bar{S}_J = coeficiente de similaridade médio de Jaccard da entidade.

```

=====
Tabela 31 Coeficientes de similaridade de Jaccard de
V11958 V11961 V11967 V11995 V11996 V12018 V12030 V12031 V12070
=====
V11958 -
V11961 0,70 -
V11967 0,67 0,60 -
V11995 0,57 0,46 0,48 -  $\bar{S}_J = 0,61$ 
V11996 0,72 0,50 0,61 0,68 -
V12018 0,71 0,81 0,62 0,54 0,52 -
V12030 0,63 0,83 0,61 0,45 0,50 0,75 -
V12031 0,60 0,42 0,50 0,50 0,63 0,50 0,48 -
V12070 0,75 0,76 0,74 0,50 0,62 0,70 0,70 0,52 -
=====

```

Tabela 32: Coeficientes de similaridade de Jaccard entre os indivíduos analisados de *P.dilatatum* Torres típico. Detalhes: ver legenda da tabela 31.

```

=====
V12044 V11146 V4019 V4020 V8262
=====
V12044 -
V11146 0,55 -  $\bar{S}_J = 0,54$ 
V 4019 0,64 0,58 -
V 4020 0,59 0,48 0,64 -
V 8262 0,46 0,35 0,48 0,65 -
=====

```

Tabela 33: Coeficientes de similaridade de Jaccard dos indivíduos analisados de *P.dilatatum* Torres armado. Detalhes: ver legenda da tabela 31.

```

=====
          V12000 V12005 V12003 V12020 V12021 V12023 V8120 V4441 V11103
=====
V12000    -
V12005    0,64  -
V12003    0,85  0,59  -
V12020    0,84  0,50  0,79  -
V12021    0,64  0,79  0,59  0,57  -
V12023    0,77  0,61  0,73  0,71  0,76  -
V 8120    0,67  0,73  0,70  0,61  0,73  0,71  -
V 4441    0,68  0,67  0,71  0,63  0,67  0,65  0,76  -
V11103    0,52  0,56  0,54  0,52  0,63  0,62  0,65  0,67  -
=====

```

$$\bar{S}_J = 0,67$$

Tabela 34: Coeficientes de similaridade de Jaccard entre os indivíduos analisados de *P.dilatatum* de Virasoro. 1)V12066; 2)V12068; 3)V12058; 4)V12062; 5)V12063; 6)V10717; 7)V10652; 8)V9809; 9)V12060 e 10)V12061. Detalhes: ver legenda da tabela 31.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1)	-									
2)	0,58	-								
3)	0,59	0,55	-							
4)	0,52	0,54	0,62	-						
5)	0,74	0,44	0,47	0,44	-					
6)	0,44	0,41	0,39	0,40	0,54	-				
7)	0,31	0,38	0,41	0,43	0,39	0,48	-			
8)	0,35	0,36	0,40	0,50	0,38	0,40	0,77	-		
9)	0,33	0,35	0,28	0,41	0,37	0,39	0,54	0,70	-	
10)	0,50	0,46	0,59	0,52	0,48	0,44	0,55	0,56	0,39	-

$\bar{S}_J = 0,46$

Tabela 35: Coeficientes de similaridade de Jaccard entre os indivíduos analisados de *P.dilatatum* de Vacaria. 1)V11966; 2)V11974; 3)V11987; 4)V11977; 5)V11989; 6)V11997; 7)V12015; 8)V12032; 9)V12035; 10)V12051 e 11)V10811. Detalhes: ver legenda da tabela 31.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1)	-										
2)	0,67	-									
3)	0,65	0,74	-								
4)	0,54	0,59	0,81	-							
5)	0,54	0,52	0,75	0,61	-						
6)	0,64	0,63	0,79	0,64	0,83	-					
7)	0,74	0,67	0,73	0,60	0,61	0,71	-				
8)	0,54	0,59	0,81	0,74	0,76	0,71	0,60	-			
9)	0,63	0,56	0,68	0,63	0,64	0,60	0,63	0,69	-		
10)	0,68	0,61	0,67	0,62	0,63	0,73	0,83	0,62	0,64	-	
11)	0,57	0,55	0,70	0,57	0,74	0,78	0,64	0,80	0,60	0,65	-

$$\bar{S}_J = 0,66$$

Tabela 36: Coeficientes de similaridade de Jaccard entre os indivíduos pertencentes à forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei*. 1)V11955; 2)V11959; 3)V11962; 4)V11964; 5)V11965; 6)V11968; 7)V11978; 8)V11980; 9)V11991 10)V12019 e 11)V12046. Detalhes: ver legenda da tabela 31.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1)	-										
2)	0,67	-									
3)	0,42	0,54	-								
4)	0,60	0,68	0,56	-							
5)	0,55	0,63	0,52	0,65	-						
6)	0,54	0,61	0,52	0,50	0,58	-					
7)	0,57	0,65	0,48	0,59	0,62	0,60	-				
8)	0,55	0,62	0,52	0,64	0,52	0,52	0,54	-			
9)	0,65	0,74	0,54	0,67	0,55	0,60	0,64	0,85	-		
10)	0,56	0,56	0,53	0,46	0,48	0,70	0,68	0,59	0,62	-	
11)	0,57	0,57	0,60	0,59	0,70	0,60	0,71	0,61	0,64	0,62	-

$$\bar{S}_J = 0,59$$

$$S_J = 0,43$$

Tabela 37: Coeficientes de similaridade de Jaccard entre os indivíduos analisados de *P.urvillei*. Detalhes: ver legenda da tabela 31.

```

=====
V11970 V12001 V12004 V12011 V12017 V12028 V12048 V12057 V12067
=====
V11970      -
V12001    0,43      -
V12004    0,71    0,44      -
V12011    0,46    0,55    0,58      -
V12017    0,43    0,54    0,50    0,73      -
V12028    0,39    0,53    0,45    0,65    0,70      -
V12048    0,38    0,48    0,50    0,60    0,48    0,58      -
V12057    0,52    0,44    0,67    0,69    0,70    0,67    0,62      -
V12067    0,46    0,50    0,52    0,68    0,62    0,60    0,55    0,64      -
=====

```

$\bar{S}_J = 0,55$

Tabela 38: Coeficientes de similaridade de Jaccard entre os indivíduos pertencentes à forma morfologicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii*. Detalhes: ver legenda da tabela 31.

```

=====
V12016 V12007 V12014 V12040 V12047 V12064 V12008 V11234 V12075
=====
V12016      -
V12007    0,46      -
V12014    0,74    0,59      -
V12040    0,60    0,67    0,67      -
V12047    0,52    0,65    0,65    0,58      -
V12064    0,39    0,26    0,26    0,26    0,37      -
V12008    0,32    0,33    0,38    0,27    0,24    0,19      -
V11234    0,35    0,53    0,48    0,35    0,45    0,15    0,33      -
V12075    0,48    0,53    0,55    0,42    0,52    0,38    0,29    0,39      -
=====

```

$\bar{S}_J = 0,43$

Tabela 39: Coeficientes de similaridade de Jaccard entre os indivíduos analisados de *P.juergensii*. Detalhes: ver legenda da tabela 31.

```

=====
                V11963 V12054 V12065 V4383 V12043
=====
V11963          -
V12054          0,42      -            $\bar{S}_J = 0,49$ 
V12065          0,53      0,62      -
V 4383          0,37      0,50      0,37      -
V12043          0,48      0,55      0,48      0,55      -
=====

```

Tabela 40: Coeficientes de similaridade de Jaccard dos indivíduos analisados de *P.intermedium*. Detalhes: ver legenda da tabela 31.

```

=====
                V11840 V11849
=====
V11840          -            $\bar{S}_J = 0,32$ 
V11849          0,32      -
=====

```

indivíduos analisados também apresentaram pouca variabilidade entre eles. Para o sistema das peroxidases, este biótipo também apresentou o segundo mais alto coeficiente de similaridade médio de Jaccard e para o sistema de superóxido dismutases, foi a entidade taxonômica que apresentou o mais alto índice médio de similaridade de Jaccard intrataxonômico.

O terceiro mais alto índice médio de similaridade de Jaccard foi apresentado por *P.dilatatum* anteras roxas ($\bar{S}_J = 0,61$), variando de 0,42 a 0,83, indicando uma maior variabilidade isoenzimática entre pares de indivíduos do que os biótipos citados anteriormente (ver tabela 31). Para o sistema das peroxidases, este biótipo apresentou o mais alto índice médio de similaridade intrataxonômico, no entanto, para o sistema das superóxido dismutases, apresentou um baixo índice de similaridade de Jaccard.

A forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* apresentou um valor intermediário para o índice médio de similaridade de Jaccard ($\bar{S}_J = 0,59$), com uma variação de 0,42 a 0,85, ou seja, uma grande variabilidade entre os índices apresentados pelos pares de indivíduos analisados (ver tabela 36). Para as peroxidases, esta

entidade também apresentou um valor médio para o índice médio de similaridade de Jaccard intrataxonômico, mas para o sistema das superóxido dismutases, apresentou um alto índice de similaridade médio.

Conforme a tabela 37, *P.urvillei* também apresentou um índice médio de similaridade de Jaccard de valor médio ($\bar{S}_J = 0,55$), variando de 0,38 a 0,73, com uma grande variação entre os índices apresentados pelos pares de indivíduos. Para as peroxidases, esta espécie apresentou um índice de similaridade alto e para as superóxido dismutases, apresentou um baixo coeficiente de similaridade médio.

P.dilatatum Torres típico apresentou um valor intermediário para o índice médio de similaridade de Jaccard intrataxonômico ($\bar{S}_J = 0,54$; tabela 32). Este índice variou de 0,35 a 0,65. As peroxidases apresentaram praticamente o mesmo valor ($\bar{S}_J = 0,55$) e as superóxido dismutases apresentaram praticamente o mesmo índice.

P.juergensii apresentou um baixo índice médio de similaridade de Jaccard ($\bar{S}_J = 0,49$), com uma variação de 0,37 a 0,62 (ver tabela 39). Para o sistema das peroxidases, a espécie apresentou um valor médio para o índice de

similaridade médio e para as superóxido dismutases, apresentou um baixo índice médio de similaridade de Jaccard.

P.dilatatum de virasoro também apresentou um baixo índice médio de similaridade de Jaccard ($\bar{S}_J = 0,46$; tabela 34), variando de 0,28 a 0,77, correspondendo a uma grande variabilidade entre os indivíduos amostrados. Para as peroxidases, o biótipo apresentou um valor médio para o índice de similaridade e para as superóxido dismutases, apresentou o mais baixo índice médio de similaridade de Jaccard intrataxonômico.

Conforme a tabela 38, a forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii* também apresentou um baixo índice médio de similaridade de Jaccard ($\bar{S}_J = 0,43$), variando de 0,15 a 0,74, correspondendo a uma variação muito grande entre os índices apresentados pelos pares de indivíduos. O sistema das peroxidases apresentou um médio índice de similaridade para esta entidade taxonômica e as superóxido dismutases apresentaram um valor baixo para este índice.

P.intermedium apresentou o mais baixo índice de similaridade de Jaccard ($\bar{S}_J = 0,32$; tabela 40). Para o sistema das peroxidases, esta espécie apresentou um baixo

índice de similaridade de Jaccard entre os indivíduos, mas as superóxido dismutases apresentaram um valor médio para este índice.

Na figura 30 é apresentado um fenograma feito através de distância Manhattan a partir do método de agrupamento UPGMA, para os dois sistemas enzimáticos, onde a OTU foi o indivíduo, e os caracteres (binários) foram as bandas isoenzimáticas com dois estados: presente (1) e ausente (0). Podemos observar nesta figura e nos demais fenogramas feitos (com o coeficiente de similaridade de Jaccard e distância Euclidiana, não apresentados no presente trabalho) para a comparação dos indivíduos dois a dois, os seguintes resultados:

Como já observado nos dois fenogramas anteriores, o resultado que mais chama a atenção é a quase total ausência de reunião de indivíduos pertencentes a uma mesma entidade taxonômica. De uma maneira geral, os agrupamentos apresentaram indivíduos das mais diferentes espécies ou biótipos.

Alguns agrupamentos podem ser destacados. *P.dilatatum* anteras roxas apresentou sete de seus indivíduos num único agrupamento que também reuniu plantas de *P.dilatatum* de

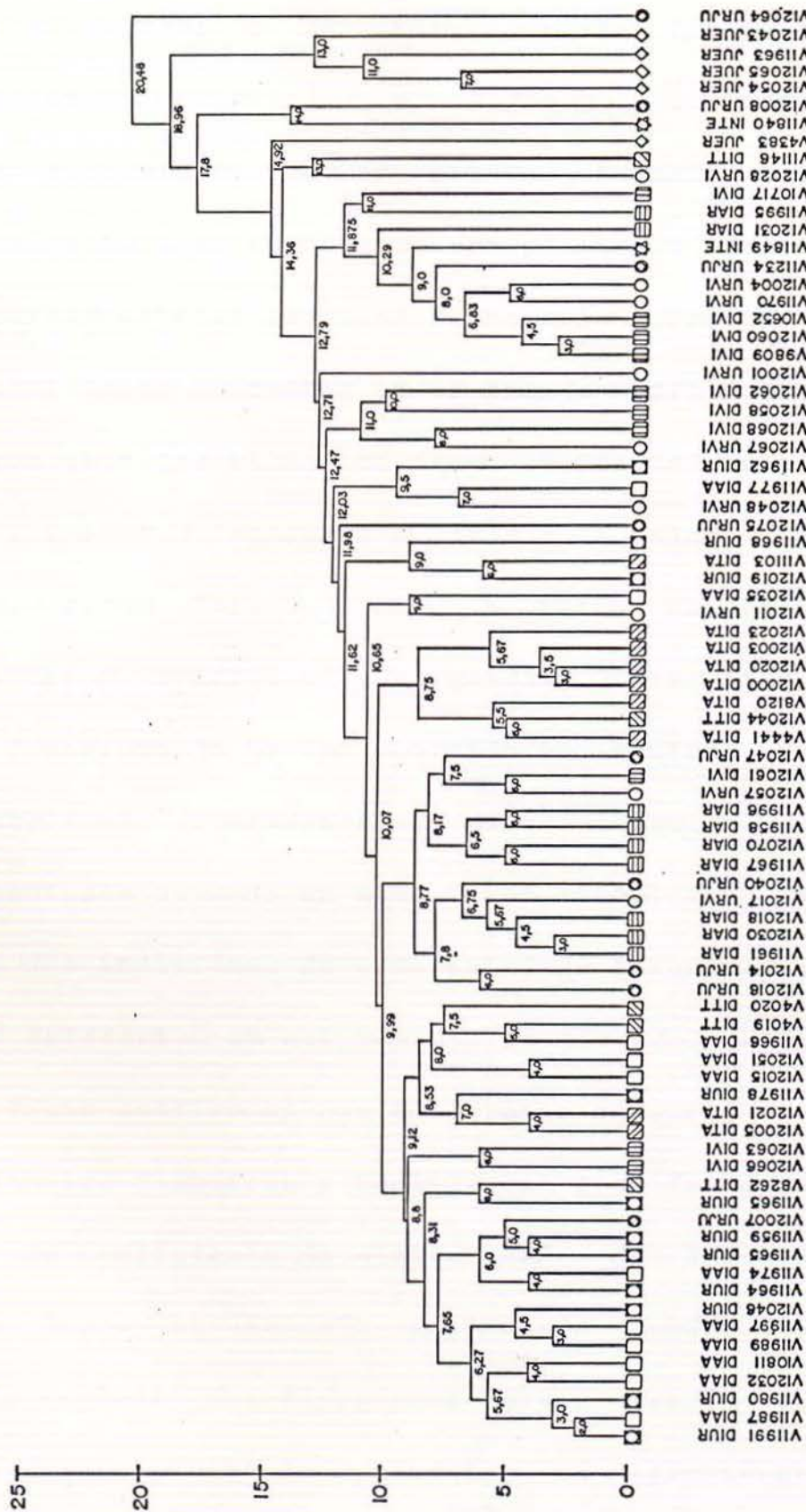


Figura 30: Fenograma feito a partir dos dados de peroxidases e superóxido dismutases através de distância Manhattan pelo método de agrupamento UPGMA.

Virasoro, de *P.urvillei* e da forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii*. Seis indivíduos de *P.dilatatum* Torres armado formaram um agrupamento que mistura-se com apenas uma planta de Torres típico. *P.dilatatum* anteras amarelas de Vacaria apresentou seis de seus indivíduos presentes em um grande agrupamento junto com outros sete indivíduos da forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* e ainda uma planta de *P.dilatatum* Torres típico e outra da forma intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii*. Os resultados obtidos nesse fenograma já haviam ocorrido no sistema das peroxidases analisado isoladamente, diferentemente das superóxido dismutases que, de um modo geral, propiciou uma maior dispersão dos indivíduos de cada entidade taxonômica.

P.juergensii apresentou um agrupamento envolvendo quatro dos cinco indivíduos analisados nos fenogramas construídos a partir das distâncias Manhattan e Euclidiana, e no fenograma feito através do coeficiente de similaridade de Jaccard, apresentou um único agrupamento englobando todos os indivíduos desta espécie. Nos fenogramas feitos através dos dados de peroxidases, a espécie apresentou um agrupamento com quatro indivíduos e naqueles construídos a partir de

superóxido dismutases, *P.juergensii* apresentou um agrupamento envolvendo dois indivíduos nos fenogramas obtidos por distância Manhattan e Euclidiana e naquele feito a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard, não houve agrupamentos para esta espécie.

P.intermedium não apresentou nenhum agrupamento em nenhum dos fenogramas, assim com aqueles feitos por dados parciais de peroxidases e superóxido dismutases.

3.2 Diferenciação Intertaxonômica

Na tabela 41 são apresentados os coeficientes de similaridade médios intertaxonômicos, comparando todas as entidades taxonômicas analisadas através da média dos índices de similaridades entre pares de indivíduos pertencentes a taxons distintos, considerando os dados dos dois sistemas isoenzimáticos simultaneamente. É apresentado também, o índice de similaridade médio entre os biótipos de *P.dilatatum*, o índice de similaridade entre os mesmos e as demais espécies e o índice médio para o gênero.

Na tabela 42, os mesmos coeficientes apresentados na tabela 41 são ordenados de tal maneira que mostre as

Tabela 41: Coeficientes de similaridade médios de Jaccard intertaxonômico obtidos pela média dos índices entre pares de indivíduos pertencentes a entidades taxonômicas distintas, para os dados de peroxidases e superóxido dismutases. Em destaque, é dado o índice médio de similaridade de Jaccard intertaxonômico do gênero e o índice de similaridade médio entre os biótipos de *P.dilatatum*. As abreviaturas dos nomes estão conforme a tabela 1.

=====

	DIAR	DITT	DITA	DIVI	DIAA	DIUR	URVI	URJU	JUER	INTE
DIAR	-									
DITT	0,49	-								
DITA	0,54	0,59	-							
DIVI	0,51	0,46	0,50	-						
DIAA	0,55	0,56	0,59	0,49	-					
----- $\bar{S}_J(2) = 0,44$										
DIUR	0,53	0,52	0,55	0,46	0,63	-				
URVI	0,56	0,51	0,56	0,50	0,55	0,52	-			
URJU	0,50	0,47	0,48	0,43	0,49	0,48	0,49	-		
JUER	0,32	0,34	0,38	0,28	0,38	0,36	0,34	0,29	-	
INTE	0,32	0,26	0,32	0,32	0,29	0,28	0,30	0,28	0,18	-

\bar{S}^J do gênero = 0,44										
=====										

$\bar{S}^J(1)$ = coeficiente de similaridade médio entre os biótipos de *P.dilatatum*.
 $\bar{S}^J(2)$ = coeficiente de similaridade médio entre os biótipos de *P.dilatatum* e demais entidades do gênero.

Tabela 42: Relacionamento entre espécies e biótipos baseado nos maiores e menores índices apresentados na tabela 41. \bar{S}^J = coeficiente de similaridade médio global da entidade em relação a todas as demais baseado na comparação dos indivíduos dois a dois. As abreviaturas dos nomes estão conforme a tabela 1.

ENTIDADE	\bar{S}^J	ENTIDADE MAIS RELAC.(3)			ENTIDADE MENOS RELAC.(3)		
DIAR	0,48	,56:URVI	,55:DIAA	,54:DITA	,49:DITT	,32:JUER	,32:INTE
DITT	0,47	,59:DITA	,56:DIAA	,56:URVI	,46:DIVI	,34:JUER	,26:INTE
DITA	0,50	,59:DITT	,59:DIAA	,56:URVI	,48:URJU	,38:JUER	,32:INTE
DIVI	0,44	,51:DIAR	,50:DITA	,50:URVI	,43:URJU	,32:JUER	,28:INTE
DIAA	0,50	,63:DIUR	,59:DITA	,56:DITT	,49:DIVI	,38:JUER	,29:INTE
DIUR	0,48	,63:DIAA	,55:URVI	,55:DITA	,46:DIVI	,36:JUER	,28:INTE
URVI	0,48	,56:DIUR	,56:DITA	,55:DIAA	,49:URJU	,34:JUER	,30:INTE
URJU	0,43	,50:DIAR	,49:URVI	,49:DIAA	,43:DIVI	,29:JUER	,28:INTE
JUER	0,32	,38:DITA	,38:DIAA	,36:DIUR	,29:URJU	,28:DIVI	,18:INTE
INTE	0,28	,32:DIAR	,32:DITA	,32:DIVI	,28:DIUR	,26:DITT	,18:JUER

entidades taxonômicas que mais se relacionam e as que menos se relacionam.

Conforme mostra a tabela 41, o índice médio de similaridade de Jaccard intertaxonômico para o gênero foi de $\bar{S}^J = 0,44$, variando de 0,18 entre *P.intermedium* e *P.juergensii* a 0,63 para a comparação entre *P.dilatatum* de Vacaria e a forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei*. O coeficiente médio de Jaccard entre os biótipos de *P.dilatatum* foi de 0,53, variando de 0,45 para a comparação entre os biótipos Torres típico e o de Virasoro a 0,59 entre os biótipos de Vacaria e Torres armado e entre Torres típico e Torres armado.

Se compararmos os valores acima com os dados parciais de peroxidases e superóxido dismutases, percebemos que o índice de similaridade médio de Jaccard intertaxonômico para o gênero apresentou o mesmo valor obtido para o sistema das superóxido dismutases, e praticamente o mesmo para as peroxidases ($\bar{S}^J = 0,45$).

Na tabela 42, observa-se que os biótipos de *P.dilatatum*, junto com *P.urvillei* e a forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* apresentaram os maiores índices médios globais de similaridade

intertaxonômico em relação a todas as demais entidades taxonômicas. Com relação aos dados obtidos pelas superóxido dismutases, somente os biótipos de Vacaria e Torres armado apresentaram os maiores valores para o índice médio global de similaridade de Jaccard intertaxonômico. Quanto aos valores obtidos para o sistema das peroxidases, os biótipos anteras roxas e de Vacaria, juntamente com *P.urvillei*, apresentaram os maiores valores para o índice de similaridade médio global.

Conforme já mencionado, os dois biótipos de Torres apresentaram o maior coeficiente intertaxonômico ($\bar{S}^J=0,59$) das comparações entre os biótipos de *P.dilatatum*. *P.urvillei* apresentou um alto grau de similaridade genética com todos os biótipos de *P.dilatatum*, com índices similares aos encontrados entre os próprios biótipos. A forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* apresentou uma grande similaridade com *P.dilatatum* de Vacaria ($\bar{S}^J=0,63$) e uma similaridade intermediária com *P.urvillei* ($\bar{S}^J=0,55$). E a forma intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii* se mostrou bastante similar a *P.urvillei* ($\bar{S}^J=0,49$) mas apresentou uma similaridade muito baixa ($\bar{S}^J=0,29$) com *P.juergensii*. *P.intermedium* e *P.juergensii* foram as espécies que

apresentaram o maior grau de diferenciação em relação às demais.

Foram feitos fenogramas, utilizando a entidade taxonômica como OTU, e a frequência das bandas isoenzimáticas nas entidades como caracteres. Para a execução destes fenogramas, utilizamos a distância Manhattan e distância Euclidiana. Estas análises foram feitas através do método de agrupamento UPGMA.

Na figura 31 é apresentado o fenograma construído a partir das frequências das bandas nas entidades analisadas através de distância Manhattan pelo método de agrupamento UPGMA. Observa-se nesta figura, que o biótipo de Vacaria está intimamente relacionado com a forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei*. Também os biótipos Torres típico e Torres armado estão bastante relacionados.

P.dilatatum anteras roxas agrupa-se com *P.urvillei*, mostrando um relacionamento íntimo e a estes agrupam-se sequencialmente o biótipo de Virasoro, a forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii*, o agrupamento entre *P.dilatatum* de Vacaria e a

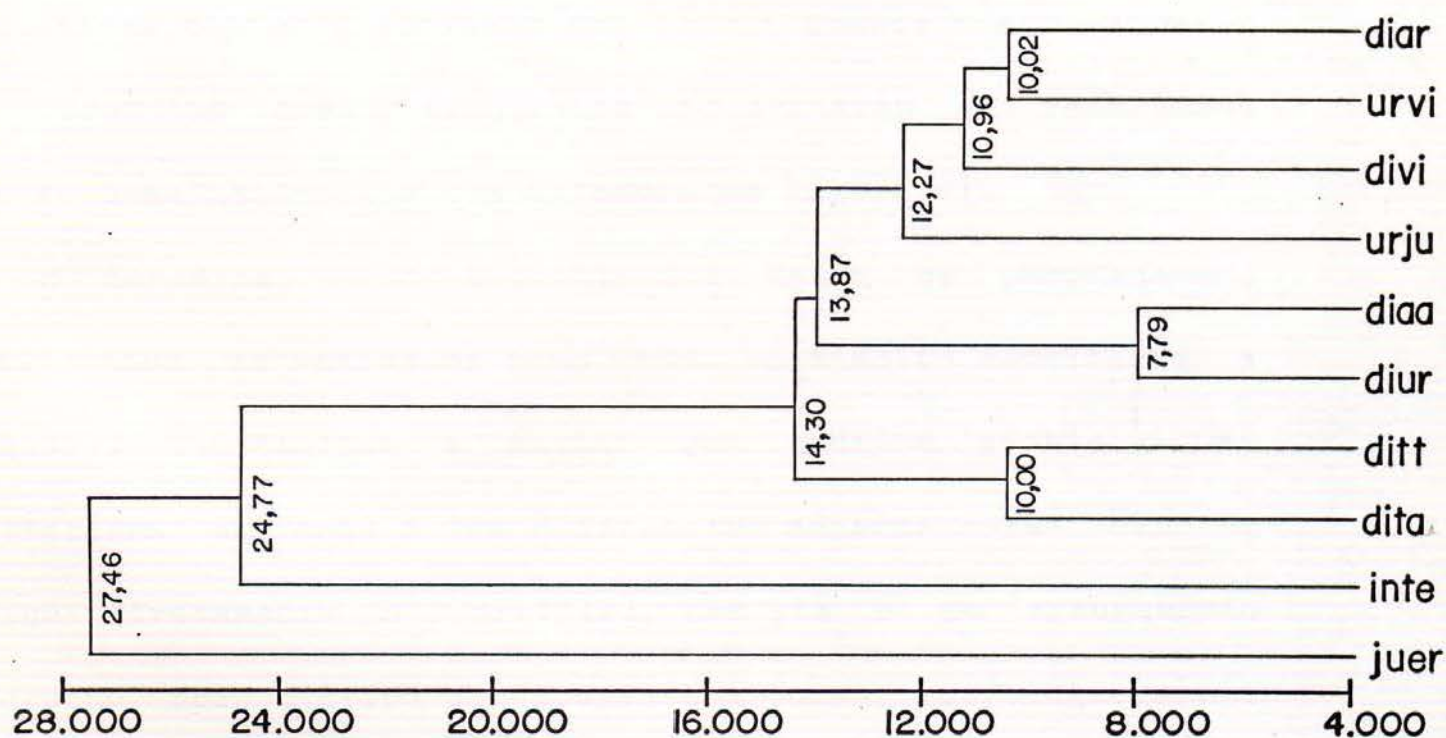


Figura 31: Fenograma obtido a partir da freqüência de bandas isoperoxidásicas e das de superóxido dismutases apresentadas pelas espécies e biótipos analisados do gênero *Paspalum*. Análise feita a partir de distância Manhattan pelo método de agrupamento UPGMA. As abreviaturas dos nomes das entidades estão conforme a tabela 1.

forma intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei*, e o agrupamento já formado entre os dois biótipos de Torres. *P.intermedium* e *P.juergensii* reúnem-se a distâncias genéticas bastante elevadas aos demais grupos taxonômicos.

Todos os demais fenogramas apresentaram os resultados muito semelhantes aos demonstrados na figura 31.

O fenograma feito a partir dos dados de peroxidases, utilizando as entidades como OTUs, está muito semelhante a aqueles construídos a partir dos padrões gerais. Uma diferença marcante é que *P.dilatatum* anteras roxas não se liga diretamente a *P.urvillei*, mas sim a um agrupamento formado pelo biótipo de Vacaria e a forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei*.

Quanto ao fenograma feito a partir dos dados de superóxido dismutases, *P.dilatatum* anteras roxas agrupa-se primeiro ao biótipo de Virasoro, os quais agrupam-se a *P.urvillei*. Mas os demais agrupamentos são muito semelhantes aos obtidos nos fenogramas construídos a partir dos padrões gerais.

3.4. Análise Cladística

Para completar as análises entre as espécies e biótipos analisados do gênero *Paspalum*, fizemos uma análise filogenética a partir dos dados de presença e ausência de bandas peroxidásicas e superóxido dismutásicas. Para isto, utilizamos o método de parcimônia de Wagner.

A partir desta análise obteve-se uma árvore de consenso formada a partir de três árvores iniciais. A árvore de consenso mostrou que *P.dilatatum* de Virasoro, *P.dilatatum* de Vacaria, forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei*, *P.urvillei*, forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii* e *P.juergensii* encontram-se numa politomia, que *P.intermedium* e *P.dilatatum* anteras roxas localizam-se em posições bastante próximas, e *P.dilatatum* Torres típico e o biótipo Torres armado divergem de pontos diferentes, mas muito próximos (ver figura 32).

Fizemos esta mesma análise retirando as duas formas morfológicamente intermediárias, pois este método é apropriado para o estudo da divergência de entidades evolutivas ao longo do tempo. Como as formas intermediárias supostamente se originaram de uma hibridização, a

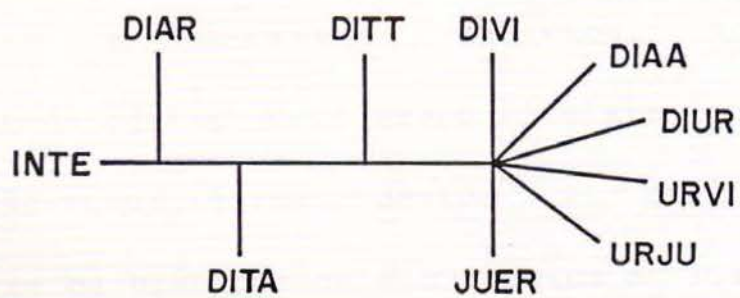


Figura 32: Árvore de consenso (sem raiz) obtida através do método de parcimônia de Wagner a partir dos dados de presença e ausência de bandas isoperoxidásicas e superóxido dismutásicas.

utilização destas poderia prejudicar a análise. Esta análise também levou à formação de uma árvore de consenso, obtida a partir de três árvores filogenéticas iniciais. A árvore de consenso mostrou que os biótipos de Virasoro e de Vacaria, *P.urvillei* e *P.juergensii* continuam numa posição não resolvida e a posição dos demais permaneceram iguais às apresentadas pela primeira análise (ver figura 33).

Também foi feita uma análise com os dados de presença e ausência das bandas isoenzimáticas em que foram atribuídos pesos sucessivos a caracteres distintos. A árvore filogenética obtida mostra que o grupo Dilatata do gênero *Paspalum* é não-monofilético devido à inclusão de *P.juergensii* entre os biótipos de *P.dilatatum* e *P.urvillei*. Também as demais espécies reúnem-se com os biótipos de *P.dilatatum*, mostrando a não-monofilia desta espécie. Estes resultados podem ser observados na figura 34.

A partir dos dados de presença e ausência de bandas e também a frequência das bandas nas entidades, calculou-se uma matriz de distância Manhattan entre as entidades taxonômicas, e a partir desta matriz foram feitas duas análises pelo método de agrupamento Neighbor-Joining. O resultado da análise feita a partir dos dados de frequências

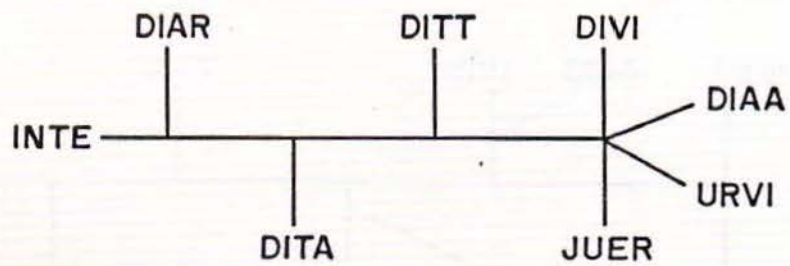


Figura 33: Análise filogenética a partir do método de parcimônia de Wagner das entidades analisadas do gênero *Paspalum*, com exceção das duas formas morfológicamente intermediárias. Detalhes: ver legenda da figura 32.

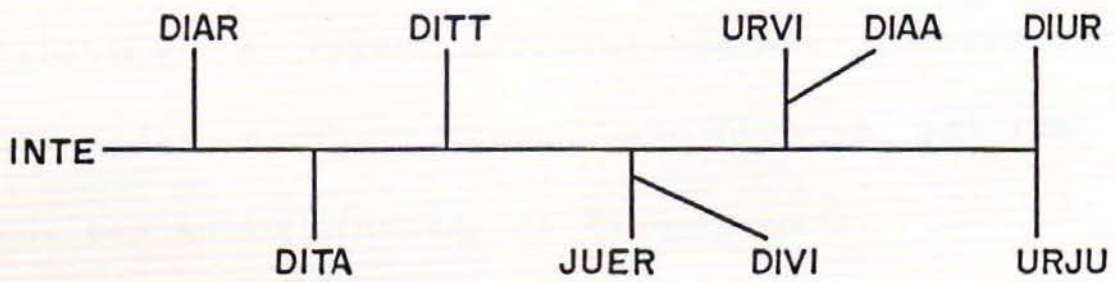


Figura 34: Análise filogenética das entidades taxonômicas do gênero *Paspalum* a partir do método de parcimônia de Wagner, com diferentes pesos por cada caracter.

são ilustrados na figura 34. *P.juergensii* e *P.intermedium* são nitidamente afastados das demais entidades taxonômicas e também muito distanciadas entre si. *P.dilatatum* anteras amarelas de Vacaria e a forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* são muito relacionadas divergindo de um ponto comum. Também *P.dilatatum* Torres típico e Torres armado mostram-se muito relacionados, divergindo de um ponto próximo. *P.urvillei* incluiu-se junto aos biótipos de *P.dilatatum*, o que torna esta última espécie não-monofilética. A forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii* encontra-se próximo de *P.urvillei*, mas muito afastado de *P.juergensii*.

Figura 34: Árvore filogenética calculada a partir da matriz de caracteres morfológicos e de dados de frequência de bandas de isoenzimas e agrupada pelo método de Joiner (1985). Detalhes ver no texto.

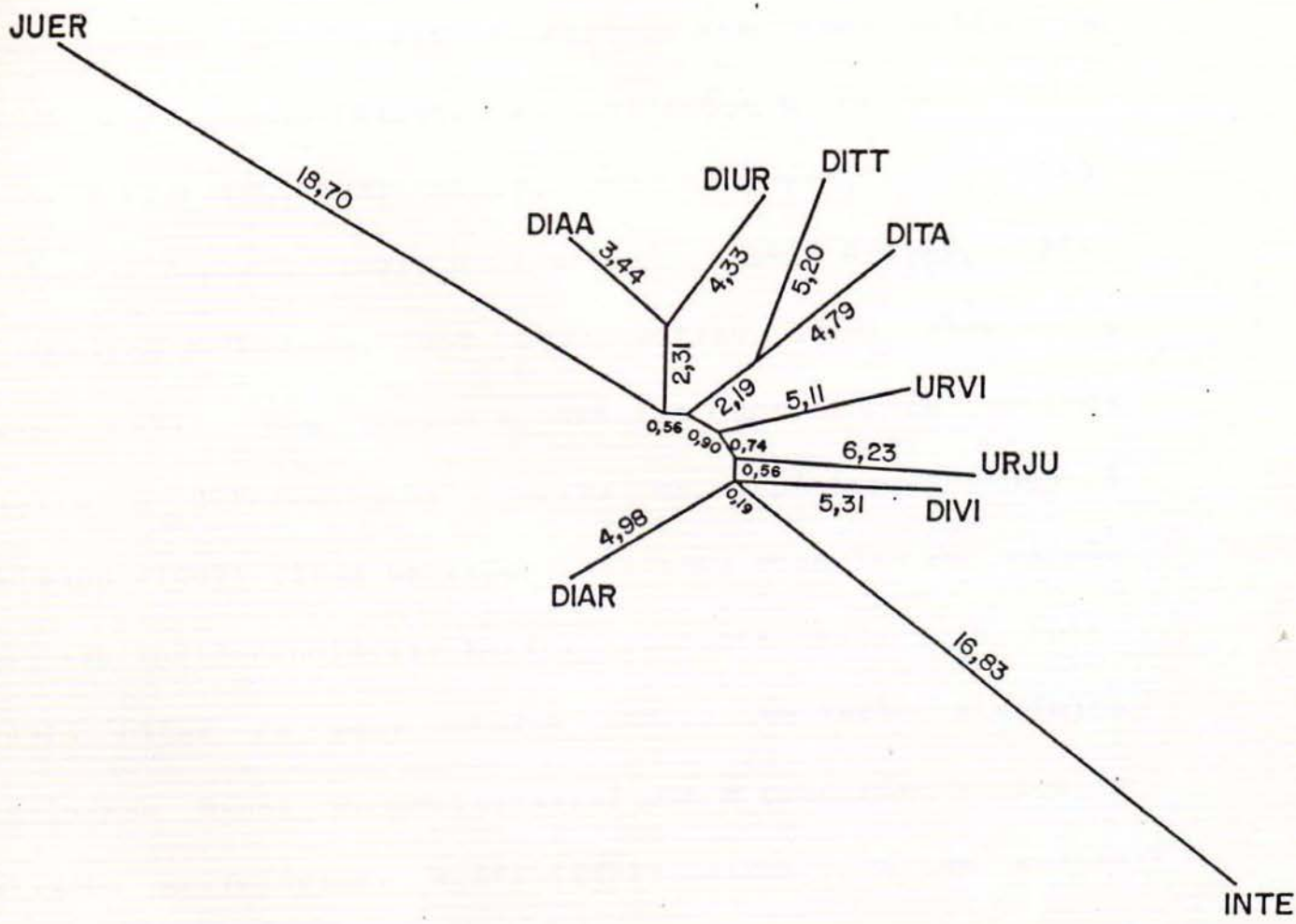


Figura 35: Arvore filogenética calculada a partir da matriz de distância Manhattan, a qual foi executada através dos dados de frequência de bandas nas entidades, e agrupada pelo método Neigbor- Joining. Detalhes: ver no texto.

DISCUSSÃO

Atualmente, o conceito de espécie tem sido motivo de revisão e discussão (Rosen, 1979; Eldredge & Cracraft, 1980; Nelson & Platnick, 1981; Wiley, 1981; Cracraft, 1983, 1989; Mishler & Donogue, 1982; Hill & Crane, 1982; Ridley, 1989; de Queiroz & Donogue, 1988, 1990; Nelson, 1989; Wheeler & Nixon, 1990). Nem sempre a análise morfológica isolada permite a diferenciação precisa de espécies, Jordan & Evermann (1902) citam um exemplo de três espécies de salmão que são indiferenciáveis morfológicamente. Rajora & cols. (1991) citam em seus estudos que a variação alozímica (incluindo dados de peroxidases) não é concordante com a variação morfológica. Wolff (1991) coloca que em muitos casos não há correlação entre variabilidade morfológica e eletroforética.

Larsen (1965) salienta que todas as manifestações morfológicas de variedades diferentes podem apresentar diferenças bioquímicas, mas nem todas as diferenças bioquímicas são refletidas morfológicamente. Por isso, sugere-se que o uso de técnicas como cromatografia e eletroforese para ajudar a caracterizar e identificar variedades. Segundo Larsen (1969), existem pelo menos trinta

sistemas enzimáticos com múltiplas formas moleculares e que a análise isoenzimática de dois ou mais sistemas parecem apresentar considerável potencial para a caracterização de variedades. A eletroforese destinada ao estudo de isoenzimas é muito importante para a sistemática. (Boulter & cols., 1966; Tanksley & Orton, 1983; Micales & cols., 1986; Conicella & cols., 1990; Sen, 1990).

Esta metodologia permite analisar níveis de variabilidade gênica populacionais e interpopulacionais (Allard & Kahler, 1971; Gottlieb, 1971; Johnson, 1974; Scandalios, 1974; Roy & Rieseberg, 1989) e inferir o grau de relacionamento filogenético entre diferentes espécies animais (Johnson & cols., 1966; Kanapi & Wheeler, 1970; Nair & cols., 1971; Ayala & cols., 1974) e vegetais (Cavalli, 1976).

Segundo Johnson (1975), a eletroforese permite o acesso direto a níveis de variabilidade genética em populações naturais e ainda as causas de cada variabilidade. Os dados eletroforéticos são comumente utilizados em avaliação de distâncias genéticas e em questões sobre a função da variabilidade genética na diversidade de espécies.

Desenvolveram-se uma série de coeficientes para sumarizar os dados de presença e ausência de isoenzimas ou de

freqüências genotípicas e alélicas em uma figura simples que valoriza o grau de similaridade, ou estes mesmos dados são convertidos em distâncias entre cada par amostral (Cavalli-Sforza & Edward, 1967; Hedrick, 1971; Nei, 1971; Rogers, 1972; e outros). Para melhor visualizar e sumarizar os dados obtidos das matrizes com coeficientes de similaridade e distâncias genéticas, desenvolveram-se dendogramas para agrupar populações.

Wolf e cols. (1991) estudaram o relacionamento genético e o padrão de diversidade alozímica em um grupo de espécies da família Polemoniaceae, utilizando a técnica de eletroforese. Neste trabalho, o relacionamento genético baseado na identidade genética de Nei não corresponde ao relacionamento taxonômico inicialmente proposto. Os resultados demonstraram uma baixa diversidade entre taxons, agrupando diferentes espécies. Os autores citam que este padrão de relacionamento genético é o esperado para modelos de especiação recente e incipiente.

Oudemans & Coffey (1991) separaram espécies e subespécies através de dados isozímicos, as quais eram intimamente relacionadas morfologicamente.

Com base nas afirmações acima, o presente trabalho

procurou fazer uma analogia entre os dados de relacionamento isoenzimático e a taxonomia baseada em caracteres morfológicos das diferentes entidades taxonômicas analisadas do gênero *Paspalum*.

Como já citado (Burson & cols., 1991), a espécie *P.dilatatum* apresenta pelo menos seis biótipos diferentes e estes apresentam uma semelhança muito grande com relação à *P.urvillei*. Estudos já realizados (Burson & Bennett, 1972; Burson, 1978; Burson, 1979) demonstraram que esta última espécie e um biótipo de *P.dilatatum* (anteras amarelas de Vacaria) apresentam a mesma fórmula genômica (IIJJ) e a semelhança morfológica entre estas duas entidades taxonômicas é muito grande.

Os dados obtidos pelo presente estudo mostraram que *P.urvillei* apresenta um coeficiente de similaridade mais alto com relação à maioria dos biótipos de *P.dilatatum* do que os próprios indivíduos de *P.urvillei* entre si e também de muitos biótipos de *P.dilatatum* entre si. Nos fenogramas, *P.urvillei* está sempre junto com os demais biótipos. Levando-se em conta que não existe uma barreira reprodutiva nem geográfica de *P.urvillei* com muitos biótipos de *P.dilatatum*, talvez esta espécie não seja uma espécie

distinta, mas sim uma variação de *P.dilatatum*.

Com exceção das espécies diplóides (*P.juergensii* e *P.intermedium*), encontrou-se uma alta similaridade gênica entre todas as demais entidades taxonômicas estudadas, tanto para o sistema das peroxidases como para o sistema das superóxido dismutases.

Excluindo-se estas duas espécies diplóides, o índice de similaridade médio de Jaccard é de 0,475. Esta similaridade é ainda mais alta que a similaridade encontrada para dezoito espécies do gênero *Relbunium* ($\bar{S}_J=0,39$) que foi considerada muito alta pela autora (Cavalli, 1976). Hubby & Throckmorlon (1968) encontraram que pares de espécies crípticas do gênero *Drosophila* compartilham 50% de suas proteínas, enquanto que as espécies não crípticas compartilham apenas 18%. Martinez (1975) encontrou um índice médio de similaridade de 23% para espécies do grupo Cardini de *Drosophila*. Estas similaridades são bastante inferiores que as encontradas em *Paspalum*, especialmente entre os biótipos de *P.dilatatum*, e entre estes e *P.urvillei*, mostrando uma baixa reformulação gênica entre estes taxons, sugerindo tratar-se de entidades taxonômicas sub-específicas.

Na análise fenética, as espécies diplóides apresentaram

as menores distâncias em relação às demais entidades taxonômicas analisadas e entre si, e também apresentaram os menores coeficientes de similaridade intertaxonômico. Sendo as espécies citadas, os possíveis progenitores do grupo Dilatata (Burson & Bennett, 1972; Burson & cols., 1973; Barreto, 1974; Fernandes & cols., 1974; Burson, 1978; Burson, 1979; Burson, 1983; Norrmann & cols., 1989; Caponio & Quarin, 1990), parece que os dados obtidos no presente trabalho estão plenamente concordantes.

A análise cladística mostrou que o grupo Dilatata é não-monofilético, pois as espécies *P.juergensii* e *P.intermedium* estão muito próximos e até juntas com as demais espécies e biótipos de *P.dilatatum*. Como a análise cladística pressupõe modificações graduais ao longo do tempo e não origem por hibridações, a inclusão das espécies diplóides parentais entre espécies poliplóides derivadas pode ser decorrente de um programa técnico.

Espécies diplóides apresentam um menor número de isoenzimas em relação às poliplóides (Gottlieb, 1982; Menancio & Hymowitz, 1989). Os dados apresentados no presente trabalho, demonstraram que para o sistema das superóxido dismutases, *P.juergensii* e *P.intermedium* foram as

entidades taxonômicas que apresentaram o menor número de bandas isozímicas, diferenciando-se do sistema das peroxidases, no qual somente *P.intermedium* apresentou um pequeno número de bandas; *P.juergensii* foi um dos grupos taxonômicos que apresentou um alto número de isoenzimas.

F.J.M.Valls (comunicação pessoal) diferenciou o biótipo de Torres em *P.dilatatum* Torres típico e *P.dilatatum* Torres armado devido a características morfológicas já citadas anteriormente. Na análise isoenzimática, os indivíduos pertencentes a estas entidades taxonômicas apresentaram-se sempre bastante próximos, com os coeficientes de similaridade bastante altos. Estes dados parecem demonstrar que a divergência destes biótipos foi bastante recente na escala evolutiva, ou não existe esta diferenciação, sendo que as diferenças morfológicas possam ser conseqüências de adaptação ambiental.

A forma morfológicamente intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei*, como já citado, decorrente de hibridização natural entre *P.dilatatum* de Vacaria e *P.urvillei*, demonstrou uma alta similaridade isozímica com relação à *P.dilatatum* de Vacaria e uma baixa similaridade quanto à *P.urvillei*. Nos fenogramas, *P.dilatatum* de Vacaria esteve

sempre agrupado à forma intermediária, enquanto que esta última nunca agrupou-se com *P.urvillei*.

Estes dados colocam uma interrogação se esta entidade realmente é um híbrido natural, ou possa fazer parte da própria variabilidade de *P.dilatatum* de Vacaria. Outra colocação importante é o fato destes indivíduos pertencentes à forma intermediária entre *P.dilatatum* e *P.urvillei* apresentarem meiose regular (Hickenbick e Kersting, não publicado). No entanto, um fato que reforça a idéia desta entidade ser um híbrido natural é a alta percentagem de sementes vazias que apresenta (Souza-Chies e Cavalli-Molina, não publicado), fato comum em espécies híbridas.

Caso esta forma intermediária seja realmente um híbrido, os dados obtidos sugerem a ocorrência de uma introgressão muito grande em direção à *P.dilatatum* de Vacaria.

A forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii* também mostraram resultados semelhantes. Esta entidade taxonômica demonstrou uma similaridade muito grande com relação à *P.urvillei* e uma similaridade muito baixa com *P.juergensii*, inclusive um dos menores índices de similaridade obtido por esta forma intermediária foi com relação à *P.juergensii*. Nos fenogramas, a forma

morfologicamente intermediária normalmente encontra-se junto à *P.urvillei*, e nunca agrupado à *P.juergensii*.

Estes dados parecem mostrar que esta forma intermediária pode fazer parte da própria variabilidade de *P.urvillei*. Dados de Hickenbick e Kersting (comunicação pessoal) mostraram que alguns indivíduos classificados (com base somente na morfologia) como pertencentes à forma morfologicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii* apresentam 40 cromossomos, e não 30 como o esperado.

Os resultados obtidos neste trabalho e demais dados citados acima demonstram que a análise morfológica não é suficiente para a sistemática vegetal.

A baixa diferenciação gênica obtida entre as espécies e biótipos analisados pode ser decorrente do próprio processo de especiação que lhes originou. Conforme salientado por Moraes-Fernandes (1974), diferentes espécies e biótipos de *Paspalum* surgiram por hibridação interespecífica e poliploidização. Assim sendo, a barreira reprodutiva decorrente da ocorrência de números cromossômicos diferentes levou ao isolamento reprodutivo sem uma necessária divergência gênica que construísse outros mecanismos de

isolamento reprodutivo.

Um outro fator que pode estar contribuindo para a baixa diferenciação intertaxonômica entre os grupos analisados são os sistemas isoenzimáticos estudados. Estes caracterizam-se pelo alto polimorfismo e baixa diferenciação (Benito & cols., 1980). Uma razão para este alto polimorfismo é o fato destas enzimas estarem envolvidas no metabolismo do oxigênio em todos os organismos aeróbicos.

Diferentes autores (Allen & Hall, 1973; Asada & cols., 1973; de Jesus & cols., 1989; Scandalios, 1990; Zhen-Chang & McClure, 1990) relacionaram o sistema das superóxido dismutases e o das peroxidases ao "stress" oxidativo, estas enzimas são capazes de remover, neutralizar ou reaproveitar os radicais livres em oxigênios intermediários. Para desenvolver esta função, SOD normalmente encontra-se no cloroplasto ou mitocôndria, PER encontra-se na parede celular. Esta última também apresenta um importante papel no processo de lignificação (Lagarimini & cols., 1987; Cassab & Varner, 1988; Ferrer & cols., 1990) e no "stress" mecânico e patogênico (Adams & Galston, 1974).

Rajora & cols. (1991) mostraram em seus estudos que não há relação entre padrão isozimico com latitude e longitude,

entre os onze sistemas isoenzimáticos analisados por estes autores, incluindo PER. Scandalios (1974) cita que as peroxidases constituem um grupo de enzimas determinadas temporalmente e espacialmente. No entanto Boulter & cols. (1966) colocam que os padrões enzimáticos variam de acordo com a distribuição geográfica.

Nossos dados baseados no sistema das peroxidases, demonstraram para a maioria das entidades taxonômicas estudadas, que existe uma relação muito pequena quanto à variação isoenzimática e a amplitude da distribuição geográfica da amostra analisada. *P.juergensii* foi a única espécie que aparentemente demonstrou diferença isozímica relacionada à diferença espacial. Nesta espécie, um único indivíduo coletado na região da campanha rio-grandense apresentou os menores coeficientes de similaridade em relação aos demais originários de regiões de serra. Observamos que a variação temporal apresenta um efeito bastante importante para este sistema enzimático. Metade da amostra de *P.dilatatum* de Virasoro, um indivíduo de *P.dilatatum* Torres armado e poucas plantas pertencentes à forma morfológicamente intermediária entre *P.urvillei* e *P.juergensii* foram coletados e analisados em uma época

posterior aos demais. Estes indivíduos apresentaram os coeficientes de similaridade muito baixos em relação aos primeiros, apesar de que para a forma intermediária, o relacionamento entre os próprios indivíduos da segunda amostragem é bastante baixo.

Os dados obtidos através da análise de superóxido dismutases mostraram que não existe relação entre variação isozimica e distribuição geográfica para este sistema.

RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho analisou diferentes entidades taxonômicas do gênero *Paspalum* quanto ao relacionamento isoenzimático, utilizando dois sistemas enzimáticos (PER) e (SOD). A partir dos padrões de bandas isoenzimáticas dos dois sistemas, foram calculados coeficientes de similaridade de Jaccard intra e intertaxonômico. Foram construídos fenogramas a partir destes coeficientes e distâncias Manhattan e Euclidiana e também foram feitas análises cladísticas utilizando o programa filogenético de HENNIG86 e o método de agrupamento Neighbor-Joining.

Os resultados obtidos no presente trabalho, bem como as conclusões que os mesmos permitiram, podem ser assim sumarizados:

- A análise isoenzimática realizada neste trabalho não foi concordante com a taxonomia baseada em somente análise morfológica, requerendo uma revisão taxonômica do grupo *Dilatata* e espécies relacionadas do gênero *Paspalum*.
- *P.urvillei* mostrou-se intimamente relacionado com os biótipos de *P.dilatatum*, colocando dúvidas do porquê

P. urvillei constitui-se uma espécie à parte e não um biótipo de *P. dilatatum*.

- *P. dilatatum* Torres típico e Torres armado mostraram-se intimamente relacionados, sugerindo tratar-se de uma única entidade taxonômica.

- A forma morfológicamente intermediária entre *P. dilatatum* e *P. urvillei* não se comportou como uma espécie intermediária, mostrando alta similaridade com *P. dilatatum* de Vacaria, mas muito diferenciado de *P. urvillei*.

- A forma morfológicamente intermediária entre *P. urvillei* e *P. juergensii* também não demonstrou ser uma espécie intermediária, sendo que parte dos indivíduos classificados pela morfologia comprovadamente fazem parte da variabilidade de *P. urvillei*.

- Foi verificada uma grande similaridade entre as espécies e biótipos analisados, superior a obtida por outros autores, para outras espécies, revelando uma baixa reformulação gênica entre os mesmos, pelo menos no que se refere aos genes que codificam as isoenzimas estudadas.

- As espécies diplóides tendem a apresentar um menor número

de bandas isozimicas em relação aos grupos poliplóides.

- De uma maneira geral, os dados de variabilidade isoenzimática não são diretamente proporcionais com a amplitude da distribuição geográfica das amostras das entidades taxonômicas estudadas.

ABSTRACT AND CONCLUSIONS

Different taxonomic entities of gennes *Paspalum* have been analysed in this work concerning their isoenzymatic relationships using two enzymatic systems (PER) and (SOD). Similarity coefficient of Jaccard were calculated, intra and intertaxonomic, from the isoenzymatic banding patterns of the two systems. Fenograms were constructed using these coefficients and Manhattan and Euclidian distances and also cladistic analyses utilizing the filogenetic program HENNIG86 and the clustering Neighbor-Joining method were performed.

the results and conclusions obtained in this work may be summarized as fallows:

- The isoenzymatic analysis done is not in agreement with the taxonomy based on the use of morfological data only, thus, requiring a taxonomic review of the Dilatata group and related species of gennes *Paspalum*.
- *P.urvillei* showed to be very closely related with the *P.dilatatum* biotypes, raising doubts about the reasons why *P.urvillei* is considered an outsider specie and not a biotype of *P.dilatatum*.
- *P.dilatatum* Torres típico and Torres armado showed to be

very closely related suggesting to represent just one taxonomic entity.

- The intermediate morfological form between *P.dilatatum* and *P.urvillei* did not behave like an intermediate species, showing high similarity with *P.dilatatum* Vacaria, and being very different from *P.urvillei*.

- The intermediate morfological form between *P.urvillei* and *P.juergensii* also did not show to be an intermediate species. A number of the individuals classified by the morfology, were proved to be part of the *P.urvillei* variability.

- A great similarity between the species and biotypes analysed were verified showing to be even stronger than the results of other authors, for other species, demonstrating low genetic reformulation between them, at least, considering the genes that code isoenzymes studied in this work.

- The diploid species have a tendency to present a lower isoenzymatic band number compared to poliploid groups.

- As a whole, the isoenzymatic variability data are not directly proporcional with the width of the geographic distribution from samples of the studied taxonomic entity.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, W.R. & Galston, A.W. Differential effects of ethylene on pith peroxidase of intact tobacco plants and excised tissue. *Plant. Physiol.* 53: 931-933. 1974.
- Allard, R.W. & Kahler, A.L. Allozyme polymorphisms in plant populations. *Stadler Symposia* 3: 8-24. 1971.
- Allen, J.I. & Hall, D.O. Superoxide reduction as a mechanism of ascorbate-stimulated oxygen uptake by isolated chloroplasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 52(3): 856-862. 1973.
- Asada, K.; Urano, M. & Takanashi, M.A. Subcellular location of superoxide dismutase in spinach leaves and preparation and properties of crystalline spinach superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 36: 257-266. 1973.
- Avise, J.C. Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.* 23: 465-481. 1975.
- Ayala, F.J.; Tracey, M.L.; Hedgecock, D. & Richmond, R.C. Genetic differentiation during the speciation process in *Drosophila*. *Evolution*, 28: 576-592. 1974.
- Barreto, I. L. O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul. Tese apresentada para Concurso de Livre-Docência no Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1974.
- Bashaw, E.C. Apomixis and its application in crop improvement. *Hybridization of Crop Plants*: 45-63. 1980.
- Batista, L.A.R.; Godoy, R. & Valls, J.F.M. Melhoramento genético de forrageiras do gênero *Paspalum*. *Encontro Internacional sobre Melhoramento de Paspalum*. 1987.
- Benito, C.; La Vega, M.P. de & Salinas, J. The inheritance of wheat kernel peroxidases. *The Journal of Heredity* 71:

- Bennett, H. W. & Bashaw, E. C. An interspecific hybrid in *Paspalum*. *Journal of Heredity* 51(2): 81-85. 1960.
- Boulter, D.; Thurman, D.A.; & Turner, B.L. The use of disc electrophoresis of plant proteins in systematics. 135-143. 1966.
- Brewer, G.J. An introduction to isozyme techniques. *Academic Press*. New York. p47. 1970.
- Burkart, A. Flora ilustrada de entre rios. II. *Gramíneas*, 551p. Buenos Aires. 1969. Citado por Quarin e Norrmann, 1987b.
- Burson, B. L. & Bennett, H. W. Genome relations between an intraspecific *Paspalum dilatatum* hybrid and two diploid *Paspalum* species. *Can J. Genet. Cytol.* 14: 609-613. 1972.
- Burson, B. L.; Lee, H. & Bennett, H. W. Genome relations between tetraploid *Paspalum dilatatum* and four diploid *Paspalum* species. *Crop Science* 13: 739-743. 1973.
- Burson, B.L. Genome relations between *Paspalum conspersum* and two diploid *Paspalum* species. *Can. J. Genet. Cytol.*, 20: 365-372. 1978. Citado por Burson, 1979.
- Burson, B.L. Cytogenetics of *Paspalum urvillei* x *P.intermedium* and *P.dilatatum* x *P.paniculatum* hybrids. *Crop Science* 19: 534-538. 1979.
- Burson, B. L. Phylogenetic investigations of *Paspalum dilatatum* and related species. *XIV Internacional Grassland Congress*. 1983.
- Burson, B.L. Cytology of some apomictic *Paspalum* species. *Crop Sci.* 15: 229-232. 1985. Citado por Quarin e Norrmann, 1987b.
- Burson, B. L. Genome relationships between tetraploid and hexaploid biotypes of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. *Bot. Gaz.* 152(2): 219-223. 1991.

- Burton, G.W. & Jackson, J.E. Radiation breeding of apomictic prostrate Dallisgrass, *Paspalum dilatatum* var. *pauciciliatum*. *Crop Sci.* 2ã: 495-497. 1962. Citado por Quarin, 1987.
- Caponio, I. & Quarin, C. L. El sistema genetico de *Paspalum simplex* y de un hibrido interespecifico con *P.dilatatum*. *Kurtziana* 19: 35-45. 1987.
- Caponio, I. & Quarin, C. L. Intra and interspecific hybridization between dallisgrass and vaseygrass. *Crop Science* 30: 362-364. 1990.
- Cassab, G.I. & Varner, J.E. Cell wall proteins. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 39: 321-353. 1988. Citado por Li & McClure, 1990.
- Cavalli, S.S. Divergência isoenzimica e relações evolutivas entre espécies do gênero *Relbunium* (Rubiaceae). Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em genética da Univ. fed. do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. 179p. 1976.
- Cavalli-Sforza, L.L. & Edward, A.M.F. Phylogenetic analysis models and estimation procedures. *Evolution* 21: 550-570. 1967. Citado por Avise, 1975.
- Chase, A. The north american species of *Paspalum*. *Contr. U.S. Natl. Herbarium* 28: 1-310. 1929. Citado por Quarin & Norrmann, 1987b; Caponio e Quarin, 1987 e Burson, 1979.
- Conicella, C.; Errico, A. & Saccardo, F. Cytogenetics and isozyme studies of wild and cultivated *Capsicum annum*. *Genome* 33: 279-282. 1990.
- Cracraft, J. Species concepts and speciation analysis. *Curr. Ornith.* 1: 159-187. 1983. Citado por Nixon & Wheeler, 1990.
- Cracraft, J. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In: D.Otte and J.A. Endler (eds).

Speciation and its Consequences. Sinauer Assoc., Sunderland, Mass., pp.28-59. 1989. Citado por Nixon & Wheeler, 1990.

- Crawford, D.J.; Stuessy, T.F.; Lammers, T.G.; Silva, M.O. & Pacheco, P. Allozyme variation and evolutionary relationships among three species of *Wahlenbergia* (Campanulaceae) in the Juan Fernandez Islands. *Botanical Gazette* 151(1): 119-124. 1990.
- De Jesus, M.D.; Tabatabai, F. & Chapman, D.J. Taxonomic distribution of copper-zinc superoxide dismutase in green algae and its phylogenetic importance. *J. Phycol.* 25: 767-772. 1989.
- De Queiroz, K. & Donogue, M. Phylogenetic systematics and the species problem. *Cladistics* 4: 317-338. 1988. Citado por Nixon & Wheeler, 1990.
- De Queiroz, K. & Donogue, M. Phylogenetic systematics and species revisited. *Cladistics* 6: 83-90. 1990. Citado por Nixon & Wheeler, 1990.
- Di Renzo, M.A.; Poverene, M.M.; Tiranti, I.N. & Medina, M.I. Polimorfismos isoenzimáticos en cuatro cultivares de pasto Llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad. Nees). *Turrialba* 40(3): 397-402. 1990.
- Dobzhansky, Th.; Ayala, F. J.; Stebbins, G. L.; Valentine, J. W. *Evolution*. San Francisco, USA. 1977.
- Eldredge, N. & Cracraft, J. Phylogenetic patterns and the evolutionary process. *Columbia Univ. Press*, New York. 1980. Citado por Nixon & Wheeler, 1990.
- Ferrer, M.A.; Pedreño, M.A.; Calderón, A.A.; Muñoz, R & Barceló, A.R. Distribution of isoflavones in lupin hypocotyls. Possible control of cell wall peroxidase activity involved in lignification. *Physiologia Plantarum* 79: 610-616. 1990.
- Gottlieb, L.D. Gel electrophoresis: new approach to the study of evolution. *BioScience* 21: 939-944. 1971. Citado por Avise, 1975.

- Gottlieb, L.D. Genetic differentiation, sympatric speciation, and the origin of a diploid species of *Stephanomeria*. *Amer. J. Bot.* 60: 545-553. 1973.
- Gottlieb, L.D. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 216: 373-380. 1982.
- Gottlieb, L.D. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 206: 373-380. 1982. Citado por Crawford & cols., 1990.
- Hedrick, P.W. A new approach to measuring genetic similarity. *Evolution* 25: 276-280. 1971. Citado por Avise, 1975.
- Hickenbick, M.C.M.; Flores, A.I.P.; Molina, S.C.; Weber, L.H.; Kersting, A.C.O.; Costa, L.C.; Souza-Chies, T.T. & Albarus, M.H. Mode of reproduction and seed production in *Paspalum dilatatum* POIR Virasoro biotype-Dilatata group (Gramineae). *Rev. Bras. Genet.* No prelo.
- Hill, C. & Crane, P. Evolutionary cladistics and the origin of angiosperms. In Joysey, K.A. & Friday, A.E. (eds), *Problems of Phylogenetic Reconstruction*. Academic Press, London, Chapter 10. 1982. Citado por Nixon & Wheeler, 1990.
- Hubby, I.L. & Throckmorton, L.H. Protein differences in *Drosophila*. IV. A study of sibling species. *The American Naturalist*. 102: 193-205. 1968.
- Johnson, G.B. Enzyme polymorphism and metabolism. *Science* 184: 28-37. 1974.
- Johnson, G.B. Use of internal standards in electrophoretic surveys of enzyme polymorphism. *Biochemical Genetics* (13): 833-847. 1975.
- Johnson, F.M.; Kanapi, C.G.; Richardson, R.H.; Wheeler, M.R. & Stone, W.S. An operational classification of *Drosophila* esterases for species comparisons. *The Univ. Texas Publ.* 6615: 517-532. 1966.

- Kanapi, C.G. & Wheeler, M.R. Comparative isozyme patterns in three species of the *Drosophila masuta* complex. *Texas Rep. Biol. Med.*, 28: 261-278. 1970.
- Lagarimini, L.M.; Burkart, M.; Moyer, M. & Rothstein, S. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming-peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue specific expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7542-7546. 1987. Citado por Li & McClure, 1990.
- Larsen, A.L. In: Mckee, G.W. 1973. Chemical and biochemical techniques for varietal identification. *Seed Sci. & Technol.* 1:181-199. 1965.
- Larsen, A.L. Isoenzymes and varietal identification. *Seed World* 104(8): 5-6. In: Mckee, G.W. 1973. 1969.
- Li, Z.C. & McClure, J.W. Soluble and bound applastc proteins and isozymes of peroxidase, esterase and malate dehydrogenase in oat primary leaves. *J. Plant. Physiol.* 136: 398-403. 1990.
- Mckee, G.W. Chemical and biochemical techniques for varietal identification. *Seed Sci & Technol.* 1: 181-199. 1973.
- Menancio, D.I. & Hymowitz, T. Isozyme variation between diploid and tetraploid cytotypes of *Glycine tapacina* (Labill.) Benth. *Euphytica* 42: 79-87. 1989.
- Micales, J.A.; Bonde, M.R. & Peterson, G.L. The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon.* 27: 405-449. 1986. Citado por Sen, 1990.
- Mishler, B.D. & Donogue, D.J. Species concepts: a case for pluralism. *Syst. Zool.* 31: 491-503. 1982. Citado por Nixon e Wheeler, 1990.
- Moraes-Fernandes, M.I.B.; Barreto, I.L.; Salzano, F.M.; Sacchet, A. M. O. F. Cytological and evolutionary relationships in brazilian forms of *Paspalum* (Gramineae). *Caryologia* 27(4): 455-465. 1974.

- Nair, P.S.; Brncic, D. & Kojima, K. Isozyme variation and evolutionary relationships in the *mesophragmatica* species group of *Drosophila*. *Univ. Texas Publ.*, 7103: 17-28. 1971.
- Nei, M. Interspecific gene differences and evolutionary time estimated from electrophoretic data on protein identity. *Amer. Nat.* 105: 385-398. 1971. Citado por Avise, 1975.
- Nelson, G. Species and taxa: systematics and evolution. In Otte, D. & Endler, J.A. (eds), *Speciation and its consequences*. Sinauer Assoc., Sunderland, Mass, pp 60-81. Citado por Nixon & Wheeler, 1990.
- Nixon, K.C. & Wheeler, Q.D. An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6: 211-223. 1990.
- Norrmann, G.A.; Quarin, C.L.; & Burson, B.L. Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *Journal of Heredity* 80(1): 24-28. 1989.
- Oudemans, P. & Coffey, M.D. A revised systematics of twelve papillate phytophthora species based on isozyme analysis. *Mycol. Res.* 95(9): 1025-1046. 1991.
- Prestes, P.J.Q.; Freitas, E.A.G. de & Barreto, I.L. Hábito vegetativo e variação estacional do valor nutritivo das principais gramíneas da pastagem nativa do Rio Grande do Sul. *Anu. Tec. IPZFO* 3: 516-531. 1976.
- Quarin, C.L. Melhoramento de *Paspalum* por meio de hibridações interespecíficas. *Encontro Internacional Sobre Melhoramento Genético de Paspalum*. 1987.
- Quarin, C.L. & Norrmann, G.A. The survey in the genetics system of *Paspalum*: progress and prospects. *Encontro Internacional sobre Melhoramento Genético de Paspalum*. 1987a.
- Quarin, C.L. & Norrmann, G.A. Relaciones entre el número de cromosomas, su comportamiento en la meiosis y el

sistema reproductivo del genero *Paspalum*. *Anales del IV Congreso Latinoamericano de Botânica* 3: 25-34. 1987b.

- Rajora, O.P.; Zsuffa, L. & Dancik, B.P. Allozyme and leaf morphological variation of eastern cottonwood at the northern limits of its range in Ontario. *Forest Science* 37(2): 688-702. 1991.
- Ridley, M. The cladistics solution to the species problem. *Biol. Phil.* 4: 1-16. 1989. Citado por Nixon & Wheeler, 1990.
- Rogers, J.S. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Univ. Texas Publ.* 7213: 145-153. 1972. Citado por Avise, 1975.
- Roy, B.A. & Rieseberg, L.H. Evidence for apomixis in *Arabis*. *Journal of Heredity* 80(6): 506-508. 1989.
- Saiton, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406-425. 1987.
- Savidan, Y. A apomixia das gramíneas forrageiras tropicais e subtropicais. *Encontro Internacional Sobre Melhoramento Genético de Paspalum*. 1987.
- Scandalios, J.G. Isozymes in development and differentiation. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 225-258. 1974.
- Scandalios, J.G. Isozymes—a biochemical approach to seed identification. *American Seed Research Foundation* 12(1): 1-8. 1974.
- Scandalios, J.G. Response to plant antioxidant defense genes to environmental stress. (eds) Scandalios, J.G. & Wright, T.R.F. In: *Advances in Genetics-Genomic Responses to Environmental Stress* 28. Chapter 1: 6-33. 1990.
- Sen, R. Intraspecific variation in two species of *Suillus* from scots pine (*Pinus sylvestris* L.) forests based on somatic incompatibility and isozyme analyses. *New Phytol.* 114: 607-616. 1990.

- Tanksley, S.D. & Orton, T.J. Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part. A. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. 1983.
- Valls, J.F.M. & Pozzobon, M.T. Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil. Encontro Internacional Sobre Melhoramento Genético de *Paspalum*. 1987.
- Van Dijk, H.; Wolff, K. & De Vries, A. Genetic variability in *Plantago* species in relation to their ecology. 3. Structure of populations of *P.major*, *P.lanceolata*, and *P.coronopus*. *Theor. Appl. Genet.* 75: 518-528. 1988. Citado por Wolff, 1991.
- Wheeler, Q.D. & Nixon, K.C. Another way of looking at the species problem: a reply to the Queiroz and Donogue. *Cladistics* 6: 77-81. 1990. Citado por Nixon & Wheeler, 1990.
- Wiley, E.O. Phylogenetic systematics. Wiley, New York. 1981. Citado por Nixon & Wheeler, 1990.
- Williams, B.L.; Price, T.V.; Morley, T.B. Resistance in *Paspalum dilatatum* to *Ascochyta paspali*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 30: 73-77. 1990.
- Wolf, P.G.; Soltis, P.P. & Soltis, D.E. Genetic relationships and patterns of allozymic divergence in the *Ipomopsis Aggregata* complex and related species (Polemoniaceae). *American Journal of Botany* 78(4): 515-526.
- Wolff, K. Analysis of allozyme variability in three *Plantago* species and a comparison to morphological variability. *Theor. Appl. Genet.* 81: 119-126. 1991.