



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO**

DANIELE LUCIANA DE LIMA

**TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES SSR DE TOMATE PARA
SOLANÁCEAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA E VARIABILIDADE
GENÉTICA EM *Solanum mauritianum* Scop. UTILIZANDO MARCADORES ISSR**

GUARAPUAVA

2015

DANIELE LUCIANA DE LIMA

**TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES SSR DE TOMATE PARA
SOLANÁCEAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA E VARIABILIDADE
GENÉTICA EM *Solanum mauritianum* Scop. UTILIZANDO MARCADORES ISSR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva na Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador

Prof. Dr. Paulo Roberto Da Silva

Coorientador

Prof. Dr. Adriano Silvério

GUARAPUAVA

2015

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

L732t

Lima, Daniele Luciana de

Transferibilidade de marcadores ssr de tomate para solanáceas nativas da Mata Atlântica e variabilidade genética em *Solanum mauritianum* Scop. Utilizando marcadores issr / Daniele Luciana de Lima. -- Guarapuava, 2015

x, 74 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva, 2015

Orientador: Paulo Roberto da Silva

Co-orientador: Adriano Silvério

Banca examinadora: Elisabete Satsuki Sekine, Marcos Ventura Faria

Bibliografia

1. Ciências biológicas. 2. Biologia evolutiva. 3. Mata Atlântica. 4. Conservação. 5. Microssatélite. 6. Amplificação heteróloga. 7. ISSR. 8. Floresta ombrófila mista. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

CDD 583.79

Dedico esse trabalho àqueles que me inspiram coragem, determinação e humildade: ao meu companheiro de todos os momentos Rodrigo de Lima Silveira e a minha mãe Ivone Coloda.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me iluminar e me colocar na hora e no momento que Ele julgou ser certo, pois havia um propósito muito maior do que eu havia planejado.

Ao meu orientador professor Paulo pelas oportunidades, por me acolher em seu laboratório, por acreditar em mim e até mesmo pelos “puxões de orelha”. Jamais deixou de estar presente no exercício de sua função de orientador, mesmo fora dos seus horários.

Ao professor Adriano meu coorientador, obrigada pela paciência, pela grande ajuda que propiciou na execução do trabalho e pelas palavras de apoio.

Ao meu companheiro de todos os momentos, meu marido Rodrigo, o qual sempre me incentivou, acreditando mais em mim do que eu mesma, obrigada por ser o “Pink” sempre me auxiliando, você é meu porto seguro.

À minha mãe querida que sempre me acompanhou, mesmo de longe. Sei que sempre estive em suas orações, obrigada pelo seu colo e por me passar algo que julgo ser o último degrau da sabedoria, a humildade.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal, em especial a Bruna e a Renata que passaram seus conhecimentos da melhor forma possível e sempre me auxiliaram. Agradeço também a Mariana, a Letícia e o Rafael, por me ajudarem na execução do projeto. Agradeço ainda a Juliana e o Felipe pelos auxílios nas análises dos dados. E a todos os demais colegas pelo companheirismo e auxílio.

Ao programa, aos professores e aos colegas do Programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva e ao Departamento de Ciências Biológicas pelo incentivo.

Aos meus colegas do Laboratório de sementes e patologia da cooperativa Agrária, pela compreensão, apoio e descontrações.

À João Stehmann que apesar de não o conhecê-lo pessoalmente, sempre respondeu meus e-mails com toda cordialidade e respeito, obrigada por nortear a identificação das plantas.

À todos muito obrigada.

Se fracassar, ao menos que fracasse ousando grandes feitos, de modo que a sua postura não seja nunca a dessas almas frias e tímidas que não conhecem nem a vitória nem a derrota.

Theodore Roosevelt

RESUMO

TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES SSR DE TOMATE PARA SOLANÁCEAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA E VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Solanum mauritianum* Scop. UTILIZANDO MARCADORES ISSR

A diversidade biológica da Mata Atlântica está sob constante pressão, sendo afetada principalmente por ações antrópicas. Essas ações tem como consequência a fragmentação deste bioma. Em áreas abertas e perturbadas as plantas colonizadoras desempenham um importante papel para sua recuperação. A família Solanaceae possui diversas espécies pioneiras. Neste estudo, com o objetivo de investigar a diversidade genética de populações naturais, 72 pares de *primers* EST-SSR (*expressed sequence tag - simple sequence repeat*), desenvolvidos em tomate, foram avaliados em sete espécies de solanáceas nativas da Mata Atlântica e 10 *primers* ISSR (*inter-simple sequence repeat*) foram utilizados em duas populações de *Solanum mauritianum* Scop. Para o teste de transferibilidade dos *primers* EST-SSR foram utilizados o DNA de cinco acessos de cada espécie. Para avaliar o potencial dos marcadores ISSR nos estudo genético em *S. mauritianum* 10 *primers* ISSR foram avaliados em duas populações da espécie. A população "A" foi coletada em Guarapuava, PR, próximo a uma área conservada e a população "B" em Pitanga, PR, em área agrícola. Dentre os 72 pares de *primers* SSR testados nas sete espécies, 55 apresentaram produtos de amplificação com diferentes porcentagens de amplificação nas diferentes espécies: 48,6% em *Solanum mauritianum* Scop., 33,3% em *Solanum americanum* Mill., 36,5% em *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil., 33,3% em *Solanum hasslerianum* Chodat, 29,2% em *Solanum viarum* Dunal, 18,1% em *Solanum sisymbriifolium* Lam. e 22,2% em *Brugmansia suaveolens* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Bercht. & J.Presl. Os dados obtidos mostram que há moderada taxa de transferibilidade de *primers* de regiões codificadoras de tomate para as espécies avaliadas. O maior polimorfismo foi observado nos *primers* que amplificaram fragmentos em *S. guaraniticum* (60,9%) em contrapartida ao que foi encontrado em *S. sisymbriifolium* (16,6%). O polimorfismo encontrado foi a presença de alelos nulos o que inviabiliza a utilização de *primers* EST-SSR para estudos genéticos populacionais nas espécies avaliadas. No estudo utilizando os *primers* ISSR, a porcentagem de polimorfismo foi de 87,6% e 80,30% para população "A" e "B" respectivamente. A população "A" apresentou 5 locos exclusivos enquanto a "B", apenas 1. O agrupamento de todos os indivíduos formou 10 grupos,

mostrando fraca estruturação nas populações estudadas. A análise de variância molecular evidenciou uma taxa alta de fluxo gênico (10,78). A variação genética dentro das populações foi maior (93,5%) do que entre elas (6,49%), a variação encontrada entre as populações mostrou-se baixa ($G_{ST} = 0,044$). Alta diversidade genética foi observada pelo índice de Shannon ($A = 0,53$; $B = 0,46$), bem como entre as populações (0,52). Os dados obtidos com os marcadores ISSR mostraram que mesmo a mais de 100 km de distância, as populações apresentam elevado fluxo gênico. Este comportamento pode ser explicado pelas características biológicas da espécie e as associações que a planta estabelece com animais. Os resultados obtidos em nosso trabalho mostram que os marcadores EST-SSR desenvolvidos para tomate não são úteis para estudos genéticos em solanáceas nativas, enquanto os marcadores ISSR se mostraram muito efetivos na obtenção de dados genéticos populacionais de *S. mauritianum*.

Palavras-chave: Conservação; Microssatélite; Amplificação heteróloga; ISSR; Floresta Ombrófila Mista.

ABSTRACT

TRANSFERABILITY OF SSR MARKERS FROM TOMATO TO NATIVE SOLANACEOUS OF THE ATLANTIC FOREST AND GENETIC VARIABILITY IN *Solanum mauritianum* Scop. BY ISSR MARKERS

The biological diversity of the Atlantic Forest is under constant pressure, being mainly affected by human actions. These actions have resulted in the fragmentation of this biome. In disturbed and open areas pioneer plants species play an important role in their recovery. The solanaceous family has several pioneer species. In this study, in order to investigate the genetic diversity of natural populations, 72 EST-SSR (expressed sequence tag - simple sequence repeat) primers pairs developed in tomato, were evaluated in seven Solanaceae species native of the Atlantic Forest and 10 ISSR primers (inter-simple sequence repeat) were run in two *Solanum mauritianum* Scop. populations. To test the transferability of EST-SSR primers were used the DNA of five plants of each species. To evaluate the potential of ISSR markers in genetic studies in *S. mauritianum* 10 ISSR primers were run in two populations of the species. The population "A" was collected in Guarapuava, PR, near a conservation area and the "B" population was collected in Pitanga, PR, in an agricultural area. Of 72 EST-SSR primer pairs tested on seven species, 55 showed amplification products with different percentages of amplification on different species: 48.6% in *Solanum mauritianum* Scop., 33.3% in *Solanum americanum* Mill., 36.5% in *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil., 33.3% in *Solanum hasslerianum* Chodat, 29.2% in *Solanum viarum* Dunal, 18.1% in *Solanum sisymbriifolium* Lam. and 22.2% in *Brugmansia suaveolens* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Bercht. & J. Presl. The data obtained show that there is moderate transferability rate of the SSR primer from coding regions of tomatoes to the solanaceous species evaluated. The highest polymorphism was observed in SSR primers that amplified fragments in *S. guaraniticum* (60.9%) in contrast to what was found in *S. sisymbriifolium* (16.6%). The polymorphism found was the presence of null alleles which prevents the use of EST-SSR primers for population genetic studies in the evaluated species. In the study using ISSR primers in *S. mauritianum*, the percentage of polymorphism was 87.6% and 80.30% for the population "A" and "B" respectively. The population "A" had 5 unique loci while the "B", only 1. A grouping of all individuals formed 10 groups, showing weak structure in the populations studied. The molecular variance analysis showed a high rate of gene flow (10.78).

Genetic variation within populations was greater (93.5%) than between them (6.49%), the variation found between populations was low ($G_{ST} = 0.044$). High genetic diversity was observed by Shannon index ($A = 0.53$, $B = 0.46$) and between populations (0.52). The data obtained from the ISSR markers showed that even more than 100 km away the populations have high gene flow. This behavior can be explained by the biological characteristics of the species and associations that the plant establishes with animals. The results from our study show that the SSR markers developed for tomato are not useful for genetic studies in native Solanaceae, while the ISSR markers were very effective to obtain population genetic data from *S. mauritianum* populations.

Keywords: Conservation; Microsatellite; Heterologous amplification; ISSR; Araucaria Forest.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	8
1 REFERENCIAL TEÓRICO	11
1.1 MATA ATLÂNTICA: FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL E SUA IMPLICAÇÃO NO BIOMA.....	11
1.2 FLORESTA OMBRÓFILA MISTA (FOM).....	13
1.3 FAMÍLIA SOLANACEAE.....	13
1.4 ESTUDOS GENÉTICOS DE ESPÉCIES NATIVAS E A CONSERVAÇÃO DA NATUREZA	16
1.5 MARCADORES MOLECULARES	18
1.5.1 Transferibilidade de Marcadores SSR (Simple Sequence Repeat)	19
1.5.2 Marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)	21
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
2.1 OBJETIVOS GERAIS	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3 TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITE DE SOLANUM LYCOPERSICUM L. PARA SETE ESPÉCIES DAS SOLANACEAE NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA	34
3.1 RESUMO	34
3.2 INTRODUÇÃO	36
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.3.1 Espécies e coleta de material vegetal.....	37
3.3.2 Extração do DNA vegetal.....	37
3.3.3 Reações de amplificação via PCR-SSR.....	38
3.3.4 Análises dos dados.....	41
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.4.1 Identificação das espécies	42
3.4.2 Transferibilidade de primers EST-SSR.....	44
3.5 REFERÊNCIAS	50
4 DIVERSIDADE GENÉTICA-POPULACIONAL DE SOLANUM MAURITIANUM SCOP. (SOLANACEAE) ORIUNDOS DA MATA ATLÂNTICA	53
4.1 RESUMO	53
4.2 INTRODUÇÃO	55
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.3.1 Área de estudo.....	56
4.3.2 Extração do DNA vegetal.....	58
4.3.3 Amplificação via PCR-ISSR.....	58
4.3.4 Análises dos dados ISSR.....	58
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.5 REFERÊNCIAS	69
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Mata Atlântica: Fragmentação florestal e sua implicação no Bioma

O bioma Mata Atlântica está presente nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Este bioma ocupa uma área de 1.110.182 Km², correspondendo a cerca de 13,04% do território nacional. É um bioma que possui muita diversidade considerando ecossistemas florestais, composições florísticas e características climáticas, levando a unidades fisionômicas bem diversificadas que enriquecem ainda mais a fauna e a flora, assim como a ocorrência de espécies endêmicas (IBF, 2013). Com a Constituição Federal de 1988 foi decretada pela UNESCO reserva da Biosfera e Patrimônio Nacional.

A Mata Atlântica possui diversidade de associações vegetais que variam conforme a latitude, o compartimento do relevo, a orientação das vertentes, a insolação e os solos (IBF, 2013).

A composição original da Mata Atlântica é um mosaico de vegetações definidas como florestas ombrófilas densa; aberta e mista; florestas estacionais decidual e semidecidual; campos de altitude; mangues e restingas. Estão presentes neste bioma cerca de 20 mil espécies de plantas vasculares. Um dos fatores importantes que contribuem para a elevada biodiversidade é sua extensão em latitude e altitude, possuindo, com isso, certa homogeneidade florística (KLEIN, 1984; MATTEUCCI & COLMA, 1982). Ao longo da costa e parte do interior do país, observa-se uma série de variações na paisagem, que permite o trânsito de animais, o fluxo gênico de espécies vegetais e a existência de áreas de tensão ecológica, onde os ecossistemas se encontram e se transformam (KLEIN, 1984).

Dentre os biomas brasileiros mais ameaçados, a Mata Atlântica se destaca, originalmente a área de ocorrência da vegetação era de 150 milhões de hectares, e destes, 92% estavam distribuído ao longo da costa leste (Figura 1). Atualmente, os remanescentes florestais estão distribuídos em pequenos fragmentos, que são na maioria das vezes concentrados na forma de Unidades de Conservação, onde estão isolados por cidades e extensas áreas agrícolas (KANIESKI, 2010).

1.2 Floresta Ombrófila Mista (FOM)

Dentre as fitofisionomias da Mata Atlântica na região Sul, destaca-se a Floresta Ombrófila Mista (FOM) (MEDEIROS *et al.*, 2005) ou também conhecida como Floresta de Araucária. A delimitação da FOM é principalmente definida pela presença do Pinheiro-do-Paraná (*Araucaria angustifolia*) (MÄHLER JR & LAROCCA, 2009 *apud* FONSECA, 2009). Esta floresta representa uma das principais formações vegetais do sul do Brasil (HIGUCHI *et al.*, 2012).

Em 1950 Maack relatou que a área da Floresta Ombrófila Mista era de aproximadamente 200.000 km², sendo deste montante, 40% presentes no Paraná, 31% em Santa Catarina, 25% no Rio Grande do Sul, 3% no sul de São Paulo e 1% no sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro (KLEIN, 1960). Hoje, estima-se que restam apenas 7% da área original, o que leva esta tipologia vegetacional entre as mais ameaçadas (KANIESKI *et al.*, 2010).

Por ser uma tipologia florestal com poucos estudos (AVILA, 2010) e por possuir baixa representatividade no quadro nacional, resulta na ineficiência da preservação das espécies e ecossistemas associados a esta. Esta situação é preocupante, pois sua formação abriga um considerável número de espécies endêmicas (RIBEIRO *et al.*, 2009).

As principais atividades que impactam na floresta são a agricultura, a pecuária e mais recentemente, o cultivo de madeira de espécies arbóreas exóticas, tais como *Pinus* (Pinaceae) e *Eucalipitus* (Myrtaceae). A consequência destas ações antrópicas foi a criação de uma paisagem em mosaico com manchas da floresta original e áreas antropizadas.

Estudos voltados para o conhecimento da biodiversidade da FOM se tornam cada vez mais importantes para que se possa compreender a dinâmica das espécies em fragmentos florestais e planejar estratégias de manejo e conservação. Isto constitui estratégias essenciais e emergenciais.

1.3 Família Solanaceae

Na diversidade de flora da Floresta Ombrófila Mista as espécies de Solanaceae são representantes notáveis. Em termos gerais esta família compõe um dos maiores grupos dentre as plantas vasculares, contando com cerca de 98 gêneros e número aproximado de 2.400 espécies. Seus representantes são herbáceos, arbustivos, arbóreos, escandentes e epifíticos (ANDERSON *et al.*, 2006). Estudos realizados por D'Arcy (1976 *apud* HAWKES *et al.*, 1991), apontam que um provável centro de origem da família seria nas Américas Central e do

Sul, que possuem a maior riqueza de espécies. No Brasil, a família é bem representada, ocorrendo 34 gêneros e 449 espécies, sendo 215 destas exclusivas do país (STEHMANN *et al.*, 2010).

Dentre os gêneros de Solanaceae, o mais representativo é *Solanum*, com cerca de 1.400 espécies, seguido de *Lycianthes* com cerca de 200 espécies, *Cestrum* com aproximadamente 175 espécies, *Nicotiana* e *Physalis* com cerca de 100 espécies e *Lycium* com cerca de 90 espécies (JUDD *et al.*, 1999).

Com grande importância comercial e econômica, destacam-se diversas espécies de Solanaceae utilizadas para fins alimentício, medicinal e ornamental (RODDICK, 1991 *apud* HAWKES, 1999). Espécies como o tomate (*Solanum lycopersicum* L.), a batata (*Solanum tuberosum* L.), o tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) tem grande destaque e são muito utilizadas pelo homem. Na ornamentação destaca as espécies dos gêneros *Petunia* e *Brunfelsia* (GIACOMIM, 2014). Ainda, espécies do gênero são utilizadas na indústria farmacêutica para obtenção de alcalóides e vitanolídeos (RODDICK, 1991 *apud* HAWKES, 1999; GONZALES *et al.*, 1993), são também utilizadas na dieta de diversos animais (FELICIANO; SALIMENA, 2008).

As solanáceas possuem um tipo especial de polinização, por vibração. Abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* realizam esse tipo de polinização e já se mostraram polinizadores eficientes (IMPERATRIZ-FONSECA, 2011), há também estudos que catalogaram diversos outros tipos de abelhas associadas à família (SYMON, 1979 *apud* HAWKES; COLEMAN & COLEMANDEL, 1982; VERÇOZA *et al.*, 2012; SANTOS; BARTELLI; NOGUEIRA-FERREIRA, 2014). Essas interações entre planta, polinizador e dispersor são fundamentais na estruturação de comunidades, pois podem influenciar na sua distribuição espacial, na riqueza e abundância de espécies, na estrutura trófica e na fenodinâmica (GRESSLER *et al.*, 2006).

Esta família desempenha um papel substancial no desenvolvimento da comunidade clímax após as perturbações, ou seja, de sucessão ecológica. A família é bastante citada em levantamentos florísticos como componente de comunidades pioneiras (LIEBSCH & ACRA, 2002).

Espécies pioneiras são muito importantes no processo de sucessão ecológica, na medida em que eles são menos exigentes em relação ao solo e possuem ciclos de vida mais curtos, requerendo muita luz durante todo o ciclo. Trata-se de espécies de crescimento rápido, que fornecem as condições de proteção do solo e microclima, que são necessários para o estabelecimento de espécies que pertencem a estágios sucessionais mais tardios. Estas

espécies facilitam a sucessão natural e seus frutos servem como um atrativo para a fauna integrada, o que traz sementes de outras áreas (BOTELHO *et al.*, 1996).

Dentre as solanáceas nativas presentes em áreas de recuperação florestal na FOM, podemos citar entre as mais representativas, as espécies *Solanum mauritianum* Scop., *Solanum americanum* Mill., *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil., *Solanum hasslerianum* Chodat, *Solanum viarium* Dunal, *Solanum sisymbriifolium* Lam. e *Brugmansia suaveolens* G. Don (1838) (Humb. et Bonpl. ex Willd.) Bercht. & C. Presl.

A espécie *S. mauritianum*, conhecida como fumo bravo, ocorre nas regiões sul e sudeste do Brasil. É uma arvoreta que comumente atinge dois a quatro metros de altura (SMITH & DOWNS, 1966). Suas folhas são elípticas a oblongas, grandes, verde-claras a esbranquiçadas. A inflorescência tem aspecto corimbiforme, com pedúnculo ereto, com flores lilás, anteras amarelas e frutos carnosos, globosos, verdes a amarelados, expostos acima do ápice da copa (SOARES *et al.*, 2008).

S. americanum, conhecida como maria-pretinha, é originária das américas, como o nome propõe, ocorrendo em todo o Brasil. É uma erva ou um pequeno subarbusto de folhas membranosas. A inflorescência é umbeliforme e tem poucas flores brancas, com anteras pequenas e amarelas. O fruto é globoso, preto e brilhante na maturação (SOARES *et al.*, 2008).

S. guaraniticum, popularmente chamada de falsa jurubeba (BONFANTI *et al.*, 2013). Encontrada no Sudeste e Sul do Brasil, Argentina e Paraguai, possui folhas solitárias, oval-lanceoladas a elípticas, cuneadas na base, indumento tomentoso a velutino. Suas flores são brancas com estames amarelo-ouro. Seus tricomas são porrecto-estrelados, epiderme anfiestomática com paredes anticliniais retas a sinuosas na face adaxial.

S. hasslerianum, é um arbusto de até 60 cm de altura, possui folhas pecioladas limbo orbiculares a elípticas, base cuneiforme, lobadas a pinatífidas, com 3 a 5 pares de lobos arredondados; ambas as faces aculeadas. O caule é ramificado a partir da base, coberto por tricomas estrelado curto e longo estipitados, com acúleos dispersos, transição entre tricomas estrelados e acúleos. Inflorescência pedunculada não ramificada, as flores possuem corola branca e anteras amarelas ouro (ALARIA *et al.*, 2013).

S. viarium, conhecida como joá bravo ou mata-cavalo. Está presente e quase toda a América do Sul. Os frutos verdes são tóxicos. É um arbusto aculeado, baixo, com folhas ovaladas, levemente lobadas, cobertas de tricomas estrelados e acúleos esverdeados. A inflorescência é cimosa, com poucas flores, com corola e anteras esverdeadas. O fruto é

carneoso, globoso, esverdeado com manchas esbranquiçadas, amarelo quando maduro (SOARES *et al.*, 2008).

S. sisymbriifolium, esta espécie é conhecida como joá. Ocorre principalmente na metade sul da América do Sul, até o Uruguai e Argentina. É um subarbusto ou arbusto aculeado, com folhas lobadas, pinatífidas até pinatissectas, cobertas de tricomas estrelados e muitos acúleos. A inflorescência é uma cima escorpióide, com aspecto racemiforme, com poucas flores. A corola é branca e as anteras são amarelas a amarelo-ouro. O fruto é envolvido pelo cálice acrescente coberto de acúleos, que na maturação se torna reflexo, expondo o fruto (SOARES *et al.*, 2008).

B. suaveolens, conhecida como trombeteira, tem como sinonímia botânica *Datura suaveolens* Willd. É originária da América tropical e amplamente distribuída em ambientes úmidos da América do Sul. É um arbusto de grande porte, podendo alcançar 3 m. Caracteriza-se pelos ramos quebradiços, folhas grandes e flores pendentes de cerca de 30 cm de comprimento, de coloração branca ou amarelada, às vezes também rosada. Os frutos são carnosos, ovóides ou fusiformes, tóxicos (SOARES *et al.*, 2008). A espécie apresenta elevada importância ornamental.

1.4 Estudos Genéticos de espécies nativas e a conservação da natureza

A Mata Atlântica é um bioma com elevadas taxas de endemismo, o que a leva ao status de *hotspot* de diversidade (MYERS *et al.*, 2000), no entanto está fragmentada em pequenos remanescentes. Diferenças dentro de fragmentos e entre eles podem modificar a variabilidade genética dentro ou entre populações da mesma espécie (KNOWLES, 1984). Essas diferenças podem interferir de várias maneiras nas populações, nas suas interações, fluxos biológicos, sistema de reprodução e dispersão, em aspectos genéticos, entre outros (ALMEIDA *et al.*, 2012; THOMÉ, 1995).

Considerando que a conservação da biodiversidade é uma forte estratégia para a segurança alimentar, econômica e ecológica para a humanidade (RIBEIRO, 2006), se faz necessário a elaboração de estratégias de conservação, manejo e recuperação de seus fragmentos. Desta forma, evidencia-se a necessidade da obtenção de informações científicas acerca destas florestas (SCHAAF *et al.*, 2006).

Práticas de restauração devem incorporar a recuperação das diversidades florística, genética e de processos ecológicos que garantam a resistência/resiliência do ecossistema florestal (LIMA & RODRIGUES, 2009). Os estudos em genética da conservação e ecologia

são ferramentas importantes para orientar as ações e definir os parâmetros para a reestruturação dessas áreas (MATIOLI & FERNANDES, 2012).

Mesmo que ocorram mecanismos que evitem a autopolinização presente em algumas plantas, em populações reduzidas o risco de endogamia se torna maior, bem como a restrição de dispersão de pólen e sementes (ELLSTRAND & ELLAN, 1993). Conseqüentemente leva a diminuição da variabilidade genética, expondo as espécies a um potencial risco de extinção (LOVELESS; HAMRICK, 1984; ALMEIDA *et al.*, 2012), uma vez que a variabilidade é a base dos processos evolutivos (MCKAY *et al.*, 2001).

A dinâmica das populações pode também ser afetada por outros fenômenos evolutivos, tais como seleção, deriva genética, gargalo de garrafa, etc., isso ocorre pelo fato de trazer conseqüências para a estrutura genética das populações (GAIOTTO; GRATTAPAGLIA; VENCOVSKY, 2003; MATIOLI & FERNANDES, 2012), esses fenômenos são observados em grande parte dos fragmentos florestais (YOUNG & BOYLE, 2000). Essas alterações nos padrões espaciais causam a instabilidade das populações, comunidades e ecossistemas, acarretando na perda de biodiversidade e da diversidade (CAIRNS, 1988; LAURANCE *et al.*, 2000), podendo causar mudanças na história evolutiva das espécies (YOUNG & BOYLE, 2000). Em populações isoladas há limitação de fluxo gênico (VIA & WEST, 2008), podendo ocorrer perda ou fixação de alelos e diminuindo a variabilidade. Uma vez que um alelo seja perdido ou fixado, forças evolutivas não operam (TEMPLETON, 2011).

A conservação dos recursos genéticos tem se tornado cada vez mais necessária, pois as populações e sua diversidade genética estão sendo perdidas em conseqüência da fragmentação dos ecossistemas. Para uma gestão de sucesso, é necessário primeiramente conhecer de maneira mais ampla possível as espécies em estudo, quais suas composições genéticas, como elas estão organizadas (estruturadas) em suas populações e se esta organização é uma característica natural ou é resultado de ação antrópica (GALETTI JUNIOR *et al.*, 2007). Estudos com as mais variadas espécies, como membros das Myrtaceae do gênero *Eugenia* como *E. uniflora*, *E. pyriformis*, *E. brasiliensis* e *E. francavilleana* (ALMEIDA, 2012; FERREIRA-RAMOS *et al.*, 2014), *Dicksonia sellowiana* (SANTOS, 2011), *Luehea divaricata* (Malvaceae) (CONSON *et al.*, 2013), *Araucaria angustifolia* (DANNER *et al.*, 2013), sugerem maneiras de avaliar a diversidade genética, o impacto da fragmentação, e se a fragmentação dos habitat está comprometendo a espécie em estudo.

Para a implantação de alternativas que visam minimizar os efeitos da fragmentação em populações naturais, os estudos genéticos quantificam a variabilidade genética no tempo e espaço dessas populações. Assim, conhecer a variabilidade e estrutura genética entre e dentro de populações, auxiliará em práticas mais eficientes de conservação e manejo de espécies nativas (FRANKEL & SOULÉ, 1995).

A biodiversidade molecular pode ser usada como instrumento de investigação por ecólogos e sistematas em diversos ramos, como para verificar as afinidades e os limites entre as espécies, para identificar a origem de bioinvasores e auxiliar em seu controle, para detectar modos de reprodução e estrutura familiar, para estimar níveis de migração e dispersão nas populações (AVISE, 2004; SOLÉ-CAVA & CUNHA, 2012).

Qualquer processo de tomada de decisão para a conservação destaca a importância da informação sobre a montante e localização da diversidade genética, no entanto isso ainda é escasso, especialmente quando se trata de florestas tropicais. Para avaliar adequadamente o estado da diversidade genética dos ecossistemas, se faz necessário a combinação dos padrões de distribuição espacial e diversidade genética. Isso implicará em áreas classificadas de acordo com o nível de ameaças e da diversidade que detém (BOFFA *et al.*, 2008).

1.5 Marcadores Moleculares

Uma ferramenta que auxilia na obtenção de dados para uso nas tomadas de decisão de conservação da biodiversidade são os marcadores moleculares. Marcadores moleculares são características de uma determinada região do DNA que permitem diferenciar dois ou mais indivíduos e que são herdadas geneticamente (MILACH, 1998). Eles revelam semelhança ou diferença genética entre indivíduos de uma determinada espécie, o que permite obter informações sobre a diversidade genética (AVISE, 2004).

A genética molecular tem permitido diversos estudos como, o estudo da diversidade genética inter e intraespecífica, origem genética, identificação de novas variantes e problemas de identificação de indivíduos (FALEIRO, 2007) e até mesmo separação de espécies crípticas. Estas possibilidades dependem da metodologia aplicada, pois a escolha judiciosa pode nos ajudar na formulação de hipóteses implicando na resolução de problemas e aumentando a eficiência dos programas de conservação (SOLÉ-CAVA & CUNHA, 2012).

Os marcadores moleculares baseados em DNA podem ser de caráter dominante ou codominante. Em indivíduos diplóides, os marcadores codominantes permitem visualizar e distinguir ambos os alelos em um loco, enquanto que marcadores dominantes não permitem a

distinção entre indivíduos homocigotos e heterocigotos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Critérios como a quantidade de DNA não possuem mais problemas graças aos avanços das tecnologias, o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) permite excelentes resultados mesmo com pequenas quantidades de DNA (SOLÉ-CAVA & CUNHA, 2012).

Existe um grande número de tecnologias da genética molecular que fornecem informações substanciais para programas de conservação e uso de recursos genéticos. Contudo, todos possuem vantagens e desvantagens, dependendo, dentre outros fatores, da infraestrutura, do objeto de estudo, investimento, etc. Dentre essas técnicas destacam-se os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) (FALEIRO, 2007). A escolha da técnica utilizada deve levar em consideração o problema em estudo, recursos e infraestrutura disponível.

1.5.1 Transferibilidade de Marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*)

Diferentes experimentos no início dos anos 1980 demonstraram que os genomas eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de sequências repetidas, umas mais complexas e outras mais simples. Estas sequências simples repetidas (SSR – *Simple Sequence Repeats*), mais tarde denominadas também de microssatélites (LITT & LUTY, 1989), consistem de pequenas sequências que possuem de 2 a 4 nucleotídeos de extensão, repetidas em tandem, ou seja, uma após a outra e que se espalha por todo o genoma (FALEIRO, 2007; TEPLETON, 2011). Para obtê-los envolve a amplificação via PCR utilizando *primers* específicos. Com este marcador, é possível identificar variações de um loco no genoma (alelos), o que o faz um marcador codominante. Ainda é um marcador de fácil detecção via PCR (HAMADA *et al.*, 1982; LITT & LUTY, 1989).

Em plantas, uma busca em bancos de dados de sequência de DNA publicados, revelou que os sítios de microssatélites são largamente distribuídos com uma frequência de uma a cada 50 mil pares de bases (CARBONARO, 2011). Constituem um loco genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco. Possuem expressão codominante, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterocigoto são

visualizados, numa população onde potencialmente todos os alelos daquele loco podem ser detectados e discriminados (BORBA, 2000).

Esses marcadores apresentam altas taxas de mutação, o que permite identificar a variabilidade entre indivíduos, famílias e populações (HODGETTS *et al.*, 2001). Vários estudos mostraram sucesso na utilização desses marcadores para análises de populações, como em *Butia odorata* (MISTURA *et al.*, 2013) e diversas espécies de *Eugenia* nativas (FERREIRA-RAMOS, 2014). Assim, os SSR são utilizados para estimar os níveis de heterozigosidade e fluxo gênico e associá-los com parâmetros importantes para a adaptação da espécie, o que torna esses marcadores indicados para trabalhos de genética de populações (MATIOLI & FERNANDES, 2012). Esses marcadores são desenvolvidos a partir de sequências específicas do genoma da espécie estudada. Para tanto, a técnica utilizada para o desenvolvimento desses marcadores é a construção de biblioteca genômica e sequenciamento. Essa é uma técnica que demanda tempo e elevado recursos, pois necessita de digestão de DNA genômico por enzimas de restrição, clonagem, sequenciamento, seleção de regiões com SSR, e sucessivos testes para verificar a qualidade dos *primers* desenvolvidos (MILACH *et al.*, 1998; BRONDANI; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2007).

No entanto, para estudos de genética de populações de espécies nativas, isso se torna uma limitação, pois para o desenvolvimento de *primers* há demanda de tempo e recursos (ENGEL *et al.*, 1996), sendo essa sua principal desvantagem (ZUCCHI *et al.*, 2003). Em alguns casos uma alternativa para utilizar marcadores SSR em espécies pouco estudadas é o emprego de *primers* desenvolvidos em espécies geneticamente relacionadas que pertença à mesma família ou gênero (FALEIRO, 2003).

A chance de sucesso na transferência de sequências de DNA por PCR é inversamente relacionada com a distância evolutiva entre as duas espécies em análise (STEINKELLNER *et al.*, 1997). Muitos estudos têm mostrado essa possibilidade para espécies pertencentes ao mesmo gênero ou ainda entre gêneros diferentes (ROA *et al.*, 2000; WHITE & POWELL, 1997). Por exemplo, sucesso na transferência de microssatélites entre espécies dentro de um mesmo gênero tem sido relatado em plantas de grande porte como *Pinus* (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2004) e *Euterpe* (OLIVEIRA *et al.*, 2010) e em espécies cultivadas, como *Triticum* (ADONINA *et al.*, 2005) e *Avena* (DA-SILVA; MILACH; TISIAN, 2011).

Estudos relacionados foram descritos, desde plantas primitivas, como é o caso da pteridófita *Isoetes* (LI, 2013), até plantas arbóreas mais derivadas como *Eugenia* (ZUCCHI *et al.*, 2003) e *Mangifera* (RAVISHANKAR *et al.*, 2011). Em angiospermas herbáceas, foram

realizados transferibilidade de marcadores SSR com diversas famílias, por exemplo, Brassicaceae (MUÑOZ-PAJARES *et al.*, 2011), Lamiaceae (RADOSAVLJEVIC *et al.*, 2011), Malvaceae (BRUNA *et al.*, 2009), Valerianaceae (MCEWEN *et al.*, 2011) e Solanaceae (NAGY *et al.*, 2007; KRIEDT *et al.*, 2011; GROVER & SHARMA, 2012).

Ainda, visando planos de conservação de plantas da Mata Atlântica, exemplos com Bromeliaceae (MANHÃES *et al.*, 2013), Vochysiaceae (LEITE *et al.*, 2013) e Myrtaceae (FERREIRA-RAMOS *et al.*, 2014) tem sido descritos por pesquisadores brasileiros, evidenciando a necessidade e utilidade deste tipo de estudo na obtenção de dados de espécies nativas ainda geneticamente desconhecidas.

1.5.2 Marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)

Os marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) são fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb (BORNET & BRANCHARD, 2001; REDDY *et al.*, 2002), amplificados via PCR usando um único *primer* (16 – 25 pb) construído a partir de sequências de microssatélites (FALEIRO, 2007). Estes marcadores não requerem informações prévias de sequências de DNA da espécie-alvo, produzem fragmentos com grande reprodutibilidade, quando comparados a outros marcadores com base em PCR não-específico, o marcador RAPD, por exemplo, e requerem pouca infraestrutura em termos de equipamento de laboratório para execução dos experimentos (SOUZA *et al.*, 2008).

Estes marcadores foram desenvolvidos para contornar a problemática do alto custo e trabalho envolvidos no desenvolvimento dos marcadores SSR e pelo fato de haver à necessidade de explorar tais regiões (SSR) sem haver sequenciamento do DNA. O ISSR é composto por uma sequência do microssatélite, é utilizado para amplificar principalmente as sequências Inter-SSR de diferentes tamanhos. Os *primers* podem ser não ancorados ou usualmente ancorados na extremidade 5' ou 3' por 1 a 4 bases degeneradas. O polimorfismo ocorre devido a diferenças no comprimento do microssatélite, principalmente nos *primers* ancorados na posição 5' (GOULÃO & OLIVEIRA, 2001) e são evidenciados como presença e ausência de um fragmento (bandas) após a amplificação e eletroforese em gel.

Pelo fato de gerar grande número de bandas informativas e para a construção de *primers*, não é necessário o conhecimento prévio da sequência de DNA, o torna um marcador muito vantajoso (FALEIRO, 2007). Embora os ISSR sejam marcadores dominantes, têm a vantagem de analisar *loci* múltiplos em uma única reação (GOULÃO & OLIVEIRA, 2001), o uso de testes estatísticos permite usar os dados gerados por este tipo de marcador para estimar

índices de variação genética entre indivíduos, populações e espécies (LYNCH & MILLIGAN, 1994). Podem ser empregados para estudos de relações entre populações estreitamente relacionadas por apresentar abundância e dispersão no genoma (LIMA *et al.*, 2011).

Trabalhos publicados mostram que esse marcador pode ser empregado em estudos de variabilidade genética e estrutura populacional em plantas cultivadas como, *Eucalyptus* sp. (BALASARAVANAN *et al.*, 2005) e batata doce (HU *et al.*, 2003), bem como em plantas nativas como é o caso de *Passiflora* sp. (DOS-SANTOS *et al.*, 2011) e Jojoba (SHARMA *et al.*, 2008), e em Solanáceas tais como *Solanum melongena* (GE, *et al.*, 2014) *Solanum trilobatum* (SHILPHA *et al.*, 2013). O ISSR é uma combinação de marcadores, em que apresenta a facilidade dos marcadores RAPD juntamente com a robustez dos marcadores AFLP e SSR, sendo assim recomendados para trabalhos que requerem confiabilidade sem alto custo para as análises (BUSO *et al.*, 2003).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADONINA, I. G. *et al.* Transferability of wheat microsatellites to diploid *Aegilops* species and determination of chromosomal localizations of microsatellites in the *S* genome. **Genome**, v. 48, p. 959-970. 2005.
- ALARIA, A. *et al.* **Flora Argentina**, v. 13. 2013. 61 p.
- ALMEIDA, D. J. de; FARIA, M. V.; SILVA, P. R. Effect of forest fragmentation on microsporogenesis and pollen viability in *Eugenia uniflora*, a tree native to the Atlantic Forest. **Genetic and Molecular Research**, v. 11, n. 4, p. 4245-4255. 2012.
- ANDERSON, G. J. *et al.* Reproductive biology of the dioecious Canary Islands endemic *Withania aristata* (Solanaceae). **American Journal of Botany**, v. 93, n. 9, p. 1295-1305, 2006.
- AVILA, A. L. **Mecanismos de regeneração natural e estrutura populacional de três espécies arbóreas em remanescente de Floresta Ombrófila Mista, Rio Grande do Sul**. 2010. 150 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Sinauer Inc., 2a ed., 2004.
- BALASARAVANAN, T. *et al.* Determination of inter- and intra-species genetic relationships among six *Eucalyptus* species based on inter-simple sequence repeats (ISSR). **Tree Physiology**, v. 25, p. 1295-1302. 2005.
- BOFFA, J. M. *et al.* Management of tree diversity in agricultural landscapes around Mabira Forest Reserve, Uganda. **African Journal of Ecology**, v. 46, n. 1, p. 24-32. 2008.
- BONFANTI, G. *et al.* *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* show similar antioxidant properties but induce different enzymatic activities in the brain of rats. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9179-9194. 2013.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 209-215. 2001.
- BOTELHO, S. A.; DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R. Desenvolvimento inicial de seis espécies florestais nativas em dois sítios, na região sul de Minas Gerais. **Cerne**, v. 2, n. 1, p. 43-52. 1996.

- BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. **Manual Prático para o Desenvolvimento de Marcadores Microsatélites em Plantas**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. 2007.
- BRUNA, S. E. *et al.* Isolation and characterization of microsatellite markers from *Hibiscus rosa-sinensis* (Malvaceae) and cross-species amplifications. **Conservation Genetics**, v. 10, p. 771-774. 2009.
- BUSO, G. S. C. *et al.* Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 7, p. 46-50. 2003.
- CAIRNS, J. Increasing diversity by restoring damaged ecosystems. **Biodiversity**. Washington: National Academy Press. 1988. 333-344 p.
- CHADA, S. S.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M. Sucessão vegetal em uma encosta reflorestada com leguminosas arbóreas em Angra dos Reis, RJ. **Revista Árvore**, v. 28, n. 6, p. 801-809. 2004.
- COLEMAN, J. R.; COLEMAN, M. A. Reproductive biology of andromonoecious *Solanum* (*Solanum palinacanthum* Dunal). **Biotropica**, v. 14, p. 69-75. 1982.
- COLLEVATTI, R. G. *et al.* Spatial Genetic Structure and life history traits in Cerrado tree species: Inferences for conservation. **Natureza & Conservação**, v. 8, n. 1, p. 54-59. 2010.
- CONSON, A. R. O. *et al.* Genetic structure of the Atlantic Rainforest tree species *Luehea divaricata* (Malvaceae). **Genetic**, v. 141, n. 4-6, p. 205-215. 2013.
- DANNER, M. A. *et al.* Impact of monoecy in the genetic structure of a predominately dioecious conifer species, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, n. 5, p. 949-958. 2013.
- D'ARCY, W. G. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography apud HAWKES, J. G.; LESTER, R. N.; NEE, M.; ESTRADA, Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution. London: **Kew Royal Botanical Gardens**. 1991.
- DA-SILVA P. R.; MILACH, S. C. K.; TISIAN, L. M. Transferability and utility of white oat (*Avena sativa*) microsatellite markers for genetic studies in black oat (*Avena strigosa*). **Genetics Molecular Research**. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2011.November.29.2>. 2011.
- DOS SANTOS, L. F. *et al.* ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in Passiflora. **Biochemical Genetics**, v. 49, n. 7-8, p. 540-554. 2011.

- ELLSTRAND, N. C.; ELLAN, D. R. Population genetic consequences of small population sizes: implication for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematic**, v. 24, p. 217-242. 1993.
- ENGEL, S. R. *et al.* Conservation of microsatellite locos across species of artiodactyls: implications for population studies. **Journal of Mammology**, v. 2, p. 504-518. 1996.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**, Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.
- FELICIANO, E. A.; SALIMENA, F. R. G. Solanaceae na Serra Negra, Rio Preto, Minas Gerais. **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 62, n. 1. 2008.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.
- FERREIRA-RAMOS, R. **Estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de *Eugenia uniflora* L. na região de Ribeirão Preto (SP), utilizando marcadores microssatélites**. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. 2014.
- FERREIRA-RAMOS, *et al.* Genetic diversity assessment for *Eugenia uniflora* L., *E. pyriformis* Cambess., *E. brasiliensis* Lam. and *E. francavilleana* O. Berg neotropical tree species (Myrtaceae) with heterologous SSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 61, p. 267-272. 2014.
- FRANKEL, O. H.; SOULÉ, M. E. **Conservation and Evolution**. Cambridge, Cambridge University Press, 1995. 327 p.
- GAIOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOSKY, R. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in Heart of Palm (*Euterpe edulis* Mar.). **Journal of Heredity**, v. 94, n. 5, p. 399-406. 2003.
- GALETTI JUNIOR, P. M. *et al.* Genética da conservação na biodiversidade brasileira. apud: FRANKHAM, R.; BALLOU, J.; BRISCOE, D.; GALETTI JUNIOR, P. M. (Org.). **Fundamentos de Genética da Conservação**. 1 ed. Ribeirão Preto: SBG. v. 1, p. 199-229. 2007.
- GE, H. *et al.* Analysis of genetic diversity and structure of eggplant populations (*Solanum melongena* L.) in China using simple sequence repeat markers. **Scientia Horticulturae**, v. 162, p. 71-75. 2013.

- GIACOMIN, L. L.; KAMINO, L. H. Y.; STEHMANN, J. R. **Speeding up the discovery of unknown plants: a case study of *Solanum* (Solanaceae) endemics from the Brazilian Atlantic Forest.** Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão, n. 36, 2014.
- GONZALES, A. *et al.* Biological screening of Uruguayan medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2, n. 39, p. 217-220. 1993.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C. *et al.* Cross-amplification and sequence variation of microsatellite locos in Eurasian hard pines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, p. 103-111. 2004.
- GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v. 122, n. 1, p. 81-89. 2001.
- GRESSLER, E. *et al.* Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509-530. 2006.
- GROVER, A.; SHARMA, P. Tandem repetitions in transcriptomes of some Solanaceae species. **American Journal of Molecular Biology**, v. 2, p. 140-152. 2012.
- HAMADA, H.; PETRINO, M. C.; TAKUGANA, T. A novel repeated element with Z-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, p. 6465-6469. 1982.
- HAWKES, J. G. The economic importance of the family Solanaceae apud NEE, M.; SYMON, D. E.; LESTER, R. N.; JESSO, P. Solanaceae IV. Advances in Biology & Utilization. Eds., J. P. 1-8. London: Kew: **Royal Botanic Gardens**. 1999.
- HIGUCHI, P. *et al.* Influência de variáveis ambientais sobre o padrão estrutural e florístico do componente arbóreo, em um fragmento de Floresta Ombrófila Mista Montana em Lages, SC. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 79-90. 2012.
- HODGETTS, R. B. *et al.* Development of microsatellite markers for white spruce (*Picea glauca*) and related species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 1252-1258. 2001.
- HU, J. *et al.* Genetic analysis of sweet potato and wild relatives using inter-simple sequence repeats (ISSRs). **Breeding Science**, v. 53, p. 297-304. 2003.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **Os mecanismos da polinização de Solanaceae por abelhas sem ferrão.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP). Universidade de São Paulo (USP). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2011.

- INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS - IBF. **Bioma Mata Atlântica**, 2013.
Disponível em: < <http://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica.html>>. Acesso em: 09 out. 2014.
- JUDD, W. S. *et al.* **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, M. A. USA. 1999. 466 p.
- KANIESKI, M. R. **Caracterização florística, diversidade e correlação ambiental na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- KLEIN, R. M. Aspectos dinâmicos da vegetação do sul do Brasil. **Selowia**, n. 36, p. 5-54. 1984.
- KLEIN, R. M. O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Selowia**, n. 12, p. 17-44. 1960.
- KRIEDT, R. A. *et al.* Isolation, characterization, and cross-amplification of microsatellite markers for the *Petunia integrifolia* (Solanaceae) complex. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 10, p. 277-279. 2011.
- LAURANCE, W. F.; VASCONCELOS, H. L.; LOVEJOY, T. E. Forest loss and fragmentation in the Amazon: implications for wildlife conservation. **Oryx**, v. 34, p. 39-45. 2000.
- LEITE, C. T. *et al.* Amplificação heteróloga de marcadores microssatélites em *Vochysia bifalcata* (Vochysiaceae). 64º Congresso Nacional de Botânica Belo Horizonte. 2013.
- LIEBSCH, D.; ACRA, L. A. Riqueza de espécies de sub-bosque de um fragmento de floresta ombrófila mista em Tijucas do Sul, PR. **Ciência Florestal**, v. 14, n. 1, p. 67-76. 2002.
- LIMA, R. S. N. *et al.* RAPD and ISSR markers in the evaluation of genetic divergence among accessions of elephant grass. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 1304-1313. 2011.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 398-401. 1989.
- LI, X. L. Genetic diversity and population structure of the endangered alpine quillwort *Isoetes shypsophila* (Isoetaceae) revealed by SSR analysis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 47, p. 11-20. 2013.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 65-95. 1984.

- LYNCH, M.; B. MILLIGAN. Analysis of population-genetic structure using RAPD markers. **Molecular Ecology**, v. 3, p. 91-99. 1994.
- MÄHLER JR, J. K. F.; LAROCCA, J. F. Fitofisionomias, desmatamento e fragmentação da Floresta com Araucária. apud FONSECA, C. R. *et al.* (Eds.). **Floresta com Araucária: ecologia, conservação de desenvolvimento sustentável**. Ribeirão Preto: Holos, p. 243-252. 2009.
- MANHÃES, V. C.; MIRANDA, F. D.; CARRIJO, T. T. Amplificação heteróloga de marcadores microssatélites em *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae). 64º Congresso Nacional de Botânica Belo Horizonte, 2013.
- MATIOLI, S.R. (Org.); FERNANDES, F. M. C. (Org.). **Biologia molecular e evolução**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, v. 1. 2012. 250 p.
- MATTEUCCI, S. D.; COLMA, A. **Metodologia para el estudio de la vegetacion**. Washington, OEA/PRDECT, 1982. 168 p.
- MCEWEN, J. R.; VAMOSI, J. C.; ROGERS, S. M. Rapid isolation and cross-amplification of microsatellite markers in *Plectritis congesta* (Valerianaceae) with 454 sequencing. **American Journal of Botany**, p. 369-371. 2011.
- MCKAY, J. K. *et al.* Local adaptation across a climatic gradient despite small effective population size in the rare sapphire rockcress. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 268, p. 1715-1721. 2001.
- MEDEIROS, J. D.; SAVI, M.; DE BRITO, B. F. A. Seleção de áreas para criação de Unidades de Conservação na Floresta Ombrófila Mista. **Biotemas**, v. 18, n. 2, p. 33-50. 2005.
- MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Editora: UFRGS, 1998.
- MISTURA, C. C. *et al.* **Transferibilidade de marcadores microssatélites de coco (*Cocos nucifera*) para butiá (*Butia odorata*)**. Embrapa Clima Temperado-Artigo em periódico indexado (ALICE). 2013.
- MUÑOZ-PAJARES, A. J. *et al.* Characterization of microsatellite locos in *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae) and cross-amplification in related species. **American Journal of Botany**, p. 287-289. 2011.
- MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858. 2000.

- NAGY, I. *et al.* Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Genome**, v. 50, n. 7, p. 668-688, 2007.
- OLIVEIRA, M. S. P. *et al.* Variabilidade genética entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microssatélites. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1253-1260. 2010.
- PINTO-COELHO, R. M. **Fundamentos em Ecologia**. Artmed. Porto Alegre, RS. 2000.
- RADOSAVLJEVIC, I. *et al.* New microsatellite markers for *Salvia officinalis* (Lamiaceae) and cross-amplification in closely related species. **American Journal of Botany**, p. 316-318. 2011.
- RAVISHANKAR, K. V. *et al.* Development of new microsatellite markers from Mango (*Mangifera indica*) and cross-species amplification. **American Journal Botany**, v. 98, n. 4, p. 96-99. 2011.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; REDDY, E. A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17. 2002.
- RIBEIRO, M. C. *et al.* The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141-1153. 2009.
- ROA, A. C. *et al.* Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship **American Journal Botany**, v. 87, p.1647-1655. 2000.
- RODDICK, J. G. The Importance of the Solanaceae in Medicine and Drug Therapy, 1991 apud HAWKES, J. G. *et al.* Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution. London: Kew: **Royal Botanic Garden**. 1999.
- SANTOS, A. O. R.; BARTELLI, B. F.; NOGUEIRA-FERREIRA, F. H. Potential Pollinators of Tomato, *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae), in Open Crops and the Effect of a Solitary Bee in Fruit Set and Quality. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 3, p. 987-994. 2014.
- SANTOS, J. dos. **Estrutura populacional de *Dicksonia Sellowiana* Hook (Dicksoniaceae) no Brasil**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná. 2011.
- SHARMA, K.; AJAY, K. M.; RAJ, S. M. A simple and efficient method for extraction of genomic DNA from tropical tuber crops. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1018-1022. 2008.

- SHILPHA, J. *et al.* Assessment of genetic diversity in *Solanum trilobatum* L., an important medicinal plant from South India using RAPD and ISSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, n. 3, p. 807-818. 2013.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Solanáceas. In: REITZ, R. (ed.). **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, SC: Herbário Barbosa Rodrigues (HBR), 1966. 321 p.
- SOARES, E. L. C. *et al.* A família Solanaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, 2008.
- SOLÉ-CAVA, A. M.; CUNHA, H. A. A Genética e a Conservação da Natureza. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. 2. Ed, Holos editora, Ribeirão Preto, 2012. 217-238 p.
- SOS MATA ATLÂNTICA. **Projetos SOS - Sustentabilidade**. 2012. Disponível em: <<http://www.sosmatatlantica.org.br>>. Acesso em: 11 nov. 2014.
- SOUZA, G. A. *et al.* Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008.
- STEHMANN, J. R. *et al.* Solanaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2010. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000225>>. Acesso em: 10 out. 2014.
- STEINKELLNER, H. *et al.* Conservation of (GA)_n microsatellit between *Quercus* species. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 1189-1194. 1997.
- SYMON, D. E. Sex forms in *Solanum* (Solanaceae) and the role of pollen collecting insects. p. 385- 398, 1979 apud HAWKES, J. G; LESTER, R. N.; SKELDING, A. D. (Eds.). **The Biology and Taxonomy of the Solanaceae**. Academic Press, London. 1979.
- TEMPLETON, A. R. **Genética de populações e teoria microevolutiva**. Rio Preto, SP, SGB, 2011. 705 p.
- VERÇOZA, F. C. *et al.* Polinização e dispersão de sementes de *Dysochroma viridiflora* (Sims) Miers (Solanaceae) por Morcegos no Parque Nacional da Tijuca, um remanescente de Floresta Atlântica no Sudeste do Brasil. **Natureza online**, v. 10, n. 1, p. 7-11. 2012.
- VIA, S.; WEST, J. The genetic mosaic suggests a new role for hitchhiking in ecological speciation. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 334-4345. 2008.
- WHITE G.; POWELL, W. Cross-species amplification of SSR locos in the Meliaceae family. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 1195-1197. 1997.

YOUNG, A.; BOYLE, T. J. Forest fragmentation Forest conservation genetics: principles and practice Collingwood. **Csiro Publishing**. 123-132. 2000.

ZUCCHI, M. I. *et al.* Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetic and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 449-457. 2003.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a transferibilidade de marcadores moleculares EST-SSR, desenvolvidos para *S. lycopersicum* L., para espécies nativas das Solanaceae e avaliar a diversidade genética de populações de *S. mauritianum* Scop., provenientes da Mata Atlântica, utilizando marcadores ISSR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a transferibilidade de marcadores moleculares EST-SSR desenvolvidos para *S. lycopersicum* para *S. mauritianum*, *S. americanum*, *S. guaraniticum*, *S. hasslerianum*, *S. viarium*, *S. sisymbriifolium* e *B. suaveolens*, espécies de Solanaceae nativas da Mata Atlântica;
- Obter informações sobre o potencial e a viabilidade dos marcadores moleculares desenvolvidos para *S. lycopersicum* para as espécies nativas de solanáceas;
- Obter informações a respeito da variabilidade genética intra e interpopulacional de *S. mauritianum* utilizando marcadores moleculares ISSR.

Para apresentação dos materiais e métodos, resultados e discussão esta dissertação será apresentada em dois capítulos conforme segue:

CAPÍTULO I

TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITE DE *Solanum lycopersicum* L. PARA SETE ESPÉCIES DAS SOLANACEAE NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA

Daniele Luciana de Lima, Adriano Silvério, Paulo Roberto Da Silva

CAPÍTULO II

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Solanum mauritianum* Scop. (SOLANACEAE) ORIUNDAS DA MATA ATLÂNTICA

Daniele Luciana de Lima, Rafael de Assis, Adriano Silvério, Paulo Roberto Da Silva

CAPÍTULO 1

3 TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITE DE *Solanum lycopersicum* L. PARA SETE ESPÉCIES DAS SOLANACEAE NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA

Daniele Luciana de Lima¹, Adriano Silvério^{1,3}, Paulo Roberto Da-Silva^{1,2}

¹ Programa de Pós – Graduação em Biologia Evolutiva, Universidade Estadual do Centro – Oeste, UNICENTRO, Guarapuava, PR, Brasil.

² Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, UNICENTRO, Guarapuava, PR, Brasil.

³ Laboratório de Botânica Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Centro – Oeste, UNICENTRO, Guarapuava, PR, Brasil.

3.1 RESUMO

A Mata Atlântica é um dos biomas com a maior diversidade biológica do planeta e também uma dos mais ameaçados pelas ações antrópicas. Os marcadores microsatélites, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeat*) tem se mostrado uma ótima ferramenta para obtenção de dados genéticos. Considerando o elevado custo para o desenvolvimento desses marcadores, a transferibilidade de *primers* entre espécies aparentadas é uma alternativa para redução de custos desta técnica. Solanaceae apresentam inúmeras espécies de elevada importância ecológica na Mata Atlântica, para as quais não há marcadores SSR desenvolvidos. Os *primers* SSR desenvolvidos em solanáceas de importância econômica podem ser uma ferramenta para estudos genéticos das espécies nativas da Mata Atlântica. Neste trabalho 72 pares de *primers* EST-SSR desenvolvidos para *Solanum lycopersicum* foram avaliados em sete espécies de solanáceas nativas da Mata Atlântica (*Solanum mauritianum* Scop., *Solanum americanum* Mill., *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil., *Solanum hasslerianum* Chodat, *Solanum viarum* Dunal, *Solanum sisymbriifolium* Lam.e *Brugmansia suaveolens* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Bercht. & J.Presl.). Para cada espécie foi extraído o DNA de cinco acessos. O DNA obtido de cada acesso foi amplificado pela técnica de PCR utilizando 72 pares de *primers* EST-SSR avaliados. Dentre os 55 pares de *primers* que apresentaram produtos de amplificação, 48,6% amplificaram em *S. mauritianum*, 33,3% em *S. americanum*, 36,5% em *S. guaraniticum*, 33,3% em *S. hasslerianum*, 29,2% em *S. viarum*, 18,1% em *S. sisymbriifolium* e 22,2% em *B. suaveolens*. Os dados obtidos mostram moderada

taxa de transferibilidade de *primers* de regiões codificadoras de tomate para as espécies avaliadas. O maior polimorfismo foi observado nos *primers* que amplificaram fragmentos em *S. guaraniticum* (60,9%), em contrapartida o menor polimorfismo foi em *S. sisymbriifolium* (16,6%). O polimorfismo encontrado foi a presença de alelos nulos. Os resultados obtidos com relação ao tipo de polimorfismo levam à conclusão que os *primers* SSR desenvolvidos de regiões codificadoras de tomate não são apropriados para estudos genéticos populacionais em espécies de solanáceas nativas da Mata Atlântica.

Palavras-chave: Floresta de Araucária; SSR; amplificação heteróloga.

3.2 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é considerada um dos *hotpots* de biodiversidade no mundo, em virtude da grande riqueza de espécies e do alto endemismo. Este bioma é constituído por diversos tipos de fitofisionomias, dentre eles se encontra a Floresta Ombrófila Mista, também conhecida como Floresta de Araucária, pela presença da *Araucaria angustifolia* (MMA, 2002). Estudos indicam que a cobertura florestal original do bioma foi reduzida para algo entre 7% e 8% de sua área (HIROTA, 2003; SOS MATA ATLÂNTICA, 2012), e os remanescentes florestais estão inseridos em uma matriz alterada por atividades humanas, e distribuídos em pequenos fragmentos (SOS MATA ATLÂNTICA, 2012).

A extinção de espécies é a causa mais expressiva da destruição de habitats (HANSKI, 1998). Esta destruição de habitat leva ao isolamento de populações em pequenos remanescentes que na maioria das vezes não tem comunicação com outras áreas. Entre estas populações isoladas pode haver diminuição do fluxo gênico e aumento dos cruzamentos endogâmicos, ocasionando deriva genética que leva a alterações da estrutura e variabilidade genética das espécies (ESTOPA *et al.*, 2007). A variabilidade genética é uma característica fundamental de uma população, pois é sobre esta que os processos evolutivos ocorrem, levando a combinações genéticas que garantem a perpetuação da espécie.

Neste sentido, o conhecimento da diversidade genética em populações naturais é um passo importante para diagnosticar as condições genéticas destas populações. A obtenção de dados genéticos pode auxiliar na tomada de decisões para elaboração de estratégias de conservação. As técnicas de genética molecular são ferramentas bastante úteis na obtenção de dados genéticos para utilização com fins conservacionistas (BITTENCOURT & SEBBENN, 2009; BRANDÃO *et al.*, 2011; LOPES & GONZAGA, 2014). Dentre as técnicas moleculares, destacam-se os marcadores moleculares e, mais especificamente, os microssatélites.

Os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) tem sido muito utilizados em estudos de genética de populações de espécies silvestres, pela sua robustez, confiabilidade e praticidade operacional (OLIVEIRA *et al.*, 2006; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). A ampla aplicação dos marcadores SSR se deve ainda ao fato de que estes são codominantes, multialélicos, altamente reprodutíveis, têm ampla resolução e são baseados na reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Porém, em razão do alto custo de desenvolvimento (envolve montagem de bibliotecas genômicas e sequenciamento) os SSR têm sido desenvolvidos para um número limitado de espécies de importância econômica. Para

reverter esta situação e utilizar estes marcadores em espécies para os quais ainda não há marcadores desenvolvidos, a transferibilidade de *primers* SSR entre espécies próximas, têm sido avaliada (KULEUNG *et al.*, 2004; KRIEDT *et al.*, 2011; MIRANDA *et al.*, 2012; SILVA, 2012; DU, 2013).

As Solanaceae possuem espécies com alto interesse econômico como tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e a batata (*Solanum tuberosum* L.) (ANDRADA *et al.*, 2003) e também espécies de elevada importância ecológica, por serem pioneiras e desempenharem importante papel na recuperação de ecossistemas, facilitando a sucessão natural e o estabelecimento de outras espécies em áreas degradadas (CHADA; CAMPELLO; FARIA *et al.*, 2004). Para as espécies de interesse econômico, como o tomate há um grande número de *primers* SSR desenvolvidos. No entanto, para as espécies nativas não há *primers* SSR desenvolvidos.

Neste trabalho 72 pares de *primers* EST-SSR desenvolvidos para tomate foram avaliados em sete espécies de solanáceas nativas da Mata Atlântica. O padrão de transferibilidade em cada uma das espécies e a utilidade destes marcadores para estudos genéticos nestas espécies são discutidos.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Espécies e coleta de material vegetal

Para realização deste estudo primeiramente foram observadas espécies de solanáceas que ocorriam de forma frequente em áreas degradadas. Após este levantamento, foram coletados exemplares das espécies que se mostraram comuns nestes ambientes e montadas exsiccatas para testemunho. Paralelamente, para cada espécie foram coletadas folhas jovens de cinco plantas localizadas pelo menos a 50 m uma das outras. As coletas foram realizadas no município de Guarapuava e Marialva, estado do Paraná, Brasil. As espécies foram identificadas com base nos descritores da família e depositadas no Jardim botânico de Curitiba.

3.3.2 Extração do DNA vegetal

Para extração do DNA, folhas jovens foram coletadas de cinco plantas de cada espécie e armazenadas em sílica gel até o momento da extração do DNA. O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído de acordo com protocolo proposto por Doyle & Doyle (1990); 1 mL de tampão de extração (20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH

8,0, 2 M NaCl, 2% CTAB, 2% PVP, 4% β -mercaptoethanol) foi adicionado ao tubo contendo 100 mg de tecido; os tubos foram levados ao banho maria a 65 °C por 45 min. O DNA foi separado da solução por precipitação com clorofórmio:alcoólisoamílico (24:1) e centrifugação. Para obter um material genético com alto grau de pureza, foram realizadas sucessivas lavagens com etanol. Após a extração, o DNA foi ressuscitado em TE (10 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1 mM EDTA), tratado com RNase a 37 °C por 1 hora e armazenado a -20 °C até o uso. A quantificação do DNA e confirmação da sua integridade foi realizada em gel de agarose 0,9% corado com brometo de etídio, com base na comparação com um padrão com quantidades de DNA já conhecidas.

3.3.3 Reações de amplificação via PCR-SSR

Nas sete espécies de solanáceas coletadas foram testados 72 pares de *primers* SSR desenvolvidos a partir de regiões codificadoras de *S. lycopersicum* L. (Tabela 1).

As reações de amplificação do DNA de cada genótipo foram conduzidas em um volume final de 10 μ L contendo: 20 ng de DNA, 0,8 μ M de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂ e 0,04 U de Taq DNA Polimerase e 1 X de tampão para PCR. Para amplificação o termociclador foi programado para desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de uma *touchdown* de 9 ciclos de 94 °C por 30 s, 68 °C por 30 s (decaindo 1 °C por ciclo) e 72 °C por 30 s, seguido de mais 21 ciclos de 94 °C por 30 s, 62 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, para o anelamento dos *primers*, e um passo a 72 °C por 10 minutos para extensão final dos fragmentos. As temperaturas de anelamento foram às mesmas para todos os pares de *primers* SSR.

Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel de agarose 3% e visualizados por coloração com brometo de etídio (0,5 μ g mL⁻¹) sob luz UV. Para determinação do tamanho em pb os fragmentos amplificados foram comparados com o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 pb.

Tabela 1. Relação dos 72 pares de *primers* EST-SSR de *Solanum lycopersicum* L. avaliados nas sete espécies de Solanaceae utilizadas neste estudo; pb: tamanho de fragmento esperado em pares de bases.

<i>Primer</i>	<i>Sequencia 5'-3'</i>	pb
TES0985F	GTTGAGAATCGAGTCCGCTCT	299
TES0985R	TCGGAAGATAACAACAATGGG	
TES1974F	GTGTTGTAACCCGACATTTGG	253
TES1974R	CCCAGAAATTTGAGTACACG	
TES1444F	GATTTTTGTTTTGTCGCGTGC	212
TES1444R	AAAGCTAACCGTGCAAAGGA	
TES1259F	GTGGTCTTTGCTCACTGATG	147
TES1259R	CATTTACAGACTCCCCTCAA	
TES1242F	CCACCGCAACAAACCTTATT	207
TES1242R	GGGTGGTGAGAAGGATCTGA	
TES1345F	GGGATTGATAACAAGGCTGC	265
TES1345R	TGCAATTCACATACAGGGGA	
TES1791F	GTGTAGAGCCAAATTGCCACA	255
TES1791R	CTTGTTTGACCCCCACAAAC	
TES1676F	GTTGTAAATCATCACGCAGCC	205
TES1676R	AGATTGTTCCAGAGGCATCG	
TES1542F	TCATTCTCTCCACGTTTCCC	269
TES1542R	GCAAATAGCTTCGGAAGTGG	
TES1976F	GCCCCTAAGCCTCATAAAGG	175
TES1976R	AGGTGAATGAGCTGGTGGTTT	
TES1711F	GTGGATCTTGTTTGCTGATTTG	475
TES1711R	TATTTGACCCCAACGCTTTC	
TES1925F	GAGCTTTTAAACATGGCGGATG	295
TES1925R	AGGCAAAAGCTGGAAGTGAA	
TES1207F	GTTTTCACATTTCAAAAACCTCAAGC	231
TES1207R	AATCTTGCTTTGCACAACCC	
TES2046F	GCAACTTTCCACTGCGATCAA	82
TES2046R	ACCGTTCAATCAAATCGGAA	
TES1935F	GTTCAAAGGAGTCCATGCGC	263
TES1935R	CCACAGCTGAATCTCCAACA	
TES0050F	TCCTGCATGAATATTGGGAA	214
TES0050R	GATGTCATGAGGAGGAGGGA	
TES1712F	GTCACACACAGGTAAAGGGGTT	263
TES1712R	TCCATGTGGGTCTGAAACTG	
TES1203F	GAAGACTGCAGGCGATCCTTA	267
TES1203R	CCTCACAACAGGTTTCGGT	
TES1741F	AAGAGGATAAAGAACAAAGGGGA	257
TES1741R	GTTGTTTCCGATGGACCTA	
TES1141F	GTCCAATTACACAACCAGACCA	229
TES1141R	ATGAATCCCATTTACCCAA	
TES1955F	GCACAAACACTTTTGCACCA	246
TES1955R	AGGAATCGGCGTAATTTCTGA	
TES0853F	GTTTTGAGATATCTTCTCTAAAGCCG	90
TES0853R	AAAAGAGGGAAATGAAGAAGGG	
TES1364F	GGCCTGACCATAAGGCTGTA	151
TES1364R	TCCAAATCCACCTTCTCCAA	
TES1652F	AAAAAGTCAGCTTCAGTGGTAGTATAG	210
TES1652R	GCAACCTCCTACTCTGCTGG	
TES1770F	AGTTACACCTACCCACCCCC	171

TES1770R	GAAGCATGAACAAGAACGCA	
TES1325F	GTCACAATCGTTATCACCACCA	
TES1325R	TTGGCACCATTGAACTTATCC	154
TES1224F	GTTGAAGGCCTTTTGTACCCA	
TES1224R	CGATGCAAGAGAAAGCAACA	195
TES1750F	TCATCAACAAAGGCAGCTAAA	
TES1750R	GCGTGTTTCAGATGCATCAAT	271
TES1319F	GATCCAACATTGGCTGAGACC	
TES1319R	CTCCCATTTACCTTCAAGC	299
TES1743F	GAGTGTCTCGATCTCGCACCT	
TES1743R	CCATGTGTCCAACCTTTTCC	285
TES1469F	GCTCTGCGTGGACTTTATCC	
TES1469R	AAATGGGAGTCCCGTCTTCT	350
TES1873F	GTGTTCAAATTTGGTTTGGGC	
TES1873R	AAAACCGCCAGGATATAGGC	301
TES1406F	GAATTC AAGATCCGGCAGATG	
TES1406R	AATAGATGAGGGGGCAAGGT	163
TES0495F	GCGTGGAAGATGACTCCTCA	
TES0495R	TGTTGAATTTTGAACCTGAAACC	249
TES1344F	GCGGAGTGTGTTGATTAGGGA	
TES1344R	ACCTCAATCGACGAAGTTGG	151
TES1718F	GAGCCTAGGGTTTCTTCACCC	
TES1718R	TGCTTCACATGTACGTTTCCA	255
TES1521F	GTCAGAGCAGAAAAAGTGGCA	
TES1521R	CCTGGCTCTTGACTTTGAGG	156
TES1464F	GATCATTCCAATCACCCGGTA	
TES1464R	CTCTGAAGGTTGCTGGCATT	123
TES1567F	GTTCAACCAAACCAAAATCCA	
TES1567R	CAGGAAGAACATCAGGGGAA	204
TES0178F	GGAGGGATCGTCATCGTCTA	
TES0178R	TTGGCTTTAATTGTCCAGCC	294
TES1675F	GTGAAAAACCAAAATGGCACA	
TES1675R	TCTTCGATGAGACCCTCGTT	187
TES0999F	AAGCAAAATTGAGGGGAAAAA	
TES0999R	GGATCGGATGAGAAATCCAA	214
TES1427F	GTTGGTGGGAGAGAAACCCT	
TES1427R	TGCCATTACAAGCACAAGGA	232
TES1502F	GAAGGAGCTTGCTGAATTGG	
TES1502R	TGATTCCTTCACTCCTTGG	440
TES1884F	GCCTTCCTTACTTCGCCACTG	
TES1884R	TTCCGTGAAATACTTTGCC	261
TES1352F	GGGTAATGAGAATCCAGCAA	
TES1352R	AGCTGCTTTGATCAGGCTTC	273
TES2003F	GCAGAACCCACATTGCTTTT	
TES2003R	ACCCTCAACCCACAACAATC	232
TES1477F	GTGCTTTAGCTGGAGAGAGTGC	
TES1477R	TGAGATGGGATTTGGACCAT	266
TES1985F	GCTACCATGGAAGCCACTGCT	
TES1985R	TTCCAAGCATTTC AATCC	356
TES1246F	TGTTAAATCCGTGAAAGAGCA	
TES1246R	GCCTCTTTGGCCTTCTTCTT	235
TES1592F	GCCAATTTGGTGGCTACCCT	
TES1592R	CGGGATATCTGCCTCTACCA	197
TES1674F	CCTACCCAGTCCTCACTTATGG	
TES1674R	GGAACAAAACGAAGGACCAA	158

TES1690F	GCTGTGTGACTTTCTCTCCCAA	262
TES1690R	TATAACGACGTACCCTCCGC	
TES1454F	GAAGGGTTGTTCAACCACAGC	200
TES1454R	CGAGGACTCGGAAGTTTCAC	
TES1740F	GTTCTTTGTTGTTGGGGCTT	131
TES1740R	TTCAATCAAATACATAAACAAAACC	
TES1407F	GCCAATAAGGGTTTTCTCTTCTC	292
TES1407R	AACCAAGAAAGGATCCACCA	
TES1842F	GGTAAAGTGAAGAAATTGTTGTTGA	195
TES1842R	AAGCGCAGACCTTGACATCT	
TES1540F	GAGAATCACATCAGTTGGGGC	286
TES1540R	ATCATTCTTGGAACCC	
TES1966F	GACCATGGCCTCCTCTCTAT	273
TES1966R	CGCAAAAAGGGAAAAATGAA	
TES1695F	GACCCAAAAGTTGCAGAATCG	297
TES1695R	AGCAGGCCACAGTTAGAGC	
TES1442F	GTTGGGTTGATTTGATGGCT	234
TES1442R	AGCCCCAAATACACAAAGCAT	
TES1850F	CTTGCTCAAATCTCTTCGGG	259
TES1850R	GGAGGAGATGCAAGAAAGGA	
TES1449F	GCCGAAGAAGCAGAAACAAC	292
TES1449R	AGCTTCTGTCTGGAACGAC	
TES1667F	GACCCAAATGAGCCACCAATA	186
TES1667R	TAACCTGTGGGTCAGTCCCC	
TES1975F	CCTGGTGATTGTTTGGCTTT	200
TES1975R	GCACTTTCACCTGCTCATCA	
TES1635F	GTCTTATCGCAGCAAGGAGG	221
TES1635R	AGCAAAGTTGTGTAAGCAAGGG	
TES1515F	GCCTAATCTTCTCTATGAGGCCAA	269
TES1515R	CATTACGACGAACGAGACCA	
TES2042F	GTTTTCTCTCTGTAAAACCC	261
TES2042R	CGATTCCCCGTTTAGACAA	
TES1980F	GTGCTCCACTCACTTCATTCA	237
TES1980R	CTGTTTGCTCCCATGGACTT	
TES1683F	TCCCTTTTTATTTCTATTCATCA	252
TES1683R	GATGAACGCTTTAATCGGGA	
TES1724F	GTGCATTGTCAACTGGGGTT	255
TES1724R	CCAGTTGATGAAACGCACAC	

3.3.4 Análises dos dados

Os géis com os produtos de amplificação dos *primers* EST-SSR foram avaliados visualmente. Com os dados obtidos foi calculada a porcentagem de transferibilidade para cada espécie considerando o número de *primers* que amplificaram em cada espécie e o número total de *primers*. Para o cálculo da porcentagem de polimorfismo, foi dividido o número de *primers* polimórficos pelo total de *primers* que apresentaram polimorfismo na espécie em questão.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Identificação das espécies

As análises das exsicatas confirmaram que os acessos estudados pertencem às espécies *Solanum mauritianum* Scop. (Figura 1a, b), *Solanum americanum* Mill. (Figura 1c, d), *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. (Figura 1e, f), *Solanum hasslerianum* Chodat (Figura 1g, h), *Solanum viarum* Dunal (Figura 2i, j), *Solanum sisymbriifolium* Lam. (Figura 2k, l), e *Brugmansia suaveolens* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Bercht. & J.Presl (Figura 2m, n). A maioria das espécies da família são diclamídeas e apresentam flores pentâmeras, de simetria radial, com o androceu com cinco estames, com ovário bicarpelar e súpero (VIDAL & VIDAL, 2007). Na primavera e verão é a principal época que florescem e frutificam, no entanto, podem ser encontradas floridas durante quase todo o ano.

Essas espécies são comumente encontradas em locais alterados, enfatiza o comportamento ruderal típico de representantes da família. As coletas foram encontradas em locais de forte ação antrópica. As espécies *B. suaveolens* e *S. mauritianum* também podem ser encontradas em locais úmidos, como margens de rios. Esses dados corroboram com o que foi descrito por Soares *et al.* (2008) e com os espécimes presentes no herbário do Jardim Botânico de Curitiba. As espécies *S. guaraniticum* e *S. hasslerianum*, são facilmente confundidas com *S. viarium* e *S. sisymbriifolium* respectivamente, sendo que a identificação desses exemplares é realizada principalmente pelos tricomas e a exposição do fruto não ocorre em *S. hasslerianum* (MENTZ & OLIVEIRA, 2004).

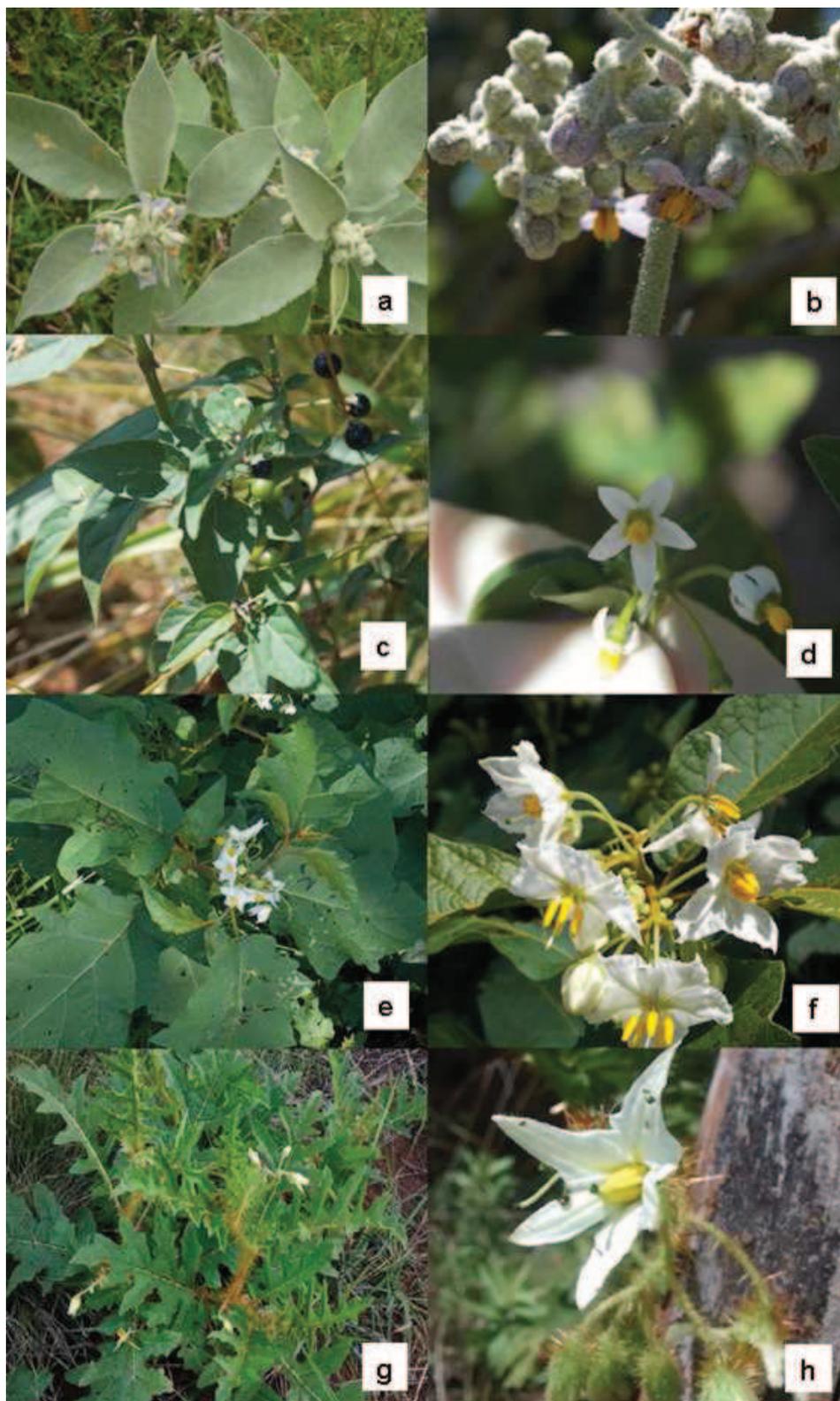


Figura 1. Espécies de Solanáceas avaliadas quanto à transferibilidade de *primers* EST-SSR de tomate. **a, b)** *Solanum mauritianum* Scop; **c, d)** *Solanum americanum* Mill; **e, f)** *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil; **g, h)** *Solanum hasslerianum* Chodat.

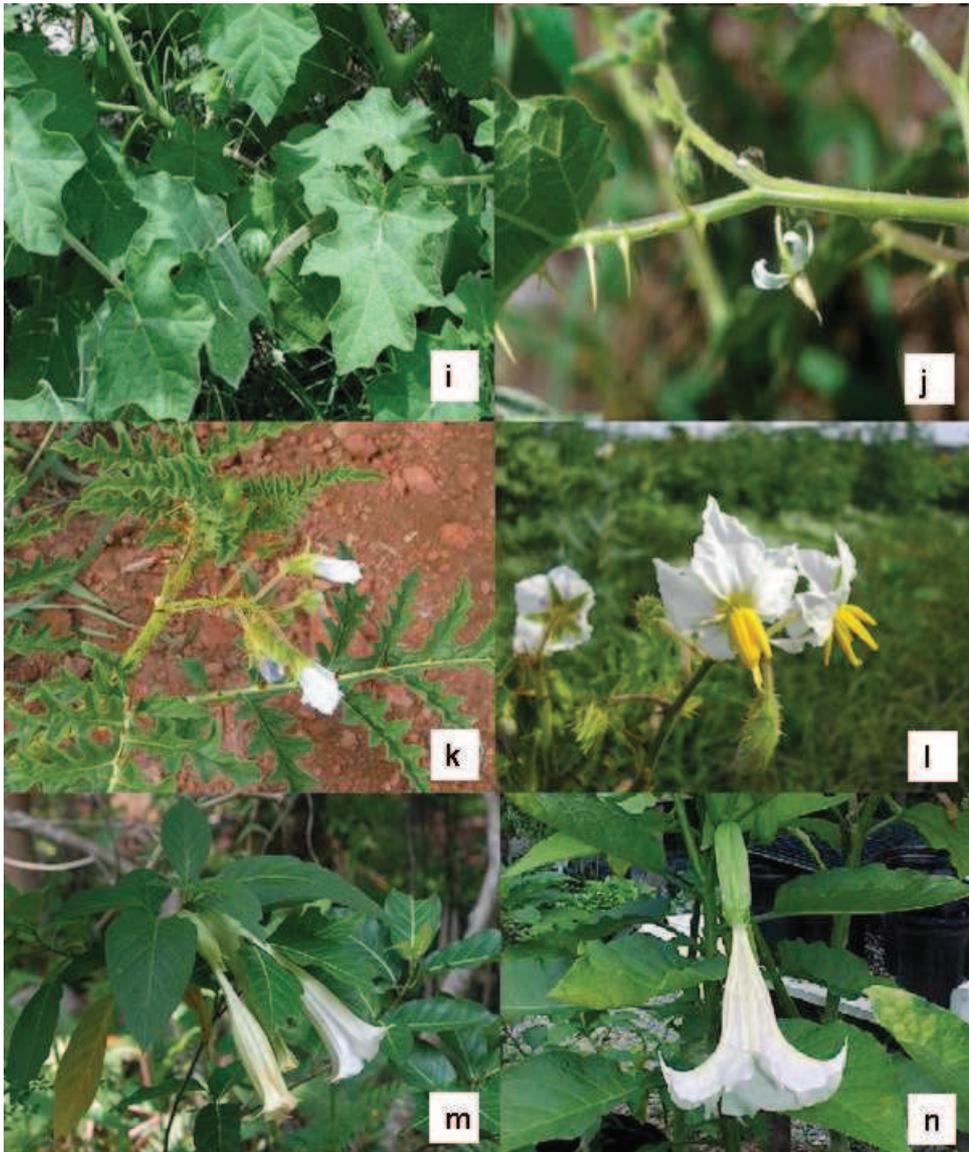


Figura 2. i, j) *Solanum viarium* Dunal; k, l) *Solanum sisymbriifolium* Lam; m, n) *Brugmansia suaveolens*(Humb. & Bonpl. ex Willd.) Bercht. & J.Presl.

3.4.2 Transferibilidade de *primers* EST-SSR

Dentre os 72 pares de *primers* EST-SSR de tomate, 17 pares de *primers* (24%) não apresentaram produto de amplificação. Dentre os 55 que apresentaram produtos de amplificação, 48,6% amplificaram em *S. mauritanum*, 33,3% em *S. americanum* 36,5% em *S. guaraniticum*, 33,3% em *S. hasslerianum*, 29,2% em *S. viarium*, 18,1% em *S. sisymbriifolium* e 22,2% em *B. suaveolens* (Tabela 3). O Padrão de amplificação de alguns dos EST-SSR é mostrado na figura 3. Pode-se observar que a maioria das espécies do mesmo gênero do tomate apresentaram maior porcentagem de amplificação (Tabela 3), o que não ocorreu com *B. suaveolens* (Tabela 3). Isso foi relatado por Billote *et al.* (2004), em que

consideraram a possibilidade de transferir *primers* desenvolvidos para *Phoenix dactylifera* para espécies do gênero *Astrocaryum*, porém estes não demonstraram transferibilidade. O potencial de transferibilidade de locos SSR depende do grau de parentesco genético das espécies analisadas (GONÇALVES *et al.*, 2010) e também da taxa de evolução das sequências genômicas para quais os *primers* foram desenhados (CHOUMANE *et al.*, 2000).

Espécies mais aparentadas apresentam maior conservação das regiões que flanqueiam o SSR onde estão os sítios de ligação desses *primers* (DA-SILVA *et al.*, 2011) estando de acordo com o que foi sugerido por Grattapaglia (2007), que considera a transferibilidade entre espécies do mesmo gênero como uma característica desejável dos marcadores SSR.

Os produtos de amplificação destas espécies não apresentaram qualidade quando observamos o polimorfismo presente nesses resultados. Dentre os *primers* que apresentaram amplificação o percentual de polimorfismo variou bastante entre as espécies (Tabela 3). O maior polimorfismo (60,9%) foi observado nos *primers* que amplificaram fragmentos em *S. guaraniticum*, em contrapartida o menor polimorfismo (16,6%) foi observado nos *primers* que amplificaram fragmentos em *S. sisymbriifolium* (Tabela 3). O baixo polimorfismo pode ser explicado devido à maior conservação de sequências de DNA localizadas em regiões transcritas, provavelmente devido à ação de forças seletivas (VARSHNEY *et al.*, 2007).

Tabela 2. Resultados do teste de transferibilidade dos *primers* EST-SSR de *Solanum lycopersicum* L. para sete espécies das Solanaceae. Os números de 0 a 5 indicam os números de acessos no qual o marcador apresentou amplificação. (-) Representa quando o *primer* não apresentou amplificação nas duas primeiras espécies testadas consequentemente não foi testado nas demais.

<i>Primer</i>	<i>Solanum mauritianum</i>	<i>Solanum americanum</i>	<i>Solanum suaveolens</i>	<i>Solanum guaraniticum</i>	<i>Solanum hasslerianum</i>	<i>Solanum sisymbriifolium</i>	<i>Solanum viarium</i>
TES0050	5	0	0	1	5	0	0
TES0178	4	0	0	0	0	0	0
TES0495	0	0	0	-	-	-	-
TES0853	0	0	0	-	0	-	-
TES0985	2	0	0	0	0	5	0
TES0999	0	0	0	0	5	0	0
TES1141	0	0	0	1	0	3	0
TES1203	1	0	0	3	0	0	0
TES1207	0	0	0	-	0	-	-
TES1224	0	4	0	4	5	0	0
TES1242	0	0	0	-	-	-	-
TES1246	0	0	3	0	5	0	0
TES1259	0	0	0	-	-	-	-

TES1319	4	4	5	0	0	0	0
TES1325	5	4	3	4	0	0	5
TES1344	5	3	5	5	2	0	5
TES1345	4	5	5	3	0	5	5
TES1352	2	1	0	1	0	0	0
TES1364	1	4	4	5	0	5	5
TES1406	2	0	0	5	5	0	4
TES1407	4	3	4	0	4	0	0
TES1427	0	0	2	3	5	2	5
TES1442	4	2	1	0	0	0	0
TES1444	5	0	0	0	0	0	5
TES1449	0	0	-	-	0	-	-
TES1454	5	0	0	0	0	5	0
TES1464	0	0	0	0	1	5	0
TES1469	4	4	0	0	0	5	0
TES1477	5	5	3	4	5	0	5
TES1502	5	5	1	5	5	0	5
TES1515	0	5	4	0	0	0	0
TES1521	0	4	0	0	5	0	0
TES1540	5	0	2	0	4	0	0
TES1542	0	0	-	-	0	-	-
TES1567	0	0	0	0	4	0	0
TES1592	2	0	0	0	4	0	0
TES1635	0	0	-	-	0	-	-
TES1652	5	3	0	2	0	0	0
TES1667	5	0	0	0	0	0	0
TES1674	0	0	0	0	4	0	0
TES1675	0	0	-	-	0	-	-
TES1676	0	2	0	0	0	0	3
TES1683	0	0	-	-	0	-	-
TES1690	0	0	0	-	4	0	3
TES1695	0	0	0	1	0	0	4
TES1711	4	4	0	3	0	0	5
TES1712	0	0	-	-	-	-	-
TES1718	4	2	5	3	2	0	0
TES1724	5	0	0	2	0	0	3
TES1740	5	0	0	0	4	0	2
TES1741	3	0	0	0	0	0	5
TES1743	0	0	-	-	-	-	-
TES1750	4	0	0	1	1	0	0
TES1770	0	0	-	-	-	-	-
TES1791	0	0	0	1	-	5	3
TES1842	4	0	3	0	4	5	0
TES1850	0	2	0	0	0	5	0
TES1873	0	0	-	-	-	-	-
TES1884	1	3	0	2	0	4	0
TES1925	5	0	2	3	4	0	0
TES1935	5	0	0	2	2	0	5
TES1955	0	0	-	-	0	-	-
TES1966	5	0	0	0	0	0	5
TES1974	0	2	0	0	0	0	4
TES1975	0	0	-	-	0	-	-
TES1976	0	0	-	-	0	-	-
TES1980	0	3	0	1	0	0	0
TES1985	5	0	0	0	0	0	0
TES2003	0	2	0	3	0	0	0
TES2042	5	0	0	2	0	0	0
TES2046	0	3	0	0	5	5	5

Tabela 3. Porcentagem de transferibilidade e de polimorfismo dos *primers* EST-SSR de *Solanum lycopersicum* L. em sete espécies das Solanaceae nativas da Mata Atlântica.

	S. <i>mauritanum</i>	S. <i>americanum</i>	B. <i>suaveolens</i>	S. <i>guaraniticum</i>	S. <i>hasslerianum</i>	S. <i>sisymbriifolium</i>	S. <i>viarium</i>
% de amplificação	48,6	33,3	22,2	36,1	33,3	18,1	29,2
% de polimorfismo	37,0	60,0	54,0	60,9	42,0	16,6	27,4

Os dados obtidos evidenciam significativa taxa de transferência dos *primers* EST-SSR de tomate para as espécies testadas, no entanto, quando observado o tipo de polimorfismo, todas as espécies apresentaram unicamente a presença de alelos nulos (Figura 3). Este é um sério problema quanto ao uso de marcadores interespecíficos (PASHLEY *et al.*, 2006), pois os alelos nulos não são amplificados via PCR e nem podem ser detectados na genotipagem dos indivíduos e a consequência é um número elevado de homozigotos (ALDRICH *et al.*, 1998; WHITE *et al.*, 1999). Além disso, quando o único tipo de polimorfismo observado é alelo nulo, inviabiliza do cálculo dos índices de diversidade genética de uma população, pois o marcador passa a se comportar com um marcador dominante, onde se observa somente dois alelos, presença e ausência.

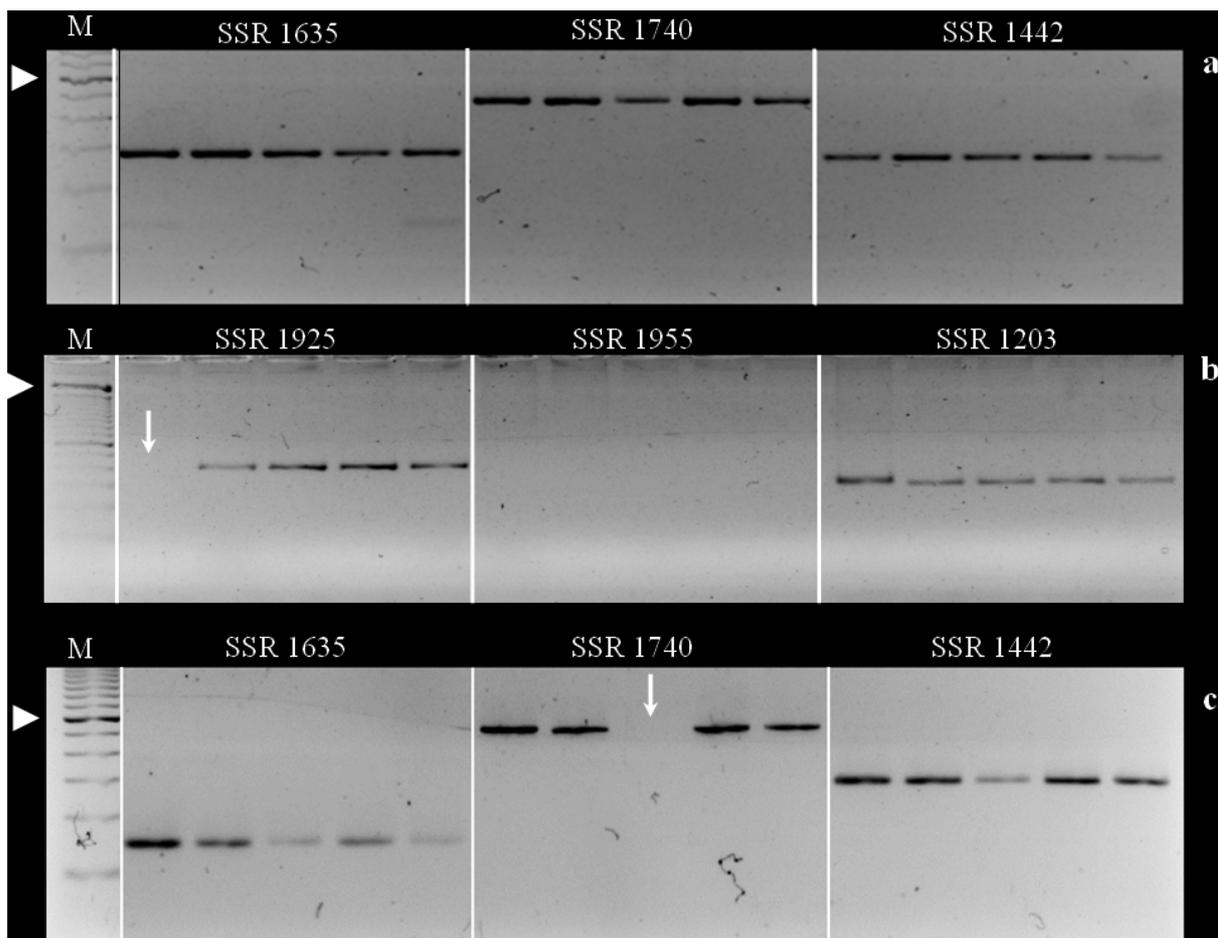


Figura 3. Géis de agarose com o padrão de amplificação alguns dos pares de *primers* EST-SSR de tomate utilizados neste estudo. **a)** padrão de amplificação em *Solanum mauritianum* Scop.; **b)** padrão de amplificação em *Solanum americanum* Mill; **c)** padrão de amplificação em *Solanum guaraniticum* A. St.- Hill. A seta na figura b (EST-SSR 1925) e na figura c (EST-SSR 1740) indica alelos nulos. O EST-SSR 1955 da figura B indica um marcador que não foi transferido (não apresentou produto de amplificação). Os demais EST-SSRs são marcadores transferidos, porém monomórficos. M indica o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 pb. As cabeças de seta à esquerda das figuras indicam a banda de 600 pb do DNA *Ladder*.

A literatura sugere que os marcadores EST-SSR serão mais úteis do que os marcadores genômicos, no entanto o alvo das pesquisas citadas são as espécies de interesse econômico (RAKOCZY-TROJANOWSKA & BOLIBOK, 2004). Com os dados obtidos em nosso trabalho podemos ressaltar a utilização deste tipo de marcador em espécies nativas.

Há evidências de conservação de conteúdos genômicos entre tomate e batata (GEBHARDT *et al.*, 1991) e entre tomate e pimenta (TANKSLEY *et al.*, 1988). Assim como,

trabalhos realizados *Capsicum annuum*, no qual foram testados para duas espécies do mesmo gênero como *C. frutescens* e *C. chinense* (CARVALHO, 2014) se mostraram transferíveis e polimórficos. Este fator está intimamente relacionado à distância filogenética (KALÓ, 2004) e a transferibilidade ocorre em função da conservação desses conteúdos genômicos. Assim, os resultados aqui obtidos sugerem que não há um alto grau de parentesco entre as espécies estudadas e *S. lycopersicum* (DOYLE & LUCKOW, 2003). Esta espécie está incluída em outro subgênero, *Potatoe*, como demonstrado em estudos realizados com DNA de cloroplasto (cpDNA) baseados na sequência *ndhF* que identificaram 13 clados dentro do gênero *Solanum* (BOHS, 2005).

Os EST-SSR (cDNA-SSR) ou também chamados de microssatélites gênicos, que são desenvolvidos a partir de regiões transcritas dos genomas (GUPTA, 1998), tem se mostrado importantes em espécies cultivadas (BAGGE & LUBBERSTECT, 2007). No entanto, os dados observados em nosso trabalho indicam que o tipo de polimorfismos (alelos nulos) deste marcador em espécies não cultivadas das Solanaceae torna-o inapropriado para estudos de genética de populações.

Esta restrição do uso destes marcadores em estudos genéticos em espécies nativas, se deve pelo polimorfismo ser baixo e o tipo de polimorfismo detectado ser alelo nulo. Neste sentido, devido à impossibilidade de uso dos marcadores SSR, é recomendado o uso de outros marcadores, como por exemplo os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) para estudo genéticos destas espécies.

3.5 REFERÊNCIAS

- ALARIA, A. *et al.* **Flora Argentina**, v. 13. 2013. 61 p.
- ALDRICH, P. R. *et al.* Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 933-944. 1998.
- ANDRADA, B. A.; NORA, M. D. A.; ADRIANA, V. P. Caracterización citológica em *Solanum nigrum* L. **Agro Sur** **31**, v. 1, p. 77-81. 2003.
- BAGGE, X. W.; LUBBERSTEDT, T. Functional markers in wheat. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 211-216. 2007.
- BILLOTE, N. *et al.* Nuclear microsatellite markers for the date palm (*Phoenix dactylifera* L.): characterization and utility across the genus *Phoenix* and in other palm genera. **Molecular Ecology Notes** **4**, p. 256-258. 2004.
- BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Genetic effects of forest fragmentation in high-density *Araucaria angustifolia* populations in Southern Brazil. **Tree Genetics & Genomes**, v. 5, p. 573-582. 2009.
- BOHS, L. Major clades in *Solanum* based on *ndhF* sequence data. **Monographs in Systematic Botany**, v. 104, p. 27. 2005.
- BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO D. Fine-scale genetic structure of *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore**, v. 35, p. 957-964. 2011.
- CARVALHO, S. I. C. **Estudos filogenéticos e de diversidade em *Capsicum* e sua aplicação na conservação e uso de recursos genéticos das espécies *C. frutescens* e *C. chinense***. 2014. 192 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- CHADA, S. S.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M. Sucessão vegetal em uma encosta reflorestada com leguminosas arbóreas em Angra dos Reis, RJ. **Revista Árvore**, v. 28, n. 6, p. 801-809. 2004.
- CHOUMANE, W. *et al.* Conservation and variability of sequence-tagged microsatellite sites (STMSs) from chickpea (*Cicer arietinum* L.) within the genus *Cicer*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 1-2, p. 269-278. 2000.
- DA-SILVA, P. R.; MILACH, S. C. K.; TISIAN, L. M. Transferability and utility of white oat (*Avena sativa*) microsatellite markers for genetic studies in black oat (*Avena strigosa*). **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 2916-2923. 2011.
- DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Ithaca**, v. 12, p. 13-18. 1990.

- DOYLE, J. J.; LUCKOW, A. The rest of the iceberg Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**, v. 131, p. 900-910. 2003.
- DU, X. Y. Transferability of retrotransposon *primers* derived from Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). Across other plant species. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 2, p. 1781-1795. 2013.
- ESTOPA, R. A. *et al.* Performance of inbred and outbred *Eucalyptus* spp. **Cerne**, Lavras. 2007.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEM, 1996. 220 p.
- GEBHARDT, C. *et al.* RFLP maps of potato and their alignment with the homologous tomato genome. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 83, p. 49-57. 1991.
- GONÇALVES, F. K. *et al.* Avaliação de transferibilidade de microssatélites funcionais de sorgo (EST-SSR) visando a construção de mapas de ligação em cana-de-açúcar. In: 5º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica-CIIC. **Anais...2010**.
- GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BOREM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 175-200.
- GUPTA, P. K. Transferable EST-SSR markers for their study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 270, p. 315-323. 2004.
- HANSKI, I. Metapopulation dynamics. **Nature**, v. 396, p. 41-49, 1998.
- HIROTA, M. M. Monitoring the Brazilian Atlantic Forest Cover. In: GALINDO-LEAL C.; GUSMÃO-CAMARA, I.). **The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook**, p. 60-65. 2003.
- KALÓ, P. Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 272, p. 235-246. 2004.
- KRIEDT, R. A. *et al.* Isolation, characterization, and cross-amplification of microsatellite markers for the *Petunia integrifolia* (Solanaceae) complex. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 10, p. 277-279. 2011.
- KULEUNG, C.; BAENZIGER, P. S.; DWEIKAT, I. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 1147-1150. 2004.
- LOPES, L. E.; GONZAGA, L. P. Taxonomy, distribution, natural history and conservation of the Russet-mantled Foliage-gleaner *Syndactyla dimidiata* (Pelzeln, 1859) (Aves: Furnariidae). **Zootaxa**, v. 3754, n. 4, p. 435-449. 2014.

- MENTZ, L. A. ; OLIVEIRA, P. L. *Solanum* (Solanaceae) na região sul do Brasil. **Pesquisa**, v.54, n. 1, p. 327. 2004.
- MIRANDA, F. D *et al.* Transferability and characterization of microsatellite markers in five Bromeliaceae species belonging to the subfamilies Pitcairnoideae and Bromelioideae **Biota Neotropica**, v. 12, n. 3. 2012.
- Ministério do Meio Ambiente - MMA. **Proposta do grupo de trabalho preservação e recuperação da Floresta Ombrófila Mista no Estado de Santa Catarina**. Portaria Ministerial 49 de 06 de fevereiro de 2002, Brasília, Brasil, p. 77. 2002.
- OLIVEIRA, E. J. *et al.* Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 294-307. 2006.
- PASHLEY, C. H. *et al.* EST databases as a source for molecular markers: Lessons from the Helianthus. **Journal of Heredity**, v. 97, p. 381-388. 2006.
- RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Celular & Molecular Biology Letters**, v. 9, p. 221-238. 2004.
- SILVA, L. F. **Diversidade genética em populações de *Campomanesia xanthocarpa* Berg. oriundas de fragmentos da Mata Atlântica**. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná, 2012.
- SOS MATA ATLÂNTICA. **Projetos SOS - Sustentabilidade 2012**. Disponível em: <<http://www.sosmatatlantica.org.br>>. Acesso em: 11 nov. 2014.
- TANKSLEY, S. D *et al.* Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 85, p. 6419-6423. 1988.
- VARSHNEY, R. K. *et al.* Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation os genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. **Plant Science**, v. 173, p. 628-649. 2007.
- VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Botânica-organografia: quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos**. Viçosa: UFV, 2007. 114 p.
- WHITE, G. M.; BOSCHER, D. H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis*. Zucc. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1899-1909. 1999.

4 DIVERSIDADE GENÉTICA-POPULACIONAL DE *Solanum mauritianum* Scop. (SOLANACEAE) ORIUNDOS DA MATA ATLÂNTICA

Daniele Luciana de Lima¹, Rafael de Assis¹, Adriano Silvério^{1,3}, Paulo Roberto Da Silva^{1,2}

¹ Programa de Pós – Graduação em Biologia Evolutiva, Universidade Estadual do Centro – Oeste, UNICENTRO, Guarapuava, PR, Brasil.

² Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Centro – Oeste, UNICENTRO, Guarapuava, PR, Brasil.

³ Laboratório de Botânica Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Centro – Oeste, UNICENTRO, Guarapuava, PR, Brasil.

4.1 RESUMO

Plantas colonizadoras de áreas abertas e perturbadas desempenham um importante papel para a recuperação. Uma espécie vegetal com grande representatividade e pioneira na Mata Atlântica é a *Solanum mauritianum* Scop., também conhecida como fumo bravo. Objetivando investigar a diversidade genética de populações naturais de *S. mauritianum*, 10 locos ISSR foram amplificados em duas populações da Floresta Ombrófila Mista. A população “A” foi coletada em Guarapuava, PR, próximo a uma área conservada e a população “B” em Pitanga, PR, em área agrícola. A porcentagem de polimorfismo foi de 87,6% e 80,30% para população “A” e “B”, respectivamente. A média de polimorfismo de todos os *primers* nas duas populações foi de 83,9%. A população “A” apresentou 5 locos exclusivos, enquanto a “B”, apenas 1. O agrupamento de todos os indivíduos formou 10 grupos mostrando fraca estruturação nas populações estudadas. A análise de variância molecular evidenciou alto fluxo gênico (10,78). Este alto valor para fluxo gênico é explicado pelo fato da planta apresentar características que facilitam sua dispersão. Esses dados corroboram com o que foi encontrado na variação genética dentro das populações (93,5%) e entre elas (6,49%). A variação entre as populações mostrou-se baixa ($G_{ST}= 0,044$), o que é comum em populações com altas taxas de fluxo gênico. Alta diversidade genética foi observada pelo índice de Shannon (A= 0,53; B= 0,46), bem como para as populações (0,52). A alta diversidade genética observada em *S. mauritianum* em nosso trabalho pode ser explicada pela biologia reprodutiva da espécie, como

a características da polinização e dispersão de sementes, ampla distribuição e a constante atividade reprodutiva que facilitam o fluxo gênico entre as populações.

Palavras-chave: Sucessão ecológica; Densidade populacional; Conservação; ISSR; Solanáceas.

4.2 INTRODUÇÃO

Espécies pioneiras são muito importantes nos processos de sucessão ecológica. Elas fornecem microclimas que são necessários para o estabelecimento de espécies secundárias. Essas espécies não são exigentes quanto ao solo, crescem rapidamente e seu ciclo de vida é mais curto comparado a outras espécies de estágios sucessionais posteriores. A luminosidade também não é um fator limitante para o desenvolvimento destas espécies (RICKLEFS, 2010).

Solanum mauritianum Scop. é um arbusto nativo do sul e sudeste do Brasil, conhecido como fumo bravo, sua polinização é realizada por abelhas e isso requer um comportamento especial chamado polinização vibrátil (*buzz pollination*) (RAMBUDA & JOHNSON, 2004). Trata-se de uma espécie abundante na Floresta Ombrófila Mista. A espécie é tipicamente pioneira, comum nas áreas antropizadas como beira de estradas, borda de florestas e áreas agrícolas. Esta espécie apresenta características importantes, como alto endemismo, características ecológicas associadas, como polinização (BUCHMANN *et al.*, 1983; SYMON, 1979 apud HAWKES; LESTER; SKELDING, 1982), resiliência ambiental, abundante produção de sementes e dispersão zoocórica. Está na lista de espécies nativas que são importantes para recuperação de áreas degradadas (GRIS *et al.*, 2012).

Para elaborar estratégias de manejo e conservação de uma espécie o conhecimento da distribuição da variação genética entre e dentro de populações é de fundamental importância (LYNCH & MILLIGAN, 1994). Uma das ferramentas mais indicadas para os estudos das estruturas genéticas de populações são os marcadores moleculares. Dentre estes, os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) têm sido empregados em diversos estudos de variabilidade e estrutura genética de populações (WHITE *et al.*, 1999; SHARMA *et al.*, 2008; BITTENCOURT & SEBBENN, 2009; GE *et al.*, 2013 HUANG *et al.*, 2014).

Os marcadores ISSR são baseados em técnica simples e de baixo custo, apresentam alta reprodutibilidade e são altamente polimórficos (REDDY *et al.*, 2002). Ainda geram um grande número de bandas por reação e não há necessidade de conhecimento prévio do genoma para a construção dos *primers*.

Considerando que *S. mauritianum* tem elevada importância ecológica na recuperação de áreas degradadas, a associação ecológica com diversos animais e a necessidade de obtenção de dados genéticos de espécies nativas da Floresta Ombrófila Mista, este trabalho teve como objetivo levantar dados de variabilidade e estrutura genética de populações de *S. mauritianum* utilizando marcadores ISSR.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Área de estudo

Foram avaliadas duas populações de *S. mauritianum* coletadas em fragmentos da Floresta Ombrófila Mista localizados no município de Guarapuava, PR (distrito de Entre Rios) e no município de Pitanga, PR (Figura 1). Foram amostradas 30 árvores adultas de cada população, pelo menos à 50 M de distância entre elas. As populações de Guarapuava e Pitanga foram codificadas como populações “A” e “B”, respectivamente. A população “A” foi coletada ao longo de uma estrada que corta áreas agrícolas, não havendo contato direto com fragmentos florestais, no entanto, a estrada está próxima a regiões bastante conservadas (Figura 2a). A população “B” foi coletada ao longo de uma estrada que corta dois fragmentos florestais, no entanto sem regiões conservadas próximas (Figura 2b). Estas populações se encontram a 100 km de distância em linha reta (Figura 1).

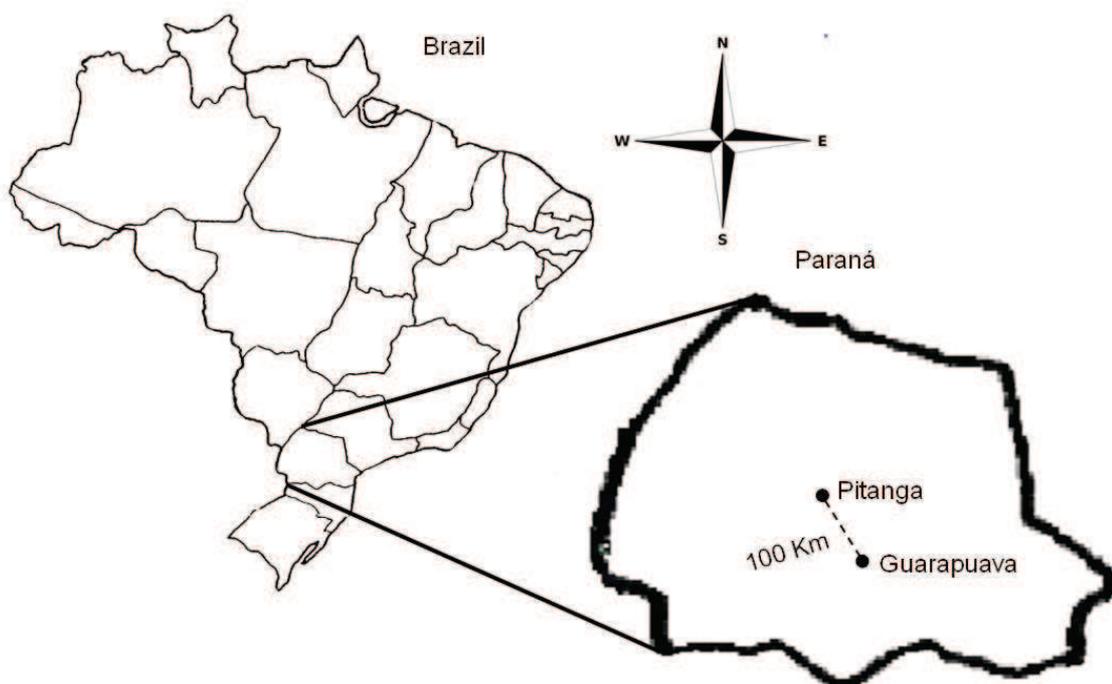


Figura 1. Localização das populações "A" (Guarapuava) e "B" (Pitanga) de *Solanum mauritianum* Scop. analisadas neste estudo.



Figura 2. Detalhes das regiões onde estão localizadas as populações de *Solanum mauritianum* Scop. avaliadas neste trabalho. **a)** Região de coleta da população "A"; **b)** Região de coleta da população "B". A linha pontilhada indica o transecto onde foi coletada cada população. A linha contínua delimita áreas onde a vegetação apresenta certo grau de conservação com áreas agrícolas. Base da imagem obtida com o *Software Google Earth* (Google Inc.). Data da captura das imagens: **a)** 06/02/2014; **b)** 21/07/2014.

4.3.2 Extração do DNA vegetal

Para extração do DNA, folhas jovens de cada um dos 30 genótipos de cada população foram coletadas separadamente e mantidas em sílica gel. O tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído de acordo com protocolo proposto por Doyle & Doyle (1990); 1 mL de tampão de extração (20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 M NaCl, 2% CTAB, 2% PVP, 4% β -mercaptoethanol) foi adicionado ao tubo contendo 100 mg de tecido; os tubos foram levados ao banho maria a 65 °C por 45 min. O DNA foi separado da solução por precipitação com clorofórmio:alcoólico (24:1) e centrifugação. Para obter um material genético de alto grau de pureza, sucessivas lavagens com etanol foram realizadas. Após a extração, o DNA foi ressuspense em TE (10 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1 mM EDTA), tratado com RNase a 37 °C por 1 hora e armazenado a -20 °C até o uso. A quantificação do DNA e confirmação da sua integridade foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,9%. Para determinação da quantidade de DNA, após eletroforese cada amostra foi comparada o padrão de massa molecular *Lambda*, cuja quantidade de DNA já era conhecida.

4.3.3 Amplificação via PCR-ISSR

Para amplificação do DNA dos genótipos das populações em estudo foram utilizados 10 *primers* ISSR previamente selecionados em outras espécies entre 42 disponíveis na literatura por Marangoni (2013) e Cardoso (2014) (Tabela 1). As reações de amplificação do DNA de cada genótipo via PCR foram conduzidas em volume final de 12,5 μ L contendo: 20 ng de DNA, 0,2 μ M de *primer*, 200 μ M de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 1 U de Taq DNA Polimerase e 1X de tampão para PCR. Para a amplificação o termociclador foi programado para uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 45 s, temperatura de anelamento dos *primers* por 45 s e 72 °C por 90 s, e por fim foi feito um passo a 72 °C por 5 minutos para extensão final dos fragmentos. Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel de agarose 1,8 % corado com brometo de etídio (0,5 μ g mL⁻¹). Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA *Ladder* 100 pb. O resultado da eletroforese foi visualizado em luz UV e documentado com fotodocumentador digital.

4.3.4 Análises dos dados ISSR

A leitura dos géis foi realizada utilizando o sistema binário (1 = presença da banda e 0 = ausência da banda) e uma matriz binária foi construída a partir desses dados. A partir

desta matriz foram calculadas as porcentagens de polimorfismo de cada *primer* ISSR e a frequência de cada loco nas populações. Ainda, foi avaliada a presença de locos exclusivos em cada uma das populações.

A similaridade genética entre os indivíduos foi mensurada pelo *software* NTSYS 2.2 utilizando o coeficiente de Jaccard e o dendrograma de similaridade entre os indivíduos foi desenhado pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). A análise de variância molecular (AMOVA) foi feita utilizando o *software* ARLEQUIN versão 3.11, determinando assim os índices de diferenciação genética dentro e entre as populações (*Gst*), a presença de locos exclusivos e suas frequências e a variância entre os componentes e seus níveis de significância. O índice de diversidade de Shannon (*I*) foi mensurado pelo do *software* POPGENE versão 1.32.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os 10 *primers* testados apresentaram produtos de amplificação de qualidade. Na figura 3 pode ser observado o padrão de amplificação do *primer* ISSR UBC-834 nas duas populações de *S. mauritianum*. Os 10 *primers* amplificaram 107 locos (fragmentos) com média de 10,7 locos por *primer* (Tabela 1). Destes locos, 96 foram polimórficos para a população “A” (Guarapuava) e 89 para população “B” (Pitanga). A porcentagem de polimorfismo foi de 87,6% e 80,30% para população “A” e “B”, respectivamente. O número de locos amplificados com cada *primer* variou de 23 (*Primer* 834) a quatro (*primer* UBC-855) (Tabela 1). O menor polimorfismo encontrado (61,1%) foi no *primer* 868. O *primer* UBC-848 apresentou 100% de polimorfismo. E os *primers* UBC-807 UBC-815 e UBC-834, apresentaram mais que 90% de polimorfismo (Tabela 1). A média de polimorfismo de todos os *primers* foi de 83,9% (Tabela 1).

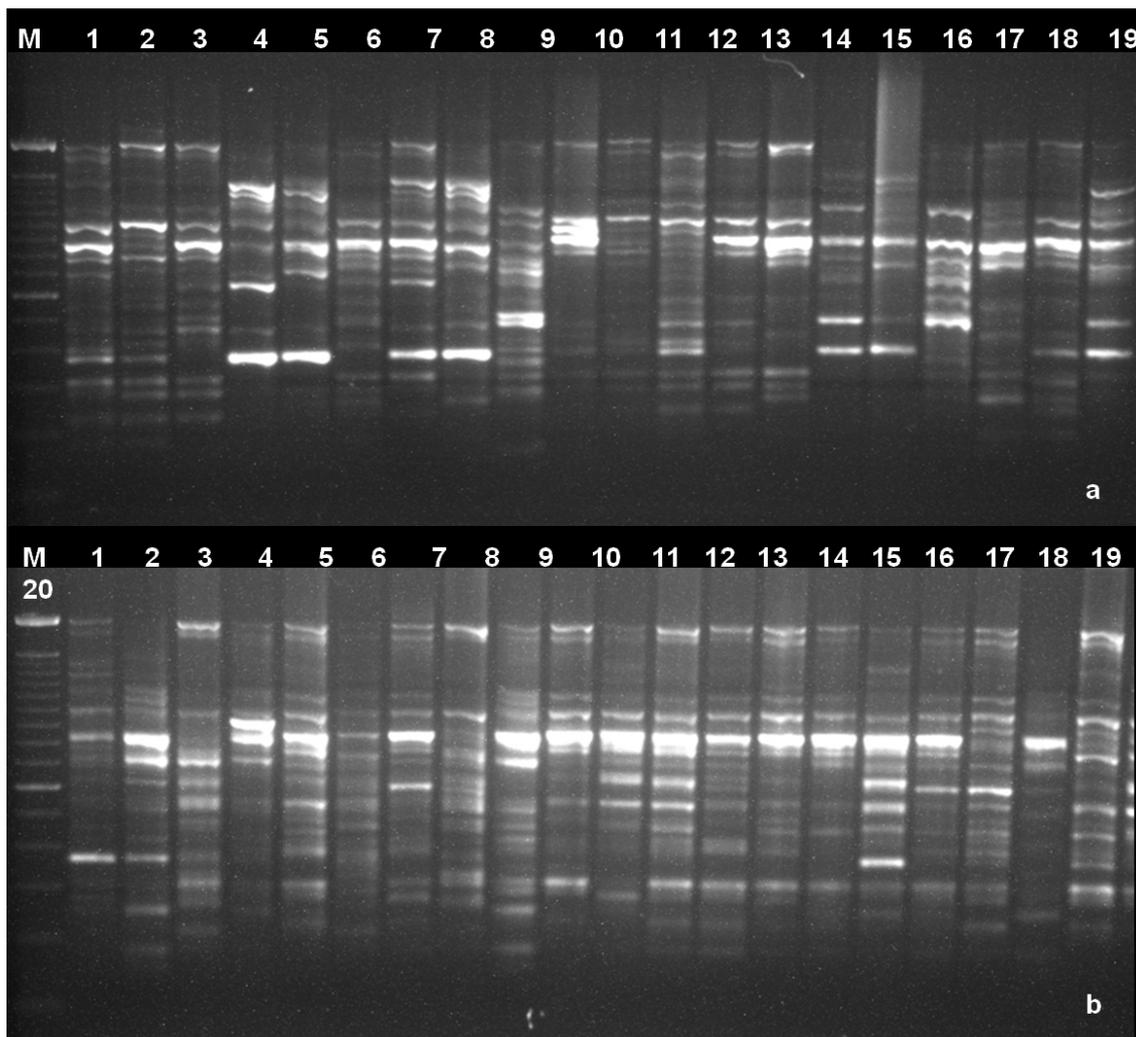


Figura 3. Padrão de amplificação do marcador ISSR UBC-834 em parte das populações "A" (figura a) e "B" (figura b) de *Solanum mauritianum* Scop. M indica o padrão de peso molecular DNA *Ladder* 100 pb.

Tabela 1. Primers ISSR avaliados nas populações de *Solanum mauritianum* Scop. com suas respectivas sequências, temperatura de anelamento (TA), número total de fragmentos amplificados (NT), número de fragmentos polimórficos (NP), porcentagem de polimorfismo média entre as populações (%P).

<i>Primers</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>	<i>TA (°C)</i>	<i>NT</i>	<i>NP (A)</i>	<i>NP(B)</i>	<i>%P</i>
UBC-807	(AG) ₈ T	52	18	17	16	91,7
UBC-808	(AG) ₈ C	50	12	11	10	87,5
UBC-815	(CT) ₈ G	53	8	8	7	93,8
UBC-823	(TC) ₈ C	52	7	6	6	85,7
UBC-827	(AC) ₈ G	53	7	5	5	71,4
UBC-834	(AG) ₈ CTT	52	23	23	22	97,8
UBC-848	(CA) ₈ AGG	55	7	7	7	100,0
UBC-855	(AC) ₈ CTT	55	7	7	4	78,6
UBC-866	(CTC) ₆	55	9	7	6	72,2
UBC-868	(GGA) ₆	50	9	5	6	61,1
Total	-	-	107	96	89	83,9

O polimorfismo encontrado com marcadores ISSR tem sido variável de acordo com a espécie em estudo. Em espécies arbóreas nativas da Floresta Ombrófila Mista (FOM) como *Campomanesia xanthocarpa* (SILVA, 2012) e *Eugenia uniflora* (FAGUNDES, 2013) foram encontrados 84,4% e 95,4% de polimorfismo respectivamente. Valores variáveis também foram encontrados em *Achyrocline satureioides* (75,78%) (CARDOSO, 2014) e *Baccharis trimera* (87,5%) (MARANGONI, 2013), que também são nativas da FOM, estas são espécies herbáceas. Com relação a espécies de Solanaceae, tanto nativas como cultivadas apresentaram altos índices de polimorfismo, por exemplo, *Capsicum* sp. (88%) (THUL *et al.*, 2013) e *S. melongena*; *S. aethiopicum*; *S. anguivi*; *S. incanum*; *S. violaceum*; *S. kurzii*; *S. macrocarpon*; *S. virginianum* e *S. torvum* com média 99% de polimorfismo (ADENIJI & ALOYCE *et al.*, 2012).

A porcentagem de polimorfismo dos marcadores ISSR tem sido utilizada como medida de diversidade em populações naturais (LACERDA *et al.*, 2001; GE & SUN, 2001). Neste sentido, o alto polimorfismo dos marcadores ISSR encontrado nas populações de *S. mauritianum* indicam que estas populações possuem alta variabilidade genética. Os dados encontrados e os dados na literatura (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002; REDDY *et al.*, 2002; CORTESI *et al.*, 2005; LUAN *et al.*, 2006; SHILPHA *et al.*, 2013) mostram a excelência dos

marcadores ISSR como ferramenta para acessar a diversidade genética e conseqüentemente sua eficiência na caracterização genética em diversos grupos de plantas.

A análise da frequência dos locos nas populações mostrou que dos 30 locos mais frequentes na população “A”, 27 deles também estavam entre os 30 mais frequentes na população “B”. Este resultado indica que as populações apresentam elevada similaridade genética. No entanto, quando avaliada a presença de locos exclusivos, a população “A” apresentou cinco, enquanto a população “B” apresentou apenas um. Estes dados indicam que a população “B” está provavelmente sofrendo perda de variabilidade quando comparada com a população “A”. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva (2012) em um estudo com *C. xanthocarpa*, no qual as populações próximas a áreas mais preservadas obtiveram uma maior riqueza dos patrimônios genéticos. Este fato está atrelado a forças evolutivas ou a dispersão e aos processos reprodutivos, fatores esses que levam a alterações nas frequências alélicas.

As áreas preservadas tem um papel importante para polinizadores e dispersores, pois, contribuem para manutenção da diversidade de espécies, aumentando a área de habitat disponível e criando áreas com maior conectividade entre as populações remanescentes, e também facilitam a movimentação da fauna funcionando como “trampolins ecológicos” (GALETTI et al. , 2010). Áreas de vegetação nativa preservadas são fundamentais para conservação da diversidade brasileira, permitindo que animais movam-se entre grandes fragmentos de vegetação nativa através desses “trampolins ecológicos” (CULLEN JR. et al. 2003), e criando paisagens modificadas pelo homem que possam, em grande escala, diminuir o isolamento entre as populações. Desta forma, a preservação de áreas conservadas é um fator relevante para a manutenção da variabilidade genética de espécies nativas, tanto dentro das áreas quanto ao seu redor.

O dendrograma baseado no coeficiente de Jaccard, construído pelo método UPGMA, considerando os 60 indivíduos, formou 10 grupos, sendo que os indivíduos das populações “A” e “B” se misturam (Figura 4). Este dado corrobora com os dados de frequência de locos e sugere que está ocorrendo fluxo gênico entre as populações.

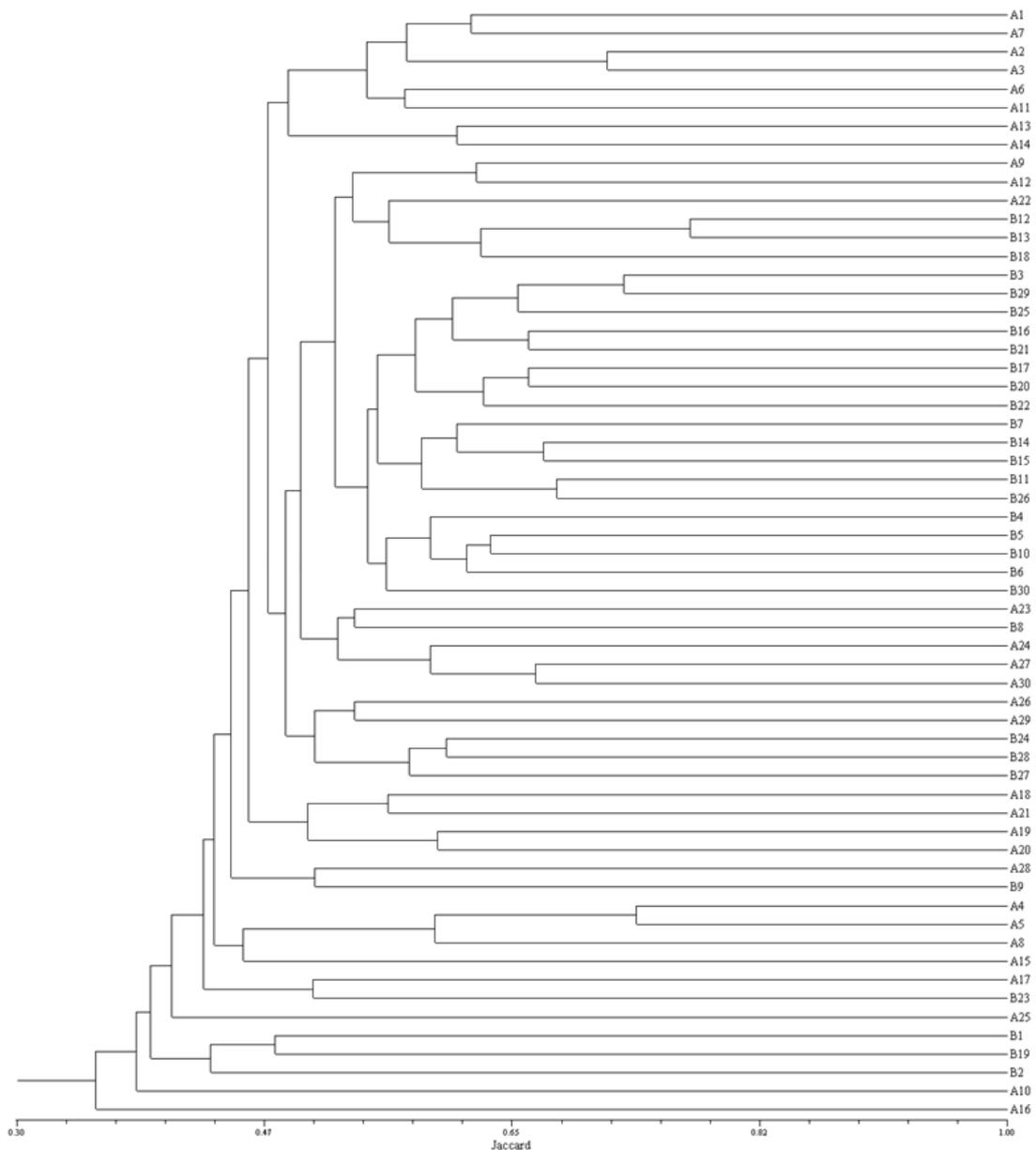


Figura 4. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA com os dados de 10 marcadores ISSR dos 60 indivíduos das duas populações de *Solanum mauritianum* Scop. avaliadas neste estudo.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) evidenciou taxa de fluxo gênico de 10,78. Este índice é considerado altíssimo, uma vez que valores acima de 0,5 já são considerados significativos (PINTO-COELHO, 2000). Este dado confirma o observado no agrupamento presente no dendrograma (Figura 4), no qual foi evidenciado alto fluxo gênico devido os indivíduos das populações “A” e “B” não terem formados grupos de acordo com a origem. O fluxo gênico é um termo que caracteriza todos os mecanismos resultantes do movimento de genes de uma população para outra. Este fator evolutivo promove a evolução,

espalhando novos genes e combinações gênicas entre populações (SLATKIN, 1987), tendendo a reduzir a homogeneização genética ocasionada pela deriva genética e a seleção natural.

A espécie *S. mauritianum* possui várias características que podem explicar o alto fluxo gênico observado, dentre estes destacamos: a produção de frutos praticamente durante todo ano; os frutos serem consumidos avidamente, principalmente por pássaros (WILDY, 2006), que são excelentes dispersores; a cor amarela a laranja dos frutos, facilita a sua visualização; o pequeno tamanho de suas sementes, que facilita a ingestão pelos pássaros e, consequente dispersão e a associação da planta com mais de 34 espécies de insetos (OLCKERS *et al.*, 2002).

A frugivoria é um evento de disseminação dos diásporos que, além de aumentar o fluxo gênico e de diminuir cruzamentos entre plantas próximas, tende a minimizar a competição. No entanto, para que isso ocorra, plantas ornitocórias apresentam: frutos expostos ou pendentes, cores que sinalizam sua maturação, contraste da cor dos frutos em relação à coloração da folhagem de fundo, o que influencia na preferência pelas aves (BURNS & DALEN, 2002). A escolha alimentar é acrescida pelo tamanho dos frutos e sementes. Trabalhos realizados com frutos artificiais (ARRUDA *et al.*, 2008) e em frutos naturais (FAUSTINO & MACHADO, 2006), mostraram que estas características são importantes para dispersão, pois prevalecem na preferência das aves.

O fumo bravo também apresenta associação com morcegos, que são dispersores, o que foi evidenciado pela presença de sementes em suas fezes (PAULINO-NETO *et al.*, 2013). Um comparativo entre sementes coletadas diretamente dos frutos maduros e coletada das fezes dos morcegos mostrou que o sucesso da germinação foi fortemente afetado pela passagem no trato digestório dos morcegos, apresentando germinação significativamente maior nas sementes defecadas (PAULINO-NETO *et al.*, 2013). A arquitetura da planta é favorável ao consumo por este mamífero, pois as inflorescências são inteiramente expostas, podendo consistir numa adaptação ecológica, pois frutos expostos são mais facilmente removidos por frugívoros voadores. Além dos morcegos também foram observados frutos de *S. mauritianum* sendo consumidos por Jacu (Cracidae: *Penelope superciliaris*) e um pequeno roedor (Muridae: Oryzomyini: *Oryzomys russatus*) (PAULINO-NETO *et al.*, 2013). Os frugívoros são imprescindíveis como agentes efetivos na dispersão das sementes, levando-as a longa distância, e possibilitando a sua regeneração e a colonização de outras áreas (FIGLIOLIA & KAGEYAMA, 1995).

A associação com os polinizadores é outro fator importante que ajuda a explicar o alto fluxo gênico observado. O fumo bravo, assim como a maioria das plantas depende dos agentes polinizadores para sua reprodução sexuada (ENDRESS, 1998), aquele possui um tipo especial de polinização, vibrátil (*buzz pollination*), estas abelhas abraçam as anteras e efetuam movimentos vibratórios para extrair o pólen (BUCHMANN, 1983), resultando em uma diversidade de interações interespecíficas que asseguram a manutenção dos ecossistemas em que se encontram. A polinização caracteriza-se por ser um dos processos chave no sucesso reprodutivo das espécies vegetais (SCHLINDWEIN, 2000). A polinização efetiva depende entre outros fatores, da adequação do formato do corpo ou determinados órgãos do visitante à morfologia, de como ele aborda a flor e de seu comportamento durante a visita (PROCTOR & YEO, 1972). Esse sistema de interação reduz a perda de pólen, direcionando-o ao ser expelido, através da vibração, para partes bem definidas do corpo do polinizador (BUCHMANN *et al.*, 1983).

Estas abelhas podem ser especialistas em determinadas flores ou famílias botânicas, coletando pólen com a máxima eficiência e operando como polinizadores especializados. Assim, a relação das abelhas com determinados grupos de plantas pode indicar não só a importância das plantas na dieta e manutenção das populações destes visitantes, mas também mostrar a importância dos visitantes no processo de polinização das plantas. Desta forma, o destino de muitas plantas nativas depende da preservação de suas relações mutualísticas com os polinizadores e vice versa (KEARNS & INOUE, 1997).

O *S. mauritanum* apresenta ainda rápido crescimento, tornando-se adulta em dois a três anos, geralmente, entram em senescência após 15 anos de idade (HALEY, 2006). O uso desta espécie para a recuperação de áreas degradadas é devido sua agressividade, produção de biomassa capacidade de ocupação de áreas abandonadas. Esta representa uma espécie chave, muito importante, pois prevalece na colonização florestal e produz abundante recurso forrageiro para pássaros, insetos e grande quantidade de serrapilheira, o que proporciona condição edáfica à colonização das espécies mais exigentes em fertilidade, umidade do solo e sombreamento (RUSCHEL; PEDRO; NODARI, 2008).

Todas essas características facilitam sua polinização e dispersão, conseqüentemente influenciam diretamente a variabilidade genética de populações naturais da espécie. Além disso, a agressividade, rusticidade e elasticidade na ocupação em áreas abertas são fatores que levam a espécie a apresentar ocorrência contínua em uma grande área (SAMWAYS *et al.*,

1996; OLCKERS & ZIMMERMANN, 1991; OLCKERS *et al.*, 2002) facilitando o fluxo gênico.

A análise de variação genética (AMOVA) indicou que a maior variação é encontrada dentro das populações (93,5%) do que entre elas (6,49%). Este resultado é esperado uma vez que o fluxo gênico foi alto entre as populações. A variação encontrada entre as duas populações foi baixa ($G_{ST} = 0,044$) evidenciando a não estruturação das populações. Estes resultados são comuns em populações onde ocorre alto fluxo gênico (SOLÉ-CAVA & CUNHA, 2012).

Em um trabalho com pitangueira (*Eugenia uniflora*), outra frutífera da FOM, Fagundes (2014) encontrou maior variação genética entre as populações. Esta diferença entre a variação genética nas duas espécies pode ser explicada pelos seguintes fatores: pitangueira apesar de ser frutífera e apreciada pelos pássaros, suas sementes são grandes, o que impossibilita que os pássaros as engulam, dificultando desta forma, sua dispersão; esta espécie não apresenta distribuição contínua como *S. mauritianum*, o que dificulta o fluxo gênico, sendo também a distância entre plantas com frutos um fator relevante (TSUJITA *et al.*, 2008); abelhas que a polinizam são generalistas (SILVA & PINHEIRO, 2007), isto é, visitam as flores de muitas espécies botânicas e as polinizam com menor eficiência do que as especialistas.

Espécies pertencentes ao grupo ecológico das pioneiras ou secundárias iniciais, são consideradas precursoras na invasão de campos, possuem crescimento rápido, como *Eremanthus erythropappus* (CARVALHO, 1994) e *Mimosa scabrella* (bracatinga) (MOREIRA *et al.*, 2011), elas apresentaram resultados divergentes ao nosso, como altos índices de fixação de alelos e a estruturação das populações. Em *Schinus terebinthifolius* (aroeira) (BARREIRA *et al.*, 2006), estudos identificaram a presença de alelos exclusivos nas populações analisadas, demonstrando diferenciação significativa entre elas.

Os resultados encontrados nessas populações, das espécies *E. erythropappus*, *M. scabrella* e *S. terebinthifolius*, são coerentes para espécies pioneiras, com baixo potencial de dispersão de pólen ou sementes e com grande probabilidade de cruzamentos aparentados (LOVELESS & HAMRICK, 1984), e também apresentam sistema reprodutivo misto, tolerantes a autopolinização (SOBIERAJSKI; KAGEYAMA; SEBBENN, 2006; BARREIRA *et al.*, 2006; HAMRICK.; GODT, 1982). Esses resultados indicam que há endogamia causada tanto pelo sistema reprodutivo, como também pela deriva genética, sendo estes reconhecidos na dinâmica de clareiras (ALVAREZ-BUYLLA *et al.* 1996) ou pelo efeito de mosaico

resultado de fragmentação (YOUNG & BOYLE, 1993) levando à estruturação genética dessas população com fixação de alelos e divergência genética entre as populações.

Essas espécies apresentam características reprodutivas que favorecem a ocorrência agregada e baixo potencial de dispersão das sementes, desta forma, não se espera um fluxo gênico intenso. Na bracatinga a floração é maciça, atrai muitos visitantes oportunistas com estratégias poliléticas (HARTER-MARQUES & ENGELS, 2003), estes autores especulam que os polinizadores, visitem poucas plantas por um longo período, o que restringiria a amplitude do fluxo de pólen. Isto explica porque esses resultados foram divergentes ao de *S. mauritianum*, pois mesmo essas espécies apresentando ampla distribuição como este, o sistema de reprodução e dispersão desfavorece que haja fluxo gênico entre as populações.

Os valores encontrados para o índice de Shannon (*I*) nesse estudo foram de 0,53 e 0,46, para as populações “A” e “B”, respectivamente e entre elas 0,52 (Tabela 4). Os valores encontrados com esse índice variam de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo de 1, maior a diversidade genética. Neste sentido, nossos resultados mostram que ambas as populações apresentam alta diversidade. No entanto, a população “A” é mais diversa geneticamente (Tabela 4). Esta maior diversidade na população “A” pode ser explicada pela sua proximidade a extensas regiões com áreas mais “conservadas” quando comparada com a população “B” (Figura 2). Estudos realizados com *S. lycocarpum* (lobeira) apresentaram valores próximos ao encontrado em nosso trabalho (MOURA; SIQUEIRA; OLIVEIRA, 2013). Estes autores encontraram valores de índice de Shannon de 0,48 para populações naturais que estavam em áreas conservadas e de 0,36 para populações que estavam em áreas antropizadas (MOURA; SIQUEIRA; OLIVEIRA, 2013). A variação genética é fundamental para a adaptação da espécie às alterações no ambiente (TORGGLER *et al.*, 1995), neste sentido podemos afirmar que mesmo sendo uma espécie de alta ocorrência em áreas antropizadas, populações de *S. mauritianum* sofre efeitos genéticos negativos quando presente nestas áreas.

Tabela 2. Diversidade Genética em *Solanum mauritianum* Scop. N: número de indivíduos; h: diversidade genética de Nei (1973); I: índice diversidade de Shannon (*I*).

População	N	h	I
A	30	0,36	0,53
B	30	0,31	0,46
Total	60	0,34	0,52

A distância geográfica entre plantas é um fator relevante para a ocorrência de fluxo gênico. As espécies arbóreas são as mais prejudicadas pela fragmentação, pois na maioria das vezes, estas só se desenvolvem até a fase reprodutiva em fragmentos com certo grau de conservação. A espécie *S. mauritianum* parece ter menor grau de sensibilidade à fragmentação quando comparado a espécies arbóreas. Esta característica da espécie é devido, provavelmente, por ser uma planta pioneira com capacidade de ocorrência em locais altamente antropizados, o que diminui a distância entre as plantas, facilitando o fluxo gênico e garantindo alta diversidade genética nas populações.

A alta diversidade genética observada em *S. mauritianum* nesse trabalho, pode ser explicada pela biologia reprodutiva da espécie, como a características da polinização e dispersão de sementes, sua ampla distribuição e a constante atividade reprodutiva facilitam o fluxo gênico dentro e entre as populações.

4.5 REFERÊNCIAS

- ADENIJI, O. T.; ALOYCE, A. Farmer's Knowledge of Horticultural Traits and Participatory Selection of African Eggplant Varieties (*Solanum aethiopicum*) in Tanzania. **Sommaire/Inhoud/Sumario**, v. 30, n. 3, p. 185-191. 2012.
- ALVAREZ-BUYLLA, E. R., *et al.* Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest tree species. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, n. 27. pp. 387-421.1996.
- ARRUDA, R.; RODRIGUES D. J.; IZZO, T. J. Rapid assessment of fruit-color selection by birds using artificial fruits at local scale in Central Amazonia. **Acta Amazonica**, v. 38, p. 291-296. 2008.
- BARREIRA, S. *et al.* Genetic diversity and mating system of *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish populations under forest logging. **Scientia Florestalis**, n. 71, p. 119-130 2006
- BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Pollen movement within a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. **Conservation Genetics**, v. 9, p. 855-868, 2009.
- BUCHMANN, S. L.; JONES, C. E.; COLIN, L. J. Vibratile pollination of *Solanum douglassii* and *S. xanti* (Solanaceae) in Southern California. **Wasmann Journal and Biology**, v. 35, p. 1-25.1983.
- BUCHMANN, S. L. Buzz pollination in angiosperms. In: Handbook of experimental pollination biology. (C. E. Jones & R. J. Little, eds.). **Van Nostrand Reinhold**, p. 73-113. 1983.
- BURNS, K. C.; DALEN, J. L. Foliage color contrasts and adaptive fruit color variation in a bird-dispersed plant community. **Oikos**, v. 96, n. 3, p. 463-469. 2002.
- CARDOSO, R. **Seleção de primers ISSR para estudos genéticos em macela (*Achyrocline satureioides* Lam. (D.C.) (Asteraceae)).** Monografia (Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná, 2014.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo: Embrapa Florestas, 1994. 640p.
- CORTESI, P. *et al.* Genetic similarity of flag shoot and ascospore subpopulations of *Erysiphe necator* in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7788-7791. 2005.

- CULLEN Jr., L. *et al.* Trampolins ecológicos e zonas de benefício múltiplo: ferramentas agroflorestais para a conservação de paisagens rurais fragmentadas na Floresta Atlântica Brasileira. **Journal for Nature Conservation**, v. 1. p.:93-102. 2003.
- DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Itaca**, v. 12, p. 13-18, 1990.
- ENDRESS, P. K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.
- FAGUNDES, B. S. **Estrutura genético-populacional de *Eugenia uniflora* L. (MYRTACEAE) em fragmentos florestais de mata atlântica**. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná, 2014.
- FAUSTINO, T. C.; MACHADO, C. G. Frugivoria por aves em uma área de campo rupestre na Chapada Diamantina, BA. **Revista Brasileira Ornitologia**, v. 14, p. 137-143. 2006.
- FERNÁNDEZ, M. E.; FIGUEIRAS, A. M.; BENITO, C. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 845-851. 2002.
- FIGLIOLIA, M. B.; KAGEYAMA, P. Y. Dispersão de sementes de *Inga uruguensis* Hook. Et Arn. em floresta ripária do rio Mogi Guaçu, município de Mogi Guaçu – SP. **Revista do Instituto Florestal**, v. 7, p. 65-80. 1995.
- GALETTI, M. *et al.* Mudanças no Código Florestal e seu impacto na ecologia e diversidade dos mamíferos no Brasil. **Biota Neotropica**, v.10, n.4, pp. 47-52. 2010.
- GE, X. J. *et al.* Genetic divergence and biogeographical patterns in *Amentotaxus argotaenia* species complex. **Plant Molecular Biology Reporter**, p. 1-17. 2014.
- GE, X. J.; SUN, M. Population genetic structure of *Ceriops tagal* (Rhizophoraceae) in Thailand and China. **Wetlands Ecology Management**, v. 9, p. 203-209. 2001.
- GRIS, D. *et al.* Native species indicated for degraded area recovery in Western Parana, Brazil, **Revista Árvore**, v. 36, n. 1, p. 113-125. 2012.
- HALEY, N. **Weed control methods: *Solanum mauritianum***. 2006. Department of Conservation, Environment BOP (Bay of Plenty Regional Council). <http://www.boprc.govt.nz/land/media/pdf/Fact_Sheet_PP01.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2015.

- HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. 1982. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A. D. H. *et al.*, Plant population genetics. **Breeding and Genetic Resources**, Sunderland, pp. 43-63. 1990.
- HARTER-MARQUES, B., ENGELS, W. A produção de sementes de *Mimosa scabrella* (Mimosaceae) no planalto das araucárias, RS, Brasil, depende da polinização por abelhas sem ferrão. **Biociências**, v. 11. pp. 9-16. 2003.
- HUANG, W. *et al.* Relationship between the genetic diversity of *Artemisia halodendron* and climatic factors. **Acta Oecologica**, v. 55, p. 97-103. 2014.
- KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. Pollinators, flowering plants, and conservation Biology. **BioScience**, v. 47, n. 5, p. 297-306. 1997.
- LACERDA, D. R. *et al.* Genetic Diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 1143-1152. 2001.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, n.15: pp. 65-95. 1984.
- LUAN, S.; CHIANG, T. Y.; GONG, X. High genetic diversity vs low genetic differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, revealed by ISSR fingerprinting. **Annals of Botany**, v. 98, p. 583-589. 2006.
- LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v. 3, p. 91-99. 1994.
- MARANGONI, N. F. **Seleção de primers ISSR para estudos genéticos em *Baccharis trimera* (Less) DC; Asteraceae**. Monografia (Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná, 2013.
- MOREIRA, P. A. *et al.* Genetic diversity and mating system of bracatinga (*Mimosa scabrella*) in a re-emergent agroforestry system in southern Brazil. *Agroforestry systems*, v. 83, n. 2, p. 245-256, 2011. MOURA, T. M.; SIQUEIRA, M. V. B. M.; OLIVEIRA, G. C. X. Inbreeding effects in *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil populations, an endangered species of the Brazilian Cerrado. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 6006. 2013.
- OLCKERS, T.; MEDAL, J. C.; GANDOLFO, D. E. Insect herbivores associated with species of *Solanum* (Solanaceae). In: Northeastern Argentina and Southeastern Paraguay, with reference to biological control of weeds in South Africa and the United States of America. **Florida Entomologist**, v. 85, p. 254-260. 2002.

- OLCKERS, T.; ZIMMERMANN, H. G. Biological control of silverleaf nightshade, *Solanum elaeagnifolium*, and bugweed, *Solanum mauritianum* (Solanaceae) in South Africa. **Agricultural Ecosystems and Environment**, v. 37, p. 137-155. 1991.
- PAULINO-NETO, H. F. *et al.* Frugivory by *Sturnira lilium* bats (Phyllostomidae) on *Solanum mauritianum* (Solanaceae) in Southeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 48, n. 3, p. 183-189. 2013.
- PROCTOR, M.; YEO, P. **The pollination of flowers**. Taplinger Publ. Company, New York. 1972, 418 p.
- RAMBUDA, T. D.; JOHNSON, S. D. Breeding systems of invasive alien plants in South Africa: does Baker's rule apply? **Diversity and Distributions**, v. 10, p. 409-416. 2004.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; REDDY, E. A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17. 2002.
- RICKLEFS, R. E. **A economia da Natureza**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 572 p.
- RUSCHEL, A. R.; PEDRO, J.; NODARI, R. O. Diversidade genética em populações antropizadas do fumo brabo (*Solanum mauritianum*) em Santa Catarina, Brasil. **Scientia Forestalis**, v. 36, n. 77, p. 63-72, 2008.
- SAMWAYS, M. J.; CALDWELL, P. M.; OSBORN, R. Ground-living invertebrate assemblages in native, planted and invasive vegetation in South Africa Agriculture. **Ecosystems and Environment**, v. 59, p. 19-32. 1996.
- SHARMA, K.; AJAY, K. M.; RAJ, S. M. A simple and efficient method for extraction of genomic DNA from tropical tuber crops. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1018-1022. 2008.
- SHILPHA, J. *et al.* Assessment of genetic diversity in *Solanum trilobatum* L., an important medicinal plant from South India using RAPD and ISSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, n. 3, p. 807-818. 2013.
- SCHLINDWEIN, C. A importância de abelhas especializadas na polinização de plantas nativas e conservação do meio ambiente. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 4, 2000, Ribeirão Preto (SP). **Anais...** Ribeirão Preto: USP, 2000. p. 131-141.
- SILVA, L. F. **Diversidade genética em populações de *Campomanesia xanthocarpa* Berg. oriundas de fragmentos da Mata Atlântica**. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná, 2012.

- SILVA, A. L. G.; PINHEIRO, M. C. B. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 235-247. 2007.
- SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, p. 787-792. 1987.
- SOBIERAJSKI, G. R. ; KAGEYAMA, P.Y. ; SEBBENN, A. M. Estimates of genetic parameters in *Mimosa scabrella* populations by random and mixed reproduction models. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, n. 6. pp. 47-54. 2006.
- SOLÉ-CAVA, A. M.; CUNHA, H. A. A Genética e a Conservação da Natureza. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. 2. Ed, Holos editora, Ribeirão Preto, 2012. 217-238 p.
- SYMON, D. E. Sex forms in *Solanum* (Solanaceae) and the role of pollen collecting insects. p. 385- 398. In: HAWKES, J. G; LESTER, R. N.; SKELDING, A. D. (Eds.). **The Biology and Taxonomy of the Solanaceae**. Academic Press, London. 1979.
- THUL, S. T. *et al.* Molecular profiling for genetic variability in *Capsicum* species based on ISSR and RAPD markers. **Molecular Biotechnology**, v. 51, n. 2, p. 137-147. 2013.
- TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. Isoenzimas – Variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**. 1995. 186 p.
- TSUJITA, K.; SAKAI, S.; KIKUZAWA, K. Does individual variation in fruit profitability override color differences in avian choice of red or white *Ilex serrata* fruits? **Ecology Research**, v. 23, p. 445-450. 2008.
- WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1899-1909. 1999.
- WILDY, E. **Alien invader plants within South Africa**. Natal: Wildlife and Environment Society of South Africa (WESSA), Kwa Zulu Natal Region, 2006. Disponível em: <<http://www.geocities.com/wessaaliens/index.htm>>. Acesso em: 20 out. 2014.
- YOUNG, A. G.; BOYLE, T. T. Forest fragmentation. 1993. In: YOUNG, A. G.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. J. (Ed.) **Forest Conservation Genetics**, Oxford, CABI, 2000. p.123-133.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os marcadores moleculares SSR são amplamente utilizados em estudos genéticos populacionais, porém os baseados em regiões codificadoras não se mostraram apropriados, pois apresentaram baixo polimorfismo e a presença de alelos nulos. Estes resultados são provavelmente, devido o melhoramento genético direcionar para características desejáveis de interesse econômico e também pelo fato de que estas espécies se encontram em subgêneros diferentes.

Pelo fato dos marcadores EST-SSR avaliados não serem úteis, a diversidade genética de *S. mauritianum* foi estimada pelo marcador molecular ISSR. Com o uso deste marcador foi possível evidenciar que as duas populações analisadas não estão estruturadas, possuem um alto polimorfismo e que a variação genética dentro delas é maior do que entre elas. Esses índices comprovam que há fluxo gênico entre as populações estudadas. O fluxo gênico promove a dispersão de genes promovendo novas combinações. Isso no futuro poderá evitar deriva gênica, efeito Wahlund e endogamia.

Apesar de alto fluxo gênico, foi evidenciado menor diversidade na população “B”, o que sugere uma provável perda de variabilidade comparando-a com a população “A”. Com base nos dados obtidos do índice de Shannon é possível afirmar que a espécie em estudo apresenta maior variabilidade genética quando está próximo de áreas mais conservadas em relação àquelas que estão próximas às áreas antropizadas.

Não foram evidenciados estudos com a utilização dos marcadores ISSR para a espécie *S. mauritianum*, este marcador se mostrou uma excelente ferramenta para identificar a diversidade genética de *S. mauritianum* intra e interpopulacional, pois este é informativo e polimórfico.

A sensibilidade de *S. mauritianum* à fragmentação florestal parece ter um menor grau em relação a outras espécies arbóreas da Mata Atlântica, isto se deve provavelmente por ser pioneira e sua colonização em habitats antropizados e ainda por suas características ecológicas associadas, como endemismo, polinização, dispersão zoocórica por aves e morcegos que são considerados excelentes dispersores e sua arquitetura favorece a dispersão e também a associação com diversos insetos.

Estudos que mostram como as espécies nativas estão estruturadas geneticamente nos permite obter o máximo de informações para conhecer as populações nativas, aumentando dessa forma, as chances de sucesso de programas de conservação.