

FERNANDA LOUBACK DE CASTRO MARTINS

**ANÁLISE MOLECULAR DE ESPÉCIES PERENES E ANUAIS DO
GÊNERO *Dicerandra* (LAMIACEAE) BASEADA EM
MARCADORES ISSR**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M386a
2007

Martins, Fernanda Louback de Castro, 1979-
Análise molecular de espécies perenes e anuais do gênero
Dicerandra (Lamiaceae) baseada em marcadores ISSR
/ Fernanda Louback de Castro Martins. - Viçosa, MG,
2007.

xi, 60f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Luiz Orlando de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 52-60.

1. Genética molecular. 2. *Dicerandra* - Genética.
3. *Dicerandra* - Populações. 4. Marcadores genéticos.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.8

FERNANDA LOUBACK DE CASTRO MARTINS

**ANÁLISE MOLECULAR DE ESPÉCIES PERENES E ANUAIS DO
GÊNERO *Dicerandra* (LAMIACEAE) BASEADA EM
MARCADORES ISSR**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2007.

Prof. Luciano Gomes Fietto
(co-orientador)

Prof. Jorge A. Dergam dos Santos
(co-orientador)

Prof^a. Andréa de Oliveira B. Ribon

Prof. Wagner Campos Otoni

Prof. Luiz Orlando de Oliveira
(orientador)

Ao Supremo Deus.

Aos meus queridos pais: Heleno Lúcio e Lucinéa.

Aos meus amigos irmãos: Fabrício e Jefferson.

Ao meu grande esposo: Daniel.

Dedico & Ofereço esta tese

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me concedeu forças para enfrentar as dificuldades e pela conclusão de mais uma etapa.

Aos meus pais Heleno Lúcio e Lucinéa e aos irmãos Fabrício e Jefferson, pelo suporte, pelas orações e constante incentivo.

Ao meu esposo Daniel, pelo companheirismo, compreensão, paciência e pelos aconselhamentos e palavras de incentivo para superar as dificuldades durante o desenvolvimento deste trabalho.

À todos os familiares e amigos que torceram pela minha vitória mesmo distantes.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola vinculado ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade oferecida para a realização deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor e orientador Luiz Orlando de Oliveira pela oportunidade, orientação, compreensão e pelos ensinamentos.

A todos os amigos e colegas do curso e a todos os professores da UFV, que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Aos pesquisadores do Departamento de Botânica e do Museu de História Natural da Universidade da Flórida, pela disponibilidade do material genético para a realização deste trabalho.

A todos os amigos da ABU-Pós, pela amizade e pelos momentos agradáveis de estudo e de descontração.

À amiga Karla, pela amizade e pelos momentos de desabafo.

Às amigas da turma de graduação, em especial à Joana e Silvana, pela amizade e convivência.

Aos colegas do Laboratório de Seqüenciamento de DNA: Ana, Márcia, Giselle, Maíra, Celice, Roberta, Magali, Bruna, Talles, Mariana, Beatriz,

Poliana, Priscilla, Cassiana, Larissa, Lilian, pela convivência e pela troca de experiências.

À Ana Rossi, Giselle Anselmo e Márcia Rodrigues pela amizade, colaboração, incentivo e por estarem sempre dispostas a ajudar em todos os momentos.

Ao secretário Eduardo Monteiro, do Programa de Pós-Graduação de Bioquímica Agrícola, pela organização, competência e pela amizade.

BIOGRAFIA

Fernanda Louback de Castro Martins, filha de Heleno Lúcio de Castro e Lucinéa Louback de Castro, nasceu em Linhares, Espírito Santo, em 22 de janeiro de 1979.

Em abril de 2001, iniciou o curso de graduação em Bioquímica, na Universidade Federal de Viçosa, onde em janeiro de 2005 graduou-se como Bacharel em Bioquímica.

Em agosto de 2005 iniciou curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese no dia 31 de julho de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. O gênero <i>Dicerandra</i>	4
3.2. Diversidade Genética	9
3.3. Marcadores Moleculares	10
3.3.1. Marcadores ISSR	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Espécies e populações em estudo	14
4.2. Extração e quantificação de DNA	16
4.3. Seleção de <i>primers</i> e amplificações via PCR dos ISSRs.....	18
4.4. Análise de Dados	19
4.4.1. Análise de diversidade genética dentro dos táxons	20
4.4.2. Análise de diversidade genética entre os táxons	20
4.4.3. Análise de similaridade genética e análises de agrupamento.....	21
4.4.4. Análise para detecção de espécie híbrida e detecção de putativos parentais.....	22

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1. Caracterização molecular por marcadores ISSR.....	23
5.2. Diversidade genética dentro dos táxons.....	24
5.2.1. Grupo de maior variabilidade genética	24
5.2.2. Relação entre a diversidade genética e a distribuição dos táxons.....	26
5.3. Fracionamento da diversidade genética entre e dentro dos táxons	26
5.4. Formação de grupos de acordo com o ciclo de vida.....	29
5.5. Padrão de distribuição de bandas ISSRs dentro de cada grupo e de cada táxon.....	36
5.6. Identificação de espécie híbrida e de putativos parentais	39
5.7. Hipóteses sobre a evolução do gênero <i>Dicerandra</i> e a origem de <i>D. cornutissima</i>	41
5.8. Implicações para a conservação.....	50
6. CONCLUSÕES.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

RESUMO

MARTINS, Fernanda Louback de Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007. **Análise molecular de espécies perenes e anuais do gênero *Dicerandra* (Lamiaceae) baseada em marcadores ISSR.** Orientador: Luiz Orlando de Oliveira. Co-orientadores: Jorge Abdala Dergam dos Santos e Luciano Gomes Fietto.

Dicerandra é um gênero constituído por cinco espécies perenes e quatro anuais, todas endêmicas do sudeste dos Estados Unidos, as quais estão restritas a ambientes arbustivos e de restinga. Além da limitada distribuição da maioria das espécies, seus *habitats* têm sofrido extensivas modificações antrópicas, fazendo com que cinco espécies do gênero sejam consideradas ameaçadas ou em risco de extinção. As perturbações sofridas pelos *habitats* de *Dicerandra*, foram provavelmente preponderantes na complexa relação entre os táxons deste gênero, os quais apresentam diferenças quanto às classificações baseadas em características morfológicas, ecológicas e genéticas, sendo que algumas espécies, embora de ciclo perene, apresentem maior similaridade com as espécies anuais em termos de genoma cloroplastídico. O presente estudo objetivou avaliar a variabilidade genética distribuída entre e dentro dos táxons perenes e anuais constituintes do gênero *Dicerandra*, além de buscar entender melhor a relação dentro deste gênero, bem como a sua história evolutiva, utilizando marcadores ISSR. Com este intento, foram analisados seis táxons, quatro perenes (*D. cornutissima*, *D. thinicola*, *D. frutescens modesta* e *D. frutescens frutescens*) e dois anuais (*D. densiflora* e *D. linearifolia linearifolia*), constituindo um total de 92 indivíduos distribuídos em 14 populações do sudeste dos Estados Unidos. Assim, sete *primers* de ISSR foram selecionados e utilizados neste estudo gerando um total de 103 bandas, com 100% de polimorfismo em nível de conjunto total. O grupo dos táxons de ciclo de vida anual apresentou maior variabilidade genética e maior diferenciação entre os táxons constituintes, em comparação com o grupo dos táxons perenes, excluindo-se *Dicerandra cornutissima* (COR). A inclusão de COR aumentou a diversidade genética das perenes. O grupo

dos táxons das perenes, com a exclusão de COR, teve mais de 60% da variância molecular total atribuída à variabilidade entre indivíduos dentro dos táxons, enquanto que, considerando os táxons de ciclo anual, a variância total foi igualmente dividida entre táxons e entre os indivíduos dentro dos táxons. As análises dos dendrogramas e das coordenadas principais permitiram identificar a formação de quatro grupos principais, sendo que apenas o grupo formado pelos táxons *D. frutescens frutescens*, *D. thinicola* e *D. frutescens modesta*, apresentou-se heterogêneo, sugerindo serem muitos próximos geneticamente. Os resultados revelaram também que COR apresenta genoma nuclear originado de ancestrais anuais, porém apresentando maior proximidade genética do genoma nuclear com os táxons de ciclo perene. Além disso, COR apresentou bandas exclusivas nas análises de bandas, excluindo a hipótese, na qual COR faria parte de uma zona híbrida originada de um cruzamento recente entre parentais anuais e perenes.

ABSTRACT

MARTINS, Fernanda Louback de Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2007. **Molecular analysis of *Dicerandra* (Lamiaceae) perennials and annuals species supported with ISSR marks.** Adviser: Luiz Orlando de Oliveira. Co-advisers: Jorge Abdala Dergam dos Santos and Luciano Gomes Fietto.

Dicerandra is a genus formed by five perennials and four annuals species. All species are endemics of the southeastern United States and restricted to sandhill vegetation and a mosaic of scrub habitats. The majority of these species presents restricted geographic distribution and their habitats have suffered extent antropic modifications. Because of these, five species from *Dicerandra* are endangered or threatened. The perturbations suffered by *Dicerandra* habitats were presumably preponderant in the complex relation between their taxa. This complexity is verified by the demonstrated differences among morphologic, ecologic and genetic classifications. Although some species present perennial life cycle, they show more similarity with annuals species when compared by chloroplastic genome. This study aimed to evaluate the genetic variability distributed within and among the annuals and perennials species constituents of the *Dicerandra* genus, and to improve the understanding of the relation inside this genus as well as its evolutionary history, using ISSR markers. For this proposal were analyzed six taxa, four perennials (*D. cornutissima*, *D. thinicola*, *D. frutescens modesta* e *D. frutescens frutescens*) and two annuals (*D. densiflora* e *D. linearifolia linearifolia*), comprising 92 individuals distributed in 14 populations of the southeastern United States. Seven ISSR primers were selected for this study. Using these primers was possible to generate 103 bands with 100% of polymorphism at total ensemble level. The annuals taxa group demonstrated more genetic variability and differentiation among their taxa than perennials group, excluding *Dicerandra cornutissima* (COR). The COR inclusion raised the genetic diversity of the perennials group. This group, without COR, had over 60% of the total molecular variance attributed to the variability inter individuals within taxa, whereas the total variance in the annuals taxa group

was equally divided among the taxa and among the individuals within taxa. Phenogram and principal coordinates analyzes permitted the identification of four major groups. Only the group comprised by *D. frutescens frutescens*, *D. thinicola* e *D. frutescens modesta* taxa demonstrated heterogeneity suggesting more genetic proximity among them. The results still revealed that the nuclear genome of COR was originated from annuals ancestors, however it has more genetic proximity with the perennials taxa. Furthermore, the exclusive bands presented by COR in the band analyzes excluded the hypothesis in which COR made part of one hybrid zone originated from a recent crossing among annuals and perennials parental.

1. INTRODUÇÃO

Grande parte dos recursos genéticos vegetais tem sido perdida devido à destruição dos *habitats* naturais, aumento populacional, industrialização, destruição dos centros de diversidade, tendo como consequência a redução da biodiversidade.

Nos Estados Unidos, a maioria das espécies do gênero *Dicerandra*, vegetal endêmico do sudeste do país, o qual compreende nove espécies restritas a ambientes arbustivos e de restingas, corre risco de extinção em função de sua limitada distribuição e *habitats* alterados ou destruídos, levando à diminuição das populações.

As espécies do gênero *Dicerandra* embora não tenham importância econômica e nem uso comercial conhecido, têm grande valor ecológico, sobretudo nos *habitat* nos quais se distribuem. A maioria delas é considerada espécies endêmicas, estando restritas a regiões consideradas de refúgio e caracterizadas pela alta diversidade e grande endemismo. Algumas são ricas em óleos aromáticos e até um novo composto natural já foi identificado em uma das espécies do gênero (Eisner, 1990). Assim, a biodiversidade que essas plantas representam pode ser perdida em caso de extinção.

A conservação do gênero *Dicerandra*, sobretudo daquelas espécies em risco de extinção, requer maior conhecimento da diversidade genética dos diferentes táxons constituintes do gênero, buscando também elucidar a história evolutiva dos mesmos. Como a maioria das espécies habita áreas de expansão da atividade humana, a tomada de decisões conservacionistas deve ser precisa e concreta, de modo a preservar ao máximo as fontes de biodiversidade dessas plantas, com base na riqueza genética que os táxons apresentam.

Dada às peculiaridades do gênero e com o intuito de melhor entender o complexo *Dicerandra*, diversos estudos (Kral, 1982; Huck, 1987; Huck *et al.*, 1989) buscaram classificar o gênero não somente em termos botânicos, ecológicos e morfológicos, mas também quanto às interações entre táxons e das relações genéticas e filogenéticas.

Uma característica marcante desse gênero em termos de relacionamento entre espécies é a divisão quanto ao ciclo de vida, entre as perenes e as anuais (Huck *et al.*, 1989), que, contudo, mostrou-se bastante complexa em recente estudo de biogeografia e filogenia molecular (Oliveira *et al.*, 2007). Estes autores realizaram ampla caracterização molecular, utilizando para as análises dados cloroplastídicos (região trnT-trnL e matK) e nuclear (região de ITS) encontrando incongruências quanto a correspondência entre a filogenia e a forma de vida (perene ou anual) em dois táxons: *D. cornutissima* (COR) e *D. immaculata* var. *savannarum* (SAV). Esses dois táxons, caracterizados reprodutivamente como de ciclo perene, foram agrupados em clados de anuais.

Para verificar e elucidar a contradição entre características morfológicas e moleculares, inferir sobre a história evolutiva do gênero e gerar subsídios para a implantação de práticas conservacionistas e de manejo sustentáveis, são necessários estudos de diversidade genética entre e dentro de populações de *Dicerandra*. Os avanços na área de biologia molecular têm fornecido uma ferramenta importante para este tipo de estudo, os marcadores moleculares de origem nuclear, os quais podem revelar polimorfismos em nível de genoma completo.

2. OBJETIVOS

- Identificar qual dos dois grupos (perenes ou anuais) apresenta maior variabilidade genética.
- Verificar se a diversidade genética está associada à distribuição populacional dos táxons.
- Avaliar como a diversidade genética está fracionada dentro e entre os táxons de *Dicerandra* de ciclo perene. E dentro e entre táxons de *Dicerandra* de ciclo anual.
- Investigar qual a contribuição dos genomas de espécies perenes e anuais para a formação do genoma de *Dicerandra cornutissima*.
- Propor, com base nos resultados obtidos, práticas que possam ser aplicadas na elaboração de estratégias de conservação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O gênero *Dicerandra*

Dicerandra é um gênero membro da subfamília Nepetoideae, pertencente à família Lamiaceae, o qual compreende mentas endêmicas do sudeste dos Estados Unidos, distribuídas pela Flórida, Geórgia e regiões fronteiriças do Alabama e Carolina do Sul (Oliveira *et al.*, 2007; Wagstaff *et al.*, 1995). A Lamiaceae, uma das maiores e mais distintivas família de angiospermas, tem uma distribuição cosmopolita, abrangendo aproximadamente 250 gêneros, os quais incluem 7.000 espécies (Cantino, 1992; Thorne, 1992). Nepetoideae é a maior subfamília monofilética da família Lamiaceae e a mais importante economicamente por incluir muitas ervas culinárias tais como hortelã, orégano, condimentos apimentados e tomilho (Wagstaff *et al.*, 1995).

O gênero *Dicerandra* compreende plantas que são classificadas quanto ao ciclo de vida em espécies anuais e perenes. As plantas deste gênero caracterizam-se morfológicamente por apresentarem apêndice em forma de espora na antera, que serve como um mecanismo de gatilho na dispersão de pólen e apresentam como principais polinizadores, insetos voadores, tais como os da família *Bombyliidae*, *Apidae*, *Halictidae* e *Sphingidae* (Huck, 1987, 1992).

A literatura é divergente quanto ao tipo de reprodução sexuada que as plantas do gênero *Dicerandra* apresentam. Em um amplo estudo sobre sistemática e evolução do gênero, Huck (1987) afirmou que todas as espécies do gênero são auto-incompatíveis obrigatórias. Estes resultados foram questionados por Evans *et al.* (2004) que estudaram a biologia reprodutiva de *D. frutescens* e de *D. christmanii* e concluíram que são espécies auto-compatíveis, embora *D. frutescens* apresente certo nível de repressão à endogamia. Mesmo que essas plantas sejam auto-compatíveis, é bem provável que no ambiente predomine a alogamia, como encontrada em outras plantas da família Lamiaceae, sendo polinizadas por insetos (Huck, 1992) e pelo fato do exocruzamento em flores de *D. frutescens* subsp *frutescens* ser promovido pela troca de posição do estilete e do estigma

durante o dia, dificultando a autopolinização (Deyrup e Menges, 1997).

O gênero, representado por apenas nove espécies, inclui cinco perenes e quatro anuais, com algumas espécies divididas em duas subespécies, constituindo um total de treze táxons, todos os quais restritos a ambientes arbustivos e de restinga (Oliveira *et al.*, 2007; Huck e Chambers, 1997; Huck *et al.*, 1989). O mapa de distribuição dos táxons está demonstrado na Figura 1. As espécies anuais, *D. odoratissima*, *D. radfordiana*, *D. linearifolia* e *D. densiflora* (Figura 2- A, B, C e D) são encontradas em cumes secos de áreas arenosas, geralmente junto a cursos d'água, na Geórgia, norte da Flórida e porções fronteiriças do Alabama e da Carolina do Sul (Huck e Chambers, 1997; Huck *et al.*, 1987). *D. odoratissima* é localizada do sul da Carolina do Sul ao sudeste da Geórgia, enquanto *D. radfordiana* ocorre somente nas proximidades do rio Altamaha na Geórgia (Oliveira *et al.*, 2007, Sorrie e Weakley, 2001). *D. linearifolia*, considerada a espécie mais difundida do gênero, é dividida nas variedades *D. linearifolia* var. *linearifolia*, a qual ocorre no norte da Flórida, Geórgia e sudeste do Alabama, e *D. linearifolia* var. *robustior*, que é restrita ao norte da Flórida e região adjacente da Geórgia, apresentando distribuições parcialmente sobrepostas (Oliveira *et al.*, 2007). *D. densiflora* é a espécie anual mais próxima às espécies perenes ao sul, sendo encontrada somente na região central da Flórida (Huck e Chambers, 1997).

As espécies *D. cornutissima*, *D. frutescens*, *D. thinicola*, *D. christmanii* e *D. immaculata*, constituintes do grupo das perenes (Figura 2- E, F, G e H) apresentam distribuição bastante restrita e limitada a duas regiões. Uma região é conhecida como *Lake Wales Ridges* (LWR), formada por dunas isoladas, as quais constituem áreas de refúgio na Flórida central e a outra região, de grande endemismo, é conhecida como Divisa da Costa Atlântica (DCA) da Flórida, (Huck e Chambers, 1997; White, 1970). Das cinco espécies, *D. cornutissima*, *D. frutescens* e *D. christmanii* são restritamente endêmicas, confinadas na região da LWR na Flórida peninsular, sendo que *D. frutescens* e *D. christmanii* são restritas ao sul e *D. cornutissima* ao norte do LWR (Huck *et al.*, 1989). As outras espécies perenes, *D. thinicola* e *D. immaculata*, são encontradas em restingas na DCA, com a primeira ocupando a parte sul e a segunda a parte norte da DCA (Huck e Chambers,

1997; Huck *et al.*, 1987). A espécie *D. frutescens* é dividida nas subespécies *D. frutescens frutescens* e *D. frutescens modesta*; e a espécie *D. immaculata* é separada em duas variedades, *D. immaculata var. immaculata* e *D. immaculata var. savannarum* (Huck, 2001).

Segundo as características morfológicas, o gênero foi dividido em duas seções: *Lecontea* e *Dicerandra*. A seção *Lecontea* tem corola tubular, com lóbulo em forma de capuz, os estames inseridos e um odor de canela nas folhas. Esta seção inclui as espécies *D. odoratissima* e *D. radfordiana* (Huck e Chambers, 1997; Huck *et al.*, 1989; Huck *et al.*, 1987). A seção *Dicerandra* engloba as demais espécies do gênero, tendo como características: corola infundibular, com lóbulos padrões, estames expostos e um odor de menta nas folhas esmagadas (Huck e Chambers, 1997; Huck *et al.*, 1989; Huck *et al.*, 1987).

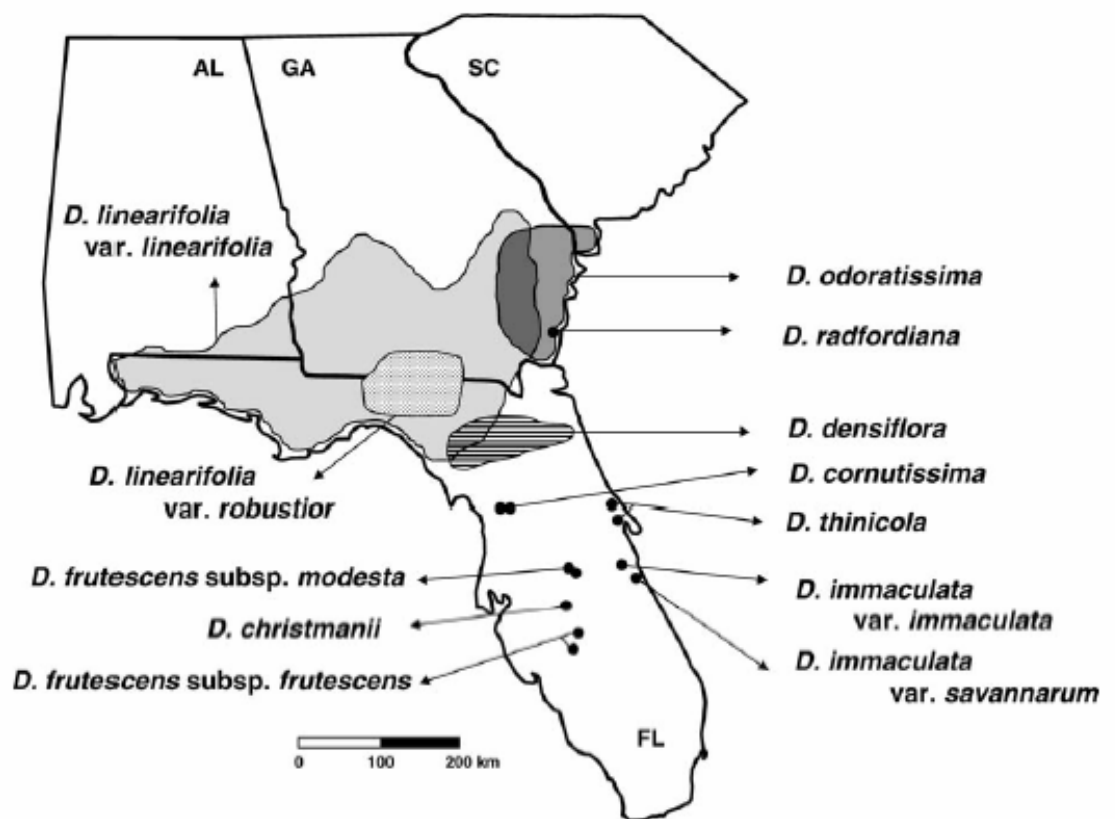


Figura 1: Mapa de distribuição da maioria dos táxons constituintes do gênero *Dicerandra* (Fonte: Oliveira *et al.*, 2007).

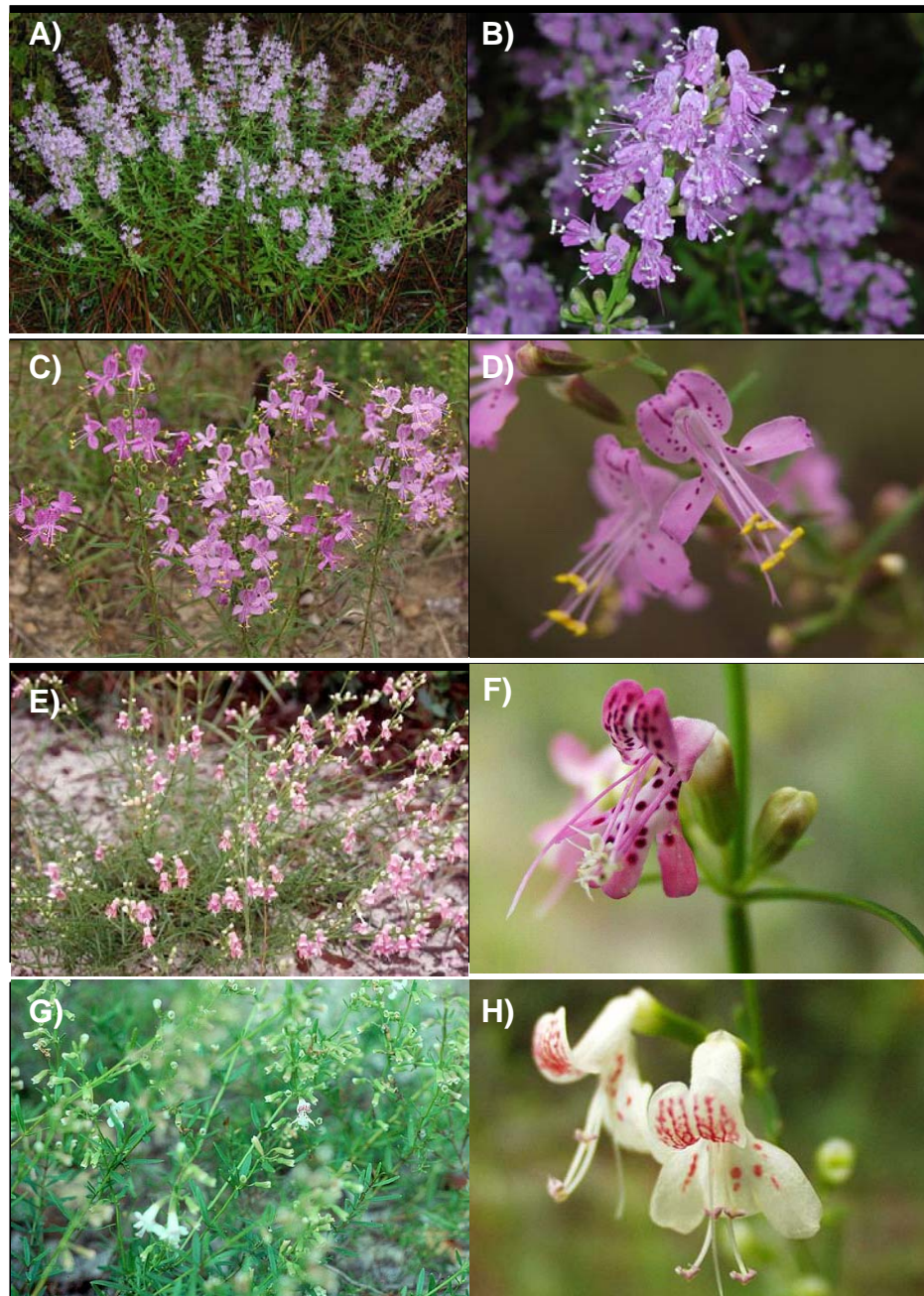


Figura 2: Fotos de alguns táxons: Anuais - A) e B) *Dicerandra densiflora*; C) e D) *Dicerandra linearifolia* var. *linearifolia*. Perenes - E) e F) *Dicerandra cornutissima*; G) e H) *Dicerandra frutescens* subsp. *frutescens* (Fonte: Atlas de Plantas Vasculares da Flórida).

Cinco das nove espécies de *Dicerandra*, ou sete dos treze táxons são listadas por órgãos federais e estaduais de pesquisa como ameaçadas ou em risco de extinção (Oliveira *et al.*, 2007; Huck e Chambers, 1997). Vários fatores têm levado a diminuição das populações de *Dicerandra*, gerando um eminente risco de extinção, tais como: fragmentação, degradação e destruição de *habitats*. Estes são fatores antrópicos resultantes principalmente dos processos de urbanização, expansão da agricultura, supressão de incêndios, aumento dos níveis de contaminantes no solo e na água, entre outros (USFWS, 1999, Huck *et al.*, 1989).

A distribuição restrita da maioria das espécies de *Dicerandra* e o eminente risco de extinção podem estar associados a fatores ligados às características reprodutivas intrínsecas destas plantas, tais como limitações no processo de polinização em áreas onde há supressão dos incêndios e restrição ao cruzamento entre espécies. Estes fatores apresentam um grande potencial de limitar a produção de sementes nestas espécies raras de plantas, extremamente dependentes da reprodução sexuada (Evans *et al.*, 2004).

A conservação das espécies de *Dicerandra* tem valor ecológico, principalmente em termos de biodiversidade e em termos de manutenção do equilíbrio e do ecossistema da região, onde essas plantas interagem com outras espécies e animais nativos e endêmicos. Além disso, algumas plantas desse gênero são utilizadas como ervas culinárias, enquanto outras têm se caracterizado pela produção de óleos essenciais compostos por misturas de terpenóides (como trans-pulegol, isomentono, α -terpineol, entre outros) os quais apresentam odores característicos, com potencial químico e atuando na defesa da planta (Wagstaff *et al.*, 1995; McCormick *et al.*, 1993).

A poliploidia do gênero *Dicerandra*, com táxons hexaplóides ($n=24$) e tetraplóides ($n=16$) distribuídos independentemente nos grupos perenes e anuais, e aleatoriamente ao padrão filogeográfico, implica em uma complicada história evolutiva do gênero (Huck e Chambers, 1997). No grupo dos táxons de ciclo perene, somente *D. frutescens frutescens* e *D. immaculata immaculata* são hexaplóides, enquanto que a maioria, *D. cornutissima*, *D. thinicola*, *D. christmanii* e *D. frutescens modesta*, são tetraplóides. Os táxons de ciclo anual, em sua maioria são também

tetraplóides, incluindo *D. odoratissima*, *D. radfordiana* e *D. linearifolia* var. *robustior*, enquanto *D. linearifolia* var. *linearifolia* e *D. densiflora* são hexaplóides (Huck e Chambers, 1997). Dentre todos, *D. immaculata* var. *savannarum* é o táxon cuja ploidia é desconhecida (Huck, 2001).

Além da complexidade quanto à origem da ploidia observada neste gênero, foram encontradas em dois táxons, *D. cornutissima* e *D. immaculata* var. *savannarum*, incongruências entre a análise filogenética e a classificação delas em relação ao ciclo de vida (perene ou anual). *D. cornutissima* representa o táxon mais ao norte entre as espécies perenes, sendo localizada geograficamente entre as espécies anuais ao norte e as demais espécies perenes ao sul, enquanto que, *D. immaculata* var. *savannarum* é um táxon endêmico localizado na DCA.

Oliveira *et al.* (2007) trabalhando com populações de todos os treze táxons de *Dicerandra* espalhadas pela Flórida e regiões adjacentes, estudaram a biogeografia e a filogenia molecular do gênero. As análises filogenéticas moleculares baseadas em dados cloroplastídicos (região trnT-trnL e matK) e nuclear (região de ITS), identificaram dois clados fortemente suportados, com altos valores de *bootstrap*, correspondentes às espécies anuais e perenes. Nessas análises, quase todos os táxons apresentaram associação com seus correspondentes ciclos (anual ou perene), porém, as árvores filogenéticas baseadas em seqüências de ITS e cloroplastídicas foram divergentes quanto à classificação dos dois táxons, *D. cornutissima* e *D. immaculata* var. *savannarum*. Estas duas espécies foram agrupadas no clado das plantas anuais na análise com marcadores cloroplastídicos e no clado das plantas perenes na análise com marcadores nucleares. Contudo, esses dois táxons são reprodutivamente de ciclo perene.

3.2. Diversidade Genética

Diversidade genética refere-se à diferença entre as freqüências gênicas de dois grupos de indivíduos, tais como populações ou espécies (Ridley, 2006). O estudo da diversidade genética em populações naturais consiste em estimar como a variabilidade genética está estruturada entre e dentro de populações de uma espécie. Dessa forma, o conhecimento e a

manutenção da variabilidade genética, em especial, de espécies raras e ameaçadas de extinção, são fundamentais para o desenvolvimento de eficazes estratégias de conservação (Ramp *et al.*, 2006).

Segundo Loveless e Hamrick (1984), a estrutura genética das populações não é obtida de forma aleatória, e sim resultante da ação de vários fatores, tais como mutação, migração, seleção natural e deriva genética, os quais operam no contexto histórico e biológico de cada espécie de planta. Além disso, a variação genética é afetada por fenômenos ecológicos, como por exemplo, pelo sistema reprodutivo e pelo fluxo gênico, através da dispersão de sementes e pólenes (Loveless *et al.*, 1998).

3.3. Marcadores Moleculares

Os marcadores moleculares constituem regiões do genoma possíveis de serem detectadas e cuja presença ou ausência pode caracterizar um organismo e cuja seqüência e função, na maioria das vezes, são desconhecidas (Gostimsky *et al.*, 1999). Esses marcadores mostram-se muito sensíveis à detecção do polimorfismo, visto que as diferenças entre as seqüências nucleotídicas de cada indivíduo, revelam uma impressão digital genética, que pode ser útil na identidade dos indivíduos.

As técnicas moleculares, que estão praticamente substituindo os marcadores morfológicos, apresentam várias vantagens sobre estes: (I) possibilidade de detecção de um número praticamente ilimitado de marcas moleculares; (II) ausência de variações por causa do ciclo de vida da planta e (III) não influência das condições ambientais (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

O primeiro marcador molecular, baseado no DNA, o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), foi desenvolvido na década de 70, com a descoberta das enzimas de restrição. Em meados de 80, com o advento das técnicas de biologia molecular, principalmente a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), novas classes de marcadores foram desenvolvidas, destacando-se, entre eles: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), STS (*Sequence Tagged Sites*)

e Microssatélites (SSR-*Single Sequence Repeats*; ISSR-*Inter-Simple Sequence Repeats*) (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Cada marcador tem sua particularidade, diferenciando-se entre si pela repetibilidade e complexidade da técnica, custo, tempo consumido, nível de polimorfismo detectado entre os indivíduos, quantidade exigida de material biológico, tipo de segregação (dominante ou co-dominante), entre outros.

A escolha de um marcador molecular depende do objetivo do trabalho, das considerações das técnicas, da disponibilidade de recursos e das facilidades do laboratório (O'Hanlon *et al.*, 1999).

Atualmente, os distintos marcadores moleculares disponíveis constituem importantes ferramentas para vários estudos, tais como, mapeamento genético, identificação e clonagem de genes, filogenia, estudos de evolução, construção de mapas genéticos, melhoramento, criação de novas variedades, biologia populacional e conservação de espécies (Caixeta *et al.*, 2006; Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Comparados com outros marcadores, os baseados em PCR, tais como RAPD, AFLP e ISSR, têm sido amplamente utilizados em estudos de diversidade genética de populações naturais de plantas, buscando entendimento da estrutura genética e da diferenciação entre as espécies (Li, *et al.*, 2005; Godwin *et al.*, 1997, Karp *et al.*, 1996). Os dados gerados por estas pesquisas podem ser utilizados para definir unidades de conservação e prioridade no manejo de recursos genéticos.

3.3.1. Marcadores ISSR

ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) é um marcador molecular recente, (Zietkiewicz *et al.*, 1994), associado ao uso de seqüências microssatélites, que são seqüências simples repetidas, organizadas em *tandem*, contendo de 1 a 3 bases, abundantemente distribuídas ao longo de todo o genoma de eucariotos (Liu e Wendel, 2001; Ratnaparkhe *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 1994). Segundo Morgante e Olivieri (1993), a seqüência (AT)*n* constitui-se no ISSR de maior abundância no genoma de plantas.

A análise de ISSR consiste na amplificação via PCR de regiões do DNA genômico que compreendem dois microssatélites idênticos, adjacentes

e inversamente orientados, apresentando distância suficientemente amplificáveis (Assefa *et al.*, 2003, Reedy *et al.*, 2002). Na técnica de ISSR utiliza-se um único *primer* complementar às seqüências microssatélites, podendo ser não ancorado (Gupta *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1994) ou mais usualmente, ancorado na extremidade 5' ou 3', com 1 a 4 bases degeneradas (Zietkiewicz *et al.*, 1994). A adição de nucleotídeos ancorados nas extremidades 5' e 3' é usada para prevenir o deslizamento da polimerase durante a amplificação via PCR, tornando o anelamento entre o *primer* e a extremidade do microssatélite, mais específica e reprodutível (Wolfe e Liston, 1998; Barth *et al.*, 2002).

A detecção do polimorfismo via ISSR é realizada a partir da visualização de bandas de diferentes tamanhos em gel de poliacrilamida ou agarose, sendo que cada banda corresponde a uma seqüência de DNA delimitada por dois microssatélites invertidos. A interpretação dos dados é realizada de forma simples: bandas em comum entre genótipos representam similaridades genéticas, enquanto que bandas incomuns representam diferenças genéticas (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

A utilização do ISSR consiste em uma técnica rápida e de fácil manuseio, que superou a maioria das limitações dos outros marcadores, combinando a maioria das vantagens do SSR e AFLP, com a universalidade do RAPD. Os ISSRs apresentam melhor reprodutibilidade das bandas, quando comparado com o RAPD, devido ao uso de *primers* longos, de 16 - 25 pb de comprimento, os quais permitem temperaturas de anelamento mais altas, resultando em condições de elevada estringência (Reedy *et al.*, 2002). Outras vantagens são: a dispensa de prévia informação da seqüência genômica, como requerido pelos SSRs e o baixo custo da técnica, quando comparado aos AFLPs (Reedy *et al.*, 2002). Estudos também demonstram que os ISSRs geram níveis de polimorfismo similares ou superiores aos RFLPs e RAPDs (Godwin *et al.*, 1997; Nagaoka e Ogihara, 1997).

A principal desvantagem dos marcadores ISSRs está relacionada ao fato de apresentarem, predominantemente, segregação dominante (Gupta *et al.*, 1994; Ratnaparkhe *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998), não distinguindo os indivíduos homozigotos dos heterozigotos. Em alguns casos, entretanto, os marcadores ISSRs têm apresentado segregação co-dominante (Wang *et al.*,

1998; Wu *et al.*, 1994).

Vários trabalhos têm demonstrado a importância deste marcador para vários estudos, tais como: mapeamento genômico (Arcade *et al.*, 2000), biologia evolutiva (Martin e Sanchez-Yelamo, 2000), *fingerprinting* genômico (Prevost e Wilkinson, 1999) e mapeamento gênico (Akagi *et al.*, 1996). Entretanto, em plantas os ISSRs, têm sido amplamente empregados em pesquisas sobre diversidade genética de populações; na estimativa da variação genética dentro e entre populações, espécies ou táxons; e também em estudos de filogenia, como relatado em trabalhos com arroz (Joshi *et al.*, 2000), trigo (Nagaoka e Ogihara, 1997), batata doce (Huang e Sun, 2000) e plantas ameaçadas de extinção (Ramp *et al.*, 2006) entre outros.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Espécies e Populações em estudo

Neste estudo foram avaliados 92 indivíduos, distribuídos em 14 populações de *Dicerandra* formadas por espécies de ciclos perenes e anuais, amostrados de várias regiões do sudeste dos Estados Unidos (Tabela 1). A Figura 3 mostra o mapa de distribuição das populações de *Dicerandra* amostradas para este estudo.

Tabela 1. Amostragem dos táxons de *Dicerandra* com os respectivos códigos das populações (CP), tamanho da amostra (TA) e coordenadas geográficas.

Táxons	CP	TA	Latitude (S)	Longitude (W)
CICLO PERENE				
<i>Dicerandra cornutissima</i>	COR 17	05	29.0167	-82.1138
	COR 18	09	29.0206	-82.1139
	COR 30	09	n.d	n.d
<i>Dicerandra thinicola</i>	THI 21	07	28.4348	-80.5183
<i>Dicerandra frutescens</i> subsp. <i>modesta</i>	MOD 19	08	28.0051	-81.3275
<i>Dicerandra frutescens</i> subsp. <i>frutescens</i>	FRU 25	08	27.3092	-81.3349
Total de Perenes		46		
CICLO ANUAL				
<i>Dicerandra densiflora</i>	DEN 15	08	29.9650	-82.9744
	DEN 16	04	29.8982	-82.9320
	DEN 29	05	n.d	n.d
	DEN 31	06	n.d	n.d
<i>Dicerandra linearifolia</i> var <i>linearifolia</i>	LIN 01	07	30.2856	-83.1518
	LIN 02	06	30.3973	-85.3466
	LIN 04	04	32.0830	-84.0401
	LIN 08	06	30.0902	-83.1682
Total de Anuais		46		
Total de Indivíduos		92		

n.d.= não determinado

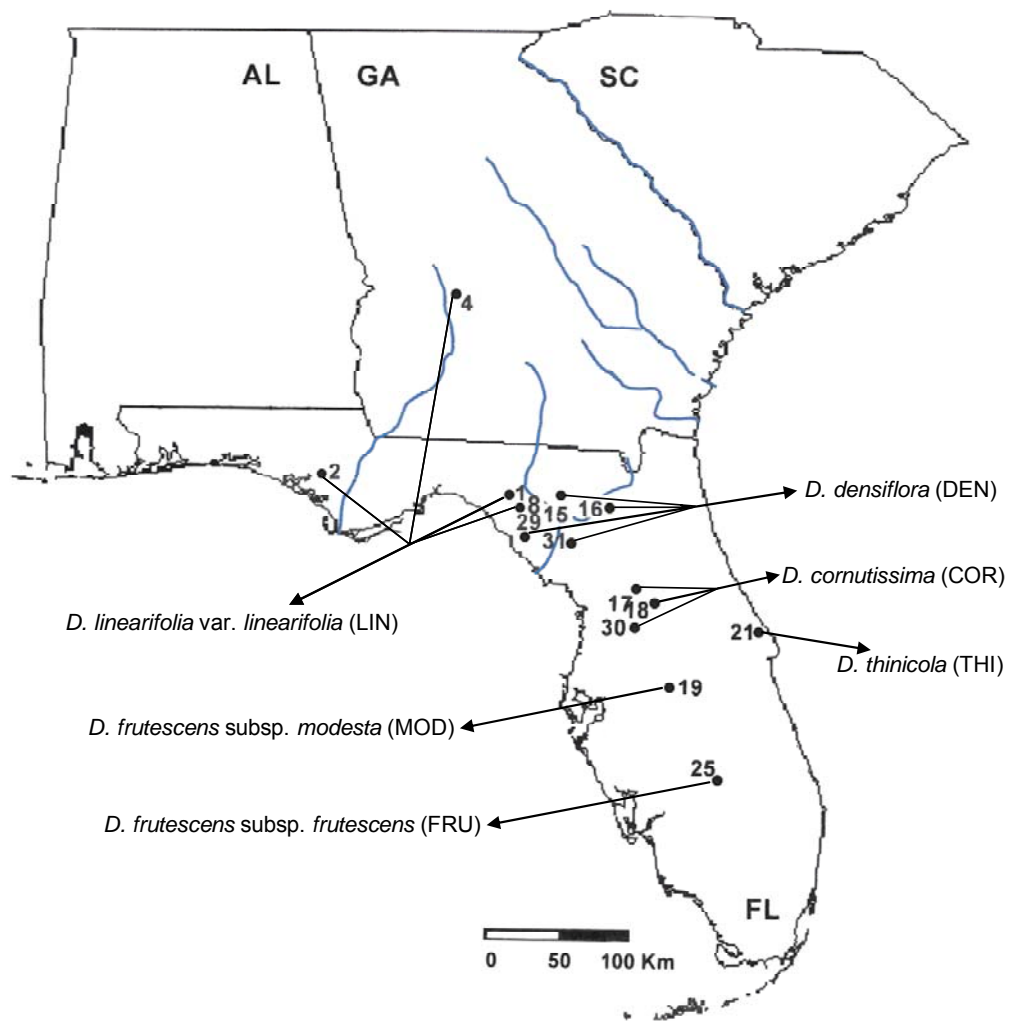


Figura 3: Mapa de distribuição das populações de *Dicerandra* amostradas no sudeste dos Estados Unidos. Os números correspondem aos códigos das populações indicadas na Tabela 1.

Dentre os táxons anuais (*D. densiflora* e *D. linearifolia* var. *linearifolia*) foram amostrados 23 indivíduos distribuídos entre quatro populações para cada um dos táxons, totalizando 46 indivíduos. Entre os táxons de ciclo perene foi avaliado uma população para cada táxon, sendo sete, oito, e oito o número de indivíduos por população amostrados respectivamente para os táxons *D. thinicola*, *D. frutescens* subsp. *modesta* e *D. frutescens* subsp. *frutescens*. A espécie *D. cornutissima*, de ciclo perene, teve uma amostragem de 23 indivíduos distribuídos em três populações. Os locais de amostragem dos indivíduos entre as populações foram escolhidos baseados na facilidade de acesso.

Foram coletadas partes aéreas de indivíduos escolhidos aleatoriamente em cada população e este material foi preservado em gel de sílica até o momento de seu uso. As coordenadas foram registradas com um receptor de sistema de posicionamento global (GPS), determinando, assim, o posicionamento geográfico de cada população.

4.2. Extração e Quantificação de DNA

A extração do DNA foi realizada com base no protocolo de CTAB, conforme descrito por Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações. O DNA total foi extraído de partes aéreas, preferencialmente de folhas. Na etapa inicial da extração, cerca de 50 mg de folhas foram triturados em gral de porcelana na presença de nitrogênio líquido, sendo o pó resultante transferido para tubos “eppendorf” de 2 mL de capacidade. Para cada tubo foram adicionados 900 µL de tampão de extração CTAB, constituído de 100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 20 mM de ácido etileno diamono tetracético (EDTA); 1,4 M NaCl; 2% de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB); 4% de polivinilpirrolidona (PVP) e 1,0% de β-mercaptoetanol (v/v), sendo este último adicionado separadamente dos demais constituintes, em capela de exaustão. A mistura foi agitada vigorosamente em agitador tipo vórtex por 30 segundos. A seguir, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65 °C, por aproximadamente, 30 minutos, sendo agitadas por inversão a cada 10 minutos. Após a incubação, foram adicionados 700 µL de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (v:v), com subsequente agitação por 1 minuto em vórtex. A

separação das fases orgânica e aquosa foi realizada por centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa (ou sobrenadante) foi transferida para um novo tubo, para o qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado (-20 °C) para a precipitação de ácidos nucleicos. O material foi incubado por 15 horas a 4 °C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado lavado uma vez com 1 mL de etanol 70% e uma vez com 1 mL de etanol 95%. Após as lavagens, o precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspensão em 200 µL de TE, pH 8,0 (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA), seguindo-se de um tratamento com RNase, na concentração final de 40 µg/ml, a 37 °C, por 30 minutos.

Novamente o DNA foi precipitado a partir da adição de 30 µL de acetato de amônio 7,5 M e 200 µL de isopropanol gelado, sendo então, incubado a -20 °C, por aproximadamente 3 horas, e posteriormente, centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm. Após a remoção do sobrenadante, o precipitado foi lavado com etanol 70 % e em seguida com etanol 95 %, seco à temperatura ambiente e ressuspensão em 40-60 µL de TE. Para posterior uso, o DNA foi mantido a -20 °C.

A integridade e quantificação do DNA foram determinadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídio. A estimativa da quantidade de DNA foi realizada comparando-se 1 µL do DNA amostral com padrões do marcador de concentração fago λ. Para essa comparação, foram aplicados no gel juntamente com 1 µL do DNA, 1 µL de corante tipo IV (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose) e 4 µL de água deionizada para cada amostra. As amostras foram aplicadas no gel e a migração eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100 V.

Após 20 minutos de corrida eletroforética, o DNA foi observado em um transiluminador de ultra-violeta e a imagem foi digitalizada e fotografada usando o sistema EagleEye (Stratagene). Para as reações PCR-ISSR, as amostras foram diluídas para a concentração final de 10 ng/µL.

4.3. Seleção de *primers* e Amplificações via PCR dos ISSRs

De um conjunto de 100 *primers* (UBC set nº 9) obtidos do Laboratório de Biotecnologia da Universidade de British Columbia, 68 *primers* foram testados para amplificação via PCR, usando quatro amostras: três de ciclo perene e uma de ciclo anual. Inicialmente foram examinadas as condições ótimas para detecção de ISSRs nas quatro amostras, levando em consideração a concentração de MgCl₂, formamida e a temperatura de anelamento no padrão de amplificação. Dos 68 *primers* testados, sete foram selecionados por apresentarem maior polimorfismo, maior reprodutibilidade no padrão de bandejamento e maior nitidez (Tabela 2).

Cada reação de amplificação foi conduzida em um volume final de 25 µL contendo: 50 mM de KCl; 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 0,1 % de Tween; 1,7 ou 2,5 mM de MgCl₂; 1,0 ou 2,0 % de formamida; 0,2 µM de *primer*; 0,75 U de Taq polimerase; 0,2 mM de dNTP; aproximadamente 20 ng de DNA genômico e água deionizada para completar o volume (Tabela 2). O programa de amplificação foi padronizado com as seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação de DNA (94 °C por 5 minutos), seguido por 35 ciclos - desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 45 ou 51 °C (dependendo do *primer*) por 45 segundos e alongamento a 72 °C por 1,5 minutos. Ao final desses ciclos, foi realizada uma etapa extra de alongamento a 72 °C por 5 minutos. Os produtos de amplificação do DNA foram analisados em gel de agarose 1,5 % imerso em TBE 1X (90 mM Tris Base, 90 mM ácido bórico e 2 mM EDTA) por quatro horas, em tensão constante de 110 V. Para a visualização das bandas, após a eletroforese, os géis foram incubados em solução de brometo de etídio, numa concentração de 0,6 ng/ml, durante 15 minutos. Em seguida, os fragmentos amplificados foram visualizados em transiluminador de luz ultra-violeta e suas imagens digitalizadas em um sistema de captura de imagens (Eagle Eye II - Stratagene). O tamanho dos fragmentos pôde ser estimado pela comparação das bandas migradas no gel com o marcador molecular DNA Ladder (100 pb) da Invitrogen.

Tabela 2: Relação dos *primers* usados nas análises ISSR de *Dicerandra* e respectivas sequências, temperatura de anelamento (T_m), concentração de MgCl₂ e porcentagem de formamida.

PRIMERS				
Código	Seqüência* (5'-3')	T _m (°C)	MgCl ₂ (mM)	Formamida (%)
UBC 809	(AG) ₈ T	51	1,7	2,0
UBC 812	(GA) ₈ A	51	2,5	1,0
UBC 835	(AG) ₈ YC	45	2,5	2,0
UBC 845	(CT) ₈ RG	51	2,5	1,0
UBC 888	BDB(CA) ₇	51	2,5	2,0
UBC 889	DBD(AC) ₇	51	2,5	2,0
UBC 891	HVH(TG) ₇	51	2,5	2,0

* Y = C ou T; R = A ou G; B = C, G ou T; D = A, G ou T; H = A, C ou T; V = A, C ou G.

4.4. Análise de dados

Para a análise dos dados de ISSR, os perfis de bandas obtidos foram convertidos em uma matriz binária de presença (1) e ausência (0) de bandas. Foram excluídas das análises bandas que apresentaram baixa reprodutibilidade e/ou intensidade e também as bandas que apresentaram a mesma mobilidade e mesmo peso molecular para todas as amostras, conhecidas como bandas monomórficas.

Os táxons foram separados em três grupos, sendo essa classificação utilizada em todas as análises subseqüentes. Essa divisão dos táxons em três grupos foi realizada, visto que, numa análise inicial, separando os táxons somente em dois grupos (das perenes e anuais), COR mostrou-se muito diferente das demais perenes. Além disso, COR foi colocada num grupo à parte, com o objetivo de estudá-la e compará-la com as demais perenes e anuais, já que trabalhos anteriores, realizados por outros pesquisadores, demonstraram que COR apresenta complexidade evolutiva. Os grupos foram: **grupo 1**, a espécie de ciclo perene COR; **grupo 2**, os demais táxons perenes (FRU, MOD e THI); e **grupo 3**, os táxons anuais (DEN e LIN).

Inicialmente, foram realizados os seguintes cálculos: o número total de bandas amplificadas, a distribuição das bandas entre os grupos (1, 2 e 3) e a porcentagem de bandas polimórficas total e para cada grupo. Foram obtidas

também as bandas exclusivas de cada táxon, de cada grupo e as bandas compartilhadas entre táxons e entre grupos. Para a obtenção das bandas exclusivas e compartilhadas foi considerado apenas o número de bandas presentes em pelo menos 25% dos indivíduos de cada táxon ou 25% do grupo.

4.4.1. Análise de diversidade genética dentro dos táxons

O programa POPGENE (*Population Genetic Analysis*) versão 32 foi utilizado para a caracterização da variabilidade genética, obtendo-se as estimativas de porcentagem de locos polimórficos (P), diversidade gênica de Nei (He) (Nei, 1973) e índice de diversidade de Shannon (I), onde foi assumido o equilíbrio de Hardy-Weinberg. As estimativas dos parâmetros de diversidade P, He e I foram calculados em três níveis: em nível de táxon, de grupo (grupo 1, 2 e 3) e de conjunto total. Os resultados obtidos na análise do POPGENE foram utilizados, também para verificar se existe alguma associação entre a diversidade genética e a distribuição dos táxons.

4.4.2. Análise de diversidade genética entre os táxons

A análise da variância molecular (AMOVA) foi utilizada com o auxílio do programa Arlequin versão 3.11 para descrever a estrutura genética entre os táxons. Nesta análise, a diversidade genética total foi fracionada em três níveis hierárquicos: variação entre os táxons, entre os indivíduos dentro de cada táxon e variação entre os grupos (1, 2 e/ou 3). Na análise da variância foi considerada ainda, a distribuição da variabilidade genética total levando em conta a divisão dos táxons nos grupos 1, 2 e 3, sem considerar a divisão dos grupos e considerando a distribuição da variabilidade dentro de cada ciclo: perene e anual.

A significância de diferenciação foi testada com 1000 permutações, onde P denota a probabilidade de se verificar um valor ao acaso igual ou maior ao valor observado.

4.4.3. Análise de similaridade genética e análises de agrupamento

Para verificar a proximidade genética entre os diferentes táxons, o programa POPGENE foi utilizado, para a comparação dos táxons par-a-par, obtendo-se estimativas da identidade genética e da distância genética de Nei (1978).

A análise de coordenadas principais, um tipo de análise de agrupamento, foi realizada com o programa NTSYS-pc, versão 2.2K. A análise gerou um gráfico tridimensional, mostrando o agrupamento entre todos os 92 indivíduos avaliados do gênero *Dicerandra*, baseado nas similaridades genéticas entre eles. O resultado da análise forneceu a porcentagem da variação total explicada por cada coordenada.

O programa NTSYS-pc, 2.2K, foi utilizado, também, para a obtenção das estimativas de similaridade genética baseadas no coeficiente de Dice, o qual é definido como $S=2N_{XY}/2N_{XY}+N_X+N_Y$, onde N_{XY} corresponde ao número de fragmentos de DNA compartilhados entre os indivíduos X e Y, N_X e N_Y correspondem aos números de fragmentos de DNA observados somente nos indivíduos X e Y, respectivamente. Essas estimativas foram então usadas para construir o dendrograma em nível de indivíduos, através da análise de agrupamento baseada na média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA). A consistência do agrupamento foi testada através do coeficiente de correlação cofenética (CCC), calculado entre os valores da matriz original e os valores da matriz cofenética, também através do programa NTSYS-pc.

O programa MEGA 3.1 foi empregado para realizar a construção dos dendrogramas representativos das distâncias genéticas entre os 6 táxons. A matriz dos valores de F_{ST} gerada pelo programa Arlequin 3.11 foi importada para o MEGA 3.1 para obtenção do dendrograma pelo método do vizinho mais próximo (*Neighbor Joining* - NJ). Já a matriz das distâncias genéticas de Nei (1978) gerada pelo POPGENE 32 foi importada também para o MEGA 3.1 para a construção do dendrograma pelo método do UPGMA.

O teste de Mantel (Mantel, 1967) realizado pelo MXCOMP, módulo do NTSYS-pc, com 9000 permutações, foi utilizado para investigar a correlação entre F_{ST} , identidade genética de Nei e diversidade genética de Nei,

baseado nas matrizes cofenéticas. Este teste compara duas matrizes entre si, fornecendo um valor de correlação (r) que quantifica o grau de relacionamento entre as duas matrizes, variando de -1 a +1. O teste compara o Z observado (Z_{obs}) com o Z randômico (Z_{rdm}), sendo que para valores negativos de r , quanto menor a frequência do $Z_{rdm} \leq Z_{obs}$, maior será a correlação entre as duas matrizes. Para os valores positivos de r , quanto menor a frequência de $Z_{rdm} \geq Z_{obs}$, maior será a correlação r entre as duas matrizes.

4.4.4. Análise para detecção de espécie híbrida e detecção de putativos parentais

Para análise de detecção de espécie híbrida e obtenção de seus *putativos* parentais, padrões de ISSR foram obtidos entre todos os *putativos* táxons parentais e a putativa espécie híbrida (COR). Foram considerados como possíveis parentais, seis pares de táxons, sempre considerando um parental anual e um perene. Dentre os pares de parentais testados estão, DEN e MOD; DEN e THI; DEN e FRU; LIN e MOD; LIN e THI; LIN e FRU.

A análise consistiu na obtenção de bandas exclusivas de cada pressuposto parental (P1 e P2) e da putativa espécie híbrida (COR) e obtenção também das bandas compartilhadas entre P1 e P2 (P1-P2); entre P1, P2 e COR (P1-P2-COR); e entre cada parental e COR (P1-COR, P2-COR) (adaptado de Zhou *et al.*, 2005). Nesta análise, para cada par de táxon parental testado, foram desconsiderados os outros táxons e como critério de representatividade, foram levadas em consideração somente as bandas presentes em pelo menos 25% dos indivíduos de cada táxon.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização molecular por marcadores ISSR

Os sete *primers* de ISSR selecionados para a análise de variabilidade genética em *Dicerandra* foram confiáveis, apresentando habilidade para detecção de bandas polimórficas e alta reprodutibilidade. Entre os 92 indivíduos investigados, foram identificadas, através dos marcadores ISSRs, 103 bandas, sendo todas polimórficas. A média de bandas polimórficas geradas por *primer* foi de 14,7 e o tamanho dos fragmentos amplificados variou de 138 a 1.800 pb. Os sete *primers* utilizados foram bastante eficientes, gerando alto grau de polimorfismo (100%) entre os indivíduos analisados.

Quando analisados separadamente, os grupos 1, 2 e 3 apresentaram respectivamente um total de 70, 69 e 83 bandas, enquanto que as porcentagens obtidas de bandas polimórficas foram de 81,43; 95,65 e 98,79 %, respectivamente (Tabela 3). O grupo 3, constituído por DEN e LIN, táxons de ciclo anual, apresentou maior porcentagem de bandas polimórficas quando comparado com o grupo 1 (COR) e grupo 2 (constituído por FRU, MOD e THI), ambos de ciclo perene.

Tabela 3: Relação dos *primers* usados nas análises ISSR de *Dicerandra*, número total de bandas (NB) e porcentagem de bandas polimórficas (PBP).

Primer	NB (PBP)			
	Táxons	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
UBC 809	11 (100,0)	06 (83,33)	09 (100,0)	07 (100,0)
UBC 812	10 (100,0)	06 (100,0)	08 (100,0)	09 (100,0)
UBC 835	16 (100,0)	11 (45,45)	08 (75,00)	13 (92,30)
UBC 845	12 (100,0)	05 (00,00)	04 (75,00)	08 (100,0)
UBC 888	06 (100,0)	06 (83,33)	03 (100,0)	05 (100,0)
UBC 889	08 (100,0)	04 (100,0)	06 (100,0)	07 (100,0)
UBC 891	40 (100,0)	32 (100,0)	31 (100,0)	34 (100,0)
Total	103 (100,0)	70 (81,43)	69 (95,65)	83 (98,79)

Grupo 1: COR; Grupo 2: FRU, MOD e THI; Grupo 3: DEN e LIN.

5.2. Diversidade genética dentro dos táxons

5.2.1. Grupo de maior variabilidade genética

Quando a diversidade genética é analisada em nível dos grupos 1, 2 e 3, COR (grupo 1) apresenta porcentagem de polimorfismo (P) de 55,34. Neste caso, COR é considerada como um táxon, já que o grupo é constituído por apenas este táxon. Para o grupo 2, a porcentagem de polimorfismo foi de 48,54, quando considerada como uma média dos táxons e de 64,08, como um grupo. O valor de P para o grupo 3 foi de 55,83 quando a porcentagem de polimorfismo é analisada como uma média dos táxons e de 79,61, como um grupo. Em nível de táxon (ou média de táxons para os grupos 2 e 3), COR apresentou um nível de polimorfismo relativamente próximo ao do grupo 3, porém comparada ao grupo das outras perenes (2) exibiu um nível de polimorfismo maior (Tabela 4).

A média dos valores de heterozigosidade esperada (H_e) e dos índices de diversidade gênica de Shannon (I) obtida, em nível de táxon foi de, 0,1528 e 0,2404 para o grupo 1; 0,1733 e 0,2603 para o grupo 2 e 0,1583 e 0,2463 para o grupo 3, respectivamente. Em nível de grupo, os valores de H_e e I foram 0,1956 e 0,3010 para o grupo 2; e 0,2488 e 0,3787 para o grupo 3. Quando considerado todos os táxons como um conjunto total, a diversidade genética aumentou, obtendo-se um H_e de 0,2935 e um I de 0,4540 (Tabela 4).

Os resultados mostraram que o grupo das anuais (grupo 3) apresenta maior diversidade genética em comparação com os outros dois grupos de táxons de ciclo perene. Entretanto, esses resultados não dão suporte para afirmar que as espécies anuais apresentam maior diversidade por serem mais antigas, ou pelo fato do relógio molecular ser mais rápido ou pelos dois motivos.

Tabela 4: Diversidade genética dentro dos táxons.

Táxons	N	P(%)	He	I
Grupo 1				
COR	23	55,34	0,1528	0,2404
Grupo 2				
MOD	8	49,51	0,1700	0,2576
THI	7	48,54	0,1810	0,2695
FRU	8	47,57	0,1690	0,2537
Média		48,54	0,1733	0,2603
Grupo	23	64,08	0,1956	0,3010
Grupo 3				
DEN	23	60,19	0,1881	0,2878
LIN	23	51,46	0,1284	0,2047
Média		55,83	0,1583	0,2463
Grupo	46	79,61	0,2488	0,3787
Conjunto Total	92	100,00	0,2935	0,4540

N, tamanho da amostra; **P (%)**, porcentagem de polimorfismo; **H_E** diversidade gênica de Nei (1973) (assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg); **I**, índice de diversidade gênica de Shannon.

Trabalhos evidenciam que uma característica comum de espécies de plantas endêmicas é o baixo nível de diversidade genética (Xie *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2004), entretanto, outros estudos também têm encontrado moderados e altos níveis de variabilidade genética em espécies raras e estreitamente endêmicas (Chen *et al.*, 2006, González- Astorga e Castillo-Campos, 2004), como os moderados níveis de diversidade encontrados dentro dos táxons de *Dicerandra* neste trabalho. Vários fatores têm explicado os altos níveis de diversidade encontrados em plantas raras, como: especiação recente, mudanças recentes na distribuição ou no *habitat*, sistema de reprodução, mutações somáticas, múltiplos efeitos fundadores e refúgios durante períodos de glaciações (Xue *et al.*, 2004).

5.2.2. Relação entre a diversidade genética e a distribuição populacional dos táxons

A partir da análise do POPGENE (Tabela 4) foi observado que não existe nenhuma associação entre a diversidade genética e a distribuição populacional dos táxons, visto que nenhuma relação consistente foi encontrada mostrando que táxons mais amplamente distribuídos apresentam maior variabilidade genética e táxons mais restritos apresentam menor variabilidade genética.

Os táxons constituintes do grupo das anuais, DEN e LIN (cada um representado por quatro populações), ocupam consideravelmente ampla distribuição geográfica e revelam alta diversidade genética, de maneira similar ao grupo 1, constituído por COR (representado por três populações), sendo contudo, este táxon restrito a poucas áreas do sudeste dos EUA. Por outro lado, os táxons constituintes do grupo 2: FRU, MOD e THI (cada um representado por uma população), têm suas populações restritamente distribuídas, apresentando, porém, menor diversidade genética quando comparada aos grupo 1 e 3.

Esses resultados contrariaram, com o obtido por vários outros pesquisadores (Smith e Pham, 1996; Helenurm, 2001), a proposta formulada por Hamrick e Godt (1989), em que existe forte associação entre a extensão geográfica e a diversidade genética de uma dada espécie.

5.3. Fracionamento da diversidade genética entre e dentro dos táxons

A diversidade genética total avaliada a partir da AMOVA, em três níveis hierárquicos: variação entre os táxons, entre os indivíduos dentro dos táxons e variação entre os grupos (1, 2 e/ou 3) (Tabela 5), revelou que do total da variabilidade genética molecular encontrada para os táxons de *Dicerandra* analisados, 51,80% se deve às diferenças individuais dentro dos táxons e 48,20% é atribuída à variabilidade entre os táxons. Realizando a análise da variância molecular, levando em consideração os três grupos, 49,76% da variância total foi atribuída a diferenças individuais dentro dos táxons, 31,50% às diferenças entre os táxons dentro de cada grupo e

18,74% às divergências entre os grupos. Ao comparar a distribuição da variância, tanto considerando a divisão dos táxons em grupos, quanto considerando todos os táxons como um único grupo, observou-se que a variação dentro dos táxons praticamente não foi afetada ao separar os táxons em grupos, e que a variação entre os táxons (48,20%) foi separada em: 31,50% de variação entre os táxons e 18,74% entre os grupos.

Quando a análise da variância molecular foi realizada considerando somente os táxons de ciclo perene, fracionando-os nos grupos 1 e 2 (COR e demais perenes), 62,10% da variância total foi atribuída às diferenças dentro dos táxons, 33,53% às divergências entre COR e as outras perenes. Entretanto, somente 4,37% foi atribuída às diferenças entre os táxons do grupo 2, demonstrando que os táxons de ciclo perene agrupados neste grupo são bastante uniformes, conseqüentemente apresentando pequena diferenciação entre si. Já na análise considerando somente os táxons de ciclo anual, da variância total, 50,88% se deve à variação entre táxons e 49,12% é atribuída às variabilidades dentro dos táxons.

Tabela 5: Análise de variância molecular (AMOVA) para diferentes níveis hierárquicos entre os táxons de *Dicerandra*

Fonte de Variação	GL	Soma dos quadrados	Componente de variância	Varição (%)	Valor de P*
Dois níveis hierárquicos:					
Entre táxons	5	573,08	7,33	48,20	< 0,001
Dentro dos táxons	86	677,42	7,88	51,80	
Total	91	1250,50	15,21		
Três níveis hierárquicos					
Entre os grupos 1, 2 e 3	2	358,43	2,96	18,74	< 0,05
Entre os táxons dentro dos grupos	3	214,65	4,99	31,50	< 0,001
Dentro dos táxons	86	677,42	7,88	49,76	< 0,001
Total	91	1250,50	15,83		
Análise dentro do ciclo perene					
Entre os grupos 1 e 2	1	119,13	4,44	33,53	0,2336
Entre táxons dentro do ciclo perene	2	25,28	0,58	4,37	< 0,05
Dentro dos táxons	42	345,15	8,21	62,10	< 0,001
Total	45	489,56	13,23		
Análise dentro do ciclo anual					
Entre os táxons	1	162,63	6,78	50,88	< 0,001
Dentro dos táxons	44	288,26	6,55	49,12	
Total	45	450,89	13,33		

*Valores de P são as probabilidades de ter um componente de variância ao acaso maior que os valores observados. As probabilidades foram calculadas por 1000 permutações ao acaso. Grupo: 1 (COR); 2 (FRU, MOD e THI) e 3 (DEN e LIN).

5.4. Formação de grupos de acordo com o ciclo de vida

As estimativas da identidade genética e distância genética de Nei (1978) foram obtidas através do programa POPGENE, relacionando todos os táxons par-a-par, como mostrado na Tabela 6. Essas estimativas variam de zero a um, sendo que na identidade genética, quanto mais próximo de um for a estimativa, maior o grau de similaridade genética entre os táxons comparados; já na distância genética, quanto mais próximo de um, mais distantes geneticamente são os pares comparados.

As estimativas de identidade genética de Nei (1978) obtidas entre os táxons de *Dicerandra* apresentaram uma média de 0,8350, variando de 0,7653 a 0,9795, sugerindo que COR (ciclo perene) e DEN (ciclo anual) constituem os táxons geneticamente mais distantes entre si, enquanto que MOD e FRU, ambos de ciclo perene, representaram os mais próximos de COR. Observou-se também grande semelhança genética entre os táxons do grupo 2 (FRU, MOD e THI), revelada a partir dos altos e próximos valores de identidade (0,9795; 0,9775 e 0,9637), obtidos entre eles.

As estimativas de distância genética variaram de 0,0207 a 0,2675, apresentando média total de 0,1287. Confirmando as estimativas de identidade, os dados demonstraram que os táxons COR e DEN são os mais distantes entre si, apresentando o maior valor de distância genética, enquanto que MOD e THI são os mais próximos, apresentando o menor valor de distância genética.

Tabela 6: Identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal), entre os 6 táxons de *Dicerandra* estimadas pelo método de Nei (1978).

	COR	DEN	LIN	MOD	THI	FRU
COR	-	0,7653	0,8061	0,8137	0,8067	0,8478
DEN	0,2675	-	0,7886	0,7918	0,7887	0,7819
LIN	0,2155	0,2375	-	0,7907	0,8083	0,8152
MOD	0,2061	0,2334	0,2348	-	0,9795	0,9775
THI	0,2148	0,2374	0,2129	0,0207	-	0,9637
FRU	0,1651	0,2461	0,2044	0,0227	0,0370	-

O gráfico gerado pela análise das coordenadas principais, a partir do agrupamento dos 92 indivíduos (Figura 4), apresentou a formação de dois grupos anuais, um formado pelos indivíduos pertencentes ao táxon DEN e outro pelos indivíduos pertencentes à LIN, ambos os grupos bem distintos entre si. Foi observada também a formação de outro grupo, constituído por indivíduos de ciclo perene, porém dividido em dois subgrupos: um representado por COR e o outro constituindo um agrupamento heterogêneo, formado por FRU, MOD e THI, os três bem próximos geneticamente entre si. Nesta análise, o grupo 1 (COR) se agrupou mais intimamente com os táxons perenes (FRU, MOD e THI), mostrando ser mais próximo geneticamente a eles. O resultado da análise revelou que todos os dados explicaram 43,48% da variância, sendo que 17,09% da variação total é explicada pela coordenada 1; 15,87% pela coordenada 2 e 10,52% da variação é atribuída à coordenada 3.

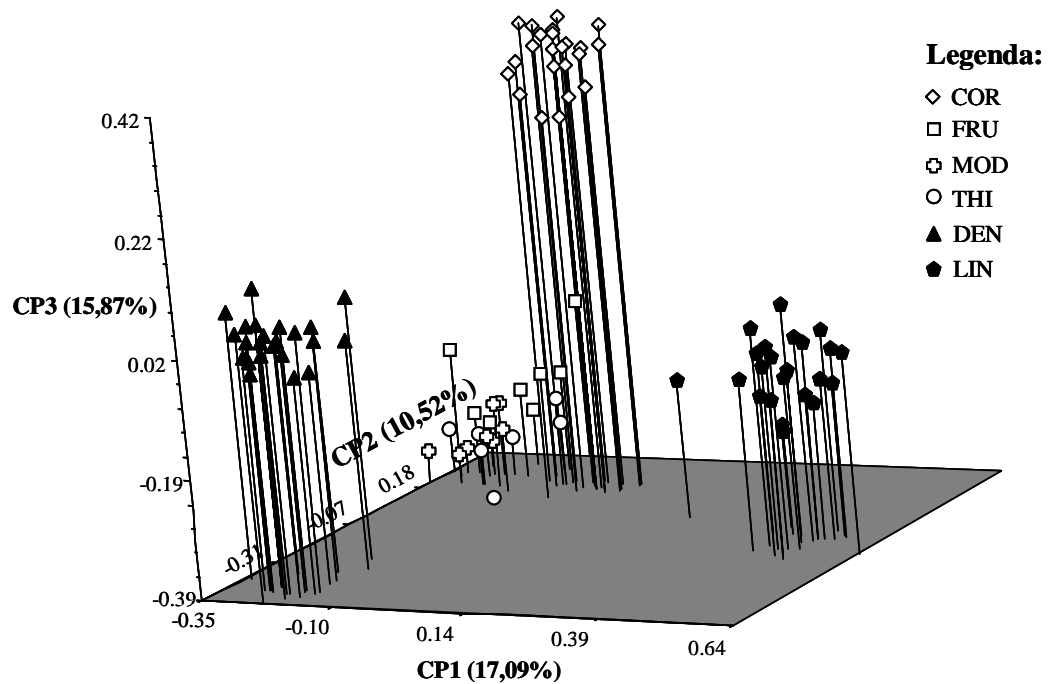


Figura 4: Gráfico representativo das três principais coordenadas para todos os indivíduos de *Dicerandra*. A porcentagem de variação explicada por cada coordenada principal (CP) é demonstrada entre parênteses.

O dendrograma, em nível de indivíduos, obtido com base no método UPGMA, apresentado na Figura 5, foi utilizado também para agrupar os 92 indivíduos de *Dicerandra* de acordo com o grau de similaridade genética. Os resultados obtidos pela análise do dendrograma confirmaram os dados gerados pela análise das coordenadas principais. Observou-se a formação de quatro clados principais, sendo que três deles são bem homogêneos entre si (COR, DEN e LIN) e um clado bastante heterogêneo (constituído pelas perenes THI, MOD e FRU), sendo esta heterogeneidade explicada pelo alto grau de similaridade genética entre esses táxons. Dentre todos os táxons avaliados, COR encontra-se mais intimamente relacionada com os indivíduos de ciclo perene, MOD, THI e FRU. Na comparação de COR com os indivíduos de ciclo anual, LIN foi considerado geneticamente o táxon mais distante de COR.

O dendrograma obtido pelo UPGMA também revelou que a formação dos clados foi consideravelmente estruturada taxonomicamente, visto que os

indivíduos constituintes de cada clado pertencem às populações amostradas dos respectivos táxons, exceto um clado, o qual apresentou indivíduos oriundos de FRU, MOD e THI.

A consistência do agrupamento foi analisada por meio do valor da correlação cofenética entre as matrizes de coeficiente de similaridade e a matriz dos valores cofenéticos, gerando um alto e significativo valor de correlação cofenética a 0,1% com $r = 0,87$ ($P=0,0010$).

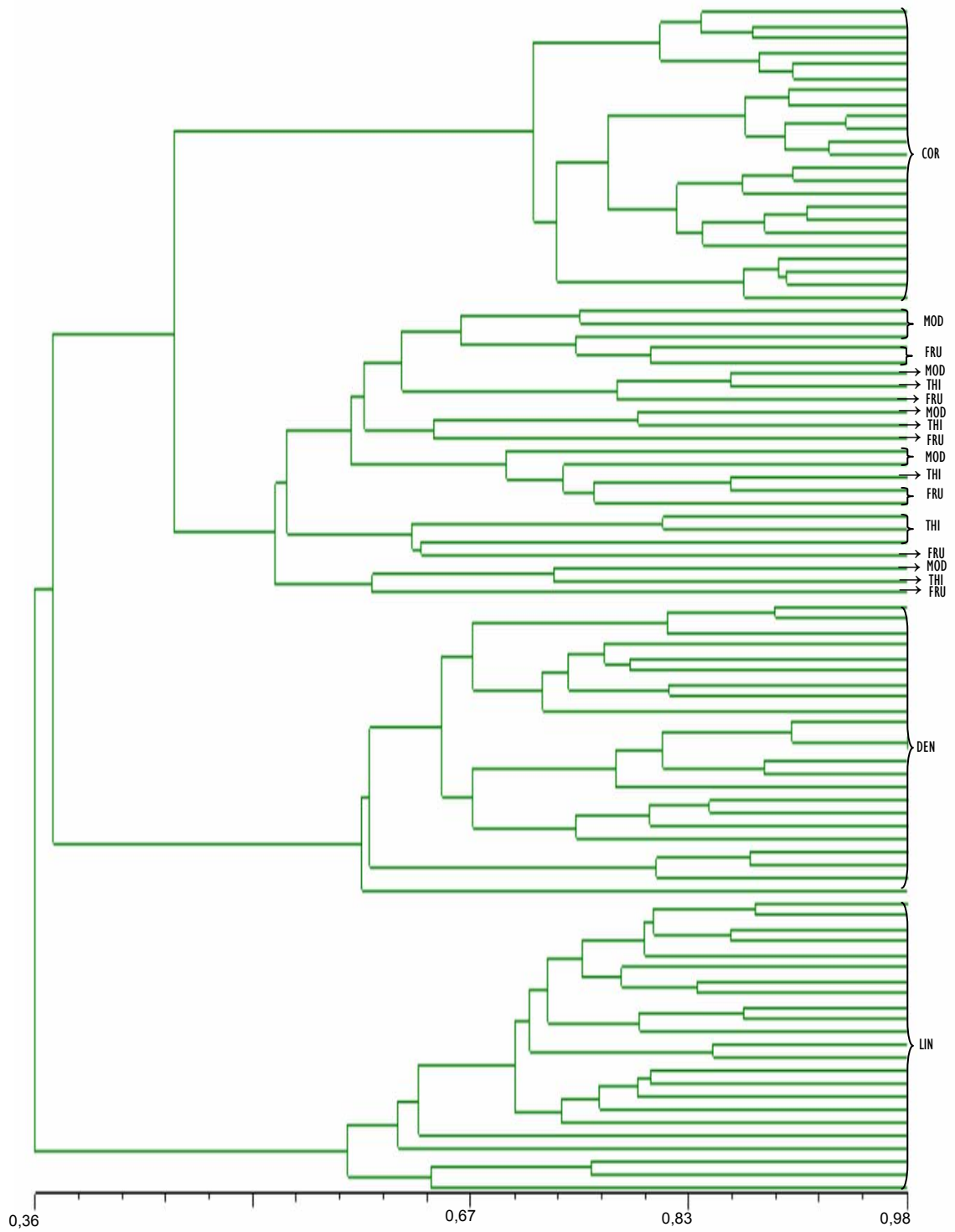


Figura 5: Dendrograma obtido pelo método de UPGMA a partir de 92 indivíduos distribuídos em 14 populações de *Dicerandra*, gerado pelo programa NTSYS PC 2.2k, com base no coeficiente de Dice. Coeficiente de correlação cofenética $r = 0,87$.

Os dendrogramas obtidos a partir do agrupamento entre os seis táxons de *Dicerandra* pelo método UPGMA e pelo método do *Neighbor Joining* (NJ) estão mostrados nas Figuras 6 e 7, respectivamente. A Figura 6 confirma a separação dos táxons em 4 clados principais, já demonstrada no dendrograma pelo UPGMA entre todos os indivíduos, onde os táxons do grupo 2 se agruparam em um clado, sugerindo serem muito próximos geneticamente entre si, e COR DEN e LIN, cada um em um clado separadamente. A Figura 7 mostra o dendrograma pelo método NJ, sob uma outra forma de representação, na qual COR se aloca entre o grupo 2 (perenes FRU, MOD e THI) e o grupo 3 (anuais). Os táxons do grupo 2 apresentam menor diferenciação genética entre si quando comparados com as anuais, provavelmente pelo fato das perenes apresentarem relógio molecular mais lento e as anuais, relógio molecular mais rápido, com estes revelando maior diferenciação entre as espécies. Vários estudos comparativos encontraram este padrão: plantas anuais frequentemente mostrando elevada taxa de evolução molecular comparado com as perenes (Andreasen e Baldwin, 2001; Laroche e Bousquet, 1999).

Diante das análises de agrupamento, como das demais análises realizadas, observou-se uma divergência quanto à identificação do táxon (DEN ou LIN) mais distante de COR. Contudo, acredita-se que LIN representa o táxon mais divergente geneticamente de COR por apresentar menos bandas em comum (ver item 5.5) com COR em comparação à DEN e pelos resultados da maioria das análises. Além disso, foi observado também que o modo como se deu a formação de COR não é demonstrada de forma clara, sendo propostas algumas hipóteses para sua origem mais adiante.

O teste de Mantel revelou correlações significativas entre a distância genética de Nei e a identidade genética de Nei ($r = -0,99972$, $p [Z_{rdm} \leq Z_{obs}] = 0,0014$) e entre a identidade genética e F_{ST} ($r = -0,98455$, $p [Z_{rdm} \leq Z_{obs}] = 0,0015$). Entretanto, correlação não significativa foi observada entre distância genética de Nei e F_{ST} ($r = -0,98455$, $p [Z_{rdm} \leq Z_{obs}] = 0,9984$).

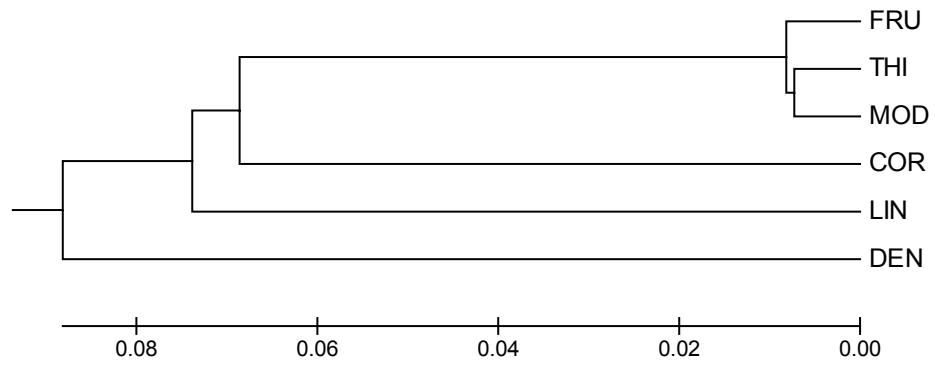


Figura 6: Dendrograma gerado pelo método UPGMA baseado nas distâncias de Nei (1978) usando os programas POPGENE 32 e MEGA 3.1.

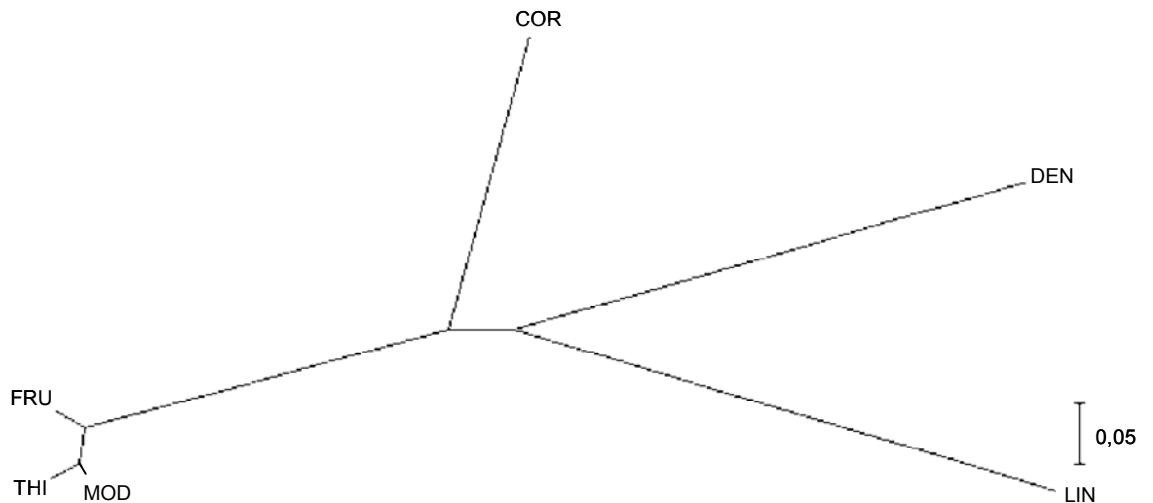


Figura 7: Dendrograma gerado pelo método do *Neighbor Joining* (NJ) baseado nos valores de F_{st} obtidos pela AMOVA usando os programas Arlequin 3.11 e MEGA 3.1.

5.5. Padrão de distribuição de bandas ISSRs dentro de cada grupo e de cada táxon

Bandas ISSR exclusivas de cada grupo e compartilhadas entre os grupos foram reveladas na Tabela 7 e bandas exclusivas de cada táxon e compartilhadas entre os táxons foram reveladas na Tabela 8.

Ao analisar a distribuição de bandas ISSR exclusivas de cada grupo e compartilhadas entre os grupos, a constituição dos grupos foi mantida: grupo 1 (constituído apenas por COR), grupo 2 (formado por FRU, MOD e THI) e grupo 3 (constituído por DEN e LIN). Os critérios para contagem de bandas adaptados de Wolfe *et al.* (1998), foram baseados nos seguintes pressupostos: o total de bandas de cada grupo foi obtido pelo somatório apenas das bandas que eram obrigatoriamente comuns entre todos os táxons dentro de cada grupo. Por exemplo, foram somadas como bandas do grupo 3 apenas aquelas bandas presentes em ambos os táxons LIN e DEN, sendo que bandas presentes somente em LIN ou somente em DEN, não foram consideradas. Para ambos os grupos, a representatividade das bandas presentes em 25% dos indivíduos de cada táxon foi levado em conta.

Nesta análise, o grupo 1 (COR) apresentou o maior número de bandas exclusivas (três), seguido pelo grupo 2 (demais perenes) com duas bandas exclusivas. O grupo 3 (anuais) não apresentou bandas exclusivas (Tabela 7A). Avaliando as bandas em comum entre os grupos, o grupo 1 compartilha exclusivamente com o grupo 2 um total de quatro bandas, enquanto que com o grupo 3 compartilha apenas três bandas.

Por outro lado, a mesma análise de obtenção de bandas exclusivas e compartilhadas entre os grupos foi realizada utilizando um critério menos rigoroso de contagem de bandas, tendo por base o seguinte pressuposto: o total de bandas de cada grupo foi obtido pelo somatório das bandas de todos os táxons de um dado grupo, independentemente dessas bandas serem ou não compartilhadas por todos os táxons do mesmo grupo. Por exemplo, para o somatório de bandas do grupo 2 foi considerado as bandas presentes nos táxons FRU, MOD e THI, independente de serem encontradas somente em apenas um dos táxons, em apenas dois ou

simultaneamente nos três táxons. Contudo, foi mantida a representatividade das bandas em 25% dos indivíduos de cada grupo.

O grupo 3 apresentou exclusividade de bandas nula (ver Tabela 7A), em um critério de contagem de bandas mais rigoroso, em que foram consideradas bandas válidas apenas aquelas comuns aos dois táxons, LIN e DEN, do grupo 3. Em uma análise menos rigorosa (Tabela 7B) o grupo 3 teria nove bandas exclusivas, superando, os demais grupos em termos de exclusividade de bandas.

Dessa forma, ressalta-se que a análise de bandas com o critério mais rigoroso (Tabela 7A) privilegiou o grupo 2 (demais perenes) formado por táxons muito mais próximos entre si, praticamente compondo um clado único. A análise menos rigorosa (Tabela 7B) privilegiou o grupo 3 (anuais) privilegiando a maior diversidade genética existente neste grupo composto por dois táxons bem diferentes, que inclusive, se agregam em dois cladros diferentes na composição do dendrograma (Figura 5). Entretanto, em termos de compartilhamento de bandas, a análise mais rigorosa parece ser a mais apropriada já que reduziu o efeito gerado pela composição heterogênea dos grupos, os quais, na verdade, poderiam ter sido divididos em 4 grupos: LIN, DEN, COR e demais perenes, conforme indica a separação por cladros. Deste modo, COR (grupo1), de fato, aparenta maior proximidade, em termos de compartilhamento de bandas, com o grupo 2 (demais perenes) que com as anuais DEN ou LIN (grupo3).

Ao analisar as bandas distribuídas entre os táxons, foi observado que, do grupo 2, FRU e MOD não apresentaram nenhuma banda exclusiva, com apenas THI revelando uma banda exclusiva (Tabela 8). Entretanto, os táxons anuais apresentaram o maior número de bandas exclusivas, sendo detectadas em DEN, cinco bandas e em LIN, quatro bandas. Poucos pares de táxons apresentaram compartilhamento exclusivo de bandas. COR não apresentou bandas compartilhadas exclusivamente com os táxons FRU, MOD e THI, contudo, cinco bandas foram compartilhadas exclusivamente entre COR e DEN e 2 entre COR e LIN, sugerindo ser DEN o táxon anual mais próximo de COR em comparação com LIN. Dentre os táxons que apresentaram compartilhamento de bandas, foram detectados MOD e THI,

com uma banda em comum e MOD e DEN, também com uma exclusiva deles em comparação com os outros táxons.

Tabela 7: Distribuição de bandas de ISSR entre os grupos. Número de bandas exclusivas de cada grupo e de bandas compartilhadas entre os grupos: Grupo 1: COR; Grupo 2: FRU, MOD e THI; Grupo 3: DEN e LIN.

A)

Bandas Exclusivas:		Bandas Compartilhadas entre:	
		Grupo 1	Grupo 3
Grupo 1	3	Grupo 2	4
Grupo 2	2	Grupo 3	3
Grupo 3	0	Grupo2/Grupo3	10

B)

Bandas Exclusivas:		Bandas Compartilhadas entre:	
		Grupo 1	Grupo 3
Grupo 1	3	Grupo 2	5
Grupo 2	5	Grupo 3	8
Grupo 3	9	Grupo2/Grupo3	15

Tabela 8: Distribuição de bandas de ISSR entre os táxons. Número de bandas exclusivas de cada grupo e de bandas compartilhadas entre os táxons:

Bandas Exclusivas:		Bandas Compartilhadas entre:					
		COR	FRU	MOD	THI	DEN	LIN
COR	3	COR	-				
FRU	0	FRU	0	-			
MOD	0	MOD	0	0	-		
THI	1	THI	0	0	1	-	
DEN	5	DEN	4	0	1	0	-
LIN	4	LIN	2	0	0	0	0

5.6. Identificação de espécie híbrida e de putativos parentais

A análise de detecção de espécie híbrida e obtenção de seus putativos parentais foi realizada a partir dos padrões de ISSR entre todos os putativos táxons parentais e a putativa espécie híbrida (COR), sendo considerado como possíveis parentais um táxon anual (DEN ou LIN) e um perene (FRU, MOD ou THI).

Segundo Zhou *et al.* (2005), critérios moleculares têm sido usados para determinar a probabilidade de uma espécie ser originada de uma hibridação. Diante disso, quatro pressupostos devem ser levados em consideração: (I) o número de bandas compartilhadas entre os possíveis parentais (P1-P2) deve ser igual ao número de bandas compartilhadas entre os parentais e a espécie híbrida (P1-P2-H); (II) o número de bandas compartilhadas exclusivamente entre o parental P1 e a espécie híbrida (P1-H) deve ser igual ao número de bandas exclusivas do parental P1; (III) o número de bandas compartilhadas exclusivamente entre o parental P2 e a espécie híbrida (P2-H) deve ser igual ao número de bandas exclusivas do parental P2 e (IV) a espécie híbrida não deve apresentar bandas exclusivas.

Dentre todos os pares de parentais testados neste trabalho (TABELA 9), DEN e FRU constituem os mais prováveis parentais de COR. No total, 18 bandas foram comuns à DEN e FRU e um número próximo, de 15 bandas foram comuns entre os três táxons, DEN, FRU e COR. Das nove bandas exclusivas de DEN, sete foram exibidas em COR e das 11 bandas exclusivas de FRU, oito foram encontradas em COR. Diante dos quatro pressupostos requeridos para uma espécie ser considerada híbrida (Zhou *et al.*, 2005), COR atendeu a três deles, porém foram detectadas seis bandas exclusivas nesta espécie, descartando a hipótese de COR ser uma espécie híbrida, originária de um cruzamento recente entre parentais anuais e perenes.

Tabela 9: Padrão de ISSR entre todas as putativas espécies parentais e a putativa espécie híbrida (COR).

N° de Bandas		N° de Bandas	
DEN-MOD	18	DEN-THI	19
DEN-MOD-COR	15	DEN-THI-COR	13
Exclusivas de DEN	16	Exclusivas de DEN	17
DEN-COR	07	DEN-COR	07
Exclusivas de MOD	15	Exclusivas de THI	14
MOD-COR	06	THI-COR	07
Exclusivas de COR	06	Exclusivas de COR	06

N° de Bandas		N° de Bandas	
DEN-FRU	18	LIN-MOD	16
DEN-FRU-COR	15	LIN-MOD-COR	14
Exclusivas de DEN	9	Exclusivas de LIN	09
DEN-COR	7	LIN-COR	06
Exclusivas de FRU	11	Exclusivas de MOD	20
FRU-COR	8	MOD-COR	09
Exclusivas de COR	6	Exclusivas de COR	08

N° de Bandas		N° de Bandas	
LIN-THI	17	LIN-FRU	15
LIN-THI-COR	13	LIN-FRU-COR	14
Exclusivas de LIN	11	Exclusivas de LIN	11
LIN-COR	06	LIN-COR	06
Exclusivas de THI	17	Exclusivas de FRU	15
THI-COR	07	FRU-COR	09
Exclusivas de COR	09	Exclusivas de COR	09

5.7. Hipóteses sobre a evolução do gênero *Dicerandra* e a origem de *D. cornutissima*

A complexidade na história evolutiva de *Dicerandra* é deduzida pelo complicado padrão filogeográfico do gênero com táxons hexaplóides simpátricos ou parapátricos com tetraplóides, extinção do táxon diplóide e populações de espécies perenes distribuídas entre os principais sistemas de refúgio ecológico da Flórida (Lake Wales Ridge e Costal Ridge) (Huck e Chamber, 1997). A região ocupada pelas populações dos diferentes táxons de *Dicerandra*, sofreu sucessivos distúrbios de *habitat*, com mudanças extremas de temperaturas decorrentes das glaciações e, sobretudo, na Flórida, pela sucessiva alternância no nível dos oceanos, que nos períodos interglaciais do Pleistoceno cobriram grande parte da península da Flórida, exceto pelas regiões de refúgio (White, 1970).

A primeira inferência sobre a divisão dos táxons de *Dicerandra* entre espécies anuais e perenes foi feita por Huck (1987) e revisada por Huck *et al.* (1989), que através de uma análise cladística com base em diversos parâmetros morfológicos, obtiveram um cladograma em que as espécies anuais e perenes eram claramente separadas. Um outro fator interessante observado por esses autores foi em relação à arquitetura de crescimento das espécies de *Dicerandra*. As espécies perenes apresentam padrão de desenvolvimento determinado das gemas florais, tal qual ocorre nas espécies anuais, diferindo contudo de outras espécies perenes (tais como as dos gêneros *Conradina* e *Calamintha*) que coabitam a mesma região e apresentam gemas florais de desenvolvimento indeterminado. Com base nestas observações e no cladograma obtido foi hipotetizado pelos autores que as espécies perenes evoluíram a partir de um ancestral anual comum.

Em um trabalho mais recente, sobre a poliploidia nas espécies de *Dicerandra*, Huck e Chambers (1997), verificaram que há espécies anuais e perenes com hexaploidia e tetraploidia e supõem que houve um ancestral comum diplóide já extinto entre os clados de perenes e anuais. De acordo com estes autores a hexaploidia evoluiu independentemente em ambos os grupos de anuais e perenes, sendo que dentro de um mesmo clado ou sub-clado, indivíduos hexaplóides têm origem mais recente que os tetraplóides.

Os autores especularam sobre a origem de *Dicerandra*, a partir de ancestrais diplóides na região sul dos Apalaches (*Appalachian province*) com movimentos em direção à Planície da Costa do Atlântico (*Atlantic Coastal Plain*). No final do Pleistoceno pode ter havido migrações dos diplóides ao norte e sul da região de refúgio nos Apalaches, podendo nesse processo ter iniciado a diferenciação entre perenes e anuais com a espécie hexaplóide *D. densiflora* evoluindo tardiamente e ocupando a antiga área conhecida como Suwanne (noroeste da Flórida). Porém, os mesmos autores não descartam a região central da Flórida como região de irradiação do gênero *Dicerandra* a partir dos refúgios da região *Lake Wales Ridge*.

Oliveira *et al.* (2007) em um trabalho com o gênero *Dicerandra* verificaram que *D. cornutissima* (COR) e *D. immaculata var savannarum* (SAV), dois táxons de ciclos perenes, foram alinhados no clado das anuais numa análise com genes cloroplastídicos, enquanto que numa análise com genes nucleares se alinharam no clado das perenes. Visando explicar as divergências quanto à classificação dos táxons supracitados, os autores suscitaram a duas hipóteses para a formação e evolução do gênero *Dicerandra*.

A primeira hipótese supõe um processo de hibridação entre um ancestral perene do sul e um ancestral anual do norte com captura do genoma cloroplastídico e posterior eliminação de parte do genoma nuclear das anuais.

A segunda hipótese é uma adaptação à hipótese de Huck (1987) e considera a existência de um ancestral comum, do qual linhagens distintas se originaram e se separaram em um evento relativamente rápido de diversificação seguido de um novo processo de adaptação ecológica e morfológica. Assim, um ancestral comum anual polimórfico para haplótipos cloroplastídicos migraram em direção ao sul trocando o modo de vida de anual para perene originando COR e SAV que se distinguem das outras perenes por possuírem um genoma cloroplastídico comum às espécies anuais.

No presente trabalho tentou-se ampliar a base de conhecimentos já existentes a cerca do gênero *Dicerandra*, e à luz dos resultados obtidos, discutir as hipóteses levantadas na literatura e com isso contribuir para a

elucidação do complexo relacionamento evolutivo entre os táxons deste gênero.

Uma das hipóteses levantada cogita a existência de espécies híbridas no processo de formação de alguns táxons de *Dicerandra*. A hibridação ou a formação de híbridos ocorre quando espécies diferentes se cruzam rompendo as barreiras reprodutivas (Futuyma, 2002). A troca de material genético entre táxons através da hibridação tem se constituído numa importante força evolutiva em uma grande variedade de plantas (Arnold, 1997) especialmente para as Angiospermas onde a maioria dos táxons existentes parece ter sido influenciada pela hibridação (Masterson, 1994).

O significado evolucionário da hibridação depende da aptidão do híbrido. Para a introgressão de genes de uma espécie em outra, a aptidão do híbrido deve ser alta o suficiente para que o híbrido sobreviva até a maturidade e haja retrocruzamentos com indivíduos paternos (Cattell e Karl, 2004).

O início da hibridação entre espécies taxonomicamente válidas resulta de um conjunto de forças, mas essencialmente envolve a mistura de gametas de espécies reprodutivamente compatíveis, sendo que, em muitas instâncias, a hibridação constitui-se em um evento altamente transitório sem nenhuma consequência evolutiva (Cattell e Karl, 2004). Alternativamente, repetidos cruzamentos entre espécies parentais, ou a estabilização do sistema híbrido produzido, podem resultar na formação de muitos híbridos, na formação de uma zona híbrida ou na formação de novas espécies híbridas (Ridley, 2006).

As zonas híbridas são regiões geográficas em que populações diferindo em várias ou muitas características, inter cruzam-se em maior ou menor extensão, produzindo híbridos (Futuyma, 2002; Dasmahapatra *et al.*, 2002).

A hibridação e as zonas híbridas têm sido consideradas como veículos para criação de novas espécies e adaptações, bem como mecanismos para aumento da diversidade genética, além de contribuir para o fortalecimento ou a redução das barreiras reprodutivas entre espécies (Arnold, 1997; Reiseberg, 1997).

A hipótese da formação de COR e SAV a partir de uma hibridação recente entre parentais anuais e perenes, tem a seu favor o fato de a maioria dos táxons de *Dicerandra* se encontrarem em ambientes que sofreram e em algumas regiões que ainda sofrem distúrbios e perturbações. Além disso, COR apresenta similaridades genotípicas com anuais e perenes e encontra-se geograficamente entre populações de táxons anuais e perenes. Semelhantemente duas variedades de *Piriqueta caroliniana* classificadas no passado como duas espécies diferentes, formam um complexo na península da Flórida com uma ampla zona composta por espécies híbridas em diferentes níveis de introgressão ao centro e espécies parentais ao sul e ao norte da península (Martin e Cruzan, 1999; Cruzan, 2005). De acordo com estes autores, a formação da zona híbrida está diretamente relacionada à fraca barreira reprodutiva entre os morfotipos e as perturbações e modificações no ambiente, relacionados ao período pós-glaciação que favoreceram a introgressão da espécie parental do sul em direção ao norte.

A hipótese de uma hibridação recente, contudo, mostra-se frágil diante dos resultados obtidos nos testes de hibridação, nos quais COR apresentou bandas exclusivas em relação a todos os cruzamentos entre os possíveis parentais, demonstrando uma especiação à parte, o que não condiz com o padrão de espécies híbridas. Além disso, COR é uma espécie tetraplóide e todos os possíveis parentais anuais (DEN e LIN) são hexaplóides, o que consiste em mais um obstáculo à teoria da hibridação.

Outra teoria a ser considerada, leva em conta a dispersão e a diversificação de linhagens, pressupondo um ancestral anual como mais antigo (Huck et al., 1989) ou um ancestral perene como mais antigo (Huck, 1987).

No primeiro caso (Figura 8), ancestrais anuais diplóides com haplótipos cloroplastídicos polimórficos (Oliveira et al., 2007) colonizavam regiões ao norte (como a região sul do Apalaches) (Figura 8 A) migrando para o sul durante períodos remotos de glaciação no Pleistoceno. Desses ancestrais, parte colonizou áreas de refúgios na região conhecida como Appalachicola e as planícies costeiras ao norte da Flórida (dando origem a LIN) (Figura 8 B) e parte alcançou a região peninsular central da Flórida (LWR) (Figura 8 C) dando, posteriormente num período mais recente,

origem as perenes (FRU, THI e MOD). Em algum ciclo subsequente de glaciação, ancestrais anuais, (talvez ancestral de DEN), alcançaram a região central da Flórida e novamente se diferenciaram no ancestral perene de COR (Figura 8 D). O ganho de ploidia deve ter ocorrido concomitantemente ao processo de especiação.

Esta teoria equaciona bem o compartilhamento de bandas, os dendrogramas e em parte as diferenças de ploidia, porém dados de identidade genética apontam COR como espécie mais próxima das perenes que das anuais. Além disso, não explica bem como COR teria adquirido a herança genômica nuclear compartilhada com as perenes (FRU, THI e MOD).

No segundo caso (Figura 9), perenes seriam mais antigas habitando em períodos remotos as regiões de refúgio da Flórida Central. Nesse caso, ancestrais diplóides de COR (e conseqüentemente COR), com haplótipos cloroplastídicos polimórficos, seriam mais antigos, sendo que, populações com um tipo de haplótipo cloroplastídico colonizariam regiões ao norte durante períodos interglaciais (Figura 9 A), enquanto que, populações com um outro tipo de haplótipo cloroplastídico se diversificariam nas demais perenes (FRU, MOD e THI) (Figura 9 B). As populações do norte, como adaptação ao novo ambiente, se tornariam anuais.

Essa teoria também equaciona o compartilhamento de bandas, os dendrogramas e em parte as diferenças de ploidia. Além disso, explica bem como COR teria adquirido a herança genômica nuclear compartilhada com as perenes (FRU, THI e MOD), supostamente mais recentes.

Uma última hipótese (Figura 10) seria a alternância entre processos de dispersão e pelo menos um processo de hibridação mais remoto. Nesse caso, ancestrais diplóides anuais migrariam do norte em direção ao sul com um grupo alcançando o norte da Flórida (Figura 10 A), o qual se diferenciaria nas anuais e um grupo colonizando a região central da Flórida, o qual se diversificaria em perenes (Figura 10 B). Em um período interglacial de expansão dos ancestrais perenes diplóides, estes podem ter alcançado regiões mais ao norte doando pólen para um ancestral materno diplóide (Figura 10 C), num processo de hibridação baseado na dispersão de pólen a longas distâncias como descrito por Modliszewski *et al.* (2006) entre

espécies do gênero *Aesculus*. Assim, seria formado o ancestral comum de COR (Figura 10 D) que se diversificaria (obtendo “bandas” exclusivas em relação aos parentais) paralelamente à divisão das ancestrais perenes nos táxons THI, MOD e FRU. Embora, as perenes (THI, MOD e FRU) estejam limitadas atualmente a áreas restritas ao sul da LWR, provavelmente tiveram momentos de expansão, como já descrito para FRU, que num passado não muito distante chegou a colonizar áreas ao norte da Flórida até ao sul de LWR (White, 1970).

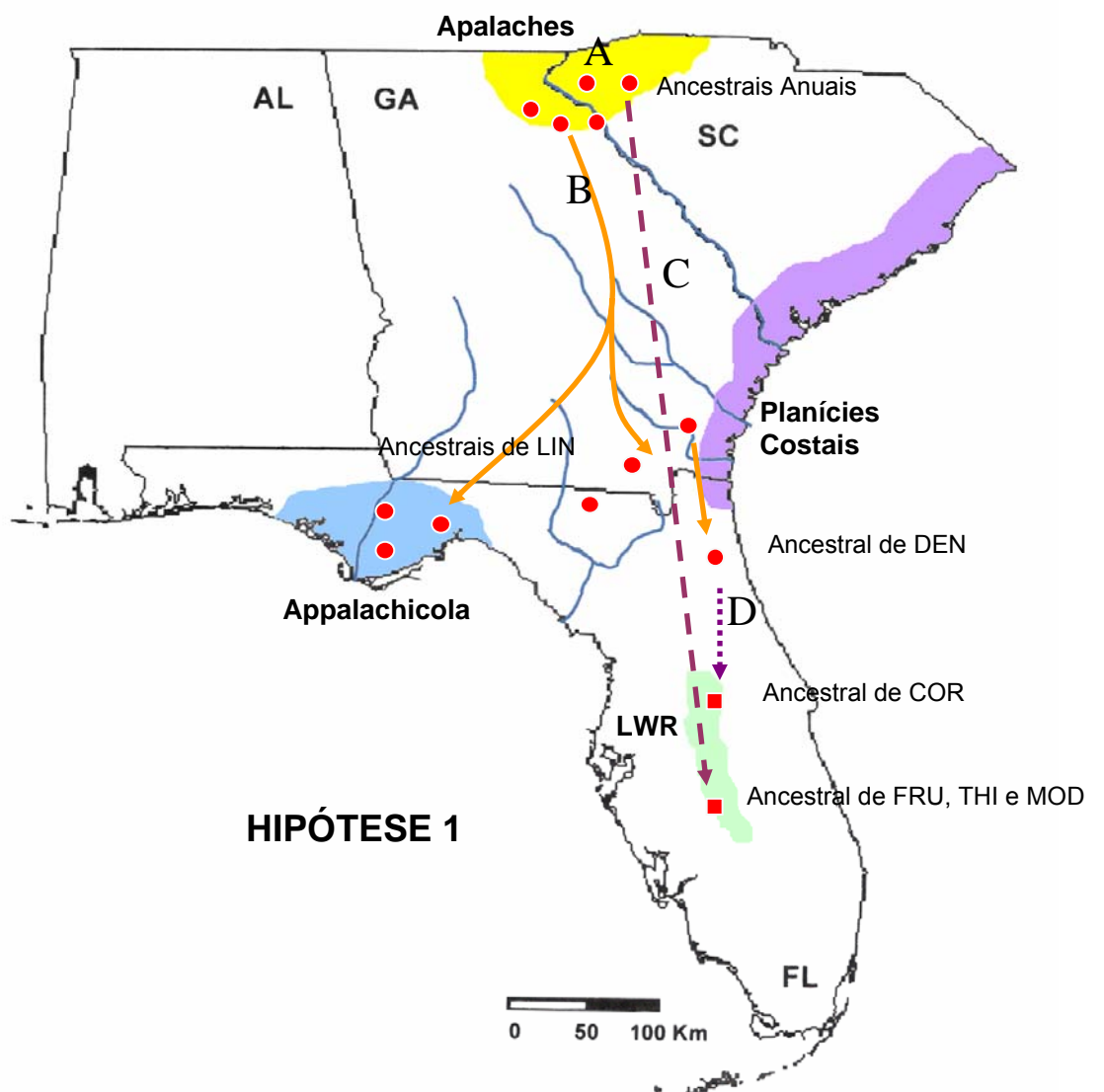


Figura 8: Esquema da Hipótese 1 - Espécies anuais originaram as perenes através de dispersão, onde A, B, C e D simbolizam a sucessão dos eventos. AL: Alabama; GA: Geórgia; SC: Carolina do Sul; FL: Flórida, LWR: Lake Wales Ridges.

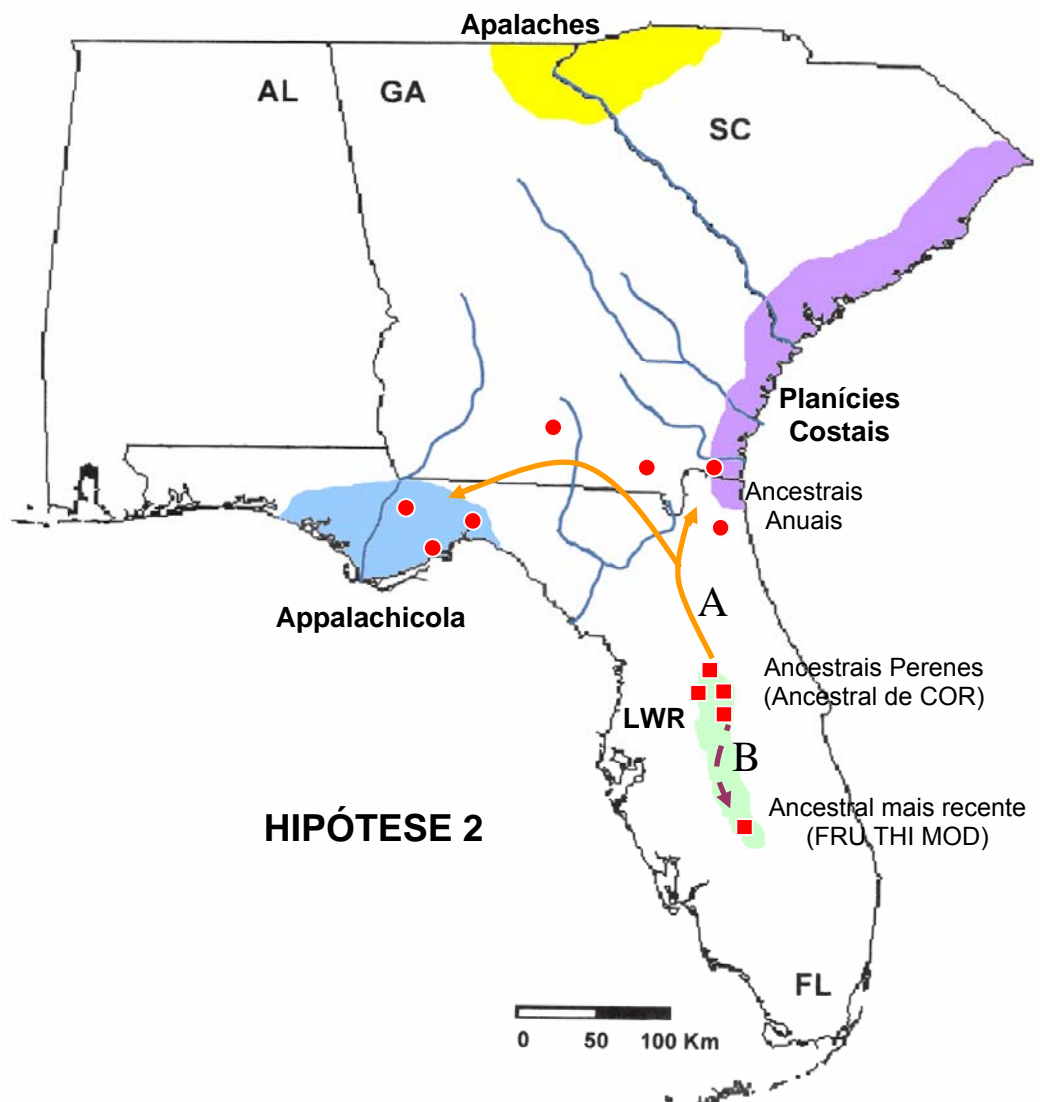


Figura 9: Esquema da Hipótese 2 - Espécies perenes originaram as anuais por dispersão onde A e B simbolizam a sucessão dos eventos. AL: Alabama; GA: Geórgia; SC: Carolina do Sul; FL: Flórida, LWR: Lake Wales Ridges.

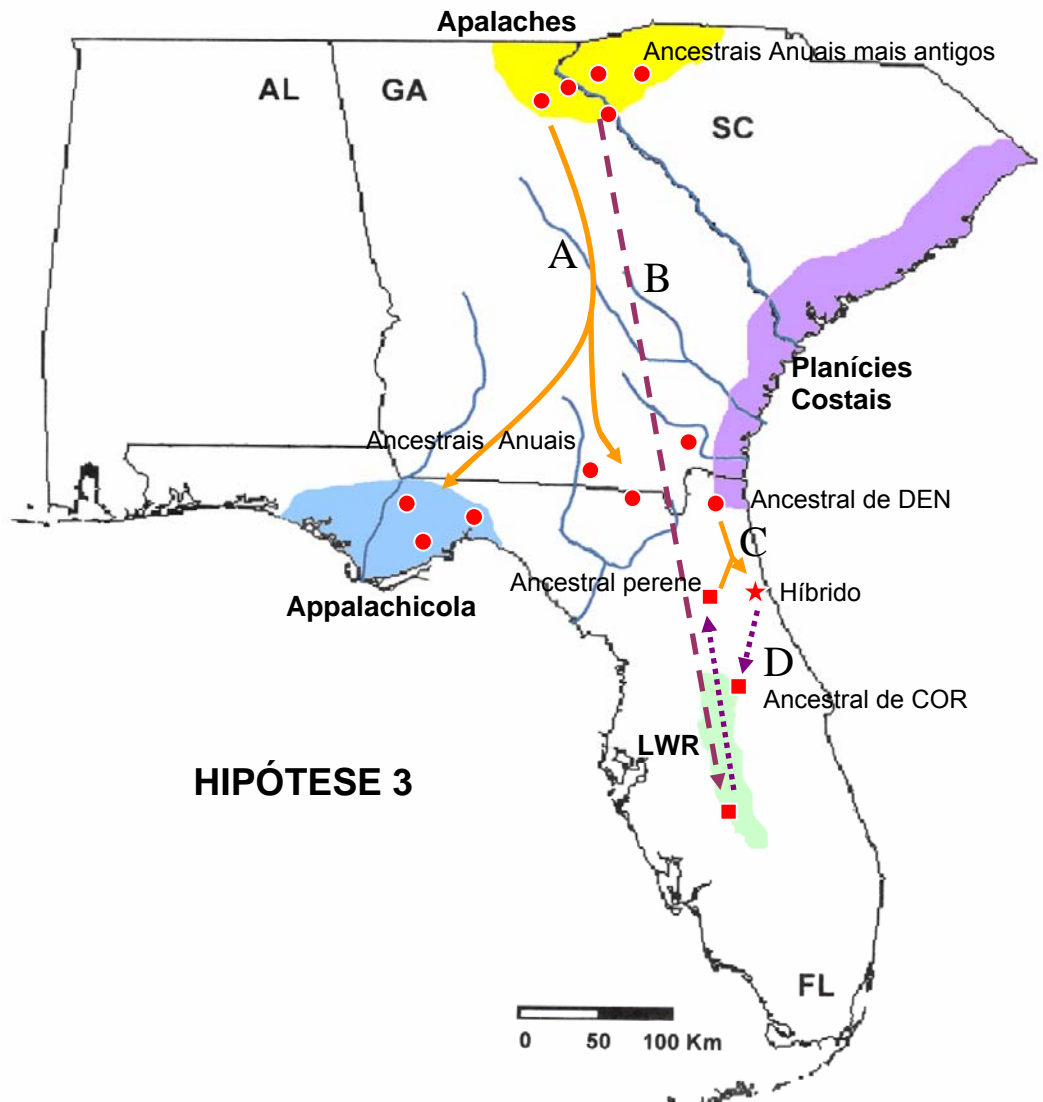


Figura 10: Esquema da Hipótese 3 - Espécies anuais originaram as perenes pela alternância entre processos de dispersão e hibridação, onde A, B, C e D simbolizam a sucessão dos eventos. AL: Alabama; GA: Geórgia; SC: Carolina do Sul; FL: Flórida, LWR: Lake Wales Ridges.

5.8. Implicações para conservação

A conservação de espécies vegetais raras e ameaçadas de extinção requer o entendimento de sua estrutura genética e da biologia da população. O estudo da conservação genética sugere que a diversidade genética influencia significativamente a persistência e a viabilidade a longo prazo de espécies locais (Frankham, 1996; Vrijenhoek, 1994). Dessa forma, o conhecimento dos padrões geográficos da diversidade genética e a manutenção da variabilidade genética, dentro das espécies raras e ameaçadas de extinção, são essenciais para o desenvolvimento de estratégias de conservação e restauração e definição de locais de prioridade para a conservação (Pressey *et al.*, 1993; Ramp *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos ao longo desse trabalho demonstraram que a variação genética encontrada entre os táxons de ciclo perene, FRU, MOD e THI, foi muito pequena, mostrando serem muito similares entre si. Assim torna-se difícil elaborar uma escala de prioridades, em termos de conservação, levando-se em consideração a biodiversidade. Entretanto, considerando-se a restrição de indivíduos, MOD requer maiores cuidados de conservação, já que possui menor distribuição geográfica de suas populações. Entre os táxons de ciclo anual, DEN por apresentar maior variabilidade genética em comparação com LIN e menor número de populações, merece maior prioridade. Entretanto, dentre os três grupos pesquisados, COR constitui o táxon de maior importância para programa de conservação, por representar um táxon, dentro do gênero, com complicações evolutivas, apresentando ciclo de vida perene, porém contendo a combinação de material genético nuclear e cloroplastídico de origem anual. Dessa forma, uma importante estratégia para a conservação de COR, é proteger *in situ* a maioria de suas populações, e prevenir a destruição antrópica, permitindo-lhes propagar e aumentar o tamanho de suas populações, através da regeneração natural.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- Os marcadores ISSR foram eficientes no estudo de diversidade genética entre os seis táxons de *Dicerandra* analisados, detectando 100% de polimorfismo.
- O grupo dos táxons de ciclo anual apresenta maior variabilidade genética e maior diferenciação entre os táxons constituintes em comparação com o grupo dos táxons de ciclo perene (excluindo COR), inferindo que os táxons perenes são muito mais próximos entre si. Entretanto, COR aumenta a variabilidade das perenes.
- A diversidade genética não está associada à distribuição dos táxons, visto que nem todos os táxons mais amplamente distribuídos apresentaram maior diversidade genética e nem os mais restritos apresentaram menor diversidade.
- O grupo dos táxons das perenes, com a exclusão de COR teve mais de 60% da variação genética total associada à variabilidade entre indivíduos dentro dos táxons, enquanto que os táxons de ciclo anual tiveram a variação genética total igualmente dividida entre a variação entre táxons e entre os indivíduos dentro dos táxons.
- COR apresenta não somente genoma cloroplastídico originado de ancestrais anuais, como detectado por outros pesquisadores, mas também parte do genoma nuclear oriundo de ancestral anual, existindo porém uma maior proximidade do genoma nuclear de COR com os táxons de ciclo perene.
- COR parece ser uma das espécies-chave, num eventual programa de conservação já que apresenta alta diversidade, e características advindas de anuais e perenes, além de maior complexidade evolutiva.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A.; NAKAMURA, A.; FUJIMURA, T. A co-dominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, Rf-1, identified with inter-SSR fingerprinting. *Genome*, 39: 1205-1209, 1996.

ANDREASEN, K.; BALDWIN, B.G. Unequal evolutionary rates between annual and perennial lineages of checker mallows (*Sidalcea*, Malvaceae): evidence from 18S –26S rDNA internal and external transcribed spacers. *Molecular Biology Evolution*, 18(6): 936-944, 2001.

ARNOLD, M.L. Natural hybridization and evolution. New York, USA: Oxford University Press. 1997.

ARCADE, A.; ANSELIN, F.; RAMPANT, P.F.; LESAGE, M.C.; PAQUES, L.E.; PRAT, D. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 299-307, 2000.

ASSEFA, K.; MERKER, A.; TEFERA, H. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic diversity in tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. *Hereditas*, 139: 174-183, 2003.

BARTH, S; MELCHINGER, A.E.; LUBBERSTED, T. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, 11: 495-505, 2002.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B. de; BRITO, G.G. de; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). Marcadores moleculares. Viçosa: UFV, p.9-78, 2006.

CANTINO, P. D. Evidence for a polyphyletic origin of the *Labiatae*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79: 361–379, 1992.

CATTELL, M.V.; KARL, S.A. Genetics and morphology in a *Borrchia frutescens* and *B. arborescens* (Asteraceae) hybrid zone. *American Journal of Botany*, 91 (11): 1757- 1766, 2004.

CHEN, J.; CI, X.; LI, Q.; LI, J. Genetic diversity of *Litsea szemaois*, an endangered species endemics to China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). *Biodiversity Science*, 14 (5): 410-420, 2006.

CRUZAN, M.B. Patterns of introgression across an expanding hybrid zone: analyzing historical patterns of gene flow using nonequilibrium approaches. *New Phytologist*, 167: 267-278, 2005.

DASMAHAPATRA, K.K.; BLUM, M.J.; AIELLO, A.; HACKWELL, S.; DAVIES, N.; BERMINGHAM, E.P.; MALLET, J. Inferences from a rapidly moving hybrid zone. *Evolution*, 56 (4): 741-753, 2002.

DEYRUP, M.; MENGES, E.S. Pollination ecology of the rare scrub mint *Dicerandra frutescens* (Lamiaceae). *Florida Scient*, 60 (3) :137-142, 1997.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11–15, 1987.

EISNER, T.; MCCORMICK, K. D; SAKAINO, M; EISNER, M.; SMEDLEY, S. R.; ANESHANSLEY, D. J.; DEYRUP, M.; MYERS, R. L.; MEINWALD, J. Chemical defense of a rare mint. *Journal of Chemoecology*, 1: 30–37, 1990.

EVANS, M. E. K; MENGES, E. S; GORDON, D. R. Mating systems and limits to seed production in two *Dicerandra* mints endemic to Florida scrub. *Biodiversity and Conservation*, 13: 1819–1832, 2004.

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

FRANKHAN, R. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*, 10: 1500-1508, 1996.

FUTUYMA, D.J. *Biologia Evolutiva*. 2ed. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 631p. 2002.

GODWIN, I.D.; AITKEN, E.A.B.; SMITH, L.M Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18: 1524-1528, 1997.

GONZÁLEZ-ASTORGA, J.; CASTILLO-CAMPOS, G. Genetic variability of the narrow endemic tree *Antirhea aromatica* Castillo-Campos and Lorence (Rubiaceae, Guettardeae) in a tropical forest of Mexico. *Annals of Botany*, 93: 521-528, 2004.

GOSTIMSKY, S.A.; KOKAEVA, Z.G.; BOBROVA, V.K. Use of molecular marker for the analysis of plant genome. *Research Journal of Genetics*, 11 (35): 1538-1549, 1999.

GUPTA M.; CHYI, Y.-S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 998–1006, 1994.

HAMRICK, J. L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. (Eds. Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L.; Weir, B.S.). Sinauer Associates, Inc., Massachusetts. 43-63, 1989.

HELENURM, K. High levels of genetic polymorphism in the insular endemic herb *Jepsonia malvifolia*. *Journal of Heredity*, 92: 427-432, 2001.

HUANG, J.; SUN, S.M. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (Convolvulaceae) as

revealed by inter- simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 1050-1060, 2000.

HUCK, R. B. Two new infraspecific taxa in Florida *Dicerandra* (Labiatae). *NOVON*, 11: 417-420, 2001.

HUCK, R. B.; CHAMBERS, H. L. Polyploidy: A factor in the evolution of *Dicerandra* Benth. (Labiatae). *Edinburgh. Journal of Botany*, 51: 217-229, 1997.

HUCK, R. B. Overview of pollination biology in the Lamiaceae. In: HARLEY, R. M.; REYNOLDS, T. (Eds) *Advances in Labiate Science*. London, Royal Botanic Gardens, 167-181, 1992.

HUCK, R. B.; JUDD, W. S.; WHITTEN, W. M.; SKEAN, J. D. JR.; WUNDERLIN, R. P.; DELANEY, K. R. A new *Dicerandra* (Labiatae) from the Lake Wales Ridge of Florida, with a Cladistic Analysis and discussion of endemism. *Systematic Botany*, 14(2): 197-213, 1989.

HUCK, R. B. Systematics and evolution of *Dicerandra* (Labiatae). *Phanerogamarum Monographiae*, 19: 1-343, 1987.

JOSHI, S.P.; GUPTA, V.S.; AGGARWAL, R.K.; RANJEKAR, P.K.; BRAR, D.S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 1311-1320, 2000.

KARP, A.; SEBERG, O.; BUIATTI, M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany*, 78: 143-149, 1996.

KRAL, R. Some notes on *Dicerandra* (Lamiaceae). *SIDA*, 9(3): 238-262, 1982.

LAROCHE, J.; BOUSQUET, J. Evolution of the mitochondrial *rps3* intron in perennial and annual angiosperms and homology to *nad5* intron 1. *Molecular Biology Evolution*, 16: 441-452, 1999.

LI, W. G.; SHEN, J.J.; WANG, J.B. Genetic diversity of the annual weed *Monochoria vaginalis* in southern China detected by random amplified polymorphic DNA and inter-simple sequence repeat analyses. *Weed Research*, 45. 424-430, 2005.

LIU, B.; WENDEL, J.F. Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes*, 1:205-208, 2001.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L.; FOSTER, R. B. Population structure and mating system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. *Heredity*, 81: 134-143, 1998.

LOVELESS, M. D. ;HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15: 65–95, 1984

MANTEL, N.A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220, 1967.

MARTIN, J.P; SANCHEZ-YELAMO, M.D. Genetic relationships among species of the genus *Diplotaxis* (Brassicaceae) using inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*,101: 1234-1241, 2000.

MARTIN, L.J; CRUZAN, M.B. Patterns of hybridization in the *Piriqueta caroliniana* complex in central Florida: evidence for an expanding hybrid zone. *Evolution*, 53: 1037-1049, 1999.

MASTERSON, J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of Angiosperms. *Science*, 264: 421-423, 1994.

MENGES, E.S.; DOLAN, R.W.; YAHR, R.; GORDON, D.R. Comparative genetics of seven plants endemic to Florida's Lake Wales Ridge. *Catanea*, 66 (1-2): 98:114, 2001.

MCCORMICK, K. D.; DEYRUP, M. A.; MENGES, E. S.; WALLACE, S. R.; MEINWALD, J.; EISNER, T. Relevance of chemistry to conservation of isolated populations: The case of volatile leaf components of *Dicerandra* mints. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90: 7701-7705, 1993

MODLISZEWSKI, J.L.; THOMAS, D.T.; FAN, C.; CRAWFORD, D.J.; PAMPHILIS, C.W.; XIANG, Q. Ancestral chloroplast polymorphism and historical secondary contact in a broad hybrid zone of *Aesculus* (Sapindaceae). *American Journal of Botany*, 93 (3): 377-388, 2006.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsattellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3: 175-182, 1993.

NAGAOKA, T.; OGIHARA, Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 597-602, 1997.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 70: 3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590, 1978.

O'HANLON, P.C.; PEAKALL, R.; BRIESE D.T. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) reveals introgression in weedy *Onopordum* thistles: hybridization and invasion. *Molecular Ecology*, 8: 1239-1246, 1999.

OLIVEIRA, L. O.; HUCK, R. B.; GITZENDANN, M.A.; JUDD, W.S.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. Molecular phylogeny, biogeography and systematics of

Dicerandra (Lamiaceae), a genus endemic to the Southeastern United States. *American Journal of Botany*, 94: 1017-1027, 2007.

PRESSEY, R.I.; HUMPHRIES, C.J.; MARGULES, C.R.; VANE-WRIGHT, R.I.; WILLIAMS, P.H. Beyond opportunism: Key principles for systematic reserve selection. *Trends in Ecology and Evolution*, 8: 124-128, 1993.

PREVOST, A.; WILKINSON, M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 107-112, 1999.

RAMP, J. M; COLLINGE, S. K.; RANKER, T. A. Restoration genetics of the vernal pool endemic *Lasthenia conjugens* (Asteraceae). *Conservation Genetics*, 7 (5): 631-649, 2006.

RATNAPARKHE, M. B; TEKEOGLU, M; MUEHLBAUER, F. J. Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 515-519, 1998.

REDDY, M. P; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its applications plant breeding. *Euphytica*, 128: 9-17, 2002.

RIDLEY, M. Evolução. 3 ed. Porto Alegre: Artmed. 752p. 2006.

RIESEBERG, L.H. Hybrid origins of plants species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28: 359-389, 1997.

SMITH, J.F.; PHAM, T.V. Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, 83 (6): 717-729, 1996.

SORRIE, B. A.; WEAKLEY, A. S. Coastal plain vascular plant endemics: Phylogeographic patterns. *Castanea*, 66: 50–82, 2001.

THORNE, R. F. Classification and geography of flowering plants. *Botanical Review*, 58: 225-348, 1992.

U.S. FISH AND WILDLIFE SERVICE. South Florida multi-species recovery plan. Atlanta, Georgia. 2172 p, 1999.

VRIJENHOEK, R.C. Genetic diversity and fitness in small populations. In: (Loescheche, V.; Tomiuk, J. and Jain, S.K. Eds). Berlin,,: Birkhauser Verlag. *Conservation Genetics*; 37-54, 1994.

XIAO, L-Q.; GE, X.G; HAO, G.; ZHENG, S-X. ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany*, 94: 133-138, 2004.

XIE, G.-W.; WANG, D.-L.; YUAN, Y.-M.; GE, X.-J. Population genetic structure of *Monimopetalum chinense* (Celastraceae) an endangered endemic species of eastern China. *Annals of Botany*, 95: 773-777, 2005

XUE, D-W; GE, X-J.; HAO, G.; ZHANG, C-Q. High genetic diversity in a rare, narrowly endemic primrose species: *Primula interjacens* by ISSR analysis. *Acta Botanica Sinica*, 46(10): 1163-1169, 2004.

WAGSTAFF, S. J.; OLMSTEAD, R. G.; CANTINO, P. D. Parsimony analysis of cpDNA restriction site variation in subfamily Nepetoideae Labiatae. *American Journal of Botany*, 82: 886–892, 1995.

WANG, G.; MAHALINGAN, R.; KNAP, H.T. (C-A) and (G-A) anchored simple sequence repeats (ISSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 1086-1096, 1998.

WANG, Z.; WEBER, J.L.; ZONGH, G.; TANKSELY, S.D. Survey of plant

short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 88 1-6, 1994.

WHITE, W. H. The geomorphology of the Florida peninsula. Geological Bulletin. 51. Tallahassee: Florida Dept. of Natural Resources. 1970.

WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In Soltis, D.E.; Soltis, P.S.; Doyle, J.J., Eds. Molecular systematics of plants. II. DNA sequencing. Norwell: Kluwer Academic Publishers, p.43–86, 1998.

WU, K.; JONES, R.; DANNAEBERGER, L.; SCOLNIK, P.A. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acid Research*,. 22: 3257-3258, 1994.

ZIEKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) -anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176–183, 1994

ZHOU, R.; SHI, S.; WU, C. Molecular criteria for determining new hybrid species - An application to the *Sonneratia* hybrids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35: 595- 601, 2005.