

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLOS AUGUSTO VANA

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE UMA ESPÉCIE APOMÍTICA,
LEANDRA AUSTRALIS (CHAM.) COGN., DO ESTADO DO PARANÁ**

CURITIBA

2010

CARLOS AUGUSTO VANA

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE UMA ESPÉCIE APOMÍTICA,
LEANDRA AUSTRALIS (CHAM.) COGN., DO ESTADO DO PARANÁ**

Monografia apresentada ao departamento de Botânica como requisito parcial à conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria Cunha Muschner
Co-orientador: Prof. Dr. Renato Goldenberg

CURITIBA

2010

RESUMO

Melastomataceae Juss. é uma família que compreende entre 4200 e 4500 espécies. O gênero *Leandra* Raddi, que pertence à tribo Miconiae, apresenta cerca de 200 espécies, 50 delas no estado do Paraná. Em *Leandra australis* (Cham.) Cogn., vem sendo registrada a ocorrência de frutos apomíticos. Apomixia é um tipo de reprodução assexuada que consiste na formação de sementes viáveis sem que haja a fecundação. Entretanto, a apomixia pode coexistir com graus de reprodução sexuada. A detecção de polimorfismos é importante para que se saiba o quanto esse tipo de reprodução assexuada afeta a variabilidade genética da espécie. Devido à ocorrência já reportada de apomixia nesta espécie, procurou-se investigar se há variabilidade genética dentro e entre seis populações do Estado do Paraná, a partir de marcadores moleculares ISSR. Foram analisados três *primers* de ISSR e o produto da amplificação foi submetido à eletroforese horizontal e posteriormente codificado para presença ou ausência de bandas homólogas. Com isso, a variabilidade genética foi inferida a partir de estimativas de porcentagem de bandas polimórficas, índice de diversidade de Nei (H), heterozigosidade, além de comparações de distância genética e AMOVA. Os índices de variabilidade genética encontrados foram elevados dentro das populações e baixos entre elas. O *primer* ISSR11 apresentou os maiores índices de *loci* polimórficos e também os maiores valores do índice de diversidade de Nei. A variabilidade genética em espécies apomíticas pode ser o resultado, principalmente, de uma taxa residual de reprodução sexuada e de mutações. Em estudos futuros, espera-se trabalhar com progênies originadas de polinização controlada, bem como com análises cromossômicas, para a obtenção de outros dados que ajudem a elucidar a elevada variabilidade genética encontrada nessa espécie apomítica.

Palavras-chave: Melastomataceae. Miconiae. Apomixia. Diversidade genética.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – FOTOGRAFIA DA ESPÉCIE <i>Leandra australis</i>	9
FIGURA 2 – INDIVÍDUOS DE <i>L. australis</i> NO CENTRO POLITÉCNICO DA UFPR.....	13
FIGURA 3 – INDIVÍDUOS DE <i>L. australis</i> EM CAMPO LARGO.....	14
FIGURA 4 – GEL DE AGAROSE MOSTRANDO OS PRODUTOS DA PCR COM O PRIMER ISSR11 PARA AS PLANTAS DA POPULAÇÃO DO PARQUE BARIGÜI.....	17
FIGURA 5 – GEL DE AGAROSE MOSTRANDO OS PRODUTOS DA PCR COM O PRIMER ISSR20 PARA AS PLANTAS DA POPULAÇÃO DO CENTRO POLITÉCNICO.....	18
FIGURA 6 – DENDROGRAMA BASEADO NAS DISTÂNCIAS GENÉTICAS DE NEI (1972) PELO MÉTODO DE UPGMA.....	21

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS.....	15
TABELA 2 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS, NÚMERO E PORCENTAGEM DE BANDAS POLIMÓRFICAS ENCONTRADOS PARA CADA POPULAÇÃO, POR <i>PRIMER</i> , DE <i>L. australis</i>	19
TABELA 3 – NÚMERO DE ALELOS OBSERVADOS (MÉDIA E DESVIO PADRÃO), NÚMERO EFETIVO DE ALELOS (MÉDIA E DESVIO PADRÃO) E VALORES DE DIVERSIDADE GÊNICA DE NEI (MÉDIA E DESVIO PADRÃO) ENCONTRADOS NAS POPULAÇÕES DE <i>L. australis</i> AMOSTRADAS.....	19
TABELA 4 – VALORES DE HETEROZIGOSIDADE OBSERVADA (H_o) E ESPERADA (H_s) E G_{st} PARA AS POPULAÇÕES DE <i>L. australis</i> , POR <i>PRIMER</i>	19
TABELA 5 – AMOVA PARA TODAS AS POPULAÇÕES DE <i>L. australis</i> AMOSTRADAS.....	20
TABELA 6 – VALORES DE IDENTIDADE GENÉTICA (ACIMA DA DIAGONAL) E DISTÂNCIA GENÉTICA DE NEI (ABAIXO DA DIAGONAL) PARA O <i>PRIMER</i> ISSR13 NAS POPULAÇÕES AMOSTRADAS DE <i>L. australis</i> ...	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1 A Família Melastomataceae.....	6
1.2 O gênero <i>Leandra</i>	8
1.3 <i>Leandra australis</i>	9
1.4 Variabilidade genética.....	10
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Coleta do material.....	13
3.2 Extração de DNA.....	14
3.3 Marcadores ISSR.....	15
3.4 Análise de dados.....	16
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	22
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1 INTRODUÇÃO

1.1 A FAMÍLIA MELASTOMATACEAE

A família Melastomataceae Jussieu apresenta entre 150 e 166 gêneros, distribuídos em 9 tribos (RENNER, 2004). A maior tribo, Miconieae, compreende cerca de 2200 espécies, em 30 gêneros. Essa tribo é caracterizada por ter frutos suculentos e ovários parcialmente ou totalmente ínferos (MICHELANGELI *et al.*, 2004). Melastomataceae possui de 4200 a 4500 espécies, sendo que, destas, cerca de 3000 encontram-se em ecossistemas tropicais e subtropicais americanos (RENNER, 1993). As plantas têm folhas caracterizadas pela venação foliar bem pronunciada, com uma veia mediana e de um a quatro pares de veias longitudinais subparalelas (RENNER, 1989). As flores geralmente nascem como inflorescências paniculadas bem desenvolvidas. A maioria das flores, tetrâmeras ou pentâmeras, é perígina ou epígina. Os estames ante-pétalos geralmente são maiores que os ante-sépalos, provavelmente relacionados a algum papel na polinização. Em plantas que possuem anteras poricidas, existem um ou dois poros nas anteras. Além disso, o tamanho e a posição dos poros também podem variar (GOLDENBERG *et al.*, 2003). Os grãos de pólen em Melastomataceae são geralmente lisos, pequenos e livres, embora, gêneros como *Tococa* e *Miconia*, possam apresentar grãos de pólen agrupados em tétrades ou políades (PATEL *et al.*, 1984).

A separação do pólen e do estigma nas flores de Melastomataceae e a necessidade de um vetor para manipular as anteras e liberar o pólen favorecem o sistema reprodutivo xenógamo (RENNER, 1989). Dessa forma, a polinização é efetuada, em muitas espécies, por abelhas, que, através de movimentos vibratórios, extraem o pólen das anteras (BUCHMANN, 1983), sendo que as vibrações de baixa frequência, como as produzidas pelo vento, não são suficientes para liberar o pólen. Além do pólen, outros atrativos para as abelhas em Melastomataceae compreendem odores doces provenientes das pétalas, do conectivo e da porção superior do estilete e a presença de uma plataforma de pouso no androceu. O modo de polinização em Melastomataceae, entretanto, depende do tipo de recompensa oferecido pela planta:

pólen ou néctar. Flores que oferecem apenas o pólen são polinizadas exclusivamente por abelhas, devido à morfologia das anteras. Já as flores que oferecem também o néctar possuem uma quantidade maior de polinizadores, como vespas, moscas, beija-flores, morcegos e roedores (RENNER, 1989; VARASSIN *et al.*, 2008).

Aproximadamente 60% das Melastomataceae neotropicais possuem frutos do tipo baga, pequenos e suculentos, dispersados por endozoocoria. A posição, o tamanho, o aroma e a cor do fruto indicam qual grupo animal fará a dispersão das sementes (RENNER, 1989). Os outros 40% das Melastomataceae neotropicais possuem frutos capsulares e sementes dispersadas pelo vento, sendo que essas espécies são mais frequentemente encontradas em savanas (RENNER, 1986).

Dentro da tribo Miconieae, que compreende, entre outros, os gêneros *Miconia*, *Leandra* e *Clidemia*, é comum a ocorrência da apomixia (GOLDENBERG & SHEPHERD, 1998). Apomixia é um tipo de reprodução assexuada, onde a produção de embriões viáveis em sementes, a partir da planta-mãe, ocorre sem que antes aconteça a polinização. Os indivíduos formados por sementes de plantas apomíticas são geneticamente iguais à planta-mãe, já que não ocorre a fecundação (GOLDENBERG & SHEPHERD, 1998). Goldenberg & Varassin (2001) constataram a produção de frutos apomíticos no gênero *Leandra*, como nas espécies *L. australis*, *L. melastomoides* e *L. purpurascens*.

Tal característica pode não estar tão relacionada a hábitos e habitat da planta, mas, aparentemente, está mais relacionada a processos como hibridação e poliploidia (GOLDENBERG, 2000). A possível relação entre hibridações e poliploidia e o fenômeno de apomixia faz com que as espécies apomíticas tenham uma menor viabilidade do pólen (GRANT, 1981). Além disso, dentro da tribo Miconieae, o sistema de auto-incompatibilidade é bastante comum (GOLDENBERG & SHEPHERD, 1998), fato que ocorre em muitos outros grupos apomíticos (RICHARDS, 1986).

Na natureza, a apomixia geralmente coexiste com alguns graus de reprodução sexuada. Extremos ambientais, como duração do dia e estresse pelo calor ou pelo frio, podem ter alguma influência no balanço entre a reprodução sexuada e a apomixia, embora isso não seja universal (JEFFERSON & BICKNELL, 1996).

As Melastomataceae apomíticas ocorrem em diversas áreas da América tropical, com habitats bem variados. São reportadas em savanas, florestas e áreas pantanosas, sendo que a maioria é representada por espécies arbustivas ou pequenas árvores (GOLDENBERG & SHEPHERD, 1998).

A apomixia pode apresentar às plantas que possuem esse tipo de reprodução algumas vantagens, tais como a fixação do genótipo heterozigoto e eliminação de perdas relacionadas à fertilização, como falhas na polinização (JEFFERSON & BICKNELL, 1996). Em contrapartida, a apomixia reduz as taxas de recombinação (SAVIDAN, CARMAN & DRESSELHAUS, 2001).

Outro problema frequentemente encontrado em espécies apomíticas é a variação na fertilidade do pólen, que pode acontecer, principalmente, devido a irregularidades meióticas. Além disso, o pólen proveniente de espécies apomíticas é geralmente irregular tanto em tamanho como em forma, quando comparado a espécies que se reproduzem sexuadamente. A fertilidade do pólen em Melastomataceae pode variar consideravelmente, porém não necessariamente em espécies apomíticas (GOLDENBERG & SHEPHERD, 1998).

1.2 O GÊNERO *LEANDRA*

O gênero *Leandra* Raddi. pertence à tribo Miconieae, possui aproximadamente 200 espécies, encontradas desde as Antilhas até o sul da Argentina (COGNIAUX, 1891), sendo que 50 são encontradas no estado do Paraná (CAMARGO & GOLDENBERG, 2007). As espécies desse gênero possuem folhas opostas, sésseis ou pecioladas. As inflorescências são terminais (MARTIN *et al.*, 2008), embora também possam ocorrer inflorescências pseudo-axilares (GOLDENBERG *et al.*, 2005). O cálice possui uma coloração que varia de verde a avermelhado e as pétalas, triangulares, variam de brancas a rosadas. O ovário é ínfero e 3-5-locular (CAMARGO *et al.*, 2009) e os frutos são carnosos, do tipo bacídio e polispérmicos (BAUMGRATZ, 2005).

Trabalhos como o de Martin *et al.*, (2008) sobre a filogenia do gênero *Leandra* mostraram que o grupo tem origem polifilética. O gênero é dividido em seções, como, por exemplo, *Secundiflorae* (na América Central e no Caribe), *Tschudya* (norte da

América do Sul e do Brasil) (MARTIN *et al.*, 2008) e *Niangae*, na qual está inserida a espécie *Leandra australis* (MARTIN & MICHELANGELI, 2009).

1.3 LEANDRA AUSTRALIS

Conhecida popularmente como pixirica, a espécie *Leandra australis* (Cham.) Cogn. (FIGURA 1) geralmente mede de meio a dois metros e é caracterizada como arbustiva ou subarbustiva. Os ramos jovens são cilíndricos e possuem indumento hirsuto. Suas folhas são pecioladas, inteiras, opostas e oblongo-ovadas, membranáceas e 5-7 nervadas. As inflorescências são paniculadas, oblongo-piramidadas. As flores não possuem pedicelo e suas pétalas são brancas. As anteras são amarelas e medem de 2,5 a 3,8 mm e seu ovário é 3-locular. Os frutos são do tipo baga e apresentam muitas sementes do tipo angulado-piramidada (CAMARGO *et al.*, 2009).



FIGURA 1 – FOTOGRAFIA DA ESPÉCIE *Leandra australis*

FONTE: O autor (2010)

O período de florescimento de *L. australis* é de outubro a março e a espécie geralmente ocorre em orla de matas e capoeiras (CAMARGO *et al.*, 2009). Esta espécie já foi reportada como sendo apomítica (GOLDENBERG & VARASSIN, 2001), e

experimentos preliminares realizados em Curitiba (R. Goldenberg, dados não publicados) mostram a ocorrência de populações com produção de frutos apomíticos e estames totalmente estéreis, não tendo sido encontrado nestas antera alguma com pólen fértil.

1.4 VARIABILIDADE GENÉTICA

Em plantas, estudos sobre variabilidade genética têm sido importantes para o entendimento da estrutura das populações e, conseqüentemente, para o estabelecimento de programas de manejo e melhoramento genético das espécies (BARBOSA NETO *et al.*, 2000). No caso de espécies apomíticas, a detecção de polimorfismos entre populações ou entre indivíduos da mesma população pode mostrar o quanto a variabilidade genética é afetada por esse tipo de reprodução assexuada (DALL'AGNOL & SCHIFINO-WITTMANN, 2005).

Trabalhos utilizando marcadores genéticos já foram realizados no gênero *Leandra*, para estabelecer relações filogenéticas, como o estudo feito por Martin *et al.*, (2008), utilizando os espaçadores internos transcritos do DNA nuclear ribossomal (nrITS).

Uma importante ferramenta para o estudo da variabilidade genética dentro de espécies é a análise de sequências repetitivas (CULLEY & WOLFE, 2001). Microsatélites ou SSRs (*simple sequence repeats*) são sequências curtas com dez a 20 pares de base (bp). Estas unidades mostram organização em *tandem* que representam loci hipervariáveis (expressados como variantes diferentes dentro de populações e entre espécies diferentes), onde as variações surgem devido a diferenças no número de unidades repetidas, formando um arranjo de repetições. Essas regiões são caracterizadas por repetições de um, dois ou três nucleotídeos (p.ex. AA..., ou AG..., CGA..., que têm quatro a dez unidades repetidas em *tandem*). Uma técnica conhecida como ISSR (*inter-simple sequence repeats*) permite a detecção de SSRs derivados de polimorfismos diretamente do genoma sem a necessidade de isolar e caracterizar estas sequências.

Os marcadores ISSR são gerados a partir de uma reação de PCR (*polymerase chain reaction*) com um único *primer* que pode ter motivos repetidos di ou trinucleotídeos com uma sequência ancoradora de um a três nucleotídeos (GUPTA *et al.*, 1994; ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994). A incorporação destas seqüências ancoradoras elimina artefatos de *strand-slippage* (deslizamento das fitas). Estas seqüências ancoradoras são geralmente aleatórias e devem incluir bases nucleotídicas redundantes (p.ex. R [pirimidinas], Y [purinas]). As regiões amplificadas representam a seqüência nucleotídica entre dois sítios SSR orientados em direções opostas. A premissa é que as regiões SSR estão dispersas no genoma (CONDIT & HUBBELL, 1991) e que as chances de amplificar entre duas regiões adjacentes dentro dos limites da processividade da *Taq* DNA polimerase é suficientemente maior que o grande número de bandas polimórficas que serão geradas (WOLFE *et al.*, 1998).

As principais vantagens dos marcadores ISSR são: 1) não requerem informações prévias de seqüência de DNA da espécie-alvo; 2) produzem fragmentos com grande reprodutibilidade, quando comparados a outros marcadores com base em PCR não-específico como RAPD (*random amplified polymorphism DNA*), por exemplo; 3) requerem pouca infra-estrutura em termos de equipamento de laboratório para a execução dos experimentos, sendo uma técnica barata (quando comparada ao sequenciamento de DNA); 4) tem-se demonstrado de grande utilidade para avaliação de diversidade genética e estruturação populacional em plantas (p. ex. ANGELONE *et al.*, 2007; DONG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

Este trabalho visa avaliar a variabilidade genética de *Leandra australis* (Cham.) Cogn. em seis áreas no estado do Paraná, utilizando-se marcadores moleculares ISSR. Devido à ocorrência já reportada de apomixia nesta espécie, procurou-se investigar se há variabilidade dentro e entre as populações analisadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DO MATERIAL

Foram coletadas amostras de seis populações de *Leandra australis*, em diferentes localidades do Paraná. As áreas de coleta compreendem os seguintes pontos: Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba (“**UFPR**”, 25°26’S, 49°14’O, UPCB 67095) [Figura 2], Jardim Botânico, em Curitiba (“**JB**”, 25°26’S, 49°14’O, UPCB 64361), Parque Barigüi, em Curitiba (“**PB**”, 25°25’S, 49°18’O, UPCB 27459), Estrada da Roseira, em Piraquara (“**PIR**”, 25°35’S, 49°10’O, UPCB 44813), Reserva do Rio Cachoeira, em Antonina (“**ANT**”, 25°19’S, 48°40’O, UPCB 67557) e Campo Largo, (“**CL**”, 25°27’S, 49°30’O, UPCB 68302) [Figura 3].



FIGURA 2 – INDIVÍDUOS DE *L. australis* NO CENTRO POLITÉCNICO DA UFPR

FONTE: O autor (2010)

Foram coletados de 11 a 26 indivíduos em cada área, dependendo da disponibilidade de indivíduos da espécie nos locais. A distância mínima entre os indivíduos coletados foi de 5 metros, para evitar a coleta de clones. De cada indivíduo, foram coletadas duas folhas, que foram acondicionadas em sílica gel para posterior extração do DNA.



FIGURA 3 – INDIVÍDUOS DE *L. australis* EM CAMPO LARGO

FONTE: O autor (2010)

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA

Depois de desidratadas em sílica gel, as folhas coletadas foram pulverizadas com nitrogênio líquido em almofariz e o DNA foi extraído pela técnica de Roy *et al.*, (1992) com algumas modificações. Cerca de 20 miligramas de material pulverizado foi transferido para um tubo de microcentrífuga, onde foram adicionados 600 microlitros de

tampão de extração [CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; β -mercaptoetanol 0,2% (v/v), PVP-40 2%], 60 μ l de β -mercaptoetanol e 6 μ l de Proteinase K (10mg/ml). Os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C por 30 minutos, sendo adicionado, posteriormente, o mesmo volume de fenol:clorofórmio (1:1; v/v). O tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante transferido para um novo tubo, onde foram adicionados igual volume de isopropanol e 1/10 do volume de acetato de sódio. Após 24 horas em freezer (-18°C), o tubo foi centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado com 200 μ l de etanol 70%, seco a temperatura ambiente por 20 minutos e eluído em 200 μ l de água ultra-pura estéril e 2 μ l de RNase (10 mg/ml).

O DNA foi avaliado e quantificado através de fluorespectrofotômetro (NanoDrop 3300).

3.3 MARCADORES ISSR

Inicialmente foram analisados sete *primers* descritos por Wolfe *et al.*, (1998), seguindo o mesmo protocolo.

TABELA 1 – SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS

Primer	Sequência (5' - 3')
ISSR 2	(CA) ₇ YG
ISSR 4	(GT) ₇ YG
ISSR 7	(CAC) ₄ RC
ISSR 10	(GA) ₇ YC
ISSR 11	(CTC) ₄ RC
ISSR 13	(GA) ₈ YT
ISSR 20	(AC) ₇ RG

FONTE: O autor (2010)

Os fragmentos de ISSR amplificados, com a mesma mobilidade de acordo com o peso molecular, foram codificados para presença ou ausência de bandas homólogas.

Dentre os *primers* testados, três foram analisados, pois os outros não amplificaram. Para cada *primer* analisado, as concentrações de reagentes ideais foram,

para um volume final de 25 µl: ISSR11 (30 ng de DNA, 0,5 µM de *primer*, tampão 1x, 3 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTP, 1,5 unidade de *Taq* DNA polimerase), ISSR13 (20 ng de DNA, 0,6 µM de *primer*, tampão 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTP, 1 U de *Taq* DNA polimerase, 24,8 µg/µl de BSA) e ISSR20 (20 ng de DNA, 0,5 µM de *primer*, tampão 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTP, 1 U de *Taq* DNA polimerase, 24,8 µg/µl de BSA). As seguintes condições foram utilizadas para a amplificação das amostras: Desnaturação inicial a 94°C por 1,5 minuto; 40 ciclos [94°C por 45 segundos, 46°C (ISSR11 e ISSR13) ou 44°C (ISSR20) por 45 segundos, 72°C por 1,5 minutos], com extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto da reação foi submetido a eletroforese horizontal, a 100 Volts, em gel de agarose 2%, tampão TBE 1x (89,9 mM de Trisbase, 89,9 mM de ácido bórico, 2,49 mM de EDTA) por 3 horas e 30 minutos. Após, o gel foi colocado em um banho de brometo de etídeo (0,8 µg/ml) por 30 minutos para corar e, em seguida, teve sua imagem capturada por um aparelho de fotodocumentação com luz ultravioleta. O tamanho das bandas homólogas (em pares de base) foi comparado com marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

Ao todo, foram realizadas 65 reações de PCR e géis para os testes ao longo do estudo.

Para analisar a presença ou ausência de bandas homólogas, foi utilizado o programa Gel Analyzer (<http://www.gelanalyzer.com>). A partir desses dados, a variabilidade genética foi estimada através do programa POPGENE (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/>), calculando: porcentagem de bandas polimórficas (PPB), heterozigiosidade e índice de diversidade gênica (H).

Comparações de distância genética interpopulacional e AMOVA (*Analysis Of Molecular Variance*) foram realizados no pacote Arlequin versão 2.0 (<http://anthropologie.unige.ch/arlequin>).

4 RESULTADOS

Dos três *primers* utilizados para as análises, somente o ISSR13 amplificou para todas as populações coletadas. O *primer* ISSR11 (Figura 4) amplificou somente para as populações UFPR, PB e JB. As populações PIR, ANT e CL não amplificaram em nenhum dos testes realizados. Novas extrações do DNA dos indivíduos dessas populações foram realizadas, porém, o resultado ainda foi negativo. Para os indivíduos da população CL, os tricomas (tectores) das folhas foram retirados antes de serem macerados, para descartar a possibilidade de que os mesmos pudessem liberar compostos secundários, fenólicos e polissacarídeos que inibissem a reação, já que esses podem representar um problema no isolamento e purificação do DNA vegetal por inibirem a atividade da *Taq* DNA polimerase (MOLINARI & CROCHEMORE, 2001). Ainda assim, não houve amplificação para esse *primer*. Já o *primer* ISSR20 (Figura 5) amplificou somente para os indivíduos das populações UFPR, CL e PIR.

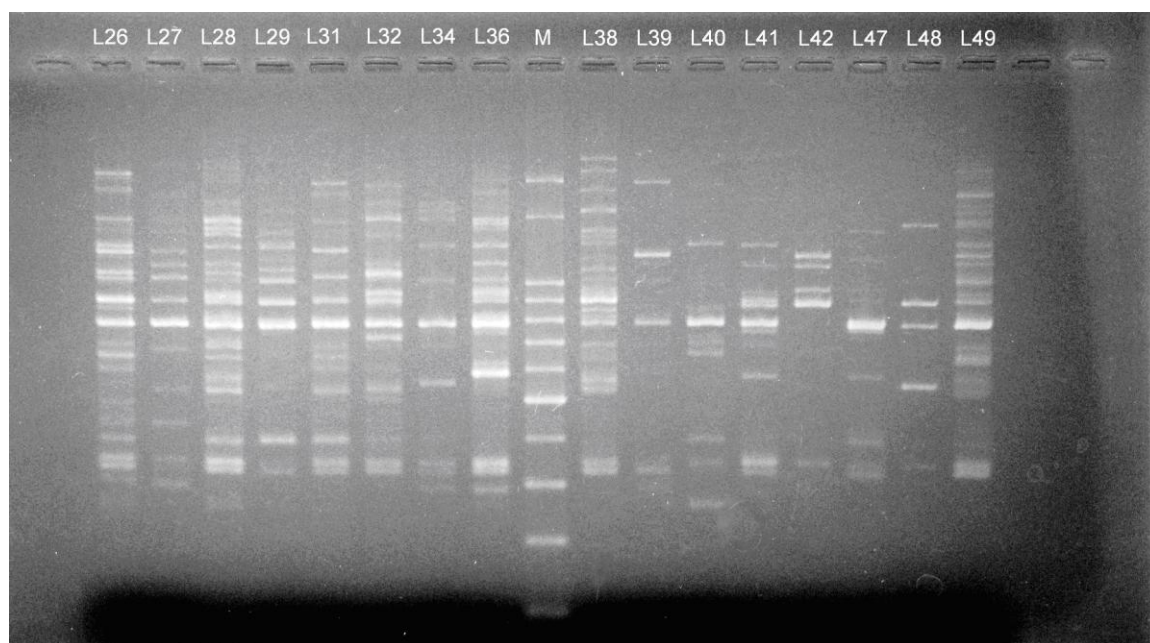


FIGURA 4 – GEL DE AGAROSE MOSTRANDO OS PRODUTOS DA PCR COM O *PRIMER* ISSR11 PARA AS PLANTAS DA POPULAÇÃO DO PARQUE BARIGÜI. “M” REPRESENTA A COLUNA DO MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100 BP)



FIGURA 5 – GEL DE AGAROSE MOSTRANDO OS PRODUTOS DA PCR COM O *PRIMER* ISSR20 PARA AS PLANTAS DA POPULAÇÃO DO CENTRO POLITÉCNICO. “M” REPRESENTA A COLUNA DO MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100 BP)

Os outros *primers* testados foram ISSR2, ISSR4, ISSR7, ISSR10. Os *primers* ISSR2 e ISSR4 não resultaram em amplificação do material, mesmo com modificações nas concentrações de reagentes e utilizando diferentes temperaturas de anelamento. Com ISSR7 e ISSR10, houve amplificação, mas, mesmo em diferentes condições, o resultado não foi satisfatório, por gerar sempre bandas de baixa intensidade (*primer* ISSR7) ou pela formação excessiva de dímeros de *primer* (ISSR10).

As análises foram realizadas separadamente para cada *primer*, pois o número de populações foi variável para cada um deles (Tabela 2). A construção de uma matriz englobando os três *primers*, resultaria em uma matriz com um excessivo número de dados faltantes, reduzindo, consideravelmente, o número de sítios analisáveis.

Para os três *primers* analisados, o que apresentou maior porcentagem de bandas polimórficas foi o ISSR11 (Tabela 2), bem como os maiores índices de diversidade gênica de Nei (1973) [Tabela 3]. Os valores de *Gst* e os valores de heterozigidade observada e esperada estão apresentados na Tabela 4. A partir desses dados pode-se observar a baixa variabilidade genética entre as populações,

sendo que a maior parte desta é encontrada dentro das populações, como demonstrado pela análise de AMOVA ($P < 0,001$) [Tabela 5].

TABELA 2 - NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS, NÚMERO E PORCENTAGEM DE BANDAS POLIMÓRFICAS ENCONTRADOS PARA CADA POPULAÇÃO, POR *PRIMER*, DE *L. australis*

		CP	PB	PI	JB	RC	CL
Número de indivíduos analisados	ISSR11	12	16	-	11	-	-
	ISSR13	15	16	10	14	7	14
	ISSR20	15	-	9	-	-	14
Número de bandas polimórficas	ISSR11	37	39	-	34	-	-
	ISSR13	27	38	23	35	21	35
	ISSR20	26	-	14	-	-	26
Porcentagem de bandas polimórficas	ISSR11	86,05%	90,70%	-	79,07%	-	-
	ISSR13	58,70%	82,61%	50,00%	76,09%	45,65%	76,09%
	ISSR20	60,47%	-	32,56%	-	-	60,47%

FONTE: O autor (2010)

TABELA 3 - NÚMERO DE ALELOS OBSERVADOS (MÉDIA E DESVIO PADRÃO), NÚMERO EFETIVO DE ALELOS (MÉDIA E DESVIO PADRÃO) E VALORES DE DIVERSIDADE GÊNICA DE NEI (MÉDIA E DESVIO PADRÃO) ENCONTRADOS NAS POPULAÇÕES DE *L. australis* AMOSTRADAS

		CP	PB	PI	JB	RC	CL
Número de amostras	ISSR11	12	16	-	11	-	-
	ISSR13	15	16	10	14	7	14
	ISSR20	15	-	9	-	-	14
Número observado de alelos	ISSR11	1,86 ± 0,35	1,90 ± 0,29	-	1,79 ± 0,41	-	-
	ISSR13	1,59 ± 0,50	1,83 ± 0,38	1,50 ± 0,51	1,76 ± 0,43	1,46 ± 0,50	1,76 ± 0,43
	ISSR20	1,60 ± 0,49	-	1,33 ± 0,47	-	-	1,60 ± 0,49
Número efetivo de alelos	ISSR11	1,35 ± 0,30	1,29 ± 0,28	-	1,17 ± 0,16	-	-
	ISSR13	1,12 ± 0,17	1,15 ± 0,15	1,13 ± 0,18	1,14 ± 0,14	1,15 ± 0,23	1,21 ± 0,22
	ISSR20	1,13 ± 0,19	-	1,08 ± 0,15	-	-	1,12 ± 0,15
Índice de diversidade de Nei (H)	ISSR11	0,22 ± 0,16	0,19 ± 0,15	-	0,13 ± 0,10	-	-
	ISSR13	0,09 ± 0,12	0,12 ± 0,09	0,10 ± 0,12	0,12 ± 0,09	0,10 ± 0,14	0,15 ± 0,13
	ISSR20	0,10 ± 0,11	-	0,06 ± 0,10	-	-	0,09 ± 0,10

FONTE: O autor (2010)

TABELA 4 – VALORES DE HETEROZIGOSIDADE OBSERVADA (H_o) E ESPERADA (H_s) E G_{st} PARA AS POPULAÇÕES DE *L. australis*, POR *PRIMER*

<i>Primer</i>	H_o	H_s	G_{st}
ISSR13	0.1188; 0.0096	0.1119; 0.0079	0.0582
ISSR11	0.1970; 0.0157	0.1820; 0.0117	0.0763
ISSR20	0.0892; 0.0064	0.0838; 0.0056	0.0601

FONTE: O autor (2010)

TABELA 5 – AMOVA PARA TODAS AS POPULAÇÕES DE *L. australis* AMOSTRADAS

<i>Primer</i>	Fonte da variação	Soma dos quadrados	% variação
ISSR11	Entre populações	28,74	9,69
	Entre indivíduos da mesma população	217,82	90,31
	Total	246,56	
ISSR13	Entre populações	28,76	2,14
	Entre indivíduos da mesma população	316,30	97,86
	Total	345,06	
ISSR20	Entre populações	14,41	8,85
	Entre indivíduos da mesma população	114,41	91,15
	Total	128,82	

FONTE: O autor (2010)

Foram também realizadas comparações entre as populações a cerca da identidade e distância genética (Tabela 6; Figura 6), somente com o *primer* ISSR13, pois foi o único que amplificou para todas as populações analisadas. Embora tenhamos analisado somente um *primer* para esse tipo de inferência, a população ANT, que fica separada das demais pela Serra do Mar, foi a que se apresentou mais diferenciada das demais.

TABELA 6 – VALORES DE IDENTIDADE GENÉTICA (ACIMA DA DIAGONAL) E DISTÂNCIA GENÉTICA DE NEI (ABAIXO DA DIAGONAL) PARA O *PRIMER* ISSR13 NAS POPULAÇÕES AMOSTRADAS DE *L. australis*

População	CP	PB	PI	JB	RC	CL
CP	---	0,9965	0,9968	0,9938	0,9847	0,9912
PB	0,0035	---	0,9961	0,9933	0,9846	0,9934
PI	0,0032	0,0039	---	0,9929	0,9881	0,9929
JB	0,0062	0,0067	0,0071	---	0,9804	0,9911
RC	0,0155	0,0155	0,0120	0,0198	---	0,9863
CL	0,0088	0,0067	0,0071	0,0090	0,0138	---

CP= Centro Politécnico; PB= Parque Barigüi; PI= Piraquara; JB= Jardim Botânico; RC= Reserva Cachoeira; CL= Campo Largo

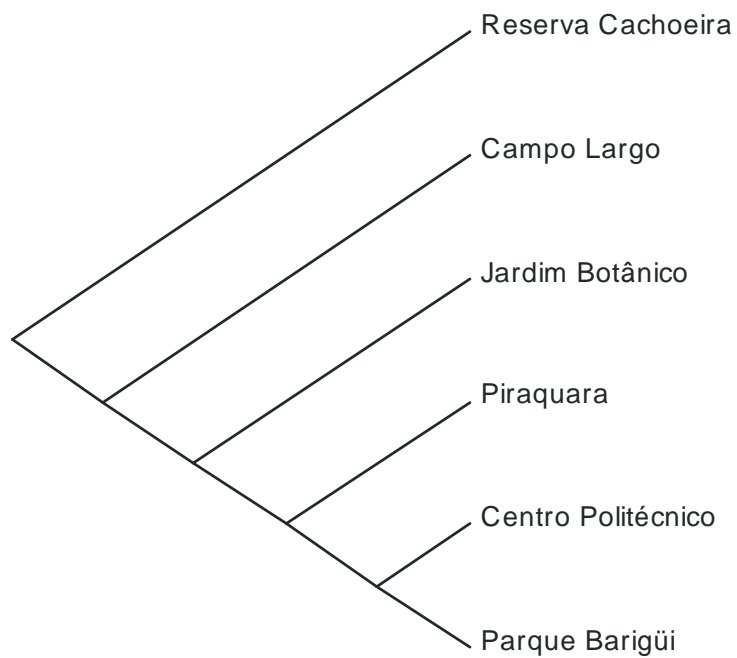


FIGURA 6 – DENDROGRAMA BASEADO NAS DISTÂNCIAS GENÉTICAS DE NEI (1972) PELO MÉTODO DE UPGMA, MOSTRANDO AS RELAÇÕES ENTRE AS POPULAÇÕES AMOSTRADAS DE *L. australis* PARA O *PRIMER* ISSR13. AS DISTÂNCIAS GENÉTICAS UTILIZADAS ESTÃO SUMARIZADAS NA TABELA 6

5 DISCUSSÃO

Em um primeiro momento, parece difícil explicar por que espécies apomíticas são mantidas na natureza. Supostamente, essas espécies deveriam apresentar uma baixa variabilidade genética (ou até mesmo ausência dessa) devido ao seu modo de reprodução, pois processos evolutivos, tais como seleção e deriva, deveriam ter um pequeno papel nessas populações (STEBBINS, 1950). Uma explicação plausível para a manutenção de espécies apomíticas na natureza está relacionada com a oferta de recursos aos polinizadores: *L. australis* não apresenta estruturas relacionadas com a produção de néctar e, além disso, a porcentagem de grãos de pólen viáveis é baixíssima (GOLDENBERG & VARASSIN, 2001; PINTO *et al.*, 2003). Portanto, se a planta não oferece recurso ao polinizador (pólen e/ou néctar) o mesmo não a visitará, tornando imprescindível uma estratégia para driblar essa situação: a apomixia.

Embora os níveis de variabilidade genética entre as populações tenham sido baixos, os valores foram bastante elevados dentro das populações amostradas de *L. australis*. Em plantas, padrões de diversidade maiores dentro de uma população são comuns, mas uma diversidade tão grande como a encontrada em uma espécie apomítica pode indicar algum grau de reprodução sexuada (HÖRANDL & PAUN, 2007). Em espécies apomíticas facultativas, a diversidade genética pode ser atribuída a diferentes fatores, como a recombinação gênica resultante da reprodução sexuada e, em menor escala, através de mutações (HOULISTON & CHAPMAN, 2004).

Segundo Hörandl & Paun (2007), o impacto das mutações na diversidade genética é mais baixo do que a encontrada devido à recombinação facultativa em espécies apomíticas, mas pode ser mais frequente e melhor distribuído geograficamente. Mutações são importantes para gerar a diversidade genotípica, principalmente pelo seu caráter de acúmulo gradual e contínuo de modificações. A respeito de efeitos deletérios causados pelas mutações, costuma-se dizer que eles são uma das causas para o baixo potencial evolutivo na reprodução assexuada, no entanto, em curto prazo, o impacto que as mutações deletérias exercem é muito baixo (HÖRANDL & PAUN, 2007).

Espécies apomíticas podem ter um pequeno grau de reprodução sexuada, como em *Ranunculus auricomus*, por exemplo. Foi verificado nessa espécie que a aposporia (quando células somáticas do óvulo dão origem, por divisões mitóticas, a um saco embrionário não reduzido) é controlada por um único fator dominante com efeitos recessivos letais. Dessa forma, indivíduos apomíticos devem ser heterozigotos para o fator da aposporia. Isso permite que a reprodução sexuada não seja totalmente eliminada em espécies apomíticas, levando até mesmo à geração de indivíduos completamente recombinados sexuadamente (NOGLER, 1984).

No estudo de Houlston & Chapman (2004), foram analisadas sementes para inferir o grau de reprodução sexuada encontrada na espécie *Hieracium pilosella*, uma Asteraceae, apomítica facultativa. Como resultado, de 0,2 a 2,7% das sementes germinadas nos três anos de estudo tiveram origem sexual. Goldenberg & Varassin (2001), estudando a espécie *L. australis*, não constataram a formação de frutos provenientes de polinização cruzada a partir de polinização controlada, sendo que, em 18 flores marcadas, 90% delas formaram frutos provenientes de apomixia. Além disso, também analisaram a viabilidade do pólen para a espécie, sendo que a porcentagem de grãos viáveis encontrados foi de 4 a 4,9%. Dessa forma, a probabilidade de ocorrer reprodução sexuada nessa espécie parece ser baixa, não significando, entretanto, que seja inexistente. Uma baixa taxa de recombinação genética pode estar ocorrendo e, somada às mutações, pode explicar a alta variabilidade genética encontrada dentro das populações.

A poliploidia parece também ter um papel importante para a manutenção da variabilidade genética em espécies apomíticas. Apomíticos diploides são raros na natureza, como os que ocorrem em algumas linhagens da Rosaceae *Potentilla argentea* (DALL'AGNOL & SCHIFINO-WITTMANN, 2005). Foi verificado que parentes diploides de indivíduos poliploides são geralmente sexuais. Em *Ranunculus auricomus*, observou-se que o fator para a apomixia é transmitido apenas por gametas diploides e não por haploides (aqueles produzidos por indivíduos diploides). A apomixia não se expressa no nível diploide devido a não transmissão do fator apomítico por gametas haplóides (NOGLER, 1982). Goldenberg & Shepherd (1998) estudaram onze espécies de Melastomataceae e relataram poliploidia naquelas que produziram frutos apomíticos.

Nada se conhece sobre o número cromossômico de *L. australis*, no entanto, Almeida & Chuang (1992) sugerem que os gêneros da tribo Miconieae tenham origem autotetraploide.

É possível também que parte da variabilidade encontrada seja devida à dispersão. Como as sementes de *L. australis* são dispersas por pássaros, que podem deslocar-se por longas distâncias, é aceitável que eles possam visitar mais de uma população, visto que as populações analisadas na cidade de Curitiba e região metropolitana se distanciam, no máximo, em 20 km. A única população que apresentou uma diferença genética maior em relação às demais foi a da Reserva do Cachoeira (ANT). Isso é justificável, visto que ela é a mais distante das demais e ainda possui a Serra do Mar como barreira física.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As prováveis explicações para o aparecimento de tamanha variabilidade genética em *Leandra australis* são reprodução sexuada residual, mutações e dispersão das sementes. Mais estudos devem ser realizados, principalmente com polinizações controladas, para obtenção de dados mais conclusivos.

Para este trabalho, foi iniciado um estudo marcando algumas flores no Centro Politécnico da UFPR para posterior germinação das sementes. Esse estudo visava analisar a variabilidade genética da progênie, ou seja, indivíduos gerados por apomixia na espécie. Isso mostraria se esses indivíduos são iguais à planta-mãe ou não. Mas as sementes obtidas no tratamento não germinaram, descontinuando o estudo. Futuramente, isso pode ser retomado, não só no Centro Politécnico, como também em outras populações.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F.; CHUANG, T. I. **Chromossome numbers and their systematic significance in some Mexican Melastomataceae.** Syst. Bot., v. 17, n. 4, p. 583-593, 1992.
- ANGELONE, S.; HILFIKER, K.; HOLDEREGGER, R.; BERGAMINI, A.; HOEBEE, S. E. **Regional population dynamics define the local genetic structure in *Sorbus torminalis*.** Mol. Ecol., v. 16, p. 1291-1301, 2007.
- BARBOSA NETO, J. F.; MATIELLO, R. R.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, J. M. S.; PEGORARO, D. G.; SCHNEIDER, F.; SORDI, M. E. B.; VACARO, E. **Progresso genético no melhoramento da aveia-branca no Sul do Brasil.** Pesq. Agropec. Bras., Brasília, v. 35, n. 8, p. 1605-1612, 2000.
- BAUMGRATZ, J. F. A.; SOUZA, M. R.; **Duas novas espécies de *Leandra* Raddi (Melastomataceae) para o Estado de São Paulo, Brasil.** Acta Bot. Bras., v. 19, n. 3, p. 573-578, 2005.
- BUCHMANN, S. L. Buzz pollination in Angiosperms. *In: Handbook of experimental pollination biology* (C.E. Jones & R.J. Little, eds.). Van Nostrand Reinhold, New York, p.73-113, 1983.
- CAMARGO, E. A.; GOLDENBERG, R. **O gênero *Leandra*, seção *Leandraria* (Melastomataceae) no Paraná.** Iheringia Série Botânica, v. 62, n. 1, p. 105-113, 2007.
- CAMARGO, E. A.; SOUZA, C. M. F.; CADDAH, M. K.; GOLDENBERG, R. **O gênero *Leandra*, seções *Carassanae*, *Chaetodon*, *Niangae*, *Oxymeris* e *Secundiflorae* (Melastomataceae) no estado do Paraná.** Rodriguésia, p. 595-631, 2009.
- COGNIAUX, A. Melastomataceae. *In: De Candolle, A.; De Candolle, C. (eds.). Monographiae Phanerogamarum.* v. 7, p. 1-1256, 1981.
- CONDIT, R.; HUBBELL, S. P. **Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes.** Genome, v. 34, p. 66-71, 1991.
- CULLEY, T. M.; WOLFE, A. D. **Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers.** Heredity, v. 86, p. 545-556, 2001.
- DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. **Apomixia, genética e melhoramento de plantas.** R. bras. Agrociência, Pelotas, v.11, n. 2, p. 127-133, 2005.
- DONG, Y. -H., CHEN, J. -M; GITURU, R. W.; WANG, Q. -F. **Gene flow in populations of the endangered fern *Ceratopteris pteridoides* in China as revealed by ISSR markers.** Aquat. Bot., v. 8, p. 69-74, 2007.

GOLDENBERG, R.; SHEPHERD, G. J. **Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in cerrado vegetation.** Plant Systematics and Evolution, v. 211, p. 13-29, 1998.

GOLDENBERG, R. Apomixia como alternativa à reprodução sexuada em Melastomataceae. *In: Tópicos Atuais em Botânica* (T.B. Cavalcanti & B.M.T.Walter, eds.). EMBRAPA Recursos Genéticos, Brasília, p. 225- 230, 2000.

GOLDENBERG, R.; VARASSIN, I. G. **Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo, Brasil.** Revta. brasil. Bot., São Paulo, v. 24, n. 3, p. 283-288, 2001.

GOLDENBERG, R.; TEIXEIRA, S. P.; MARTINS, A. B. **Anther dehiscence and circumscription of *Miconia* sect. *Hypoxanthus* (Melastomataceae).** Kew Bulletin, v. 58, n. 1, p. 195-203, 2003.

GOLDENBERG, R.; SOUZA, C. M. F.; DEQUECHI, H. B. **Clidemia, Ossaea e Pleiochiton (Melastomataceae) no estado do Paraná, Brasil.** Hoehnea, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 453-466, 2005.

GRANT, V. **Plant Speciation.** Columbia University Press, New York, 1981.

GUPTA, M.; CHYI, Y.-S. **Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats.** Theoretical and Applied Genetics, v. 89, p. 998-1006, 1994.

HÖRANDL, E; PAUN, O. Patterns and sources of genetic diversity in apomictic plants: implications for evolutionary potentials and ecology. *In: Hörandl E, Grossniklaus U, Van Dijk PJ, Sharbel T, editors. Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives.* Gantner, Ruggell; Liechtenstein., p. 169–194, 2007.

HOULISTON, G. J.; CHAPMAN, H. M. **Reproductive strategy and population variability in the facultative apomict *Hieracium pilosella* (Asteraceae).** Amer. J. Bot., v. 91, p. 37-44, 2004.

JEFFERSON, R. A.; BICKNELL, R. **The Potential Impacts of Apomixis: A Molecular Genetics Approach.** The Impact of Plant Molecular Genetics. BWS Sobral, Editor., p. 87-101, 1996.

MARTIN, C. V.; LITTLE, D. P.; GOLDENBERG, R.; MICHELANGELI, F. A. **A phylogenetic evaluation of *Leandra* (Miconieae, Melastomataceae): a polyphyletic genus where the seeds tell the story, not the petals.** Cladistics, Nova Iorque, v. 23, p. 1-13, 2008.

MARTIN, C. V.; MICHELANGELI, F. A. **Comparative seed morphology of *Leandra* (Miconieae, Melastomataceae).** Brittonia, v. 61, n. 2, p. 175–188, 2009.

- MICHELANGELI, F. A.; PENNEYS, D. S.; GIZA, J.; SOLTIS, D.; HILS, M. H.; SKEAN, J. D. **A preliminary phylogeny of the tribe Miconieae (Melastomataceae) based on nrITS sequence data and its implications on inflorescence position.** *Taxon*, v. 53, p. 279–290, 2004.
- MOLINARI, H. B.; CROCHEMORE, M. L.; **Extração de DNA genômico de *Passiflora spp.* para análises PCR-RAPD.** *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 447-450, 2001.
- NEI, M. **Genetic distance between populations.** *American Naturalist*, Chicago, v. 106, p. 283-292, 1972.
- NEI, M. **Analysis of gene diversity in subdivided populations.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 70, p. 3321-3323, 1973.
- NOGLER, G. A. **How to obtain diploid apomictic *Ranunculus auricomus* plants not found in the wild state.** *Botanica Helvetica*, Basel, v. 92, p. 13-22, 1982.
- NOGLER, G. A. **Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*: 5. conclusion.** *Bot. Helv.*, v. 94, p. 411–423, 1984.
- PATEL, V. C.; SKVARLA, J. J.; RAVEN, P.H. **Pollen characters in relation to the delimitation of Myrtales.** *Ann. Missouri Bot. Gard.*, v. 71, p. 858-969, 1984.
- PINTO, G. B. S.; SCHWARZBACH, S.; SIMOES, C. G.; BARBOSA, D. M.; MARQUES, M. C. M.; GOLDENBERG, R. **Sistemas Reprodutivos de *Leandra australis* (Cham.) Cogn. e *Tibouchina cerastifolia* (Naudin) Cogn. (Melastomataceae), em populações do município de Curitiba, PR.** Trabalho apresentado no 54. Congresso Nacional de Botânica, Belém, 2003.
- RENNER, S. S. **The neotropical epiphytic Melastomataceae: phylogeographic patterns, fruit types, and floral biology.** *Selbyana*, v. 9, p. 104-111, 1986.
- RENNER, S. S. **A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae.** *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 76, p. 496-518, 1989.
- RENNER, S. S. **Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae.** *Nordic Journal of Botany*, v. 13, p. 519-540, 1993.
- RENNER, S. S. **Bayesian analysis of combined chloroplast loci, using multiple calibrations, supports the recent arrival of Melastomataceae in Africa and Madagascar.** *Am. J. Bot.*, v. 91, p. 1427–1435, 2004.
- RICHARDS, A. J. **Plant breeding systems.** - London: Allen & Unwin. 1986.

ROY, A.; FRASCARIA, N.; MACKAY, J.; BOUSQUET, J. **Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis***. Theor. Appl. Genet., v. 85 p. 173–180, 1992.

SAVIDAN, Y.; CARMAN, J. G.; DRESSELHAUS, T. **The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering**. México, D.F.: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR), 2001.

STEBBINS, G. L. **Variation and Evolution in Plants**. Columbia Univ. Press, New York, 1950.

VARASSIN, I. G.; PENNEYS, D. S.; MICHELANGELI, F. A. **Comparative anatomy and morphology of nectar-producing Melastomataceae**. Annals of Botany, v. 102, p. 899-909, 2008.

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. (Ed.), **Molecular systematics of plants. II. DNA sequencing**. Chapman and Hall, New York, p. 43–86, 1998.

WOLFE, A. D.; XIANG, Q. Y.; KEPHART, S. R. **Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands**. Mol. Ecol., v. 7, p. 1107-1125, 1998.

ZHANG, X. L.; YUAN, Y. M.; GE, X. J. **Genetic structure and differentiation of *Gentiana atunsiensis* W. W. Smith and *G. striolata* T. N. Ho (Gentianaceae) as revealed by ISSR markers**. Bot. J. Linn. Soc., v. 154, p. 225-232, 2007.

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