Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Departamentos de Genética e Botânica

RS - IBIO

Uso de marcadores ISSR para avaliar a variabilidade genética das espécies de *Sisyrinchium* L. (Iridaceae) do Rio Grande do Sul

Roberto Farina

Orientadora: Tatiana Teixeira de Souza Chies (Dep. Botânica)

Trabalho de conclusão apresentado para a obtenção do título de Bacharel na área Molecular, Celular e Funcional do Curso de Ciências Biológicas.

Porto Alegre, julho de 2005.

UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCIÊNCIAS

Agradecimentos

Este trabalho foi uma rica experiência acadêmica, fundamental para o meu crescimento intelectual e moral. Foram anos de acertos e erros que considero muito importante para o início de minha vida como pesquisador.

Agradeço muito a minha orientadora Tatiana Teixeira de Souza Chies, por toda a dedicação, competência, amizade e paciência. Muito obrigado pela confiança depositada em mim, e espero ter retribuído.

Agradeço a professora Lílian Eggers, pelas coletas e toda ajuda com a parte morfológica. Agradeço também a professora Fernanda Bered pela ajuda nas análises com o programa NTSYS.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório que certamente tiveram uma participação ativa nesse trabalho, Ale, Jana, Lili, Rogéria, Gustavo, Fernanda Cidade, Fernanda Spier, Clarissa, Gecele, Milena, Raquel, Adriana, Ane, Camila, agradeço a todos e desculpa se me esqueci de alguém. Agradeço em especial a Sílvia, pelas inúmeras fotos.

Agradeço a minha família por todo amor e carinho que sempre recebi, principalmente ao meu pai e minha mãe, pelos ensinamentos que me levaram a ser a pessoa que sou hoje e por todo financiamento para eu poder estudar em Porto Alegre. Agradeço também aos meus irmãos Eduardo e Marcelo pelos conselhos e apoio nas horas difíceis.

Agradeço a Propesq e ao CNPq pelas bolsas que recebi.

UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCIÊNCIAS

Resumo

Sisyrinchium L. pertence à família Iridaceae, sendo a América do Sul o provável local de origem e o centro de distribuição das espécies. O gênero conta com cerca de 200 espécies distribuídas principalmente pelo continente americano, em áreas de clima temperado ou tropical. Poucos estudos foram realizados com o gênero, principalmente com as espécies da América do Sul. O principal objetivo desse trabalho é avaliar a variabilidade genética de espécies de *Sisyrinchium* do Rio Grande do Sul, visando auxiliar na identificação dessas espécies.

Para tanto, escolhemos o uso da técnica de ISSR para obtenção de polimorfismo de 33 acessos analisados. A partir dos resultados obtidos, construiu-se uma matriz de dados com presença e ausência de fragmentos, os quais variaram de 200 a 1750 pb. Esses foram utilizados para gerar um dendrograma a fim de agrupar os táxons analisados.

O dendrograma agrupou os acessos em três grandes grupos sendo o primeiro formado por acessos de *S. vaginatum* e *S. palmifolium*, o segundo formado por acessos de *S. micranthum*, *S. megapotamicum*, *S. scariosum*, *S. laxum* e *S. pachyrhizum*, e o terceiro formado por acessos de *Sisyrinchium* sp., além de acessos de *Calydorea* sp. e *Herbertia* sp, utilizados como grupo externo.

A maioria dos acessos agrupou-se conforme a identificação das espécies, com exceção dos acessos de *S. micranthum* que dividiram-se em dois grupos. Foi possível confirmar dois acessos de *Sisyrinchium* sp. como pertencentes a *S. micranthum*.

Apesar do terceiro grupo apresentar acessos de *Sisyrinchium* sp. juntamente com o grupo externo, e os resultados obtidos não estarem de total acordo com dados morfológicos, os marcadores ISSR utilizados mostraram-se favoráveis para estudos com o gênero.

Índice

Introdução 4

O gênero *Sisyrinchium* L. 4

A técnica ISSR-PCR 6

Objetivos 9

Material e métodos 9

Material 9

Extração do DNA total 11

Amplificação do DNA (ISSR-PCR) 11

Análise dos dados 12

Resultados 12

Discussão 14

Considerações finais 16

Referências bibliográficas 17

Introdução:

O gênero *Sisyrinchium* L.

A família Iridaceae possui aproximadamente 65 gêneros e 1850 espécies que são mais abundantes e diversas no hemisfério sul (Rudall et al., 2003). Iridaceae representa uma das maiores famílias da superordem Lilianae (*sensu* Dahlgren, *et al.*, 1985). Recentes análises moleculares de monocotiledôneas (e.g., Chase et al., 1995, 2000) têm colocado Iridaceae na ordem Asparagales, associada com famílias tais como Doryanthaceae, Ixioliriaceae e Tecophilaeaceae.

Goldblatt (1991), utilizando caracteres fitoquímicos, citológicos, estrutura do pólen, anatomia e morfologia, dividiu a família em quatro subfamílias: Isophysioideae, Nivenioideae, Iridoideae e Ixioideae. Iridoideae compreende as tribos Mariceae, Tigrideae, Iridineae e Sisyrinchieae, enquanto que a subfamília Ixioideae compreende as tribos Pillansieae, Watsonieae e Ixieae.

O gênero *Sisyrinchium* L. pertence à subfamília Iridoideae e à tribo Sisyrinchieae (Goldblatt, 1990,1998). A América do Sul é evidentemente um centro evolucionário para as iridáceas, e é provavelmente o local de origem e o centro de distribuição para o gênero. Esse apresenta uma grande variedade de formas no continente americano (Johnston, 1938).

Bentham e Hooker (1883) dividiram o gênero em quatro secções: *Bermudiana*, *Echthonema*, *Eriphilema* e *Nuno*. Rudall et al. (1986) demonstrou que análises sobre anatomia da folha e número cromossômico suportam essa divisão. Entretanto, poucos trabalhos foram desenvolvidos abordando as quatro secções.

Sisyrinchium conta com cerca de 200 espécies distribuídas principalmente pelo continente americano em áreas de clima temperado ou tropical, neste último caso em altitudes elevadas e temperaturas mais baixas. As espécies de *Sisyrinchium* são ervas perenes, às vezes anuais. O gênero é representado por plantas com rizomas, folhas lanceoladas, lineares ou teretes, não plicadas e escapo floral cilíndrico ou plano, mas não foliáceo como em *Neomarica* Sprague (Giulieti, 2003). Na maioria das espécies, as flores são amarelas. Entretanto, podem ser encontradas flores azuis, roxas ou rosáceas (Figura 1 e 2).

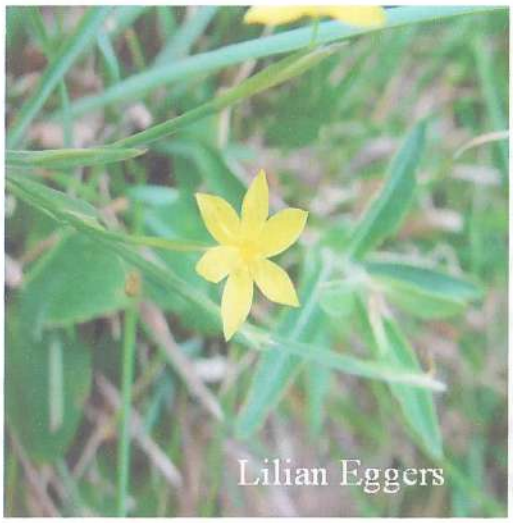

Figura 1: *Sisyrinchium vaginatum* Spreng.

Figura 2: *Sisyrinchium micranthum* Cav.

Devido à natureza invasora, a autofertilidade da maioria das espécies de *Sisyrinchium* e a escassez de estudos, a taxonomia do grupo é pobremente resolvida (Goldblatt, 1982). Até o momento, poucos trabalhos foram desenvolvidos com o gênero. Para a análise morfologica, destacam-se trabalhos de flora, como a Flora de la Província de Buenos Aires (Ravenna, 1968), a Flora Montevidensis (Lombardo, 1984), e, mais recentemente, a Flora do Estado de São Paulo (Giulieti, 2003).

Estudos de citogenética que contribuíram para a classificação de *Sisyrinchium* foram desenvolvidos. Entretanto, a grande maioria desses estudos incluem apenas espécies norte-americanas (Oliver e Lewes, 1962; Mosquin, 1970; Cholewa e Henderson, 1984; Hill, 1984; Kenton e Heuwood, 1986). A informação citológica em espécies da América do Sul é escassa, sendo que poucos trabalhos foram desenvolvidos (Kenton *et al*, 1986).

Sisyrinchium é um dos muitos gêneros de Iridaceae conhecidos por produzir óleos florais como uma recompensa para seus polinizadores. Esses óleos lipídicos são produzidos por glândulas florais especiais, chamados elaióforos (Vogel, 1988). Essa é outra área na qual foram desenvolvidos poucos trabalhos com o gênero. Os poucos trabalhos existentes

citam os gêneros *Lanthanomelissa*, *Tapinotaspis* e *Chalepogenus*, como insetos que se aproveitam desses óleos florais em algumas espécies do gênero (Cocucci e Vogel, 2001).

A técnica ISSR-PCR

Para se ter acesso às informações dos genomas dos diversos táxons, deve-se escolher uma técnica molecular bem estabelecida (Judd et al., 2002). Marcadores moleculares têm se mostrado valiosos, especialmente em estudos de diversidade genética e mapeamento gênico (Reddy et al., 2002). Os marcadores mais comumente utilizados, baseados em PCR são o RAPD, AFLP e os SSRs ou microssatélites. (Staub et al., 1996; Gupta e Varshney, 2000). Entretanto, mais recentemente vem se utilizando a técnica de ISSR-PCR, método simples e rápido que combina muitas das vantagens dos microssatélites (SSR) e (AFLPs) com a universalidade do RAPD (Reddy et al., 2002). No presente trabalho, utilizamos o ISSR-PCR, técnica descrita pela primeira vez em 1994 por Zietkiewicz e colaboradores.

O ISSR é um método baseado na amplificação de DNA por PCR, pela amplificação de fragmentos de DNA presentes em uma distância amplificável entre dois SSRs ou microssatélites idênticos repetidos, orientados em direções opostas (Reddy et al., 2002). Nessa técnica os SSRs (Seqüências Simples Repetidas), também chamados de microssatélites, são utilizados como "primers" para amplificar principalmente regiões entre SSRs (Reddy et al., 2002). A técnica do ISSR-PCR permite a detecção de polimorfismos em *locus* localizados entre os microssatélites, utilizando seqüências simples repetidas (SSRs) como "primers" (Wu et al., 1994; Zietkiewicz et al., 1994).

Os SSRs são repetições curtas em tandem (STRs) ou um número variável de repetições em tandem (VNTRs) de uma a quatro bases de DNA ubiquamente presentes em genomas eucarióticos (Tautz e Renz, 1984). Eles são completamente dispersos no genoma e variam no número de unidades repetidas (Reddy et al., 2002). As repetições de microssatélites utilizados como "primers" para a técnica do ISSR-PCR podem ser di-nucleotídeos, tri-nucleotídeos, tetra-nucleotídeos ou penta-nucleotídeos (Reddy et al., 2002). Entretanto, Wang et al. (1998) cita que microssatélites dinucleotídeos são mais comuns em plantas, sendo microssatélites tri, tetra e penta-nucleotídeos menos comuns. Repetições dinucleotídeos ancoradas tanto no final 3' como em 5' revelam um alto

polimorfismo (Nagaoka e Ogihara, 1997., Blair et al., 1999; Joshi et al., 2000). Os "primers" utilizados podem ser ou não ancorados (Gupta et al., 1994; Meyer et al., 1993; Wu et al., 1994), sendo mais comum a utilização de "primers" ancorados nas posições terminais 3' ou 5' de uma a quatro bases degeneradas dentro das seqüências flanqueadoras (Zietkiewicz et al., 1994).

O potencial oferecido pelos marcadores ISSR depende da variedade e freqüência dos microssatélites, variando com as espécies e com os motivos SSR que são utilizados como "primer" (Morgante e Olivieri, 1993; Depeiges et al., 1995). O número de bandas produzidas por um "primer" de ISSR com uma dada repetição do microssatélite pode refletir a freqüência relativa do motivo em um dado genoma e pode fornecer uma estimativa da abundância de diferentes motivos (Blair et al., 1999).

ISSR segrega na maioria das vezes como um marcador dominante, seguindo a herança mendeliana simples (Gupta et al., 1994; Tsumura et al., 1996; Ratnaparkhe et al., 1998; Wang et al., 1998). Entretanto, eles também têm se mostrado como marcadores codominantes em alguns casos permitindo assim distinção entre homozigotos e heterozigotos (Wu et al., 1994; Akagi et al., 1996; Wang et al., 1998; Sankar e Moore, 2001).

A mudança da taxa evolutiva dentro dos microssatélites é considerada maior que em outras regiões do DNA. Conseqüentemente, a probabilidade de polimorfismo dessas seqüências é maior. No caso do ISSR, a fonte de variabilidade pode ser atribuída à amostra do DNA, a natureza do "primer" utilizado ou ao método de detecção (Reddy et al., 2002).

A ocorrência de erros durante a replicação do DNA e a falha no reparo é considerada como um mecanismo para criação e hipervariabilidade dos SSRs (Levinson e Gutman, 1987). Mutações no sítio do SSR podem impedir a amplificação de um fragmento, como também nos marcadores RAPD, gerando assim presença ou ausência de polimorfismo. Um evento de inserção e deleção dentro de uma região de SSR ou da região amplificada, pode resultar na ausência de um produto ou em polimorfismo, dependendo da capacidade de amplificação e do tamanho do fragmento resultante. A variabilidade no número de nucleotídeos dentro de um microssatélite repetido pode resultar em polimorfismo quando usado um "primer" ancorado em 5'(Reddy et al., 2002).

Sendo o "primer" um SSR, a freqüência e distribuição dos microssatélites em diferentes espécies também influenciam a geração de bandas. Há uma diferença de abundância de SSRs entre seqüências de DNA nuclear e organelar.

Existem muitas aplicações para o ISSR-PCR. Na literatura, o uso desta técnica para os mais diversos fins fica bem evidenciado em estudos de "fingerprinting" (Charters e Wilkinson, 2000), diversidade genética (Salimath et al., 1995; Nagaoka e Ogihara, 1997; Wolff e Morgan-Richards, 1998; Joshi et al., 2000; Ajibade et al., 2000; Huang e Sun, 2000), estudos filogenéticos baseados na similaridade (Salimath et al., 1995; Nagaoka e Ogihara, 1997; Ajibade et al., 2000; Joshi et al., 2000; Martin e Sanchez-Yelamo, 2000), mapeamento genômico (Becker e Heun, 1995), seleção assistida por marcadores (Ratnaparkhe et al., 1998; Hussain et al., 2000), determinação da freqüência de motivos SSR (Nagaoka e Ogihara, 1997; Blair et al., 1999; Varghese et al., 2000) e estudos de populações naturais e especiação (Wolff et al., 1998).

O ISSR-PCR possui diversas vantagens sobre outros marcadores moleculares. Esta técnica pode ser empregada em algumas espécies que contenham um número e distribuição suficiente de motivos SSR, e tem a vantagem de não requerer dados de seqüência genômica (Gupta et al., 1994; Godwin et al., 1997). É uma técnica simples, rápida e eficiente, apresentando alta reprodutibilidade e não requer o uso de radioatividade. Os "primers" não são patenteados (como em SSR-PCR), podendo ser sintetizados com variação no comprimento dos "primers", motivos e âncoras. Geralmente são longos (16 a 25 pb) resultando em uma alta estringência (Reddy et al., 2002).

Os produtos amplificados possuem geralmente 200 a 2000 pb, podendo ser detectados tanto por eletroforese em gel de agarose como em gel de poliacrilamida (Reddy et al., 2002).

A técnica de ISSR tem sido usada para estimar a extensão da diversidade genética nos níveis inter e intra-específicos (Reddy et al., 2002). Ajibade et al. (2000) usando 15 "primers" de ISSR distinguiram taxas aos níveis de espécie e intra-específico. Martín e Sanchez - Yelamo (2000) verificaram que as relações genéticas entre dez espécies de *Diplotaxis* estimadas pelo polimorfismo dos marcadores ISSR estão de acordo com aquelas previamente inferidas por outros dados morfológicos bioquímicos e moleculares, indicando a confiabilidade do ISSR.

Nagaoka e Ogihara (1997), utilizando 33 "primers" verificaram que as relações genéticas de acessos de trigo, estimadas pelo polimorfismo dos marcadores ISSR, foram idênticas aquelas inferidas por marcadores RFLP e RAPD, indicando a aplicabilidade dos marcadores ISSR para estimar os genótipos.

Entretanto, o número de "primers" utilizado para análises não necessariamente necessita ser elevado. Gilbert et al. (1999) utilizaram apenas dois "primers" para distinguir todos os 37 acessos estudados. Similarmente, quatro "primers" foram suficientes para distinguir 34 cultivares de batata (Prevost e Wilkinson, 1999) e três "primers" puderam distinguir 16 genótipos de *Ribes rubrum* (Lanham e Brennan, 1998).

Apesar do grande número de trabalhos que vêm utilizando marcadores moleculares, nenhum foi desenvolvido com *Sisyrinchium*.

Objetivo:

O presente trabalho tem como objetivo utilizar a técnica de ISSR para verificar a diversidade genética dentro dos acessos de *Sisyrinchium*, colaborando para a determinação das espécies do gênero.

Material e métodos:

Material:

Trinta e três acessos foram amostrados no trabalho (Tabela 1). Dentre eles, estão cinco acessos de *Sisyrinchium vaginatum* Spreng., dez acessos de *S. micranthum* Cav., dois acessos de *S. megapotamicum* Malme., dois acessos de *S. scariosum* IM Johnst., um acesso de *S. laxum* Sims, um de *S. palmifolium* L. e um de *S. pachyrhizum* Baker. Ainda foram identificados seis acessos classificados como *Sisyrinchium* sp. Três acessos de *Calydorea* Herb. e um acesso de *Herbertia* Sweet. Os acessos representando *Calydorea* e *Herbertia* foram usados como grupo externo.

As plantas foram coletadas em diversos municípios do Rio Grande do Sul por Eggers e Souza-Chies (ESC), como mostrados na (Tabela 1).

Tabela 1: Acessos amostrados no trabalho com as respectivas identificações quanto à espécie, data de coleta e origem da coleta.

Acesso	Espécie	Data de coleta	Origem
ESC-1	*S. grupo vaginatum*	02/10/2003	Porto Alegre
ESC-3	*S. grupo vaginatum*	02/10/2003	Porto Alegre
ESC-20	*S. grupo vaginatum*	15/11/2003	Guaíba
ESC-22	*S. grupo vaginatum*	15/11/2003	Guaíba
ESC-28	*S. grupo vaginatum*	26/11/2003	Encruzilhada do Sul
ESC-8	*S. micranthum*	08/10/2003	Porto Alegre
ESC-9	*S. micranthum*	08/10/2003	Porto Alegre
ESC-14	*S. micranthum*	06/11/2003	São Leopoldo
ESC-15	*S. micranthum*	08/11/2003	Pinhal
ESC-17	*S. micranthum*	08/11/2003	Pinhal
ESC-18	*S. micranthum*	15/11/2003	Guaíba
ESC-29	*S. micranthum*	26/11/2003	Encruzilhada do Sul
ESC-36	*S. micranthum*	27/11/2003	Pelotas
ESC-38	*S. micranthum*	27/11/2003	Pelotas
ESC-78	*S. micranthum*	20/11/2004	Guaíba
ESC-4	*S. megapotamicum*	02/10/2003	Porto Alegre
ESC-7	*S. megapotamicum*	08/10/2003	Porto Alegre
ESC-5	*S. scariosum*	08/10/2003	Porto Alegre
ESC-21	*S. scariosum*	15/11/2003	Guaíba
ESC-2	*S. palmifolium*	02/10/2003	Porto Alegre
ESC-42	*S. laxum*	05/01/2004	São Francisco de Paula
ESC-13	*S. pachyrhizum*	06/11/2003	São Leopoldo
ESC-17	*Sisyrinchium sp.*	08/11/2003	Palmares do Sul
ESC-35	*Sisyrinchium* sp.	27/11/2003	Morro Redondo
ESC-55B	*Sisyrinchium* sp.	16/10/2004	Quaraí
ESC-55C	*Sisyrinchium* sp.	16/10/2004	Quaraí
ESC-70A	*Sisyrinchium* sp.	17/10/2004	Manuel Viana
ESC-70B	*Sisyrinchium* sp.	17/10/2004	Manuel Viana
ESC-53	*Herbertia* sp.	16/10/2004	Livramento
ESC-51	*Calydorea* sp.	16/10/2004	Livramento
ESC-56B	*Calydorea* sp.	17/10/2004	Quaraí
ESC-56C	*Calydorea* sp.	17/10/2004	Quaraí
ESC-59C	*Calydorea sp.*	17/10/2004	Quaraí

Extração do DNA total:

A extração de DNA total foi realizada utilizando-se uma modificação do protocolo de Doyle e Doyle (1987), adaptado a tubos para microcentrífuga de 2 ml. Folhas secas em sílica gel ou de exsicatas foram maceradas e transferidas para tubos de 2 ml com 800 µl de CTAB (tampão de extração) contendo 2% de 2-mercaptoetanol e 0,1 mg/ml de proteinase K. Após, os tubos foram incubados a 65°C por 60 minutos. Em seguida, foi adicionado à solução, uma mistura contendo 800 µl de clorofórmio: álcool-isoamílico (24 : 1, v/ v). As amostras foram levemente agitadas por 15 min e centrifugadas em 6000 rpm (rotações por minuto) por 15 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi recuperado e misturado com ½ volume de acetato de amônio 7,5M e 1 volume de isopropanol gelado. O DNA foi recuperado em forma de "pellet" por centrifugação a 12 000 rpm por 10 min à temperatura ambiente, lavado com 300 µl de etanol, seco, e ressuspenso em 100µl de tampão TE 1x. A qualidade e quantidade do DNA foram determinadas em gel de agarose 1%. A quantificação foi feita utilizando o marcador lambda 10ng, 50ng e 100ng como padrões de intensidade de bandas conhecidas.

Amplificação do DNA (ISSR-PCR)

Na técnica de ISSR-PCR, três "primers" foram utilizados: $(AC)_8T$, $(GA)_8T$ e $(CTC)_4RC$. Todos os "primers" foram sintetizados pela empresa Promega.

As reações de PCR foram realizadas com um volume total de 25 µl, contendo 16,14 µl de água ultrapura; 2,5 µl de 10X PCR Buffer; 0,78 µl de DMSO (96%); 2,35µl de $MgCl_2$ (3mM); 1 µl de dNTP (0,2mM); 1 µl de "primer (1,3mM); 0,23 µl de Taq polimerase Invitrogen; (5 unidades/ µl) e 1 µl do DNA total (10 ng). As amplificações foram realizadas em termociclador da Applied Biosystems (Gene AMP PCR System 2400) utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial de 5 min. a 92°C, 40 ciclos repetidos de 1 min. a 94°C (para desnaturação), 45 segundos a 50°C (para anelamento) e 2 min. a 72 °C (para extenção) e 5 min a 72 °C para extensão final.

Os resultados das reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,6% contendo TBE 1x, corados com brometo de etídio (0,55 µg/ml), e fotografado sobre incidência de luz ultravioleta.

Análise dos dados:

Os dados de ISSR foram baseados em presença (representado pelo número 1) ou ausência (representado pelo número zero) dos fragmentos para cada "primer". As análises foram realizadas com o programa NTSYS-pc versão 2.10m (Rohlf e Marcus 1993). A matriz (0, 1) foi usada para calcular o coeficiente de Jaccard, um estimador comum de identidade genética pela seguinte fórmula:

$$\text{Coeficiente de Jaccard} = N_{AB}/(N_{AB} + N_A + N_B)$$

onde N_{AB} é o número de bandas compartilhado pelas amostras, N_A representa os fragmentos amplificados na amostra A, e N_B representa os fragmentos na amostra B. Foi então calculada uma matriz de similaridade baseada nesses índices. E essa matriz de similaridade foi utilizada para construir um dendrograma pelo método de UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic average*).

Resultados:

Os dados para os três "primers" foram obtidos para os 33 acessos, incluindo espécies de *Sisyrinchium*, *Calydorea* e *Herbertia*. Os três "primers" geraram um total de 84 fragmentos, todos polimórficos, que variaram de 200 a 1750 pb. Os dados sobre os fragmentos para cada "primer" estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Seqüências dos "primers" utilizados, número de bandas por "primers", porcentagem de bandas polimórficas e variação de tamanho das bandas.

Seqüência	N° total de bandas	Bandas polimórficas (%)	Variação do tamanho das bandas (pb)
$(AC)_8T$	25	100	250-1400
$(GA)_8T$	28	100	275-1500
$(CTC)_4RC$	31	100	200-1750

O dendrograma (Figura 3) agrupou os 33 acessos em três grandes grupos, apresentando coeficiente de Jaccard médio de 0,19, demonstrando uma grande diferença entre os acessos.

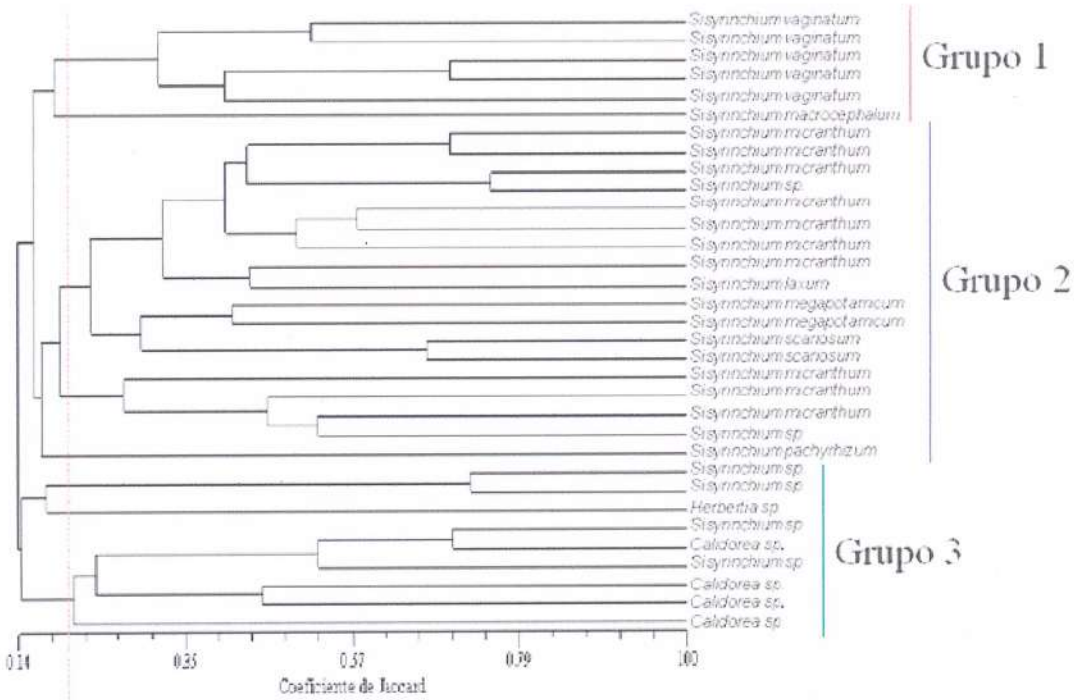

FIGURA 3: Dendrograma gerado através do programa NTSYS-pc versão 2.10m.

O primeiro grande grupo foi formado pelos cinco acessos de *S. vaginatum*, juntamente com um acesso de *S. palmifolium*. Os cinco acessos de *S. vaginatum* mantiveram-se unidos, estando *S. palmifolium* na base deste grupo.

O segundo grande grupo foi formado pelos dez acessos de *S. micranthum*, juntamente com dois acessos de *S. megapotamicum*, dois acessos de *S. scariosum*, um acesso de *S. laxum* e um de *S. pachyrhizum*. Nesse grupo ainda estão presentes dois acessos classificados como *Sisyrinchium* sp. Nesse, os dois acessos de *S. megapotamicum* e os dois

acessos de *S. scariosum* permaneceram unidos. Já os acessos de *S. micranthum* dividiram-se em dois grupos distintos, cada um desses com um acesso de *Sisyrinchium* sp. Os dois grupos de *S. micranthum* encontram-se divididos por espécies de *S. laxum*, *S. megapotamicum* e *S. scariosum*. Já *S. pachyrhizum* encontra-se na base deste segundo grande grupo.

O terceiro grande grupo é formado por quatro acessos classificados como *Sisyrinchium* sp., quatro acessos de *Calydorea* sp. e um acesso de *Herbertia* sp. Esse grupo apresenta-se bastante confuso, com espécies de *Herbertia* e *Calydorea* entre espécies de *Sisyrinchium*.

Discussão:

Devido à escassez de estudos com as espécies sul americanas do gênero *Sisyrinchium*, é difícil a comparação dos nossos resultados com a literatura. Diversos autores já descreveram subespécies dentro de *S. vaginatum*. O grupo apresenta uma enorme variação em relação ao tamanho das folhas tectrizes (Chukr, 1992). Em função deste polimorfismo, houve uma grande proliferação de *taxa* associados a intervalos da variação destes caracteres, não se observando, no entanto, continuidade desde os indivíduos de menor porte até aqueles de maior tamanho (Chukr, 2003). Nossos resultados demonstraram que todos os acessos analisados mantiveram-se agrupados, indicando a proximidade desses acessos. Um mesmo agrupamento também pôde ser verificado entre dois acessos de *S. megapotamicum*, e entre dois acessos de *S. scariosum*. Isso demonstra a eficiência do marcador para acessos dessas espécies.

Já os acessos de *S. micranthum* encontraram-se divididos em dois grupos, sendo divididos por espécies de *S. laxum*, *S. megapotamicum* e *S. scariosum*. As espécies de *S. micranthum* apresentam uma grande variação de tamanho da flor, desconhecendo-se se isso representa apenas uma variação morfológica, ou trata-se de espécies diferentes. Entretanto os resultados obtidos não respondem a essa pergunta, visto que nos dois grupos formados ocorrem flores de diversos tamanhos.

UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCIÊNCIAS

Entretanto, dois acessos classificados como *Sisyrinchium sp.* mantiveram-se dentro de cada um dos grupos de *S. micranthum*. Pode-se com isso confirmar esses acessos como pertencentes a essa espécie.

Um acesso de *S. palmifolium* encontra-se no mesmo grupo de *S. vaginatum*. Ambas espécies não possuem elaióforos, glândulas florais produtoras de óleos lipídicos. Entretanto, *S. megapotamicum* também não possui elaióforos, sendo que no dendrograma os acessos dessa espécie encontram-se em outro grupo, junto com *S. micranthum*, *S. laxum*, e *S. scariosum*, todos apresentando glândulas. Isso demonstra que o caráter quanto à presença de elaióforos não se encontra em total concordância com os resultados obtidos pelos marcadores utilizados.

O mesmo pode ser observado para o caráter morfológico presença de folhas caulinares, visto que no grupo formado por *S. vaginatum* e *S. palmifolium*, a primeira é a única espécie que possui folhas caulinares, sendo que todas as demais espécies fora desse grupo não apresentam folhas caulinares.

S. vaginatum e *S. palmifolium* apresentam filamentos soldados em aproximadamente 1mm e livres cerca de 1,1mm (Ravenna, 1968). Isso indica correlação com nossos resultados, visto que os acessos dessas duas espécies encontram-se no mesmo grupo. A mesma relação poderia ser feita com os acessos de *S. megapotamicum* e *S. scariosum,* pois ambos possuem os filamentos totalmente unidos. *S. micranthum* e *S. laxum* apresentam aproximadamente 2/3 da extensão dos filamentos soldado e 1/3 livre. Esse caráter corrobora igualmente o presente estudo, visto que o dendrograma apresenta um grupo formado por acessos de *S. micranthum* e *S. laxum*. Entretanto, outros acessos de *S. micranthum* estão agrupados com *S. pachyrhizum*, que igualmente a *S. megapotamicum* e *S. scariosum*, possuem os filamentos totalmente unidos.

O maior problema encontra-se no grupo basal do dendrograma, formado por quatro acessos classificados como *Sisyrinchium* sp., ou seja, são espécies ainda não determinadas, quatro acessos de *Calydorea sp* e um acesso de *Herbertia* sp. Não houve homogeneidade, visto que dois acessos de *Sisyrinchium* sp. estão separados por uma espécie de *Herbertia*. Ainda os quatro acessos de *Calydorea* não se mantiveram unidos, sendo que um deles ficou separado dos demais por um acesso de *Sisyrinchium* sp.

Considerações finais

Os marcadores ISSR utilizados mostraram-se satisfatórios para as espécies do gênero *Sisyrinchium*. Vários acessos considerados da mesma espécie agruparam-se, colaborando para a determinação desses acessos. Ainda foi possível a confirmação de dois acessos de *Sisyrinchium sp.* como sendo espécies de *S. micranthum*, o que também demonstra a eficiência do marcador.

Entretanto, o posicionamento de alguns acessos não foi condizente com a classificação das espécies e com algumas características morfológicas. Devemos ter consciência que os marcadores utilizados representam apenas uma pequena parte do genoma. Provavelmente se utilizarmos um maior número de "primers" teremos resultados condizentes com esses aspectos morfológicos e até mesmo com os acessos cuja posição não é condizente com a classificação.

Um maior número de "primers", assim como a inclusão de um maior número de acessos na análise, deverá apresentar uma melhor resolução do dendrograma.

Referências Bibliográficas

AJIBADE, S.R.; WEEDEN, N. F. e CHITE, S. M. **Inter-simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*.** Euphytica 111: 47–55. 2000.

AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A.; NAKAMURA, A. e 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.

BLAIR, M.W.; PANAUD, O. e MCCOUCH S.R. **Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L).** Theor Appl Genet 98: 780–792. 1999.

BECKER, J.E. e HEUN, M. **Mapping of digested and undigested random amplified microsatellite polymorphisms in barley.** Genome 38: 991–998. 1995.

BENTHAM, G. e HOOKER. J.D. **Iridaceae, Genera Plantarum** 3(2). Lovell, Reeve and Company, London, UK. 1883.

CHARTERS, Y.M. e WILKINSON, M.J. **The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm.** Theor Appl Genet 100: 160–166. 2000.

CHASE , M. W., DUVALL, M. R., HILLS, H. G., CONTRAN, J. G., COX, A. V., EGUIARTE, L. E., HARTWELL, J., FAY, M. F., CADDICK., L. R., CAMERON, K. M. e HOOR, S. **Molecular phylogeneticsof Lilianae.** 1995 *In* RUDDAL, P., CRIBB, P. J., CUTLER, D. F., e HUMPHRIES, C. J. [eds]. Monocotyledons: systematics and evolution. 109-137. Royal Botanic Gardens, Kew, London, UK.

CHASE , M. W., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., RUDALL., FAY, M. F., HAHN, W. H., SULLIVAN. S., JOSEPH. J.,GIVNISH, T., SYTSMA, K. J. e PIRES, J. C. **Higher-level**

systematicsof the monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new clacification. 2000 *In* WILSON K. L. e MORRISON, D. A. [eds.], Monocots: systematics and evolution, 3-16. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia.

CHOLEWA, A. F. e HENDERSON, D. M. **Biosystematics of *Sisyrinchium* section *Bermudiana* (Iridaceae) of the Rocky Mountains.** Brittonia. 36: 342-363. 1984.

CHUKR, N.S. e CAPELLARI Jr., L. Iridaceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPERD, G.J.; GIULIETTI, A.M.; MELHEM, T.S. (Coord.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo.** São Paulo: FAPESP: RiMa, 2003. p. 127-147

COCUCCI, A.A.; VOGEL, S. **Oil-producing flowers of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in southern South America.** Flora. 196: 26-46. 2001.

DAHLGREN, R. M. T., CLIFFORD, H. T. e YEO, E. F. The families of monocotyledons: structure, evolution and taxonomy. Springer, Berlin, Germany. 1985.

DEPEIGES, A.; GOUBELY, C.; LENOIR, A.; COCHEREL, S.; PICARD, G.; RAYNAL, M.; GRELLET, F. e DELSENY M. **Identification of the most represented repeated motifs in *Arabidopsis thaliana* microsatellite loci.** Theor Appl Genet 91 : 160-168. 1995.

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

GILBERT, J.E.; LEWIS R.V.; WILKINSON M.J.; e CALIGARI P.D.S. **Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections.** Theor Appl Genet 98: 1125–1131. 1999

GIULIETTI, A. M. e MELHEM T. S. (Coord.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo.** São Paulo: Fapesp: RiMa. 127-147. 2003.

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

GOLDBLATT, P. **Chromosome cytology in relation to suprageneric systematics of neotropical Iridaceae.** Australian Systematic Botany Society. 7: 186-198. 1982

GOLDBLATT, P. **Phylogeny and classification of Iridaceae.** Annals of the Missouri Botanocal Garden, 77: 607-627. 1990.

GOLDBLATT, P. **An overview of the systematics, phylogeny and biology of the southern African Iridaceae.** Contributions from the Bolus Herbarium 13: 1–74. 1991.

GOLDBLATT, P. 1998. Iridaceae. Pp. 295-335 *in* K. Kubitzki (editor), **Families ang Genera of Flowering Plants**, Vol. 3. Flowering Plants Monocotyledons – Lilianae. Springer, Heidelberg.

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

GUPTA, P.K. e VARSHNEY, R.K. **The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica** 113: 163–185. 2000.

HILL, L.M. **A floristic and chromosomal study of *Sisyrinchium* (Iridaceae) in Virginia.** Castanea. 49: 62-68. 1984.

HUANG, J. e 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.** Theor Appl Genet 100: 1050–1060. 2000.

HUSSAIN, A.J.; GUPTA, V.; ALI, J.; RANJEKAR, P. K. E SIDDIQ, E. A. **Physiological characterization, genetics and molecular mapping of a new source of temperature sensitive genetic male sterility in rice.** Fourth International Rice Genetics Symposium, 22–27. October 2000, IRRI, Philippines, Abstracts p. 95. 2000.

JOHNSTON, I. M. **The species of *Sisyrinchium* in Uruguay, Paraguay and Brazil**. Journal of the Arnold Arboretum 19: 376-401. 1938.

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

JUDD, W.S.; CAMPEBELL, C.S.; KELLOGG, E.A. e STEVENS, P.F. **Plant systematics: a phylogenetic approach.** Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachesetts, USA. 2002.

KENTON, A. e HEYWOOD, C.A. **Genome size variation in *Sisyrinchium* L. (Iridaceae) and its relationship to phenotype and habitat.** Botanical Gazette 147: 342-354. 1986

LANHAM, P.G. e BRENNAN, R.M. **Characterization of the genetic resources of redcurrant (*Ribes rubrum*: subg. *Ribesia*) using anchored mocrossatellite markers**. Theor Appl Genet 96: 917-921.

LEVINSON, G. e GUTMAN, G.A. **Slipped strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution**. Mol Biol Evol 4: 203–221. 1987.

LOMBARDO, **A. Flora Mortevidensis. Montevideo:** Intendencia Municipal de Montevideo, 1984.

UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCIÊNCIAS

MARTIN, J.P. e SANCHEZ-YELAMO, M. D. **Genetic relationships among species of the genus *Diplotaxis* (Brassicaceae) using inter-simple sequence repeat markers.** Theor Appl Genet 101: 1234-1241. 2000.

MEYER, W.; MITCHELL, T.G.; FREEDMAN E.Z. e VILGAYS R. **Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans.*** J Clin Microbiol 31: 2274–2280. 1993.

MORGANTE, M. e OLIVIERI, A.M. **PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics.** Plant J 3: 175-182. 1993.

MOSQUIN, T. **Chromosome numbers and a proposal for classification in *Sisyrinchium* (Iridaceae).** Madrono. *20*: 269-275. 1970.

NAGAOKA, T. e OGIHARA Y. **Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers.** Theor Apppl Genet 94: 597–602. 1997.

OLIVER, R. L. e LEWIS, W. H. **Chromossome numbers of *Sisyrinchium* (Iridaceae) in eastern North America**. Sida. 1: 43-48. 1962.

PREVOST, A.; e WILKINSON M.J. **A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars.** Theor Appl Genet 98: 107–112. 1999.

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

RAVENNA, P. **Iridaceae**. In: CABRERA, A. L. Flora de la Província de Buenos Aires. Buenos Aires: INTA. 539-565. 1968.

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

ROHLF, F.J. e MARCUS L.F. **A revolution in morphometrics.** Trends Ecol. Evol. 8: 129-132. 1993.

RUDALL, P. J., KENTON, A. Y. e LAWRENCE, T. J. **An anatomical and chromosomal investigation of *Sisyrinchium* and allied genera**. Bot. Gaz. 147: 466-477. 1986.

RUDALL, P. J., KENTON, MANNING, C. J. e GOLDBLATT, P. **Evolution of Floral Nectaries in Iridaceae.** Ann. Missouri Bot. Gard. 90: 613-631. 2003.

SALIMATH, S.S., DE OLIVEIRA, A.C.; GODWIN, I.D. e BENNETZEN, J.L. **Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers.** Genome 38: 757–763. 1995.

SANKAR, A.A. e MOORE, G.A. **Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of genetic linkage map.** Theor Appl Genet 102: 206–214. 2001.

STAUB, J.E.; SERQUEN, F.C. e GUPTA, M. **Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding.** HortScience 31(5): 729–739. 1996.

TAUTZ, D. e RENZ, M. **Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes.** Nucleic Acids Res 12: 4127–4138. 1984.

TSUMURA, Y.; OHBA, K. e STRAUSS, S.H. **Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglasfir *(Pseudotsuga menziesii)* and sugi *(Cryptomeria japonica).*** Theor Appl Genet 92: 40–45. 1996.

VARGHESE, J.P.; RUDOLPH, B.; UZUNOVA, M.I. e ECKE, W. **Use of 5'-anchored primers for the enhanced recovery of specific microsatellite markers in *Brassica napus* L.** Theor Appl Genet 101: 115–119. 2000.

VOGEL, S. Die Ölblumensymbiosen – **Parallelismus und andere Aspekte ihrer Entwichlung in Raum und Zeit.** Z. zool. Syst. Evolut. – forsch. 26: 341-362. 1988.

WANG, G.; MAHALINGAN, R. e KNAP, H.T. **(C-A) and (G-A) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated poly-morphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr.** Theor Appl Genet 96: 1086–1096. 1998.

WOLFF, K. e MORGAN-RICHARDS, M. **PCR markers distinguish *Plantago major* subspecies.** Theor Appl Genet 96: 282–286. 1998.

WU, K.; JONES, R.; DANNAEBERGER, L. e SCOLNIK, P.A. **Detection of microsatellite polymorphisms without cloning.** Nucleic Acids Res 22: 3257–3258. 1994.

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