

# APLICAÇÃO DE MARCADORES ISSR EM POPULAÇÕES DE *CAMPOMANESIA EUGENIOIDES* (CAMBESS.) D.LEGRAND EX LANDRUM (MYRTACEAE) COMO SUBSÍDIO A SUA TAXONOMIA

**João Paulo Silva Vieira<sup>1</sup>; Marla Ibrahim Uehbe de Oliveira<sup>1</sup>; Reyjane Patrícia de Oliveira<sup>1</sup>**

- 1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [ipsilva@uefs.br](mailto:ipsilva@uefs.br)**
- 2. Participante do projeto, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [marlauehbe@yahoo.com.br](mailto:marlauehbe@yahoo.com.br)**
- 3. Orientador, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [revjanepatricia@hotmail.com](mailto:revjanepatricia@hotmail.com)**

**PALAVRAS-CHAVE:** Myrteae, marcadores dominantes, delimitação específica.

## INTRODUÇÃO

Espécies são unidades fundamentais em estudos biológicos, sendo suas delimitações de grande importância para diferentes áreas do conhecimento, e as quais têm sido historicamente baseadas em caracteres morfológicos. Porém, a sobreposição de caracteres e eventos como hibridação, introgressão e/ou plasticidade fenotípica (Grant 1981) dificultam a tomada de decisões sobre estes limites. Por esse motivo, nas últimas décadas, tais delimitações vêm sendo suplantadas por dados moleculares (Hausdorf & Hennig 2010).

*Campomanesia* Ruiz & Pavón é um gênero de Myrtaceae, e inclui ca. 45 espécies distribuídas na América do Sul, em diversos tipos vegetacionais. Entretanto, há divergências entre os autores sobre alguns limites taxonômicos, como é o caso da circunscrição de *C. eugenioides* (Cambes.) D.Legrand ex Landrum, incluindo *C. repanda* O.Berg e *C. dardanolimai* Mattos na sinonímia das suas duas variedades, além de *C. cavalcantina* Soares-Silva & Proença, recentemente descrita. Todas elas ocorrem somente no Brasil.

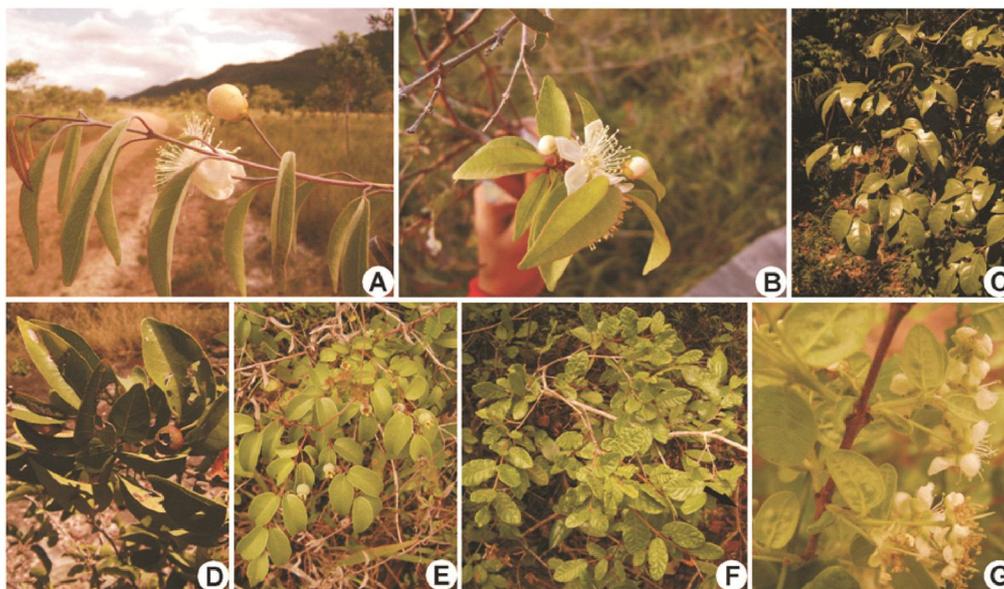
Assim, com o objetivo de melhor compreender a delimitação do “complexo *Campomanesia eugenioides*”, o presente trabalho teve como objetivo verificar o polimorfismo genético existente no grupo, através de marcadores moleculares do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*).

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 130 indivíduos oriundos de sete populações, coletadas nas regiões Nordeste e Centro-Oeste (Tab. 1; Fig. 1). O DNA total foi extraído segundo protocolo adaptado de Doyle & Doyle (1987), e as regiões alvo amplificadas através de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) através de protocolo modificado de Wolfe & Liston (1998). O produto das reações foi submetido à eletroforese em gel de agarose (2%) e o padrão de bandas de cada indivíduo foi visualizado em transiluminador e fotodocumentador. Esses padrões foram analisados no GelCompar II versão 5.1 (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium), e representados em uma matriz binária, que foi utilizada para as análises seguintes.

O grau de estruturação foi estimado por meio de análise de variância molecular (AMOVA) calculado através do GenAlEx (Peakall & Smouse 2006). O agrupamento entre as populações por inferência bayesiana foi gerado a partir de 1000 replicações no AFLP Surv 1.0 (Vekemans 2002) utilizando o algoritmo *Neighbor-Joining* disponível no PHYLIP 3.69 (Felsenstein 2011), e a árvore de consenso foi gerada com base na distância genética de Nei (1978) com valores de *bootstrap*. A representação gráfica da estrutura das populações foi

obtida através do Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000), tendo o número de grupos (“K”) mais provável calculado com base no  $\Delta K$ , conforme Evanno *et al.* (2005).



**Figura 1.** Representantes de *Campomanesia* Ruíz & Pavón coletados. A. *C. cavalcantina* Soares-Silva & Proença, Cavalcante, Goiás. B. *C. cavalcantina*, Alto Paraíso de Goiás, Goiás. C-D. *C. eugenioides* var. *eugenioides* (Cambess.) D.Legrand ex Landrum, Alto Paraíso de Goiás, Goiás. E. *C. eugenioides* var. *desertorum* (DC.) Landrum, Arcoverde, Pernambuco. F. *C. eugenioides* var. *desertorum*, Arcoverde, Pernambuco. G. *C. eugenioides* var. *desertorum*, Jeremoabo, Bahia.

**Tabela 1.** Sumário dos táxons utilizados neste estudo e seus respectivos vouchers.

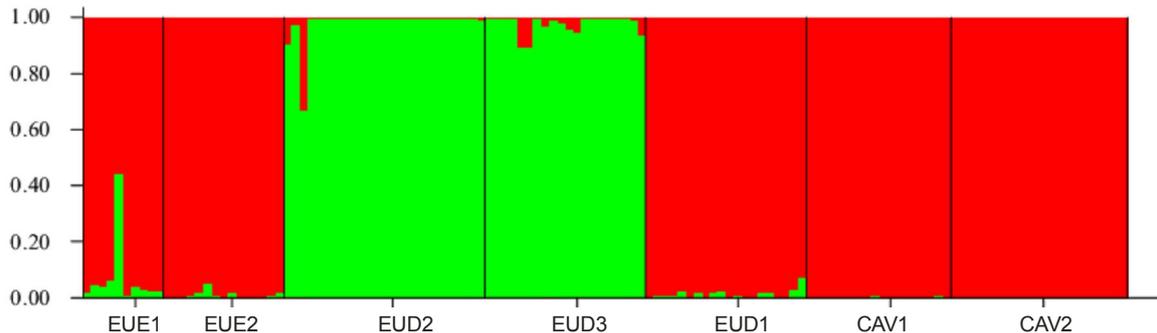
| Táxons   | Voucher               | Localidade de coleta      | Georreferência               | Nº de indivíduos | Código da população |
|--|-----------------------|---------------------------|------------------------------|------------------|---------------------|
| <i>C. eugenioides</i> var. <i>eugenioides</i> (Cambess.) | <i>M. Ibrahim 202</i> | Alto Paraíso de Goiás, GO | 14°07'59"S<br>47°31'11,4"W   | 10               | EUE 1               |
|  | D.Legrand ex Landrum  | Alto Paraíso de Goiás, GO | 14°13'26"S<br>47°29'10,8"W   | 15               | EUE 2               |
| <i>C. eugenioides</i> var. <i>desertorum</i> (DC.)       | <i>M. Ibrahim 193</i> | Arcoverde, PE             | 08°26'33,3"S<br>36°59'25,9"W | 20               | EUD 1               |
|  | <i>M. Ibrahim 194</i> | Arcoverde, PE             | 08°26'33,3"S<br>36°59'25,9"W | 20               | EUD 2               |
|  | <i>M. Ibrahim 185</i> | Jeremoabo, BA             | 10°04'30"S<br>38°28'51"W     | 25               | EUD 3               |
| <i>Campomanesia cavalcantina</i> Soares-Silva & Proença  | <i>M. Ibrahim 206</i> | Alto Paraíso de Goiás, GO | 14°10'01"S<br>47°35'57,7"W   | 18               | CAV 1               |
|  | <i>M. Ibrahim 197</i> | Cavalcante, GO            | 13°41'36,3"S<br>47°28'07,6"W | 22               | CAV 2               |

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

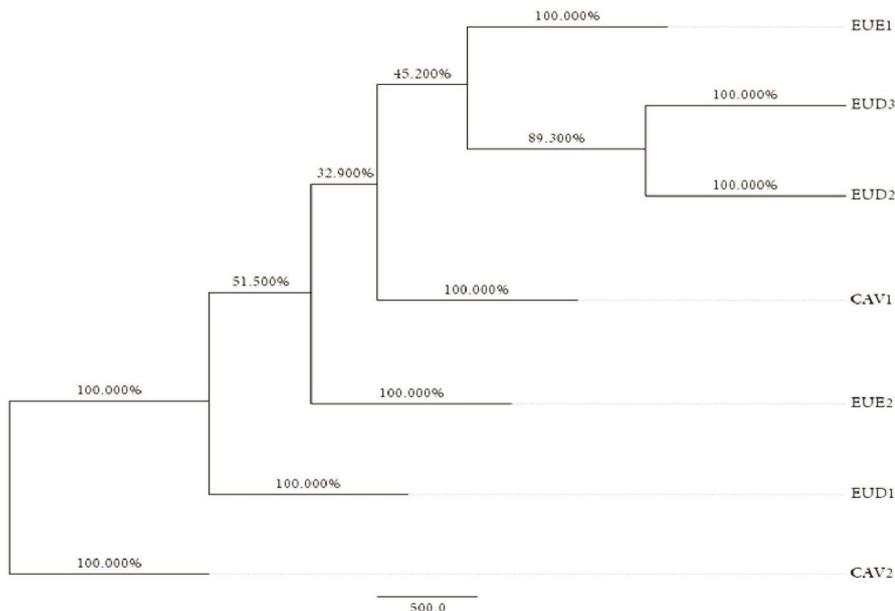
A AMOVA calculada para as sete populações estimou uma variabilidade de 52% dentro das populações e de 48% entre elas. Esta alta divergência entre as populações sugere a existência de mais de um táxon, e não de uma espécie altamente polimórfica, o que é corroborado pela representação gráfica da estrutura das populações (Fig. 2).

De acordo com critérios meramente morfológicos que norteiam a taxonomia vigente de *Campomanesia eugenioides*, especialmente de Landrum (1986) e Proença *et al.* (2010), era esperada a formação de três agrupamentos: a) CAV-1, CAV-2; b) EUE-1 e EUE-2; e c) EUD-

1, EUD-2 e EUD-3. Entretanto, tanto no dendrograma de agrupamento das populações através da distância não enviesada de Nei (Fig. 3), quanto nos resultados do STRUCTURE (Fig. 2), foi indicada a formação de dois agrupamentos: as populações EUD-2 e EUD-3 compõem um dos conjuntos gênicos, enquanto as demais (CAV-1, CAV-2, EUE-1, EUE-2, e EUD-1) foram reunidas em outro conjunto.



**Figura 2.** Gráfico de estruturação genética resultante da análise dos dados no software STRUCTURE. Formação de dois conjuntos gênicos, com destaque em verde para relação entre as populações de *C. eugenioides* var. *desertorum* (DC.) Landrum de Arcoverde, PE, e Jeremoabo, BA.



**Figura 3.** Dendrograma de agrupamento não-enraizado gerado a partir da matriz de distância genética de Nei, mostrando a relação das populações de *C. eugenioides* var. *desertorum* (DC.) Landrum provenientes de Arcoverde, PE, e Jeremoabo, BA. Percentagens acima dos ramos representando o *bootstrap*.

As populações EUD-2 e EUD-3, que se agruparam através da distância genética (Fig. 3), e formaram um conjunto gênico exclusivo na investigação da estrutura populacional (Fig. 2), representam duas espécies sinonimizadas em *Campomanesia eugenioides* var. *desertorum* por Landrum (1986) (*C. dardano-limai* e *C. repanda*). Ambas ocorrem em áreas de caatinga, nos limites do Semiárido, e diferem apenas quanto à densidade do indumento foliar. Assim, os resultados obtidos sugerem que a semelhança fenotípica tem base genética, implicando na segregação de ambas em outro táxon. A população EUD-1 apareceu mais próxima à EUE-2 e CAV-2, coletadas em áreas de cerrado. O dendrograma mostra que EUE-2 e EUE-1 (da var. *eugenioides*) são mais relacionadas à EUD-1 (var. *desertorum*) do que entre si, apesar dessa relação ter *bootstrap* baixo, assim como a relação com CAV-1.

Baseando-se em caracteres vegetativos, como formato e dimensões foliares e de acordo com os resultados de estrutura populacional, indivíduos pertencentes à EUD-1 puderam ser relacionados a populações de *C. cavalcantina* e *C. eugenioides* var. *eugenioides*,

não justificando a manutenção destas em táxons distintos. Acredita-se que, assim como constatado por McKinnon *et al.* (2008) para *Eucalyptus* L'Hér., a falta de resolução e o baixo suporte podem ser resultado de divergência recente ou especiação incompleta, e por isso esses táxons poderão ser circunscritos em uma única espécie.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises de variância e estruturação populacional aqui utilizadas podem ser extremamente importantes para a tomada de decisões quanto à delimitação taxonômica nesse grupo. Os dados obtidos indicaram que a separação de *Campomanesia eugenioides* nas duas variedades atualmente aceitas não é viável. *C. repanda* e *C. dardano-limai* devem ser segregadas em outro táxon e *C. cavalcantina* deve fazer parte de *C. eugenioides*, juntamente a espécimes antes relacionados a *C. eugenioides* var. *desertorum*. O uso de marcadores ISSR para estudos de diversidade e delimitação de espécies brasileiras de *Campomanesia* é promissor, como visto por Lima (2013), além do baixo custo. Além disso, pode produzir resultados interessantes também em outros grupos de Myrtaceae.

### REFERÊNCIAS

- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. *Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.* 19: 11-15.
- EVANO, G.; REGNAUT, S & GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molec. Ecol.* 14: 2611-2620.
- FELSENSTEIN, J. 2005. Phylip: phylogeny inference package version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle. Disponível em: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
- GRANT, V. 1981. *Plant speciation*, 2nd ed. New York: Columbia University Press.
- HAUSDORF, B. & HENNIG, C. 2010. Species delimitation using dominant and codominant multilocus markers. *Syst. Biol.* 59: 491-503.
- LANDRUM, L.R. 1986. *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium and Luma* (Myrtaceae). *Fl. Neotrop. Monogr.* 45: 7-72.
- LIMA, D.F.S. 2013. Estudos taxonômicos e biossistemáticos sobre o complexo *Myrcia laruoteana* Cambess. (Myrtaceae). MSc. diss., Universidade Estadual de Campinas.
- MCKINNON, G.E.; VAILLANCOURT, R.E.; STEANE, D.A. & POTTS, B.M. 2008. An AFLP marker approach to lower-level systematics in *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Am. J. Bot.* 95(3): 368-380.
- PEAKALL, R. & SMOUSE, P.E. 2005. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28(19): 2537-2539.
- PRITCHARD, J.K., STEPHENS, P. & DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- PROENÇA, C.E.B.; SOARES-SILVA, L.H.; SILVA, P.I.T. & FANK-DE-CARVALHO, S.M. 2010. Two new endemic species of Myrtaceae and an anatomical novelty from the Highlands of Brazil. *Kew Bull.* 65: 1-6.
- VEKEMANS, X. 2002. AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium. Disponível em: <http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/aflp-surv.html>.
- WOLFE, A.D. & LISTON A. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis, D.E.; Soltis, P.S. & Doyle, J.J. (eds.). *Plant Molecular Systematics II*. Boston: Kluwer. p. 43-86.