



## ARTIGO

# Uso de marcadores PCR-RFLP como ferramenta na identificação de espécies da subfamília Iridoideae (Iridaceae) presentes no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, RS, Brasil<sup>1</sup>

Fernanda Filippini Spier<sup>2</sup>, Luana Olinda Tacuatiá<sup>3</sup>, Gustavo Agostini<sup>4</sup>,  
Lilian Eggers<sup>5</sup> e Tatiana Teixeira de Souza Chies<sup>5,6\*</sup>

Recebido em: 29 de abril de 2007      Recebido após revisão em: 04 de setembro de 2008      Aceito em: 04 de setembro de 2008  
Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1028>

**RESUMO:** (Uso de marcadores PCR-RFLP como ferramenta na identificação de espécies da subfamília Iridoideae (Iridaceae) presentes no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, RS, Brasil). Pertencente ao grupo das monocotiledôneas, a família Iridaceae é caracterizada por apresentar uma grande diversidade morfológica. O Rio Grande do Sul possui dez gêneros nativos com algumas espécies endêmicas e acredita-se que outras ainda não sejam conhecidas no meio botânico. Dentre os seis gêneros que ocorrem no Parque Estadual de Itapuã (Viamão, Rio Grande do Sul), *Sisyrinchium* destaca-se por ser um grupo de alta variabilidade morfológica que apresenta problemas taxonômicos. O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência do uso de marcadores PCR-RFLP como ferramenta auxiliar na identificação de representantes da subfamília Iridoideae que ocorrem no Parque, principalmente *Sisyrinchium*, a fim de contribuir com o conhecimento da flora regional, auxiliando, assim, na preservação das espécies. Foram analisadas 15 amostras, sendo cinco espécies de *Sisyrinchium* e uma pertencente a cada um dos gêneros *Herbertia*, *Cypella* e *Trimezia*. As regiões *trnL-L-F* e ITS foram amplificadas por PCR e a clivagem dos fragmentos obtidos foi realizada por enzimas de restrição, com verificação dos produtos por eletroforese em gel de agarose. A matriz resultante foi utilizada para calcular o Índice de Similaridade de Dice, e a relação entre as espécies foi estimada através da construção de um dendrograma. Os resultados obtidos revelam que o uso de marcadores moleculares do tipo PCR-RFLP é eficiente para estimar a variabilidade genética dos gêneros estudados e confirmar a identificação de suas espécies, uma vez que agrupou os acessos, com altos valores de bootstrap, conforme caracteres morfológicos.

**Palavras-chave:** marcadores moleculares, Sisyrinchieae, Trigrideae, Mariceae, *Sisyrinchium*

**ABSTRACT:** (PCR-RFLP markers as a tool in the identification of subfamily Iridoideae species (Iridaceae) in the Parque Estadual de Itapuã, Viamão, RS, Brazil). Belonging to the monocots group, the family Iridaceae is characterized by great morphological diversity. The Rio Grande do Sul State, Brazil, has ten native genera with some endemic species and it is presumed that other species are not yet known in the botanical community. Among the six genera that occur in the Parque Estadual de Itapuã, (Viamão, Rio Grande do Sul, Brazil), *Sisyrinchium* highlights to be a group of high variability showing taxonomic problems. The aim of this work was to verify the applicability of PCR-RFLP markers as a tool for the identification of some representatives of subfamily Iridoideae occurring in the Park, mainly *Sisyrinchium*, in order to contribute to the knowledge of the regional flora and help the preservation of species. In this work fifteen samples were analyzed, twelve belonging to five different species of *Sisyrinchium* and one sample of the genera *Herbertia*, *Cypella* and *Trimezia*. The *trnL-L-F* and ITS regions were amplified by PCR and the cleavage of fragments was performed by restriction enzymes. Products were verified in agarose gel electrophoresis. The resulting matrix was used to calculate the Dice similarity, and the relationship among the species was estimated by building a dendrogram. The results show that the use of PCR-RFLP molecular markers is efficient to estimate the genetic variability of the studied genera and to confirm the identification of species, with high bootstrap values, according to morphological characters.

**Key words:** molecular markers, Sisyrinchieae, Trigrideae, Mariceae, *Sisyrinchium*

## INTRODUÇÃO

Pertencente à ordem Asparagales (APG II 2003), Iridaceae é uma família relativamente grande dentre as plantas monocotiledôneas (Liliiflorae *sensu* Dahlgren *et al.* 1985) e que apresenta alta diversidade morfológica

(Tillich 2003). A família encontra-se distribuída por praticamente todos os continentes, mas a maior proporção de gêneros está registrada nas regiões tropicais e temperadas do Hemisfério Sul, sendo a África o maior centro de diversidade (Ravenna 1968a, Goldblatt 1990).

1. Financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, edital CNPq 19/2004-Universal e FAPERGS, edital Proade 3 Proc. 0521471.

2. Laboratório de Genética Molecular Vegetal. Departamento de Genética. Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43312, Campus do Vale, Bairro Agronomia, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Bolsista CNPq.

3. Programa de Pós-Graduação em Genética. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43312, Campus do Vale, Bairro Agronomia, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Bolsista CNPq.

4. Programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43433, Campus do Vale, Bairro Agronomia, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Bolsista CAPES.

5. Departamento de Botânica. Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43433, Campus do Vale, Bairro Agronomia, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

6. Bolsista Produtividade do CNPq.

\*Autor para contato. E-mail: [tatiana.chies@ufrgs.br](mailto:tatiana.chies@ufrgs.br)

Goldblatt (1990), através de análises de caracteres fitoquímicos, citológicos, anatômicos e morfológicos, considerou o grupo dividido em quatro subfamílias: Isophysioideae, Nivenioideae (ou Crocoideae, segundo Goldblatt *et al.* 2006), Iridoideae e Ixioideae, sendo as duas últimas subdivididas em quatro e três tribos, respectivamente.

O estado do Rio Grande do Sul (RS) apresenta dez gêneros nativos, todos pertencentes à subfamília Iridoideae. Estudos taxonômicos e florísticos realizados até o momento em algumas regiões indicam que o número de espécies nativas de Iridaceae no estado é 43. Destas, seis espécies são de *Calydorea* Herbert, cinco de *Cypella* Herbert, duas de *Gelasine* Herbert, cinco de *Herbertia* Sweet, uma de *Kelissa* Ravenna, uma de *Neomarica* Sprague, uma de *Onira* Ravenna, até 20 espécies de *Sisyrinchium* L., uma de *Sympa* Ravenna e uma de *Trimezia* Salisb. ex Herbert (Eggers, comunicação pessoal). Os gêneros *Kelissa*, *Onira* e *Sympa*, criados recentemente, são monoespecíficos (Ravenna 1981a, 1981c, 1983).

No Brasil, a família Iridaceae é representada por espécies pouco conhecidas. No RS, algumas são consideradas endêmicas e acredita-se que outras ainda não estejam descritas. Muitas espécies da família, principalmente as de caráter endêmico, apresentam elevado risco de desaparecimento em função da ação antrópica sobre o ambiente natural, sendo necessários mais estudos para o conhecimento e esforços para preservar estes elementos da nossa flora.

Pertencente à tribo Sisyrinchieae, *Sisyrinchium* é o gênero mais difundido da família no continente americano. A América do Sul é considerada o local de origem e o centro de distribuição para o gênero (Johnston 1938). Embora Rudall *et al.* (1986) e Goldblatt *et al.* (1990) tenham afirmado que o gênero reúne mais de 100 espécies, Goldblatt *et al.* (1998) consideraram que *Sisyrinchium* apresenta apenas 60 espécies.

Os representantes de *Sisyrinchium*, distribuídos em quatro seções (*Bermudiana*, *Echthromena*, *Eriphilema* e *Nuno*) (Bentham & Hooker 1883), caracterizam-se por serem ervas geralmente perenes com raízes fibrosas ou carnosas, folhas planas ou cilíndricas e inflorescência cimosa. Apresentam flores com coloração variada e androceu com estames livres ou unidos em coluna estaminífera, a qual pode apresentar em sua base tricomas com glândulas especiais, denominadas elaióforos. Assim como em outros gêneros de Iridaceae e em outras oito famílias (Machado 2004), tais glândulas são responsáveis por produzir óleos lipídicos como recompensa para seus polinizadores (Cocucci & Vogel 2001).

Devido à natureza herbácea e autofértil da maioria de suas espécies, a taxonomia de *Sisyrinchium* é pouco resolvida (Goldblatt 1982). Estudos realizados com o gênero reconhecem que ele é constituído de membros com ampla variabilidade (Henderson 1976). Alguns dos caracteres usados pelos botânicos para delimitar as espécies são extremamente variáveis e geralmente de

natureza quantitativa (altura da planta), enquanto outros são praticamente invariáveis (textura da superfície do pólen) (Cholewa & Henderson 1984).

Johnston (1938) afirmou que os representantes sul-americanos de *Sisyrinchium* necessitam de estudos, uma vez que os trabalhos publicados são incompletos e apresentam erros, não sendo válidos para a identificação das espécies. Posteriormente, este gênero foi enfoque de muitos trabalhos de Ravenna (1968b, 1981b, 2001, 2002a, 2002b); no entanto, a falta de ilustrações ou chaves dicotômicas abrangentes ainda dificulta a taxonomia do gênero.

Análises citogenéticas contribuíram para a determinação de *Sisyrinchium*, porém a maioria dos estudos realizados envolveu apenas espécies norte-americanas (Cholewa & Henderson 1984). Um estudo detalhado de Böcher (1966) *apud* Kenton *et al.* (1986) revelou que existe variação no número e no tamanho dos cromossomos nas espécies sul-americanas e que o número dos cromossomos pode estar relacionado com o pólen ou com o tamanho da semente, sendo ambas as informações utilizadas na classificação.

Mesmo que a utilização de marcadores moleculares ofereça novas possibilidades para o estudo de diversidade genética e das relações intra e interespecíficas (Gostimsky *et al.* 2005), não há registro de trabalhos que utilizem essa ferramenta para *Sisyrinchium*. Levando em conta que este gênero apresenta uma grande variabilidade e problemas na delimitação de espécies, é fundamental a combinação de dados moleculares e morfológicos a fim de facilitar o entendimento da taxonomia desse grupo. Os resultados obtidos com a utilização de marcadores moleculares, por auxiliarem na identificação das espécies, também são, conseqüentemente, importantes no âmbito da conservação.

Entre os diversos marcadores que existem, a análise de PCR-RFLP é muito utilizada em estudos taxonômicos por ser simples e abranger diversas regiões do genoma, incluindo as não transcritas (Ferreira & Souza-Chies 2005). Tais regiões, como os espaçadores transcritos internos do DNA ribossomal nuclear (ITS rDNA), por acumularem mutações mais rapidamente que as regiões codificantes e apresentarem altas taxas de substituição nucleotídica (Baldwin 1992), são ideais para estudos infragenéricos (Matiolli 2001). Entre os 21 fragmentos não codificantes do DNA plastidial (cpDNA), a região do intron do gene *trnL* e o espaçador intergênico *trnL-trnF* estão entre as cinco regiões que provêm maior número de caracteres potencialmente informativos (Shaw *et al.* 2005). Apesar dos espaçadores ITS serem mais informativos que os de cpDNA, os dois fragmentos mostram-se muito mais informativos quando analisados em conjunto (Miz 2003).

O Parque Estadual de Itapuã (30°20' a 30°27'S; 50°05' a 51°05'W) está localizado em Viamão, RS, a 57 km de Porto Alegre (Fig. 1A, B). A temperatura média da área é de 17,5°C e a precipitação média anual é de 1200 mm. Considerando que o Parque constitui uma unidade

de conservação e abriga uma grande biodiversidade, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência do uso de marcadores PCR-RFLP como ferramenta auxiliar na identificação de espécies da subfamília Iridoideae, principalmente *Sisyrinchium*, a fim de contribuir com o conhecimento da flora regional e fornecer subsídios relevantes para a preservação das espécies.

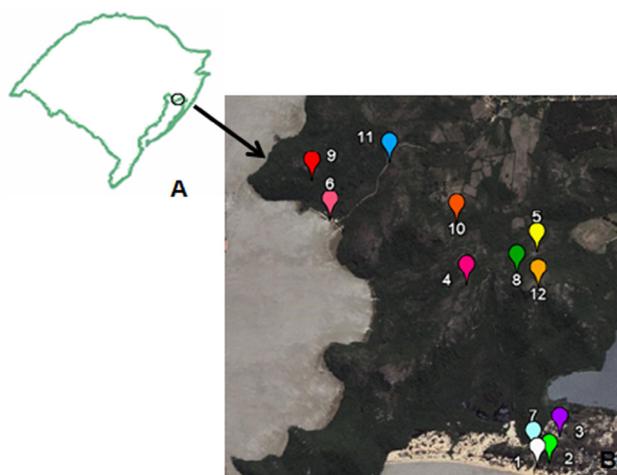
## MATERIAIS E MÉTODOS

### Local de estudo

As amostras estudadas foram coletadas no Parque Estadual de Itapuã, principalmente em locais de vegetação campestre contínua e em bordas de caminhos e estradas, localizados na Estrada para Praia de Fora, Praia de Fora, Trilha da Pedra da Visão, Trilha para o Morro da Grota, Estrada para Praia da Pedreira, Praia da Pedreira e Morro Fortaleza (Fig. 1B). No Parque Estadual de Itapuã, a família Iridaceae encontra-se representada por 15 espécies pertencentes aos gêneros *Cypella*, *Gelasine*, *Herbertia*, *Neomarica*, *Sisyrinchium* e *Trimezia* (Eggers 2008).

### Material de estudo

Foram coletadas *Herbertia pulchella* Sweet, *Trimezia spathata* Baker, uma espécie não identificada de *Cypella* e cinco espécies de *Sisyrinchium* (*S. micranthum* Cav., *S. ostenianum* Beauv., *S. palmifolium* L., *S. scariosum* Johnst. e *S. setaceum* Klatt), durante a primavera de 2005 e 2006 em sete diferentes localidades do Parque Estadual de Itapuã. As espécies coletadas, o número de indivíduos analisados por espécie, as coordenadas geográficas para a localização da área de coleta e a data de coleta podem



**Figura 1.** Localização do Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul. Fig. 1A. Estado do Rio Grande do Sul. Fig. 1B. Locais de coleta (1. Praia de Fora I, 2. Praia de Fora II, 3. Praia de Fora III, 4. Trilha da Pedra da Visão, 5. Trilha para o Morro da Grota I, 6. Praia da Pedreira, 7. Estrada para Praia de Fora I, 8. Trilha para o Morro da Grota II, 9. Morro Fortaleza, 10. Estrada para Praia de Fora II, 11. Estrada para Praia da Pedreira, 12. Trilha para o Morro da Grota III).

ser visualizados na Tabela 1.

Henderson (1976) ressaltou a importância da utilização de uma grande amostragem de indivíduos, pois a identificação pode ser difícil quando há uma grande variação intrapopulacional englobando diversas características morfológicas externas, tornando confusa a determinação de espécies. Tendo em vista este aspecto, embora ainda seja reduzido o número de repetições, foram incluídos seis acessos de *Sisyrinchium micranthum* e três de *S. palmifolium*. Além dessas espécies apresentarem o maior número de populações no Parque, *S. micranthum* exibe ampla variação morfológica, podendo apresentar três tipos morfológicos com relação ao porte das plantas (pequeno, médio e grande) e uma grande variação na coloração das flores.

### Extração de DNA

Folhas secas em sílica gel foram utilizadas para extração de DNA total conforme o método de Doyle e Doyle (1987) modificado. A quantificação do material extraído foi feita em comparação à intensidade das bandas de diferentes concentrações do marcador Lambda (50, 100, 200 e 400 ng).

### Amplificação do DNA por PCR

A região entre os genes 18S e 26S do rDNA nuclear (ITS) e o fragmento *trnL-L-F* do genoma plastidial foram amplificados usando os *primers* “92” (5'-AAG GTT TCC GTA GGT GAA C-3') e “75” (5'-TAT GCT TAA ACT CAG CGG G-3') (Baldwin 1992; Baldwin *et al.* 1995) para ITS e “C” e “F” para *trnL-L-F* (Taberlet *et al.* 1991). A reação de amplificação foi desenvolvida em um volume total de 25  $\mu$ l contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 0,1 mM de dNTPs, 0,45 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,05  $\mu$ M de cada *primer*, 1,25 unidades de Taq DNA polimerase (Cenbiot), 10% de DMSO e 50 ng de DNA.

As amplificações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems (GeneAmp PCR System 2400) utilizando as seguintes condições para a região ITS: desnaturação inicial de 5 min a 92°C, 35 ciclos repetidos de 1 min a 94°C (separação das fitas), 1 min a 58°C (anelamento dos *primers*), 1 min e 30 s a 72°C (extensão) e 2 min a 72°C para extensão final. Para o espaçador *trnL-L-F*, as condições de amplificação envolveram desnaturação inicial de 1 min a 94°C, 35 ciclos repetidos de 1 min a 94°C (separação das fitas), 1 min a 54°C (anelamento dos *primers*), 1 min e 30 s a 72°C (extensão) e 1 min a 72°C para extensão final.

O resultado das reações de PCR foi verificado em gel de agarose 1,0% contendo tampão TBE IX (50 mM de Tris, 50 mM de ácido bórico, 2,5 mM de EDTA, pH 8,3), corado com brometo de etídio e fotografado sob incidência de luz ultravioleta.

### Clivagem do DNA

As enzimas de restrição testadas para ITS foram

**Tabela 1.** Acessos utilizados para a análise de polimorfismo com as respectivas identificações quanto à espécie, coordenadas geográficas para localização e data de coleta.

| Identificação do acesso* | Espécie                        | Coordenadas geográficas           | Indicação na Fig.1 | Data de coleta |
|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------|----------------|
| ESC 130 A                | <i>Sisyrinchium micranthum</i> | 30° 23' 10,7" S / 51° 01' 12,8" W | 1                  | 10/11/2005     |
| ESC 172 N                | <i>S. micranthum</i>           | 30° 23' 09,4" S / 51° 01' 07,2" W | 2                  | 23/10/2006     |
| ESC 173 B                | <i>S. micranthum</i>           | 30° 22' 58,5" S / 51° 01' 02,3" W | 3                  | 23/10/2006     |
| ESC 174 A                | <i>S. micranthum</i>           | 30° 21' 57,2" S / 51° 01' 45,9" W | 4                  | 23/10/2006     |
| ESC 195 B                | <i>S. micranthum</i>           | 30° 21' 44,0" S / 51° 01' 13,0" W | 5                  | 20/11/2006     |
| ESC 208 K                | <i>S. micranthum</i>           | 30° 21' 30,4" S / 51° 02' 48,5" W | 6                  | 09/12/2006     |
| ESC 132 C                | <i>S. palmifolium</i>          | 30° 23' 04,3" S / 51° 01' 14,7" W | 7                  | 10/11/2005     |
| ESC 193 A                | <i>S. palmifolium</i>          | 30° 21' 53,0" S / 51° 01' 22,4" W | 8                  | 20/11/2006     |
| ESC 206 A                | <i>S. palmifolium</i>          | 30° 21' 14,6" S / 51° 02' 58,3" W | 9                  | 09/12/2006     |
| ESC 134 B                | <i>S. setaceum</i>             | 30° 21' 32,3" S / 51° 01' 50,6" W | 10                 | 10/11/2005     |
| ESC 136 B                | <i>S. scariosum</i>            | 30° 21' 07,7" S / 51° 02' 22" W   | 11                 | 10/11/2005     |
| ESC 138                  | <i>S. ostenianum</i>           | 30° 21' 07,7" S / 51° 02' 22" W   | 11                 | 10/11/2005     |
| ESC 133 A                | <i>Herbetia pulchella</i>      | 30° 21' 32,3" S / 51° 01' 50,6" W | 10                 | 10/11/2005     |
| ESC 137                  | <i>Cypella</i> sp.             | 30° 21' 07,7" S / 51° 02' 22" W   | 11                 | 10/11/2005     |
| ESC 194 A                | <i>Trimezia spathata</i>       | 30° 21' 58,6" S / 51° 01' 12,4" W | 12                 | 20/11/2006     |

\*ESC indica coletores Eggers & Souza-Chies. Os números indicam a população estudada e as letras que seguem correspondem ao indivíduo. As exsicatas serão depositadas no herbário ICN.

*DraI*, *AluI* e *HaeII* e, para a região *trnL-L-F*, foram *HhaI*, *DraI*, *MseI* e *HaeII*. Aliquotas de 10 µl de cada reação de PCR foram utilizadas para a clivagem com as enzimas de restrição durante três horas a 37°C. O produto de clivagem foi verificado em gel de agarose 1,5% contendo tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio e fotografado sob incidência de luz ultravioleta. Os fragmentos polimórficos gerados pelas enzimas de restrição foram utilizados para a construção de uma matriz binária contendo presença (1) ou ausência (0) de banda para cada indivíduo.

#### Construção do dendrograma

A matriz resultante da análise de PCR-RFLP foi utilizada para calcular o Índice de Similaridade de Dice, e a relação entre as espécies foi estimada através da construção de um dendrograma baseado no algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages). As análises foram realizadas com o programa NTSYS-pc versão 2.1 (Rohlf 2001) e o teste de reamostragem (Bootstrap: 1000 replicações) foi baseado no programa WinBoot (Yap & Nelson 1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

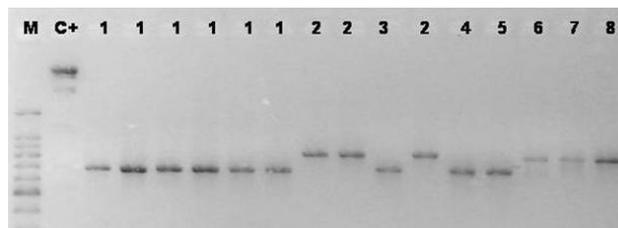
### ITS

A região ITS apresentou cerca de 700 pb de extensão, a qual foi estimada em comparação ao marcador Ladder (100 pb). Após clivagem com as três enzimas, foram produzidos seis fragmentos polimórficos. A enzima *AluI* gerou um padrão de bandas que permitiu separar *Sisyrinchium setaceum*, *S. scariosum*, um indivíduo de *S. micranthum*, *Herbetia pulchella* e *Cypella* sp., os quais não apresentaram sítio de clivagem, dos demais acessos que foram clivados parcialmente e apresentaram, além do fragmento de 700 pb, dois fragmentos (200 e 500 pb). *HaeII* produziu quatro bandas polimórficas, variando entre 150 e 700 pb. As espécies de *Sisyrinchium* exibiram

dois fragmentos (150 e 550 pb), e *Cypella* sp., apenas um (500 pb). *Trimezia spathata* não apresentou sítio de clivagem para esta enzima e o indivíduo representante de *Herbetia pulchella* não foi submetido à clivagem com *HaeII*. Nenhuma amostra apresentou sítio de clivagem para *DraI*.

### *trn L-L-F*

A região plastidial *trnL-L-F* em *Sisyrinchium* apresentou aproximadamente 800 pb de extensão e nos demais gêneros 950 pb, o qual foi estimado em comparação ao marcador Ladder (100 pb). Foram produzidos 13 fragmentos polimórficos após clivagem com as quatro enzimas. A enzima *HhaI* gerou um padrão de bandas que separou *Sisyrinchium* (com fragmentos de 50, 350 e 400 pb) dos demais gêneros, os quais não apresentaram sítio de clivagem. A enzima *DraI* produziu dois fragmentos para todas as espécies de *Sisyrinchium* (100 e 700 pb), exceto para *S. palmifolium*, que não apresentou sítio de clivagem para esta enzima. Os demais gêneros exibiram um fragmento visualizado em gel de 750 pb (Fig. 2). Cinco bandas polimórficas foram produzidas por *MseI*, variando entre 150 e 400 pb. *Sisyrinchium micranthum*, *S. setaceum*, *S. scariosum* e *S. ostenianum* agruparam-se por apresentar o mesmo padrão de bandas (150 e 350 pb).



**Figura 2.** Padrão de bandas gerado após a clivagem com enzima de restrição. Padrão de bandas gerado após clivagem da região *trnL-L-F* com a enzima *DraI*. M: Marcador Ladder (100 pb); C+: Lambda; 1. *Sisyrinchium micranthum*; 2. *S. palmifolium*; 3. *S. setaceum*; 4. *S. scariosum*; 5. *S. ostenianum*; 6. *H. pulchella*; 7. *Cypella* sp.; 8. *Trimezia spathata*.

**Tabela 2.** Índice de Similaridade de Dice estimado para as espécies dos gêneros *Sisyrinchium*, *Herbertia*, *Cypella* e *Trimezia* a partir da matriz resultante da análise de PCR-RFLP. Calculou-se uma média para os valores obtidos das espécies com mais de um indivíduo.

| Espécie                        | <i>Sisyrinchium micranthum</i> | <i>S. palmifolium</i> | <i>S. setaceum</i> | <i>S. scariosum</i> | <i>S. ostenianum</i> | <i>Herbertia pulchella</i> | <i>Cypella sp.</i> | <i>Trimezia spathata</i> |
|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|----------------------------|--------------------|--------------------------|
| <i>Sisyrinchium micranthum</i> | 1                              | 0,676                 | 0,916              | 0,916               | 0,983                | 0                          | 0                  | 0,267                    |
| <i>S. palmifolium</i>          |                                | 1                     | 0,556              | 0,556               | 0,700                | 0                          | 0                  | 0,308                    |
| <i>S. setaceum</i>             |                                |                       | 1                  | 1                   | 0,900                | 0                          | 0                  | 0                        |
| <i>S. scariosum</i>            |                                |                       |                    | 1                   | 0,900                | 0                          | 0                  | 0                        |
| <i>S. ostenianum</i>           |                                |                       |                    |                     | 1                    | 0                          | 0                  | 0,267                    |
| <i>Herbertia pulchella</i>     |                                |                       |                    |                     |                      | 1                          | 1                  | 0,667                    |
| <i>Cypella sp.</i>             |                                |                       |                    |                     |                      |                            | 1                  | 0,667                    |
| <i>Trimezia spathata</i>       |                                |                       |                    |                     |                      |                            |                    | 1                        |

*Sisyrinchium palmifolium* apresentou três fragmentos (200, 250 e 350 pb) e os demais gêneros apenas dois, com 400 pb de extensão. A enzima *HaeII* separou os representantes de *Sisyrinchium*, com dois fragmentos (500 e 200 pb), dos demais gêneros que não possuíam sítio de clivagem para esta enzima.

As enzimas *HaeII* em ITS e *MseI* e *DraI* em *trnL-L-F* geraram, para alguns indivíduos, bandas que devem apresentar tamanho muito pequeno (menor que 50 pb), as quais não são visualizados em gel de agarose 1,5%.

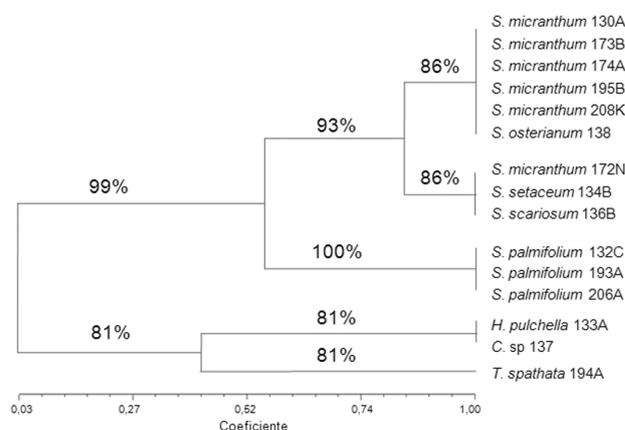
*Relação interespecífica*

O marcador escolhido e o reduzido número amostral utilizado para cada espécie não tornaram possível a obtenção de resultados concretos relacionados à variabilidade intraespecífica. A similaridade genética interespecífica baseada no índice de Dice variou de 0 a 100% (Tab. 2). Dentre todas as combinações obtidas, o valor de similaridade mais alto foi entre os pares *S. setaceum* / *S. scariosum* e *H. pulchella* / *Cypella sp.* (100%). Considerando apenas a similaridade em *Sisyrinchium* (>81%), as combinações de espécies que apresentaram os valores mais baixos foram *S. palmifolium* / *S. setaceum* e *S. scariosum* (55,6%) e os mais altos, após o par mais similar *S. setaceum* / *S. scariosum*, são *S. micranthum* / *S. ostenianum* (98,3%) e *S. micranthum* / *S. setaceum* e *S. scariosum* (91,6%). Os demais gêneros, com exceção de *Trimezia*, que compartilhou poucos marcadores com *S. micranthum*, *S. palmifolium* e *S. ostenianum*, não apresentaram similaridade com qualquer representante de *Sisyrinchium*.

O dendrograma construído a partir dos dados da matriz resultante da análise de PCR-RFLP permitiu a visualização de três grandes grupos (Fig. 3). Os dois primeiros grupos reuniram, com elevado valor de bootstrap (99%), representantes da tribo Sisyrinchieae, a mais basal e a menos especializada das quatro que compõem a subfamília. As espécies de *Sisyrinchium*, juntamente com *Libertia*, *Orthrosanthus* e outros gêneros da tribo, formam um grupo heterogêneo com carência de caracteres apomórficos, mas que apresenta os ramos do estilete em posição alterna aos estames, aspecto de natureza plesiomórfica (Goldblatt 1990). As filogenias moleculares da família apresentam sinapomorfias encontradas no genoma plastidial unindo os gêneros supracitados na tribo (Reeves *et al.* 2001, Souza-Chies

*et al.* 1997).

Conforme características citadas na chave de Jonhston (1938), o primeiro grande grupo observado no dendrograma é formado por espécies que apresentam glândulas especiais (elaióforos). Este se dividiu em dois subgrupos com alto grau de confiabilidade (93%). O primeiro subgrupo reuniu *Sisyrinchium ostenianum* e cinco indivíduos de *S. micranthum*, espécies que apresentam folhas planas e tricomas na base (*S. micranthum*) ou no topo e base (*S. ostenianum*) do tubo estaminal. O outro subgrupo congregou, além de um indivíduo de *S. micranthum*, espécies que apresentam folhas cilíndricas, filetes totalmente unidos e tubo estaminal com tricomas ao longo de toda sua extensão, esparsamente em *S. scariosum* ou densamente em *S. setaceum*. O fato deste indivíduo de *S. micranthum* permanecer separado dos demais da mesma espécie no dendrograma revela que há divergências marcantes entre os acessos analisados, as quais podem estar relacionadas a características citogenéticas. Os números cromossômicos descritos para *S. micranthum* são de 2n = 32 e 2n = 48, relativos a espécimes coletados no Texas e na Colômbia, respectivamente (Kenton *et al.* 1986). Com relação à variabilidade genética e análises citogenéticas em populações desta espécie no RS, foram identificados três níveis de ploidia (Tacuatiá *et al.*, dados não publicados). Os cinco representantes agrupados no dendrograma apresentam o mesmo nível de ploidia, enquanto o indivíduo isolado de *S. micranthum* apresenta número cromossômico distinto. Em concordância com resultados



**Figura 3.** Dendrograma gerado a partir do índice de Similaridade de Dice. Os números sobre os ramos indicam valores de bootstrap.

preliminares de análise molecular com marcadores do tipo ISSR (“Inter Simple Sequence Repeats”), este dado indica que as populações desta espécie são bem estruturadas no Parque Estadual de Itapuã, uma vez que os grupos de indivíduos de mesma ploidia apresentam similaridade maior entre si. Não há informações sobre o número cromossômico das espécies *S. setaceum* e *S. scariosum*.

O segundo grande grupo reuniu, com o mais alto valor de bootstrap (100%), apenas populações de *S. palmifolium*, espécie que não possui elaióforos. A ausência ou presença de elaióforos é considerada uma característica morfológica relevante, uma vez que separa com exatidão conjuntos de espécies bem distintos (e.g. Johnston 1938). Já em relação ao número cromossômico ou análises genéticas e populacionais, não existem dados na literatura.

O terceiro grupo reuniu plantas de outros gêneros e dividiu-se em dois subgrupos conforme a tribo a que pertencem. O primeiro agrupou espécies de *Cypella* e *Herbetia*, pertencentes à tribo Trigridae, que são plantas bulbosas com folhas plicadas. O segundo é formado por *Trimezia spathata*, espécie de folha plana, da tribo Mariceae. O mesmo resultado foi encontrado em estudo filogenético realizado por Goldblatt (1990), onde as duas tribos permaneceram reunidas no cladograma, em um grupo distinto de Sisyrinchieae. Segundo este autor, ambas possuem flores semelhantes, com ramos do estilete engrossados (em contraste com os ramos achatados que ocorrem em Irideae) e nectários florais mais desenvolvidos nas tépalas internas. Tillich (2003), em um trabalho que descreveu a morfologia e estrutura de plântulas de 36 gêneros de Iridaceae e discutiu tais contribuições para a classificação e filogenia do grupo, encontrou forte semelhança entre as duas tribos em relação à estrutura principal das plântulas. Os clados construídos a partir destes dados, conforme o autor, estão de acordo com as recentes classificações da família utilizando dados moleculares.

Os resultados obtidos revelaram que o uso de marcadores moleculares do tipo PCR-RFLP é útil para estimar a variabilidade genética dos gêneros estudados da subfamília Iridoideae que ocorrem no Parque Estadual de Itapuã e para auxiliar na identificação das suas espécies, uma vez que agrupou os acessos, com altos valores de bootstrap, conforme caracteres morfológicos. Estudos posteriores serão realizados incluindo outros representantes que apresentem problemas taxonômicos para que melhor se conheça a biodiversidade em outras áreas ao longo da distribuição geográfica da família. Dessa forma, pretende-se contribuir para o desenvolvimento de programas para a conservação e proteção das espécies da família Iridaceae.

#### AGRADECIMENTOS

À Secretaria Estadual de Meio Ambiente do Rio Grande do Sul, por viabilizar o acesso dos pesquisadores ao

Parque. Ao CNPq e FAPERGS, pelo apoio financeiro.

#### REFERÊNCIAS

- APG II (The Angiosperm Phylogeny Group). 2003. Un update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141: 399-436.
- BALDWIN, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the Internal Transcribed Spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 1: 3-16.
- BALDWIN, B. G., SANDERSON, M. J., PORTER, M. J. *et al.* 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82: 247-277.
- BENTHAM, G. & HOOKER, J. D. 1883. Iridaceae, Genera Plantarum Lovell, Reeve and Company, London, UK 3(2).
- COCUCCI, A. R. & VOGEL, S. 2001. Oil-producing of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in southern South America. *Flora*, 196: 26-46.
- CHOLEWA, A. F. & HENDERSON, D. M. 1984. Biosystematics of *Sisyrinchium* section Bermudiana (Iridaceae) of the Rocky Mountains. *Brittonia*, 36(4): 342-363.
- DAHLGREN, R. M. T., CLIFFORD, H. T., YEO, P. F. 1985. *The families of the monocotyledons*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer. p.238-249
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- EGGERS, L. 2008. A família Iridaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, 6(3): 167-175.
- FERREIRA, T. F. & SOUZA-CHIES, T. T. 2005. Genetic diversity among *Paspalum* L. species (Poaceae) belonging to the Notata and Linearia groups based on restriction fragment length polymorphism analyses. *Genetica*, 125: 133-140.
- GOLDBLATT, P. 1982. Chromosome cytology in relation to suprageneric systematics of neotropical Iridaceae. *Systematic Botany*, 7(2): 186-198.
- GOLDBLATT, P. 1990. Phylogeny and classification of Iridaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 77: 607-627.
- GOLDBLATT, P., RUDALL, P. & HENRICH, J. E. 1990. The genera of the *Sisyrinchium* Alliance (Iridaceae: Iridoideae): Phylogeny and relationships. *Syst. Bot.*, 15(3): 497-509.
- GOLDBLATT, P., MANNING, J. C. & RUDALL, P. 1998. Iridaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed) *The Families and Genera of Vascular Plants*. Springer, Berlin. v. 3, p. 295-314.
- GOLDBLATT, P., DAVIES, T. J., MANNING, J. C., VAN DER BANK, M., SAVOLAINEN, V. 2006. Phylogeny of Iridaceae subfamily Crocoideae based on a combined multigene plastid DNA analysis. *Aliso*, 22: 399-411.
- GOSTIMSKY, S. A., KOKAEVA, Z. G. & KONOVALOV, F. A. 2005. Studying plant genome variation using molecular markers. *Russian Journal of Genetics*, 41(4): 378-388.
- HENDERSON, D. M. 1976. A biosystematic study of Pacific Northwestern blue-eyed grasses (*Sisyrinchium*, Iridaceae). *Brittonia*, 28: 149-176.
- JOHNSTON, I. M. 1938. The species of *Sisyrinchium* in Uruguai, Paraguai and Brasil. *Journal of the Arnold Arboretum*, 19: 376-401.
- KENTON, A. Y., RUDALL, P. J. & JONHSON, A. R. 1986. Genome size variation in *Sisyrinchium* L. (Iridaceae) and its relationship to phenotype and habitat. *Botanical Gazette*, 147: 342-354.
- MACHADO, I. C. 2004. Oil-collecting bees and related plants: a review of the studies in the last twenty years and case histories of plants occurring in NE Brazil. In: FREITAS, B. M. & PEREIRA, J. O. P. (Eds) *Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination*. Fortaleza: Imprensa Universitária, p. 255-280.

- MATIOLLI, S. R. 2001. *Biologia Molecular e Evolução*. Holos. Editora Ltda-Me. p. 1-202.
- MIZ, R. B. 2003. *Estudo da variabilidade genética e filogenia do grupo Dilatata do gênero Paspalum (Poaceae)*. 83 f. Monografia apresentada para obtenção do título de bacharelado. Curso de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.
- RAVENNA, P. 1968a. Iridaceae. In: CABRERA, A. L. *Flora de la Provincia de Buenos Aires*. Buenos Aires: INTA. p. 539-565
- RAVENNA, P. 1968b. Notas sobre Iridaceae III. *Bonplandia* 2(16). p. 273-291
- RAVENNA, P. 1981a. *Kellissa*, a new genus of Iridaceae from South Brazil. *Bull. Mus. Nat., sér. B, Adansonia* 3: 105-110.
- RAVENNA, P. 1981b. Revisional studies in the genus *Sisyrinchium*. *Wrightia*, 7: 1-9.
- RAVENNA, P. 1981c. *Sympa*, a new genus of Iridaceae from Rio Grande do Sul, Brazil. *Wrightia*, 7: 10-11.
- RAVENNA, P. 1983. *Catila* and *Onira*, two new genera of South American Iridaceae. *Nordic Journal of Botany*, 3(2): 197-205.
- RAVENNA, P. 2001. *S. megapotamicum*. *Onira*, *Botanical Leaflets*, 6: 7-8.
- RAVENNA, P. 2002a. Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* – VIII. *Onira*, *Botanical Leaflets*, 6(7): 48-58.
- RAVENNA, P. 2002b. Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* – IX. *Onira*, *Botanical Leaflets*, 7(6): 20-29.
- REEVES, G.; CHASE, M. W.; GOLDBLATT, P. R.; FAY, M. F.; COX, A. V.; LEJEUNE, B.; SOUZA-CHIES, T. T. 2001. Molecular systematics of Iridaceae: evidence from four plastid DNA regions. *Am. J. Bot.*, 88(11): 2074-2087.
- ROHLF, F. J. 2001. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1, Exeter Software, Setauket, New York.
- RUDALL, P., KENTON, A. Y. & LAWRENCE, T. J. 1986. An anatomical and chromosomal investigation of *Sisyrinchium* and allied genera. *Botanical Gazette*, 147(4): 466-477.
- SHAW, J., LICKEY, E. B., BECK, J. T., FARMER, S. B., LIU, W., MILLER, J., SIRIPUN, K. C., WINDER, C. T., SCHILLING, E. E. & SMALL, R. L. 2005. The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am. J. Bot.*, 92(1): 142-166.
- SOUZA-CHIES, T. T.; BITTAR, G.; NADOT, S.; CARTER, L.; BESIN, E.; LEJEUNE, B. 1997. Phylogenetic analysis of Iridaceae with parsimony and distance methods using the plastid gene *rps4*. *Plant Systematics and Evolution*, 204: 109-123.
- TABERLET, P. GIELLY, L. PAUTOU, G., BOUVET, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17: 1105-1109.
- TILLICH, H-J. 2003. Seedling morphology in Iridaceae: Indications for relationships within the family and to related families. *Flora*, 198: 220-242.
- YAP, I. & NELSON, R. J. 1996. Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendrograms. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. Discussion Paper series n° 14.