

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Diversidade e estrutura genética de populações de batata-da-serra (*Ipomoea serrana* Sim.-Bianch. & L.V. Vasconcelos) da Chapada Diamantina, Bahia, utilizando marcadores ISSR

Tatiane de Oliveira Gonçalves

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2016**

Tatiane de Oliveira Gonçalves
Licenciada em Ciências Biológicas

**Diversidade e estrutura genética de populações de batata-da-serra (*Ipomoea serrana*
Sim.-Bianch. & L.V. Vasconcelos) da Chapada Diamantina, Bahia, utilizando
marcadores ISSR**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **ELIZABETH ANN VEASEY**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Gonçalves, Tatiane de Oliveira

Diversidade e estrutura genética de populações de batata da serra (*Ipomoea serrana* Sim.-Bianch. & L.V. Vasconcelos) da Chapada Diamantina, Bahia, utilizando marcadores ISSR / Tatiane de Oliveira Gonçalves. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
79 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Ipomoea serrana* 2. ISSR 3. Diversidade genética 4. Estrutura genética 5. Marcadores moleculares 6. Chapada Diamantina 7. Espécie endêmica I. Título

CDD 633.492
G635d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICO

Aos meus amados pais Zélio Gonçalves e Itacy de Oliveira Gonçalves e a minha amada irmã Cinthia de Oliveira Gonçalves pelo amor incondicional e pelo pouso certo após toda e qualquer atribulação.

AGRADECIMENTOS

A Deus;

Aos meus pais e irmã;

Ao amigo querido Marcos da Silva Sampaio;

À Profa. Dra. Elizabeth Ann Veasey pela orientação, carinho, atenção e amizade;

Ao Prof. Dr. José Geraldo de Aquino Assis e a Profa. Dra. Alessandra Selbach Schnadelbach pela amizade e pelas colaborações diversas inclusive na prospecção de indivíduos para este trabalho e, antes disso, pela centelha que me fez lançar-me nesta empreitada;

À ESALQ, à CAPES;

A toda equipe LAGEP, em especial ao amigo Gabriel Dequigiovani e Thais Melega Tomé pelo apoio em bancada e discussões acadêmicas frutíferas;

Ao ICMBio e PARNA Chapada Diamantina;

À Cristiane Freitas de Azevedo-Gonçalves e Cezar Neubert Gonçalves pela atenção e apoio durante a coleta;

Ao biólogo Victor Flavius Guimarães e Guimarães e brigadistas Jair, Ronildo (rasta), Sumé, Joeldo, Lúcio, Renato e Amauri, com suas preciosas informações sobre a Chapada Diamantina;

À D. Ená e aos guias da Chapada Diamantina Seu Péu, Leôncio, Luiz Paulo e Edmundo;

À Rosangela Simão-Bianchini e Liziane Vilela Vasconcelos pelas preciosas informações e atenção;

À Patricia Schaker, Sueme Ueno, Alessandro Alves Pereira, Wanessa Scopel pela amizade, sugestões e orientações informais;

Ao querido amigo Ramon de Carvalho Cavalcante por me acompanhar nesta jornada;

6

À querida amiga Profa. Dra. Elizabeth Gerardo Neves pela amizade doce e divertida e conselhos acadêmicos;

À querida amiga Gabriela Torres da Silva pelas longas e adoráveis conversas e sugestões para este trabalho;

À Maira Miele e Zafira Evelma Gurgel;

À Stevenson Moschini Carlos, Fábio Emílio de Oliveira e Selma Kassouf pela amizade e excelentes conversas motivadoras;

À doutoranda Carolina Delfini pela ajuda em laboratório;

Aos professores Dr. Giancarlo Conde Xavier Oliveira e Dr. Mateus Mondin, amigo querido de muitas conversas acadêmicas, mas também filosóficas;

Enfim a todos que contribuíram desde a gênese deste trabalho.

“Eu atravesso as coisas — e no meio da travessia não vejo! — só estava era entretido na ideia dos lugares de saída e de chegada. (...) o real não está na saída nem na chegada: ele se dispõe para a gente é no meio da travessia...”

João Guimarães Rosa

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Objetivos.....	20
1.2 Hipóteses.....	20
2 DESENVOLVIMENTO.....	21
2.1 A família Convolvulaceae Juss.....	21
2.2 O gênero Ipomoea L.....	22
2.3 A espécie Ipomoea serrana Sim.-Bianch. & L.V. Vasconcelos	23
2.4. A Chapara Diamantina, Bahia.....	26
2.5 Conservação e variabilidade genética.....	34
2.6 Marcadores moleculares.....	36
2.6.1 Marcadores ISSR.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1 Coleta de tecido vegetal e voucher.....	41
3.2 Extração de DNA, quantificação e padronização.....	43
3.3 Otimização de reação, amplificação e visualização de bandas.....	45
3.4 Análise de dados.....	46
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Testes para extração de DNA.....	49
4.2 Testes para otimização da Amplificação.....	50
4.3 Diversidade e estrutura genética.....	51
5 DISCUSSÃO.....	57
5.1 Isolamento de DNA genômico e otimização de iniciadores.....	57
5.2 Diversidade e estrutura genética.....	58
6 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	65

RESUMO

Diversidade e estrutura genéticas de populações de batata-da-serra (*Ipomoea serrana* Sim.-Bianch. & L.V. Vasconcelos) da Chapada Diamantina, Bahia, utilizando marcadores ISSR

A batata-da-serra, *Ipomoea serrana* Sim.-Bianch. & L.V. Vasconcelos, é uma liana endêmica da Chapada Diamantina, Bahia, cuja raiz tuberosa é consumida por populações humanas há muitos anos. Apesar da espécie, classificada como vulnerável pela IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza), estar submetida à pressão antrópica devido à exploração de raízes tuberosas, para uso na alimentação, são raros os estudos com a espécie, razão pela qual é de grande importância conhecer a diversidade e estrutura genética da espécie. Estudos sobre diversidade e estrutura genética a partir de marcadores moleculares são importantes por fornecerem dados sobre impactos da exploração antrópica sobre as populações, podendo oferecer subsídio para planos de manejo e conservação de espécie. Cinco populações da Chapada Diamantina, constituindo um total de 142 indivíduos, foram investigados com quatro iniciadores *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR), resultando em 34 bandas, das quais 25 foram polimórficas. A análise dos parâmetros genéticos mostrou que as populações apresentam variabilidade moderada, com 73,8% de bandas polimórficas, 0,264 de índice de diversidade de Nei e 0,389 de índice de Shannon (valores médios). A maior parte da variação ocorreu dentro das populações (77%), estimado pela análise de variância molecular (AMOVA), enquanto que a variação entre populações foi de 23%, o que corroborou os resultados de estruturação obtidos pelo programa Structure, análise de coordenadas principais (PCoA) e agrupamento estimado pelo método Neighbor-Joining, a partir do coeficiente de dissimilaridade de Jaccard. A análise Bayesiana separou os indivíduos em quatro grupos, sendo que as populações Andaraí e Capão foram alocadas em grupos distintos, enquanto as outras três populações compartilharam indivíduos distribuídos em outros dois grupos. Este estudo, por seu caráter pioneiro com relação aos marcadores moleculares, constituiu o primeiro passo para o conhecimento da diversidade genética da espécie. Estudos futuros poderão ampliar o conhecimento sobre a espécie podendo oferecer subsídio para a elaboração de um plano de manejo para esta espécie que tem sido explorada na região.

Palavras chave: Convolvulaceae, Espécie endêmica, Caatinga, Cadeia do Espinhaço, Serra do Sincorá

ABSTRACT**Genetic diversity and structure of *batata-da-serra* populations (*Ipomoea serrana* Sim.-Bianch. & L.V. Vasconcelos) from Chapada Diamantina, Bahia, using ISSR markers**

batata-da-serra, *Ipomoea serrana* Sim.-Bianchi. & L.V. Vasconcelos, is an endemic liana from the Chapada Diamantina, Bahia, whose tuberous roots have been consumed by human populations for many years. Although the species, classified as vulnerable by the IUCN (International Union for Conservation of Nature), is subject to anthropic pressure due to the exploration of tuberous roots for food consumption, few studies have been conducted on the species, which is why it is of great importance to know the diversity and genetic structure of the species. Studies on genetic diversity and structure with molecular markers are important for providing data on the impacts of anthropogenic exploitation and can be useful for the species management and conservation. Five populations of Chapada Diamantina, consisting a total of 142 individuals were studied with four ISSR primers, resulting in 34 bands, 25 of which were polymorphic. The genetic diversity analysis showed that populations have a moderate variability, with 73.8% of polymorphic bands, Nei's unbiased gene diversity (H_e) was 0.264; Shannon diversity index (H') was 0.389, average values. Most of the variation was within populations (77%), as estimated by the analysis of molecular variance (AMOVA), whereas the variation between populations was 23% of the total, which corroborated the results of program Structure, principal co-ordinate analysis (PcoA) and cluster analyses, using the Neighbor-Joining method, and the dissimilarity coefficient of Jaccard. The Bayesian analysis separated the individuals into four groups, with populations Andaraí and Capão allocated into different groups, while the other three populations shared individuals in two other groups. Considering the pioneering characteristic of this study at the molecular level, it represents the first step towards the knowledge on the genetic diversity of the species. Future studies will increase the knowledge on the genetics of the species and may provide subsidy for the development of a management plan for a species that has been explored in the region.

Keywords: Convolvulaceae, Endemic species, Caatinga, Cadeia do Espinhaço, Serra do Sincorá

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Uso gastronômico da batata-da-serra. A) como entrada (com coco de licuri e canela) em restaurante no município de Lençóis; B) como salada em restaurante de <i>hostel</i> no município de Mucugê.....	19
Figura 2 - A) Flor; B) parte comestível da planta de <i>Ipomoea serrana</i> , denominada batata-da-serra.....	24
Figura 3 - Mapa de ecorregiões do bioma Caatinga.....	27
Figura 4 - Mapa de altimetria do bioma Caatinga.....	28
Figura 5 - Localização do Parque Nacional da Chapada Diamantina.....	29
Figura 6 - Mapa da geologia do bioma Caatinga.....	31
Figura 7 - Mapa da coleta de tecido vegetal de <i>Ipomoea serrana</i> Sim.-Bianch. & L.V. Vasconcelos, batata-da-serra.....	41
Figura 8 - Gel de quantificação de extração de DNA de <i>Ipomoea serrana</i> Sim.-Bianch. & L.V. Vasconcelos, batata-da-serra.....	49
Figura 9 - Padrão de bandas de marcadores ISSR MANNY para a população Lençóis/BA de <i>Ipomoea serrana</i> , batata-da-serra.....	50
Figura 10 - Número de bandas de ISSR para populações de <i>Ipomoea serrana</i> , batata-da-serra.....	52
Figura 11 - Análise de Coordenadas Principais dos 122 indivíduos de <i>Ipomoea serrana</i> , batata-da-serra, com base em marcadores ISSR.....	53
Figura 12 - Análise de Coordenadas Principais das 5 populações de <i>Ipomoea serrana</i> , batata-da-serra, com base em marcadores ISSR.....	53
Figura 13 - Dendrograma estimado pelo método Neighbor-Joining, com robustez de 1.000 reamostragens <i>bootstraps</i> , a partir do coeficiente de similaridade Jaccard (S) para indivíduos de <i>Ipomoea serrana</i> , batata-da-serra.....	54
Figura 14 - Valores de ΔK para cada valor de K das populações prévias de <i>Ipomoea serrana</i> , batata-da-serra, conforme Evanno et al. (2005).....	55
Figura 15 - Análise da estrutura genética de indivíduos de <i>Ipomoea serrana</i> , batata-da-serra, da Chapada Diamantina para dois agrupamentos ($K = 2$) e ($K = 4$).....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coleta de tecido vegetal de 142 indivíduos de <i>Ipomoea serrana</i> , batata-da-serra, em cinco municípios da Chapada Diamantina/BA.....	42
Tabela 2 - Iniciadores ISSR testados em <i>Ipomoea serrana</i> , batata-da-serra, e suas respectivas sequências (WOLFE, 2000).....	45
Tabela 3 - Iniciadores (WOLFE, 2000) otimizados para <i>Ipomoea serrana</i> , batata-da-serra, com suas respectivas temperaturas de reassociação e informações de diversidade genética (NB = N° de bandas, NBP = N° de bandas polimórficas, PBP = Percentual de bandas polimórficas e Rp = Resolving Power.....	50
Tabela 4 - Análise genética de cada população de <i>Ipomoea serrana</i> , batata-da-serra (I = índice de Shannon, He = diversidade genética de Nei (1973) e P = porcentagem de locos polimórficos. Desvio padrão entre parênteses).....	51
Tabela 5 - Análise de variância molecular para populações de <i>Ipomoea serrana</i> , batata-da-serra (GL = grau de liberdade, SQ = soma dos quadrados e MS = Quadrados Médios).....	52

1 INTRODUÇÃO

A batata-da-serra, *Ipomoea serrana* Sim.-Bianch. & L.V. Vasconcelos, é uma liana cuja raiz tuberosa é consumida por populações humanas da Chapada Diamantina, Bahia (MMA, 2007; ROCHA, 2012; VASCONCELOS; SIMÃO-BIANCHINI, no prelo). A planta foi utilizada durante os ciclos de ouro e diamante por garimpeiros da região e, desde então, tem sido incorporada ao cardápio local pelos moradores e por restaurantes que a oferecem como iguaria típica (Figura 1), principalmente na cidade de Lençóis/BA (AZEVEDO-GONÇALVES et al., 2010).



Figura 1 - Uso gastronômico da batata-da-serra. A) como entrada (com coco de licuri e canela) em restaurante no município de Lençóis; B) como salada em restaurante de *hostel* no município de Mucugê. Foto: Tatiane de Oliveira Gonçalves e José Geraldo de Aquino Assis, respectivamente.

Embora a espécie silvestre esteja submetida à pressão antrópica devido à exploração de raízes tuberosas, para uso na alimentação, são raros os estudos com batata-da-serra (AZEVEDO-GONÇALVES et al., 2010; ROCHA, 2012), razão pela qual é de grande importância conhecer os impactos desta exploração sobre as populações.

O conhecimento da diversidade e estrutura genética pode ser obtido por meio de marcadores moleculares (FALEIRO, 2007). Estudos dessa natureza são importantes por fornecerem dados sobre impactos da exploração sobre as populações, e podem oferecer subsídio para planos de manejo e conservação de espécies (FRANKHAM et al., 2008).

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar a diversidade e estrutura genética de populações de *I. serrana* da Chapada Diamantina, Bahia, utilizando marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

Como objetivos específicos, pode-se citar:

- a) Otimizar métodos de extração de DNA para a espécie;
- b) Otimizar iniciadores de ISSR para ampliações;
- c) Avaliar o nível de diversidade genética intra e interpopulacional;
- d) Avaliar a estrutura genética populacional;
- e) Gerar dados visando o estabelecimento de práticas de conservação da espécie.

1.2 Hipóteses

Espera-se encontrar maior diversidade genética na população de Mucugê, já que a mesma se encontra em região protegida com fiscalização, no Parque Municipal Sempre Viva.

Como conjunto de populações amostradas se encontram distantes, no mínimo, 10,5 km, com distância média entre os pontos de cerca de 20 km, espera-se encontrar as populações estruturadas.

Lianas podem alcançar novos espaços, com a queda da árvore que a sustenta, e se propagar vegetativamente (PUTZ, 2012). Desta forma, espera-se encontrar baixa variabilidade dentro das populações.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 A família Convolvulaceae Juss.

A espécie *I. serrana* pertence à família Convolvulaceae, uma das cinco famílias da ordem Solanales, conforme o *Angiosperm Phylogeny Group* - APG. Na família, que possui forte suporte à monofilia baseado em caracteres morfológicos (JUDD et al., 2009) e moleculares (STEFANOVIC et al., 2002; REFULIO-RODRIGUEZ; OLMSTEAD, 2014), predominam subarbustos ou ervas com ramos eretos ou volúveis sinistrogiros e sem gavinhas, raramente árvores.

Em sua maioria, as espécies da família Convolvulaceae apresentam raízes pivotantes, não sendo raras raízes tuberosas, floema intraxilemático, presença de células laticíferas, folhas alternas, sem estípulas, embora possa ocorrer pseudo-estípula em *I. cairica* (L.) Sweet. e *I. quamoclit* L. Apresentam inflorescências cimosas, produção de alcalóides (SIMÃO-BIANCHINI, 1998), flores actinomorfas com cinco áreas mesopétalas bem distintas, pentâmeras, gamopétalas, monóclinas, isostêmones, hipóginas; corola funiliforme, plicada; androceu com estames geralmente de tamanhos desiguais; ovário bilocular, geralmente com dois óvulos por lóculo. Cápsulas com deiscência longitudinal em quatro segmentos, eventualmente indeiscentes, ou bagas (SOUZA; LORENZI, 2008). A presença de látex na maioria das espécies dos gêneros *Ipomoea* L. e *Convolvulus* L. não pode ser extrapolada para a família. Devido à ampla variação morfológica, sobretudo nas folhas, a taxonomia da família ainda é confusa (SIMÃO-BIANCHINI, 1998).

Com distribuição cosmopolita, exceto por áreas geladas ou desertos absolutos, a maior concentração de espécies está nos trópicos (FERREIRA, 2009; JUDD et al., 2009;

SIMÃO-BIANCHINI, 1998; SOUZA; LORENZI, 2008). Bem representadas no Brasil, elas ocorrem nas mais diversas formações vegetais, alcançando cerca de 350 espécies no país (SIMÃO-BIANCHINI; PIRANI, 2005), sendo 15 delas indicadas como raras (BIANCHINI; ROSÁRIO, 2009).

Os dois gêneros mais bem representados no Brasil, *Ipomoea* L. e *Jacquemontia* Choisy, ainda carecem de estudos (SIMÃO-BIANCHINI, 1998), embora novas espécies tenham sido descritas nos últimos anos (FERREIRA; MIOTTO, 2011; SIMÃO-BIANCHINI; PIRANI, 2005; VASCONCELOS; SIMÃO-BIANCHINI, no prelo).

2.2 O gênero *Ipomoea* L.

Com cerca de 600-700 espécies (AUSTIN; HUÁMAN, 1996; FERREIRA, 2009; JUDD et al., 2009; SIMÃO-BIANCHINI, 1998), o gênero *Ipomoea* compreende o maior número de espécies dentro da família Convolvulaceae. Mais da metade das espécies está concentrada nas Américas, somando cerca de 500 espécies, sendo que a maioria é nativa e poucas foram introduzidas. Há espécies ainda não descritas especialmente na Bolívia, Paraguai e Brasil, sendo este último um exemplo de conhecimento incompleto sobre o gênero *Ipomoea* (AUSTIN; HUÁMAN, 1996). Simão-Bianchini e Pirani (2005) mencionaram 140 espécies dentro do gênero no Brasil, e novas descrições têm sido realizadas.

Trata-se de um gênero com espécies de grande relevância para a economia englobando alimentícias, ornamentais, medicinais, agrícolas (FERREIRA, 2009; ISLAM, 2006; LORENZI, 1991; MEIRA et al., 2012; MOHANRAJ; SIVASANKAR, 2014; XAVIER et al., 2015), bem como matéria prima para produção de bioetanol (WALUYO et al., 2015), dentre as quais a *I. batatas* (L.) Lam. (batata doce) tem tido destaque como objeto de estudos

(KHOURY et al., 2015; NASCIMENTO K.O et al., 2013; VEASEY et al., 2007; ZAWEDDE et al., 2014), com destaque para estudos moleculares na subseção 2.6 deste trabalho.

O gênero não pode ser considerado um grupo natural de acordo com os dados moleculares de Miller et al. (1999, 2004). A maioria de seus representantes possui hábito volúvel, crescimento rápido e nectários extraflorais na porção distal dos pecíolos e na base das sépalas (SIMÃO-BIANCHINI, 1998). Em *Ipomoea* as áreas mesopétalas - região central de cada pétala que fica exposta no botão de Convolvulaceae - é sempre muito distinta, bem delimitada por nervuras de consistência mais firme, geralmente de coloração mais escura (SIMÃO-BIANCHINI, 1998). Apresentam flores que secretam néctar sendo que algumas *Ipomoea* são polinizadas por beija flores (JUDD, 2009; SIMÃO-BIANCHINI, 1998), abelhas principalmente do gênero *Cemolubus*, *Bombus* e *Melitoma* (EPPERSON; CLEGG, 1987; SIMÃO-BIANCHINI, 1998; STUCKY, 1985; STUCKY; BECKMANN, 1982; ENNOS, 1981), mariposas (McMULLEN, 2009; SIMÃO-BIANCHINI, 1998), borboletas, vespas, besouros e dípteros (SIMÃO-BIANCHINI, 1998) e formigas (BRITO et al., 2012). As sementes são relativamente grandes, mas provavelmente dispersas pelo vento (JUDD et al., 2009).

2.3 A espécie *Ipomoea serrana* Sim.-Bianch. & L.V. Vasconcelos

Endêmica da Chapada Diamantina (FUNCH et al., 2004), a espécie *I. serrana*, ou batata-da-serra (Figura 2) ocorre em altitudes que variam de 450 a 1200 metros acima do nível do mar, crescendo entre rochas ou serrapilheira, em campos rupestres em montanhas (VASCONCELOS; SIMÃO-BIANCHINI, no prelo).

A espécie *I. serrana*, uma liana de ramos glabros e látex hialino, é morfologicamente semelhante a *I. pintoi* O'Donell, diferindo desta por apresentar padrão de nervação foliar actinódroma com 4-5 pares de venação, enquanto *I. pintoi* apresenta distribuição de nervura foliar broquidódroma com 9-12 pares de venação (VASCONCELOS; SIMÃO-BIANCHINI, no prelo).



Figura 2 - A) Flor; B) parte comestível da planta de *Ipomoea serrana* Sim.-Bianch. & L.V. Vasconcelos, denominada batata-da-serra

I. serrana, batata-da-serra, apresenta folhas simples, alternas, inflorescências cimosas dicasiais com 9-12 flores, botões florais elipsóides, sementes elipsóides, marrom brilhante, 6 x 3 mm, tricomas em ambos os lados com 5-8 mm de comprimento (VASCONCELOS; SIMÃO-BIANCHINI, no prelo). Simão-Bianchini¹ visualizou em lupa as exsiccatas da batata-da-serra e observou a presença de nectários extraflorais na posição distal do pecíolo (informação verbal).

O status de conservação da espécie *I. serrana* na IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) é Vulnerável (VU). Sua raiz tuberosa, popular na culinária local tem sofrido extração excessiva, e algumas localidades estão extintas (VASCONCELOS; SIMÃO-BIANCHINI, no prelo).

Além da *I. serrana*, as espécies *I. anamariae* Sim.-Bianch. & L.V. Vasconcelos, *I. pintoi* O'Donell, *I. rupestris* Sim.Bianch. & Pirani e *I. longistaminea* O'Donell também têm tubérculos que, de acordo com as etiquetas de herbário, são chamados de batata-da-serra,

¹ Professora Dra. Rosângela Simão Bianchini Instituto de Botânica do Estado de São Paulo e programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente.

diferindo, entre si, por sutis características morfológicas (VASCONCELOS; SIMÃO-BIANCHINI, no prelo).

Foram observadas visitas de mamangava do gênero *Bombus* (AZEVEDO-GONÇALVES et al., 2010) e formigas (BRITO et al., 2012) em flores de *I. serrana*, no entanto não se pode afirmar que se trate do polinizador já que não há estudos desta natureza para a espécie.

Rocha (2012) identificou elevado conteúdo de água e baixas concentrações de lipídeos e proteínas na polpa de batata-da-serra *in natura*, considerando-a uma fonte alimentícia promissora de baixo valor calórico. Além disso, a polpa apresenta atividade antioxidante e baixo índice de contaminação microbiológica para fungos e leveduras, *Bacillus cereus* e mesófilos totais, sendo considerada uma fonte alimentícia segura.

A despeito das qualidades e da recomendação de utilização da batata-da-serra, por consistir num alimento seguro (ROCHA, 2012), se conhece pouco sobre a espécie e os impactos sobre a sua exploração. É possível que se trate de uma espécie incipientemente domesticada, conforme a classificação de Clement (1999), pois deve ter sofrido algum tipo de seleção e intervenção ao longo de sua utilização, sendo possível que a média fenotípica não tenha sido alterada em comparação com populações selvagens, tais como aquelas em regiões de difícil acesso e regiões protegidas, todavia é possível que haja variabilidade um pouco menor em regiões facilmente acessadas.

Os mecanismos reprodutivos e de dispersão naturais da batata-da-serra são desconhecidos. Todavia, há importantes informações sobre lianas como seu mecanismo adaptativo de formar raízes estoloníferas, originando brotos verticais que podem eventualmente dar origem a plantas independentes (ENGEL; FONSECA; OLIVEIRA, 1998) e sua capacidade de propagação vegetativa, maximizando a duração dos genótipos

individuais, mas também o elevado grau de heterozigose pelo acúmulo de mutações somáticas e de um sistema sexual obrigatoriamente cruzado (GENTRY, 1991).

As populações da batata-da-serra, por serem endêmicas e possivelmente de tamanho reduzido, podem sofrer efeitos de deriva e/ou seleção natural, e o manejo inadequado pode estar reduzindo ainda mais o seu tamanho. As análises genéticas permitem mensurar a variabilidade e inferir sobre o fluxo gênico. As abordagens de genética de populações permitem analisar a diversidade entre e dentro de populações subsidiando estratégias de manejo e conservação (LOVELESS; HAMRICK, 1984; RAO; HODGKIN, 2002).

2.4. A Chapara Diamantina, Bahia

Estima-se que pelo menos 932 espécies tenham sido registradas na Caatinga, sendo 318 delas endêmicas, com 20 gêneros de plantas exclusivos da Caatinga (GIULIETTI et al., 2003b). O Complexo da Chapada Diamantina (Figura 3) é uma das oito ecorregiões da Caatinga compreendendo uma área de 50.610 km² que se alonga no sentido Norte-Sul, em forma de Y, seguindo o alinhamento do divisor de água da Chapada Diamantina, sendo a região mais alta do bioma caatinga (VELLOSO et al., 2002) (Figura 4). Esse conjunto de extensos platôs e altitudes que variam de 600 a 1300 metros possui relevo geralmente acidentado, com grandes superfícies planas de altitude, apresentando solos profundos e muito pobres nos topos dos platôs e rasos e pedregosos nas áreas de relevo acidentado (SÁ et al., 2003).

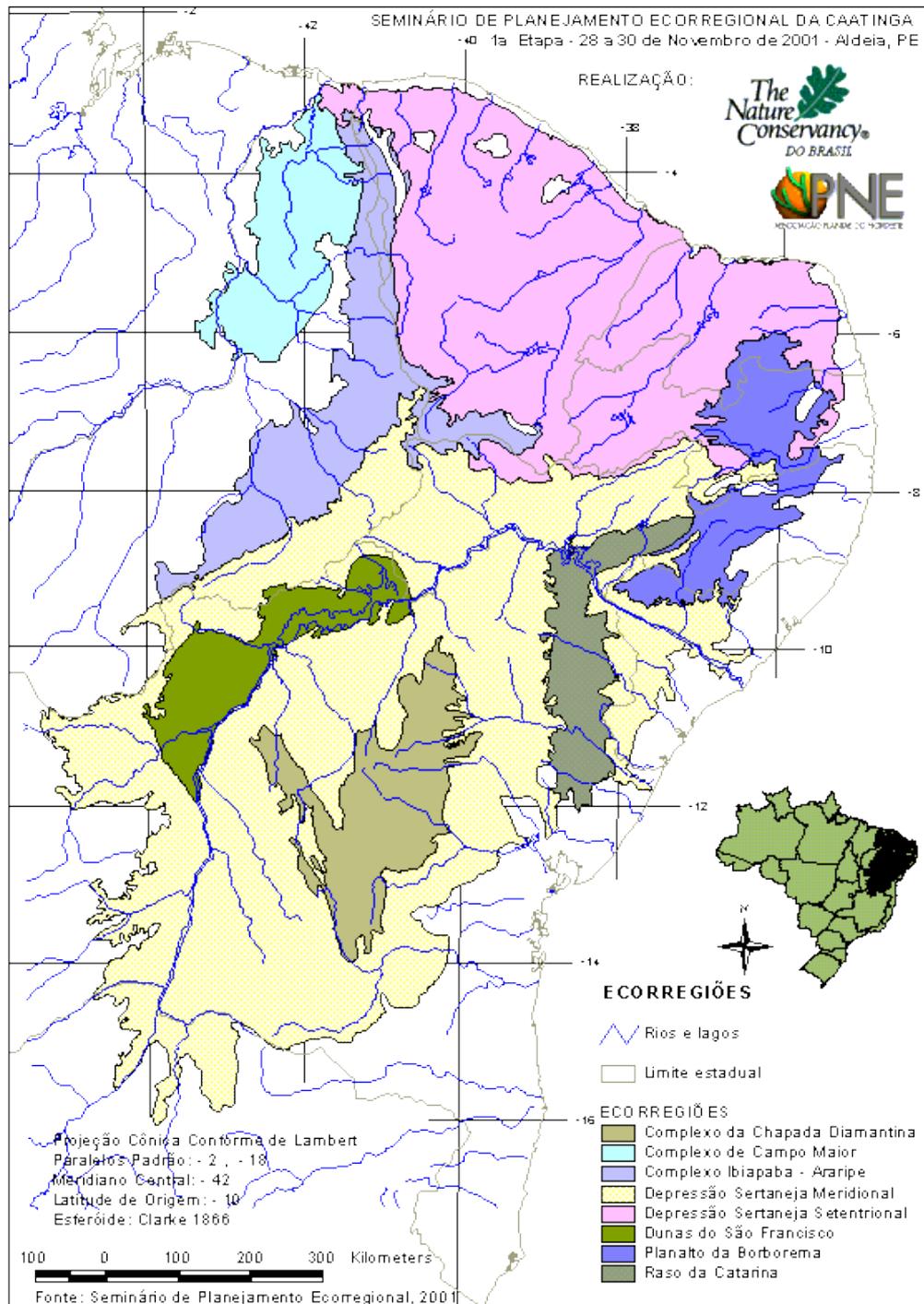


Figura 3 - Mapa de ecorregiões do bioma Caatinga. Fonte: Seminário de Planejamento Ecorregional, 2001. Disponível em: <<http://www.macamp.com.br/variedades/caatinga.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2016

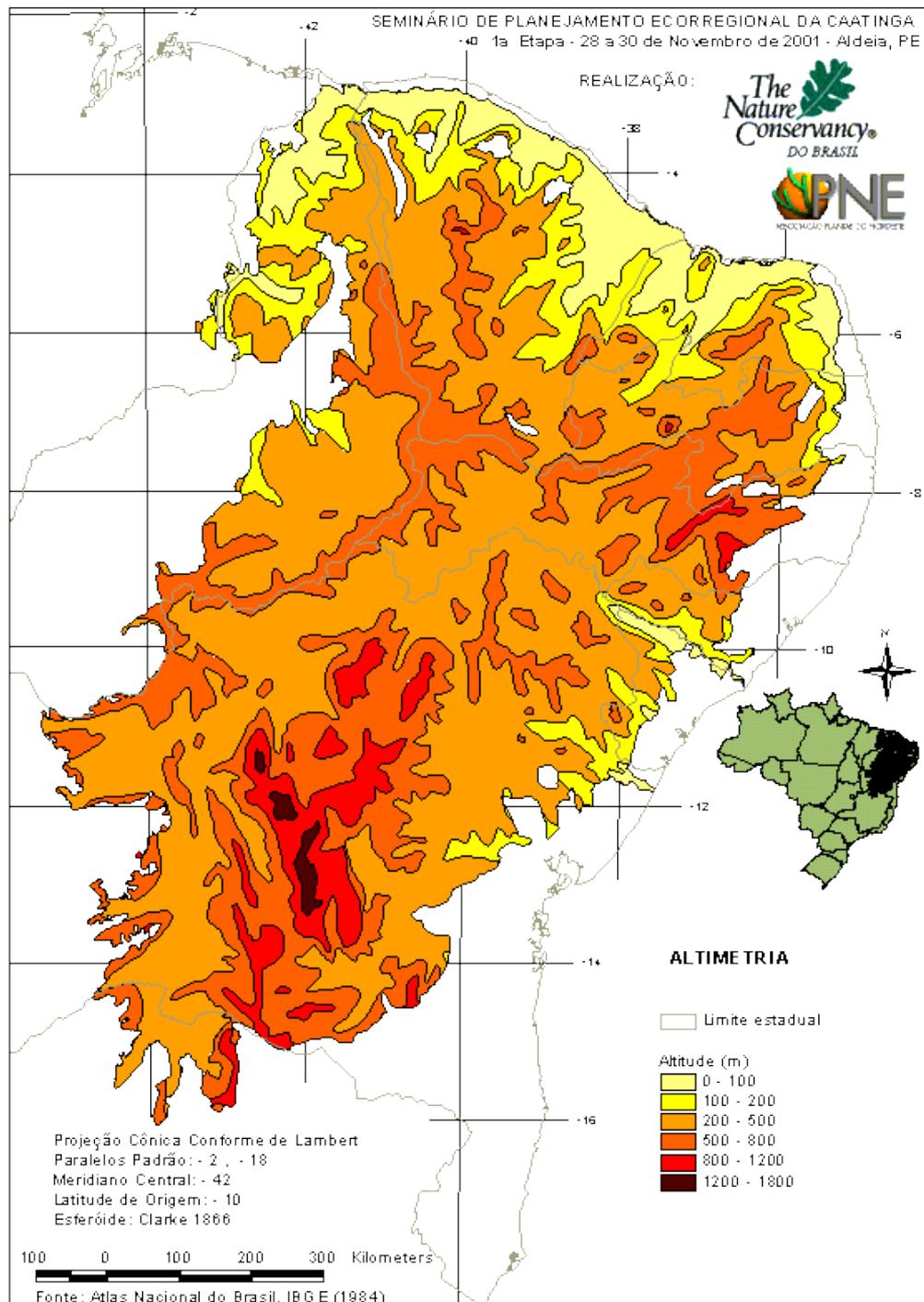


Figura 4 - Mapa de altimetria do bioma Caatinga. Fonte: Seminário de Planejamento Ecorregional, 2001. Disponível em: <<http://www.macamp.com.br/variedades/caatinga.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2016

Este complexo abriga a unidade de conservação de proteção integral Parque Nacional da Chapada Diamantina (PNCD) (Figura 5), com cerca de 152.400 ha de superfície, abrangendo os municípios de Andaraí, Ibicora, Itaetê, Lençóis, Mucugê e Palmeiras. Criado em 1985, com o objetivo de proteger amostras representativas da Serra do Sincorá, uma das feições que compõem a Chapada Diamantina que, por sua vez, faz parte da Cadeia do Espinhaço, de formação montanhosa, e que abriga grande riqueza de espécies de variadas famílias, e possui elevado número de táxons endêmicos (CONCEIÇÃO et al., 2005; COSTA et al., 2008; MMA, 2007; VELLOSO et al., 2002; ZAPPI et al., 2003), o PNCD se estende por mais de 1.000 km, desde o centro-sul de Minas Gerais até a Chapada Diamantina na Bahia (MMA, 2007).

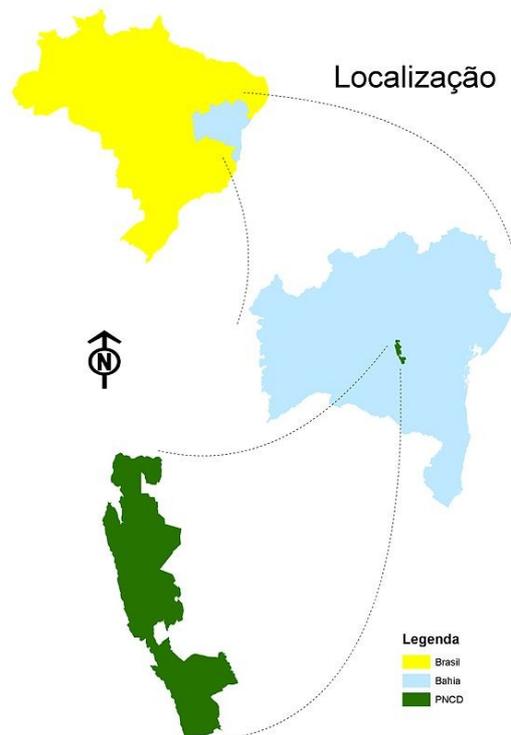


Figura 5 - Localização do Parque Nacional da Chapada Diamantina. Fonte: Arquivo PNCD - Felipe Weber. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Parque_Nacional_da_Chapada_Diamantina>. Acesso em: 14 fev. 2016

Extensas áreas do PNCD já sofreram pressão antrópica, e atualmente há pequenas roças de subsistência de moradores que ali habitam. Há, portanto, ainda, um nível de antropismo fruto da atividade artesanal de garimpeiros locais, agricultores de café e extrativistas vegetais. Os trechos ocupados correspondem a 1,6% da área do PNCD (MMA, 2007).

A Chapada Diamantina é conhecida pela riqueza de nascentes em meio ao semi-árido e vegetação com fisionomia variada, como regiões xerofíticas encontradas em grandes altitudes, típicas de Caatinga; regiões campestres de solos rasos e profundos, desde formações florestais até áreas desprovidas de árvores com intensa cobertura de gramíneas, normalmente associadas ao Cerrado; formações com características decíduais, semidecíduais ou mesmo perenefoliadas, associadas a solos profundos ou a cursos e corpos d'água, associadas à Mata Atlântica; e campos rupestres, que ocorrem sobre rocha exposta ou sobre litossolos, em geral acima de 1000 metros, mas com ocorrências em altitudes menores como em Andaraí, em regiões com cerca de 500 metros (CONCEIÇÃO et al., 2005; MMA, 2007).

A maior parte da diversidade da flora da Caatinga tem sido associada a maiores altitudes e a áreas rochosas, sob a hipótese de essa região ter sido uma zona mais protegida durante grandes oscilações climáticas do Pleistoceno e Quaternário. Possivelmente, em períodos mais úmidos, o nordeste brasileiro tenha sido coberto por diversos tipos de florestas, desde perenifólias até caducifólias (GIULIETTI et al., 2003a).

Tanto a Cadeia do Espinhaço quanto a Caatinga e a Chapada Diamantina têm sido diagnosticadas em estudos como regiões importantes para a conservação (GIULIETTI et al., 2003b; MMA, 2002; RAPINI et al., 2008; ROCHA et al., 2005; TABARELLI et al., 2003; VELLOSO, et al., 2002). As rochas presentes na Chapada Diamantina, que incluem arenitos

metamórficos (quartzitos), argilas e conglomerados, datam do período Pré-Cambriano (Figura 6) com cerca de 500 milhões de anos. A geomorfologia é complexa incluindo metamorfose em nível médio ou baixo, quebramento de várias dobras, dissecação da paisagem por movimentos tectônicos, processos de intemperismos por ação da água, glaciação e desgaste climático. A região apresenta ainda extensas falhas geológicas, com destaque para a Boninal (alinhamento Boninal-Itapebi). Depósitos notáveis de pedras preciosas e semipreciosas, como ouro, diamante e cristal de quartzito estão presentes com datação, principalmente, do Quaternário (ZAPPI et al.. 2003).

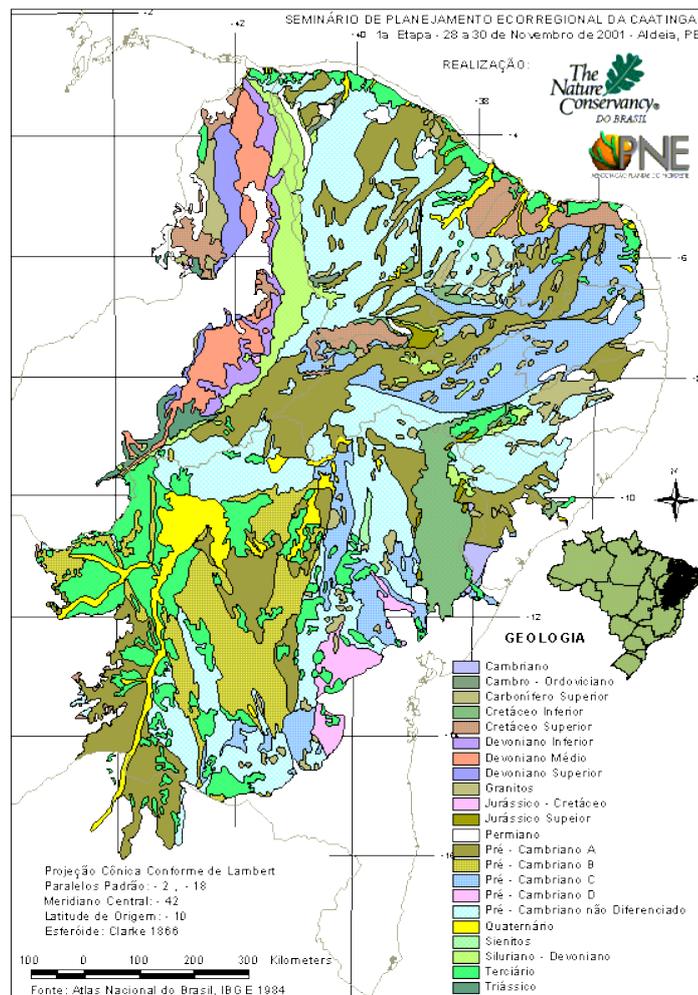


Figura 6 - Mapa da geologia do bioma Caatinga. Fonte: Seminário de Planejamento Ecorregional, 2001. Disponível em: <<http://www.macamp.com.br/variedades/caatinga.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2016

A busca pelo ouro, pedras preciosas e índios para escravização, por meio de lutas e massacres dizimando os índios Maracás, levou os primeiros bandeirantes ao sertão baiano, incluindo a região da Chapada Diamantina, no século XVI (MMA, 2007). Vinculada à extração de seus recursos minerais, deu-se a ocupação do espaço na Chapada Diamantina. Inicialmente, houve a exploração do ouro em Rio de Contas e em Jacobina, e, posteriormente, a dos diamantes, na região das Lavras Diamantinas (MATTA, 2006), formada pela Vila de Santa Izabel do Paraguaçu (atual Mucugê), Vila dos Lençóis (atual Lençóis), Vila de Andaraí (atual Andaraí) e Vila Bela Vista das Palmeiras (atual Palmeiras). Entre povoados efêmeros e perenes, a região chegou a receber 50 mil imigrantes entre as décadas de 1840 e 1860, provenientes de várias partes do país (MMA, 2007). No século XIX, o garimpeiro José Pereira do Prado (Cazuza do Prado) descobriu diamantes no rio Mucugê, caracterizando o ciclo diamantífero de mineração com exploração artesanal até início de 1980 quando passou a contar com as dragas em um modelo de exploração mecanizado e de larga escala (MATTA, 2006). Os impactos da exploração de diamantes são de grande magnitude para o ambiente, pois a ocorrência dos mesmos se dá em meio a sedimentos rochosos que são a base estruturante dos solos, substrato para o crescimento de toda a vegetação, além de gerar a mudança do curso dos rios e riachos. Atualmente a mineração está proibida, embora ocorra ainda em sua forma artesanal (MMA, 2007).

Grande volumes de sedimentos, na forma de solos e cobertura, foram mobilizados na Chapada Diamantina pela ação garimpeira, acelerando a ação sedimentar. Além disso, a ação antrópica tecnogênica, ou conjunta antrópica e não antrópica, formaram novos e diferenciados depósitos e cicatrizes. Os últimos 163 anos alteraram o ambiente das Lavras Diamantinas, haja vista as coberturas inconsolidadas e a superfície rochosa exumada (NOLASCO; MACEDO, 2005). Matta (2006) menciona impactos sociais, culturais e ambientais do

garimpo na região da Chapada Diamantina. Deste último ele se refere a assoreamento de bacias hidrográficas, perda de solo, desvios das redes de drenagem natural e dos rios, impacto sobre os aquíferos e nascentes dos rios, perda da vegetação, presença de sucatas e lixo nas frentes abandonadas de serviço, impacto visual e impacto sobre a fauna.

A Chapada Diamantina constitui uma área muito frágil ameaçada pela agricultura, extrativismo de plantas ornamentais e mineração (VELLOSO et al., 2002), na forma de garimpos clandestinos; desmatamentos para comércio ilegal de madeira; técnicas de agricultura inadequadas; caça de animais silvestres; saque de fósseis; turismo sem planejamento e pesca predatória (MATTA, 2006).

O grande pólo agrícola da região, com cerca de 7.000 ha plantados em sistema de monocultura irrigado com pivô central e grande aporte de insumos agrícolas, um dos principais produtores de batata do Nordeste, situa-se nas terras planas da bacia do Alto Paraguaçu, ocupando partes dos municípios de Mucugê e Ibicoara, com predominância do primeiro (MMA, 2007). Em uma posição privilegiada: situada a mais de 1.000 m acima do mar, tem regime hídrico constante com permanente disponibilidade de água, clima sub-úmido para seco, terra arável e mecanizável. Essa região produz, além de batata, milho, tomate, feijão e olerícolas (BATISTA, 2007; MMA, 2007). O extrativismo vegetal contempla lenha, madeira, sempre-vivas - uma planta do gênero *Syngonanthus*, plantas ornamentais como orquídeas, bromélias, algumas palmeiras e cactos (MMA, 2007).

Vale et al. (2008), realizaram um zoneamento em que categorizou algumas áreas de uso extensivo caracterizadas por médio a baixo grau de antropização, derivada de usos antigos, associado a garimpo, agricultura, pasto, coleta de “sempre-viva”, retirada de plantas ornamentais (orquídeas, bromélias) madeira e lenha, dentre as quais as cristas residuais da Serra do Sincorá até o vale dos rios Mucugê e Cumbuca - zona que se estende até a BA-142

(zona de uso intensivo) e continua do lado oposto ocupando toda a base da escarpa da serra. A zona de uso intensivo, ao longo da rodovia que atravessa o PNCD, é constituída de áreas de vegetação rupestre e campos de “sempre-viva” que foram intensamente coletadas até os anos 90. Essas regiões foram usadas para pasto, desmatadas e sazonalmente queimadas, comprometendo profundamente os ecossistemas e os recursos hídricos. Há ainda áreas consideradas por Vale et al. (2008) sob o título “de recuperação”. São regiões efetivamente ocupadas dentro do Parque por comunidades remanescentes que praticam agricultura de subsistência, sobretudo café, envolvendo desmatamento, introdução de espécies exóticas, uso da água e do solo.

O Parque Municipal Sempre Viva, Mucugê, BA, foi criado pelo Decreto Municipal nº 235, de 15 de março de 1999, em uma área de 540 ha, com altitude em torno de 1.000 m acima do nível do mar, concretizando assim a implantação do Projeto Sempre Viva. Seus objetivos são assegurar a sobrevivência da sempre viva nativa na região, de grande valor comercial, promovendo seu cultivo para proporcionar alternativa econômica à população, prioritariamente às famílias de ex coletores, bem como o repovoamento dos campos onde esta espécie foi dizimada e preservar os recursos naturais e históricos (ciclo diamantífero) do município de Mucugê, através da criação de uma unidade de manejo sustentável (BATISTA, 2007).

2.5 Conservação e variabilidade genética

O conhecimento ecológico e as práticas tradicionais de extração são resultado da observação, da tentativa e erro, ao longo do tempo (SCHMIDT; TICKTIN, 2012) e todas as atividades humanas têm consequências para o ambiente (RICKLEFS, 2011). A redução do

tamanho populacional e da área de ocupação pode gerar impactos negativos sobre a diversidade de populações (FRANKHAM et al., 2008), expondo as populações aos efeitos da deriva (acaso) e de endogamia (cruzamento entre aparentados) (HARTL; CLARCK, 2010), processos, que por sua vez, podem reduzir ainda mais a diversidade, podendo levar a população a um estado irreversível, incapaz de se regenerar. Populações pequenas e com baixa variabilidade genética são mais suscetíveis a impactos de eventos estocásticos (FRANKHAM et al., 2008), tais como alagamentos, incêndios, ou ainda a construção de estradas e barragens, limitando a chegada de novos alelos pela falta de conectividade entre os fragmentos, ou mesmo pela eliminação direta de indivíduos (FRANKHAM et al., 2008). É importante que haja diversidade genética nas populações para a sua manutenção ao longo do tempo, já que as alterações ambientais são inevitáveis (RIDLEY, 2006).

A biologia da conservação tem como um dos principais focos a manutenção da diversidade genética, pois esta é a base para adaptação e evolução de uma espécie (GALETTI et al., 2008). Os recursos para a conservação de espécies, no entanto, são escassos no Brasil, razão pela qual estudos dessa natureza devem ser realizados a fim de indicarem o nível de prioridade para ações de conservação.

Espécies silvestres são exploradas em todo o mundo, e pode-se citar casos em que a exploração não constituiu um impacto negativo para a diversidade das populações, como o caso de *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae), o capim dourado usado na confecção de artesanato na região do Jalapão, Estado de Tocantins (SCHMIDT; TICKTIN, 2012) ou o da *Eschweilera ovata* (Cambess.) Miers (Lecythidaceae), a biriba utilizada na confecção do berimbau (GUSSON et al., 2005). Essas espécies possivelmente já podem ser classificadas como incipientemente domesticadas (CLEMENT, 1999), devido ao uso que tem sido feito já há muitos anos.

São raros os estudos com a batata-da-serra. Pode-se mencionar o estudo de caracterização bromatológica e avaliação de compostos bioativos de Rocha (2012) e o de densidade populacional, número de estruturas reprodutivas e observações ecológicas de Azevedo-Gonçalves et al. (2010). Ainda não foram realizados estudos de diversidade genética com *I. serrana*. A espécie está submetida à pressão antrópica devido à extração de raízes tuberosas, para uso na alimentação. Por outro lado, sabe-se que perturbações antrópicas podem promover a abundância de lianas de grande diâmetro em florestas tropicais (PHILLIPS et al.; 2002 *apud* PUTZ, 2012). O conhecimento sobre a diversidade e estrutura genética da batata-da-serra, bem como sobre os impactos de sua exploração nas populações, poderá oferecer subsídio para planos de manejo e conservação da espécie, que é endêmica da Caatinga.

2.6 Marcadores moleculares

Os programas de conservação e uso de recursos genéticos vegetais puderam avançar com o aumento significativo de metodologias da genética molecular (GUIMARÃES et al., 2009; PINTO et al., 2001), as quais permitem acessar a variabilidade genética, oferecendo suporte a estudos de conservação e uso de bancos de germoplasma (FALEIRO, 2007). Marcadores moleculares são características na molécula de DNA capazes de diferenciar dois ou mais indivíduos e que serão herdadas geneticamente (BORÉM, 1997; BUSO et al., 2003; GUIMARÃES; MOREIRA, 1999; VIDOR et al., 2002). São sequências de DNA informativas para problemas diversos da genética (AVISE, 2004), dentre os quais a identificação de polimorfismo, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente, possibilidade de

detecção do polimorfismo em qualquer estágio do desenvolvimento da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos constituindo vantagens na sua utilização (FALEIRO, 2007).

Há vários tipos de marcadores moleculares, apresentando vantagens e desvantagens, sendo a opção por um deles, ou por vários, orientada por fatores como o objetivo do estudo, disponibilidade de infraestrutura, equipe treinada e recursos financeiros, e do nível de conhecimento de genética molecular da espécie a ser estudada. Entre os marcadores moleculares dominantes, pode-se destacar o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). As isoenzimas, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e SSR (*Simple Sequence Repeats*), dentre outros, compõem o grupo dos marcadores do tipo codominantes (FALEIRO, 2007). Avanços tecnológicos proporcionaram metodologias de alto desempenho e acurácia, como os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), marcadores também codominantes capazes de identificar alterações elementares na molécula de DNA, as mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas. Normalmente bi-alélicos e abundantes no genoma, os SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, porém, na maior parte das vezes são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada (CAETANO, 2009).

Importantes ferramentas em estudos de genética de populações, mapeamento, análises de similaridade e distância genética (LOPES et al., 2002), estratégias de conservação dos recursos genéticos, tais como a identidade genética, a diversidade, a frequência gênica e os relacionamentos filogenéticos dos recursos genéticos de determinado banco de germoplasma, coleção, repositório, os marcadores moleculares podem auxiliar em diferentes etapas como coleta, manutenção, caracterização, manejo, aplicação e uso dos recursos genéticos (FALEIRO, 2007).

Muitos estudos com diferentes marcadores moleculares e objetivos têm sido realizados com várias espécies de *Ipomoea*, tais como diversidade e estrutura genética de *I. imperati* (Vahl) Griseb. (CENRAMO et al., 2013), de *I. microdactyla* Griseb. (GEIGER et al., 2014), estudo de genética de populações com *I. hederacea* Jacq. (HULL-SANDERS; EUBANKS; CARR, 2005), desenvolvimento de *primers* de SSR a partir de sequências de *I. trifida* (Kunth) G. Don. (HU et al., 2004a) e de *I. nil* (L.) Roth (LY et al., 2012), relações taxonômicas de algumas espécies de *Ipomoea* (KHALIK; OSMAN; AL-AMOUDI, 2012), base genética do polimorfismo de cores em *I. purpurea* (L.) Roth. (ZUFALL; RAUSHER, 2003) e diversidade genética para *I. batatas* (batata doce) (BUTELER et al., 1999, 2002; CAMARGO et al., 2013; DUNCAN; RAUSHER, 2013; FAJARDO; LA BONTE; JARRET, 2002; GICHUKI et al., 2003; HIRAKAWA et al., 2015; HU et al., 2004b; HWANG; TSENG; LO, 2002; KARURI et al., 2009, 2010; KRIEGNER et al., 2003; MARTINS et al., 2014; RODRIGUEZ-BONILLA et al., 2014; ROULLIER et al., 2011; 2013a; 2013b; SCHAFLEITNER et al., 2010; SILVA et al., 2013; VEASEY et al., 2008; WANG et al., 2011; YADA et al., 2010; YANG et al., 2015; ZHANG D.P. et al., 1999; ZHANG D. et al., 1998, 2000).

2.6.1 Marcadores ISSR

Desenvolvidos por Zietkiewicz, Rafalski e Labuda (1994) e Gupta et al. (1994), os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) são fragmentos de DNA de 100 a 3.000 pb amplificados via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) usando um único iniciador (16 a 20 pb) construído a partir de sequência de microssatélites. Sua utilização envolve extração de DNA, amplificação via PCR, eletroforese para separação dos fragmentos obtidos e visualização do polimorfismo utilizando coloração. Apresenta vantagens como a geração de grande número de

bandas informativas por reação, e o fato de não haver necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para a construção do primer utilizado (FALEIRO, 2007). A dominância do marcador é sua principal desvantagem (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994), pois limita a informação não permitindo atribuir genótipo para os locos.

Marcadores ISSR têm sido utilizados em diversos estudos genéticos (FALEIRO, 2007) para várias espécies de plantas, tais como delimitações de espécies para apoio taxonômico em orquídeas (FAJARDO; VIEIRA; MOLINA, 2014; RODRIGUES et al., 2015) e cambuí (LIMA et al., 2015), relações filogenéticas entre gêneros de Cucurbitaceae (PAYEL et al., 2015) e diversidade genética em *Portulaca oleracea* L. (ALAM et al., 2015), *Juniperus brevifolia* (Seub.) (BETTENCOURT et al., 2015), *Salvia lachnostachys* (Benth.) (ERBANO; SCHNELL-E-SCHÜHLI; SANTOS, 2015), *Vitis vinifera* L. (HESSAM et al., 2015), *Primula heterochroma* Stapf. (NOROOZISHARAF et al., 2015), *Jatropha* sp. (PAZETO et al., 2015); *Passiflora setacea* DC. (PEREIRA et al., 2015), *Linum glaucum* Boiss. & Noë (TALEBI et al., 2015), *Prunus mira* Koehne (TIAN et al., 2015), *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. (UENO et al., 2015), *Manihot esculenta* Crantz (VIDAL et al., 2015), *Praxelis clematidea* (Griseb.) R.M.King & H.Rob. (WANG et al., 2015), *Trifolium alexandrinum* L. (ZAYED et al., 2015), *Camellia* sp. (ZHOU et al., 2015), *Dalbergia sissoo* DC. (JAVAID et al., 2014), *Olea europaea* L. (LINOS et al., 2014), *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis* (LIU Z.H. 2014), *Phoenix dactylifera* L. (SABIR et al., 2014), *Dioscorea trifida* L. (NASCIMENTO W.F. et al., 2013) e *Cattleya labiata* Lindl. (PINHEIRO et al., 2012). Marcadores ISSR foram também utilizados para espécies de *Ipomoea batatas* L. (Lam.) (CAMARGO et al., 2013; HU et al., 2003; HUANG; SUN, 2000; MOULIN et al., 2012; ZHANG K et al., 2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de tecido vegetal e voucher

A coleta de tecido vegetal foi realizada em junho de 2014, compreendendo amostras de folhas saudáveis de 20 indivíduos de *I. serrana* na população Capão, no município de Palmeiras e distrito de Caeté-Açu, 32 em Igatu, no município de Andaraí e 30 em cada uma das demais populações (Andaraí, Lençóis e Mucugê), com municípios com os mesmos nomes, respectivamente, totalizando 142 indivíduos em cinco populações, na região da Chapada Diamantina, Bahia (Figura 7; Tabela 1). Seis indivíduos aleatórios da população Capão (41, 43, 46, 47, 49 e 50) e dois da população Mucugê (120 e 134) tiveram botões florais coletados, além do material foliar. Só foram considerados para coletas indivíduos distantes uns dos outros em no mínimo 2 metros.

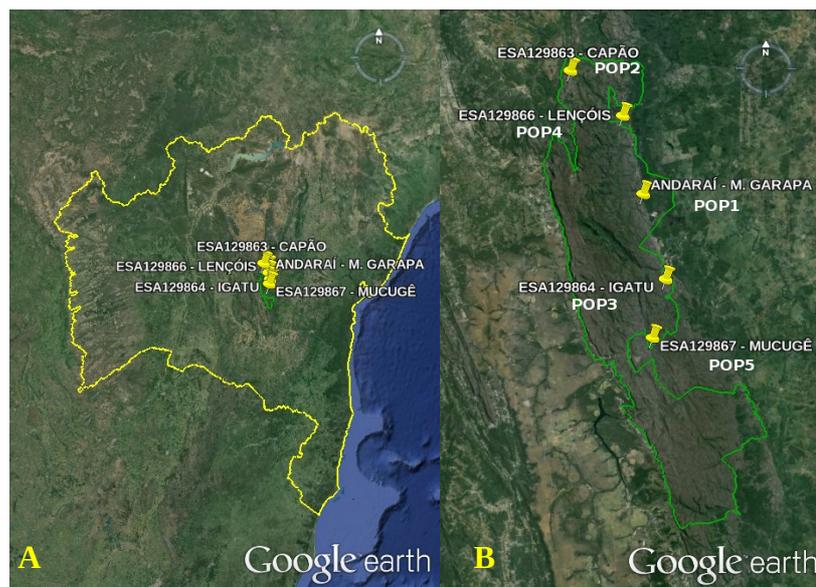


Figura 7 - Mapa da coleta de tecido vegetal de *Ipomoea serrana* Sim.-Bianch. & L.V. Vasconcelos, batata-da-serra. A) estado da Bahia, onde pode ser observada a localização central da Chapada Diamantina. B) delimitação do Parque Nacional da Chapada Diamantina, em verde, com as regiões de coleta

Tabela 1 - Coleta de tecido vegetal de 142 indivíduos de *Ipomoea serrana*, batata-da-serra, em cinco populações da Chapada Diamantina/BA

População	Município / Localidade	Nº de Indivíduos	Coordenadas geográficas	
POP1-Andaraí	Andaraí – Morro do Garapa	29	12°43'40.65"S	41°22'02.40"O
POP2-Capão	Palmeiras – Caeté-Açu	20	12°30'23.57"S	41°30'08.42"O
POP3-Igatu	Andaraí – Rampa de Caim	19	12°52'59.97"S	41°19'40.24"O
POP4-Lençóis	Lençóis – Córrego da Onça até Ribeirão do Meio	28	12°33'08.56"S	41°24'16.34"O
POP5-Mucugê	Mucugê – Parque Sempre Viva	26	12°59'22.78"S	41°20'16.60"O
Total de Indivíduos		122		

As populações estavam dentro dos limites geográficos do PNCD, exceto a população Mucugê que se encontrava no Parque Municipal de Mucugê – Projeto Sempre Viva. Guias locais² (comunicação verbal), durante a coleta, relataram que as regiões de fácil acesso apresentam poucas plantas, devido à exploração. Já as regiões mais altas e de difícil acesso apresentam maior abundância das plantas.

O material coletado foi acondicionado em solução aquosa (35 g NaCl, 3 g CTAB - Brometo de Cetil Trimetil Amônio, 70 mL água destilada) (ROGSTAD, 1992, adaptado por Cássio Van den Berg, comunicação pessoal³), em tubos de 1,5 mL, para que chegassem conservados ao laboratório, onde foram submetidos às etapas subsequentes do trabalho.

Além do tecido coletado para a extração de DNA, foram coletados ramos com estrutura floral, em cada população, para constituir o *voucher* que foi depositado no ESA - Herbário da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em Piracicaba/SP, na forma de

² Sr. Djalma (pseudônimo Fuquinha), ex garimpeiro e morador do município de Lençóis e Sr. Teté, guia local no Capão, Distrito de Caeté-Açu, município de Palmeiras.

³ Professor Dr. Cássio Van den Berg, Universidade Estadual de Feira de Santana/BA.

exsicata, sob os registros ESA129863 a ESA 129867. Os locais de coleta foram também georeferenciados (Tabela 1).

3.2 Extração de DNA, quantificação e padronização

Antes da extração de DNA foi necessário retirar o excesso da solução conservante, no qual as amostras foram acondicionadas, usando um papel absorvente sobre o fragmento da folha e, posteriormente macerando-a com 1,5 mL de tampão STE (30 mM Tris-HCl, 8,55% Sacarose, 50 mM EDTA). O material macerado foi, então, transferido para um tubo de 1,5 mL e colocado em centrífuga (5.000 rpm, 10 min), resultando em duas fases, sendo que o sobrenadante foi descartado.

Muitos testes foram realizados a fim de se obter alta concentração e baixa viscosidade de DNA. Os testes consistiram basicamente na utilização de *kits* de extração de DNA, como LGCBio (Brasílica - Kit para Extração de DNA Genômico), NucleoSpin® DNA Tissue (Macharey- Nagel), Omega (E.Z.N.A.® HP Plant DNA Mini Kit Protocol - Specimens with Lower DNA Content) e Qiagen (DNAeasy® Plant Mini kit); purificação de DNA com Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega e purificação de DNA total de plantas por tratamento com acetato de amônio (ROMANO; BRASILEIRO, 1999); protocolo modificado CTAB para *Ipomoea* (GAWEL; JARRET, 1991); e adaptações no protocolo de Doyle e Doyle (1987) que incluíam variações na concentração de CTAB (2 e 3%) e PVP (Polivinilpirrolidona) (1, 2 e 3%), inclusão de Proteinase K, tempo em banho maria e na fase do isopropanol, e limpeza com álcool etílico absoluto.

Por fim, após todos os testes, as extrações de DNA seguiram com o protocolo CTAB adaptado de Doyle e Doyle (1987), conforme etapas a seguir: (1) isolamento do DNA por

meio do rompimento da membrana celular, com a adição de 800 μL de tampão de extração CTAB [3% CTAB, 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA pH 8,0, 3% PVP], 1% de proteinase K (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 2% de β -mercaptoetanol, homogenizando-os e incubando a 65°C, por 30 minutos homogeneizando por inversão a cada 10 minutos; (2) purificação do material por meio da adição de 500 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), emulsificação e centrifugação por 10 min a 13.000 rpm com recuperação da fase aquosa (acondicionada em novo microtubo) e repetição deste procedimento com o acréscimo de 200 μL de CTAB, com posterior recuperação da fase aquosa em novo tubo e adição de 500 μL de isopropanol gelado. Homogeneizar o material por 10 minutos e, em seguida, centrifugá-lo por 10 min a 13.000 rpm para a precipitação do *pellet* de DNA; (3) novos ciclos de lavagem para retirar sais que porventura tenham ficado aderidos, vertendo o sobrenadante e adicionando 1 mL de etanol 70% e depois, repetindo este procedimento, com álcool absoluto. A seguir, o microtubo era deixado na bancada *overnight* para secar completamente para, só então, ser ressuspendido em 50 μL de tampão TE 0,1 M EDTA com 5 μL de RNase (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e incubado por 30 minutos a 37°C. O material extraído era, então, armazenado a -30°C.

O material foi quantificado em gel de agarose a 1%, corado com Gel Red, e utilizando soluções padrões (12,5 e 25 ng *Lambda* DNA Invitrogen™), em tampão TBE 10X (Tris-HCl 90mM, Ácido Bórico 90mM e EDTA 2mM) diluído dez vezes e submetido a 3,75V/cm por 60 minutos. Com esse procedimento cada amostra tinha sua concentração observada, e procedia-se a uma padronização de uma fração do DNA total para 10ng/ μL , concentração em que seria utilizado em etapa posterior.

3.3 Otimização de reação, amplificação e visualização de bandas

Seis indivíduos aleatórios de diferentes populações constituíram o grupo que foi testado para os 20 iniciadores de ISSR (WOLFE, 2000) (Tabela 2). Os testes consistiram em variações da temperatura de anelamento e adição de DMSO (Dimethyl Sulfoxide) e/ou BSA (Bovine Serum Albumin) ao mix da reação de amplificação.

A reação de amplificação foi realizada no termociclador BioRad® T100 Thermal Cycler, com volume final de 25 µL [1U *Taq*-Polimerase; 1X tampão de amplificação; 2,83 mM MgCl₂; 0,66 pmoles primer; 0,07 mM de cada dNTP; 0,5 ml/ml BSA e 50 ng DNA]. As condições da amplificação incluíram 1 ciclo de desnaturação inicial (5 min a 94°C), 35 ciclos [desnaturação (45s a 94°C), anelamento (45s com a temperatura de anelamento para cada iniciador, Tabela 3) e extensão (90s a 72°C)], seguido de 1 ciclo de extensão final da cadeia de DNA (5 min a 72°C).

Tabela 2 - Iniciadores ISSR testados em *Ipomoea serrana*, batata-da-serra, e suas respectivas sequências (WOLFE, 2000)

Iniciador	Sequência (5' – 3')
AW3	[GT]6-RG
BECKY	[CA]7-YC
CHRIS	[CA]7-YG
DAT	[GA]7-RG
GOOFY	[GT]7-YG
JOHN	[AG]7-YC
MANNY	[CAC]4-RC
MAO	[CTC]4-RC
OMAR	[GAG]4-RC
TERRY	[GTG]4-RC
7	[CT]8-RG
UBC814	[CT]8-TG
UBC843	[CT]8-RA
UBC844	[CT]8-RC
UBC 898	[CA]6-RY
UBC899	[CA]6-RG
901	[GT]6-YR
902	[GT]6-AY
M1	CAA-[GA]5
M2	GGGC-[GA]8

Finalizada a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X, por 15 min a 60V seguido de 03:45h a 80V, utilizando Gel Red como corante e 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™) como referencial de bandas. Os géis foram fotografados sobre fonte de luz ultravioleta com auxílio do sistema de fotodocumentação Syngene (Synoptics Ltda.). As leituras dos géis foram realizadas manualmente através de comparação dos padrões de bandas em gel de agarose.

3.4 Análise de dados

Os dados foram tabulados manualmente na forma de uma tabela binária, onde (1) significa a presença de uma banda e (0) a sua ausência. Foram consideradas para análise bandas robustas e inequívocas, com boa resolução. O número de bandas e o número de bandas polimórficas, bem como o número de bandas privadas foi obtido por meio de análises descritivas. Foi também calculado o índice Rp, que visa avaliar a qualidade do iniciador (ADHIKARI et al., 2015; CAMARGO et al., 2013; GRATIVOL et al., 2011; PREVOST; WILKINSON, 1999; ZORATTI et al., 2015). Este índice foi obtido pela fórmula $R = \sum Ib$, onde Ib (informatividade da banda) se refere ao valor de $1 - [2 \times |0,5 - p|]$, onde p é a relação entre genótipos que partilham uma mesma banda. Com os dados binários foi estimado o coeficiente de dissimilaridade de Jaccard, e as análises estatísticas foram processadas a partir desses dados.

O percentual de locos polimórficos, índice de diversidade de Shannon – Wiener (SHANNON, 1948) e de diversidade genética de Nei (NEI, 1978) constituíram as bases para a estimativa da diversidade genética. Para dados dominantes, por não se aplicar o cálculo de heterozigosidade esperada, o índice de diversidade de Nei torna-se uma medida de

variabilidade genética estimada ($H_e = 1 - \sum p_i^2$), onde p_i é a frequência de cada banda na população. O índice de Shannon - Wiener ($H = - \sum p_i \cdot \log p_i$), sendo p_i a frequência do alelo i (banda i no caso de dados dominantes). Esse índice é adequado para análise de marcadores dominantes (SUN; WONG, 2001), explicitando o grau de certeza com que se prevê a proximidade genética entre os indivíduos. Essas análises foram realizadas por meio do programa GenAlEx (versão 6.501) - (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

A análise de coordenadas principais foi realizada pelo programa GenAlEx (versão 6.501) - (PEAKALL; SMOUSE, 2012), baseada na matriz de distâncias genéticas, tanto para indivíduos quanto para populações.

Com a finalidade de avaliar a diversidade genética dentro e entre as populações de *Ipomoea serrana*, bem como inferências de estrutura populacional, foi realizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) através do programa GenAlEx (versão 6.501) - (PEAKALL; SMOUSE, 2012). A AMOVA pode ser utilizada com dados de marcadores dominantes por meio das estatísticas ϕ , as quais foram calculadas com 9.999 permutações, no mesmo programa.

Para se verificar o número de grupos geneticamente distintos, foi utilizada a análise Bayesiana por meio do programa Structure 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2007). As análises foram realizadas utilizando-se 10 simulações independentes feitas para cada valor de número de agrupamento K (K de 1 a 10). Em cada simulação, foram consideradas 800.000 iterações de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) com um descarte inicial (*burn in*) de 200.000. A análise foi realizada usando o modelo de ancestralidade com mistura e utilizando frequências alélicas correlacionadas. O número mais provável de agrupamentos (K) foi determinado pelo método de Evanno et al. (2005) a partir do aplicativo *online* Structure Harvester 0.6.93 (EARL; VON HOLDT, 2012).

Para inferências sobre isolamento por distância foi realizado teste de Mantel (MANTEL, 1967) no software GenAlEx 6.501 (PEAKALL; SMOUSE, 2012), utilizando as distâncias geográficas em linha reta entre as populações, medidas em GoogleEarth, com base em coordenadas geográficas obtidas por meio de GPS durante a coleta, associadas a distâncias genéticas não viesadas de Nei (NEI, 1978), com significância testada com 9.999 permutações.

4 RESULTADOS

4.1 Testes para extração de DNA

Os kits para extração de DNA não foram eficientes para a espécie *Ipomoea serrana*, exceto o Kit Qiagen (DNAeasy® Plant Mini kit), que proporcionou amostras livres de viscosidade, porém com baixa concentração de DNA (5-10 ng/μL).

Os protocolos de purificação não se mostraram eficientes sobretudo por reduzirem a concentração de DNA ou até mesmo a esgotarem. No entanto, o protocolo de purificação de DNA total de plantas por tratamento com acetato de amônio (ROMANO; BRASILEIRO, 1999) reduziu significativamente a viscosidade, mas reduziu bastante a concentração de DNA (aproximadamente 5 ng/μL).

O protocolo de DNA que proporcionou melhores resultados para o trabalho realizado foi o de Doyle e Doyle (1987) modificado, conforme descrito no item 3.2. Amostras extraídas a partir de botões florais apresentaram alta concentração de DNA, bem como material livre de viscosidade (Figura 8). As amostras de DNA obtidas a partir de folhas apresentaram concentração baixa (10-15ng/μL) e níveis variáveis de viscosidade. Para a redução da viscosidade, a amostra recebia uma quantidade maior de tampão TE 0,1 M EDTA. Esse procedimento, por reduzir a concentração, reduzia também o rendimento do estoque de DNA. Todavia, as amplificações puderam ser realizadas com estas características.

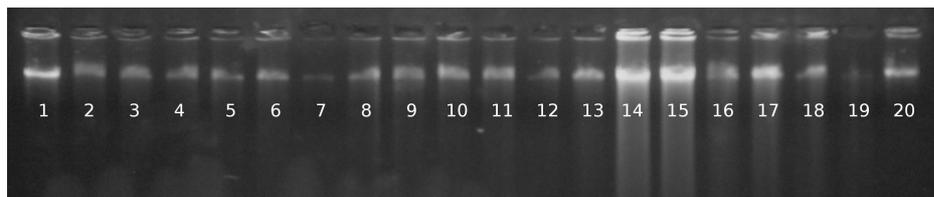


Figura 8 - Gel de quantificação de extração de DNA de *Ipomoea serrana* Sim.-Bianch. & L.V. Vasconcelos, batata-da-serra, com destaque dos indivíduos cuja extração se deu a partir de botões florais, indivíduos da população Capão (14 e 15), com lambda de 25ng/μL (poço n°. 1) e 12,5ng/μL (poço n°. 20)

4.2 Testes para otimização da Amplificação

Quatro iniciadores apresentaram boa resolução e polimorfismo, dentre os quais DAT, Manny, Omar e Terry (WOLFE, 2000), que foram utilizados neste estudo (Tabela 3; Figura 9). Os iniciadores UBC844 e John foram monomórficos, e os demais não tiveram otimização satisfatória em tempo hábil para este estudo.

Tabela 3 - Iniciadores ISSR (WOLFE, 2000) otimizados para *Ipomoea serrana*, batata-da-serra, com suas respectivas temperaturas de anelamento e informações de diversidade genética (NB = N° de bandas, NBP = N° de bandas polimórficas, PBP = Percentual de bandas polimórficas e Rp = Poder de resolução)

Iniciador	Sequência (5' – 3')	Temperatura Otimizada (°C)	Intervalo de Bandas (pb)	NB	NBP	PBP
DAT	[GA]7-RG	50	380 – 800	7	6	86,0
MANNY	[CAC]4-RC	49	350 – 1000	9	4	44,0
OMAR	[GAG]4-RC	50	250 – 1000	10	9	90,0
TERRY	[GTG]4-RC	50	400 – 1300	8	6	75,0
Total				34	25	74,0
Média				8,5	6,25	73,8

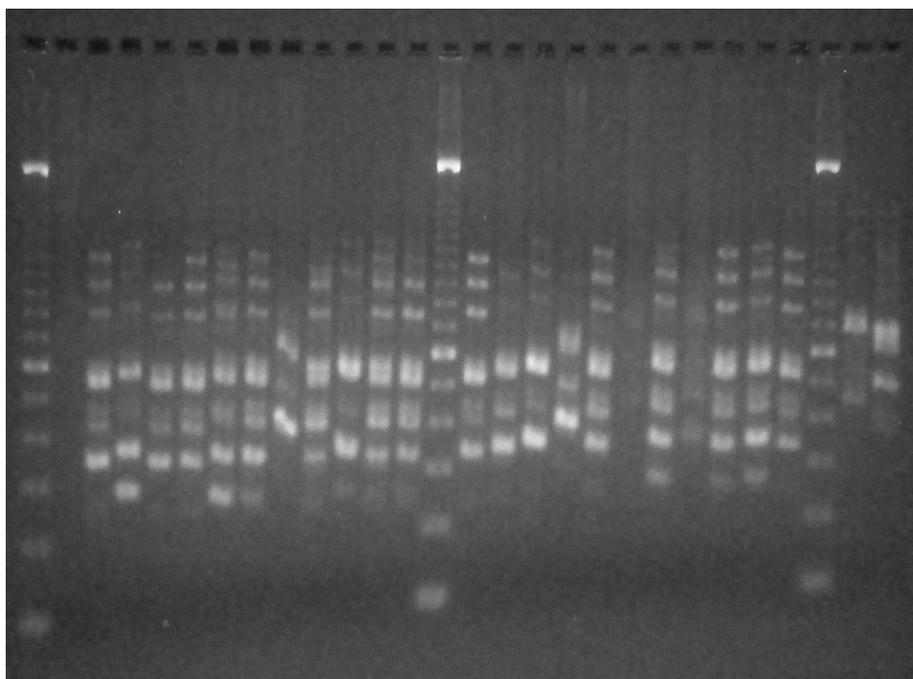


Figura 9 - Padrão de bandas de marcadores ISSR para o iniciador MANNY para a população Lençóis/BA de batata-da-serra (*Ipomoea serrana*)

Alguns indivíduos não amplificaram, em pelo menos dois dos iniciadores, mesmo após sucessivas tentativas, e foram, portanto, retirados das análises reduzindo o número de N, antes 142, para 122.

4.3 Diversidade e estrutura genética

Os quatro iniciadores utilizados proporcionaram 34 bandas, dentre as quais 25 foram polimórficas (73,8%), com variação no tamanho dos fragmentos de 250 a 1300 pares de bases (Tabela 3). O índice de Rp, que é um indicador do poder de discriminação de bandas do iniciador, variou de 6,51 para o iniciador DAT até 10,89 para o iniciador Manny. O iniciador Omar também obteve um elevado valor de Rp, 10,20, apresentando o maior número de bandas e de bandas polimórficas.

O percentual de bandas polimórficas para cada população variou de 58,8% na população 2 - Capão a 73,5% nas populações 1 e 4, Andaraí e Lençóis, com percentual médio de 69,4% (Tabela 4). A população Capão foi a única que apresentou bandas privadas, num total de duas (Figura 10).

Tabela 4 - Análise genética de cada população de *Ipomoea serrana*, batata-da-serra (N = número de indivíduos, I = índice de Shannon, He = diversidade genética de Nei (1973) e P = porcentagem de locos polimórficos. (Desvio padrão entre parênteses)

População	N	I	He	P (%)
POP1-Andaraí	29	0,3880 (0,048)	0,2610 (0,034)	73,53
POP2-Capão	20	0,3410 (0,054)	0,2360 (0,038)	58,82
POP3-Igatu	19	0,4060 (0,048)	0,2760 (0,034)	70,59
POP4-Lençóis	28	0,4080 (0,046)	0,2750 (0,033)	73,53
POP5-Mucugê	26	0,4010 (0,049)	0,2730 (0,035)	70,59
Média		0,3888	0,2642	69,41
Total de indivíduos	122			

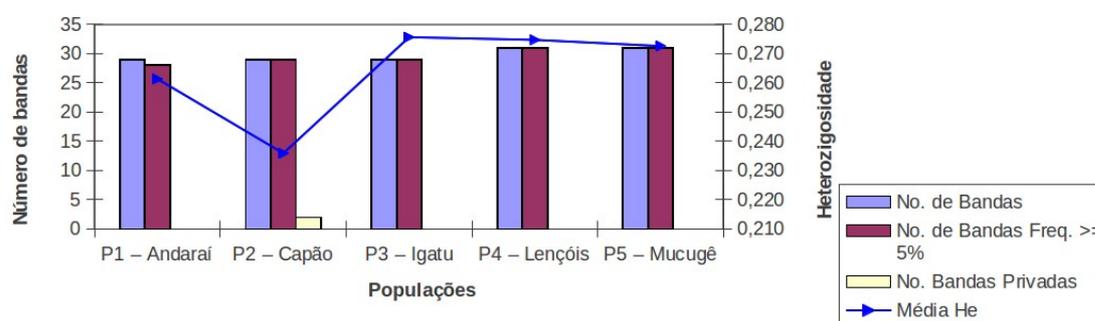


Figura 10 – Estimativas de diversidade genética para populações de *Ipomoea serrana*, batata-da-serra

O índice de Shannon variou entre 0,341 (população 2 - Capão) e 0,408 (população 4 - Lençóis) com média de 0,389. O índice de diversidade de Nei variou com valores compreendidos entre 0,236 (população 2 - Capão) e 0,276 (população 3 - Igatu) com média 0,264 (Tabela 4).

A análise de variância molecular (AMOVA) indicou populações altamente estruturadas (Tabela 5), apresentando valor de ϕ_{st} de 0,235, $P = 0,000$. A variação entre as populações foi 23%, enquanto que a maior parte da variabilidade foi observada dentro das populações (77%).

Tabela 5 - Análise de variância molecular para populações de *Ipomoea serrana*, batata-da-serra (GL = grau de liberdade, SQ = soma dos quadrados e MS = Quadrados Médio). p (9.999 permutações) = 0,0000

Fonte de Variação	GL	SQ	MS	Componentes De Variância	Varição Total
Entre populações	4	186,563	46,641	1,697	23%
Dentro de populações	117	646,659	5,527	5,527	77%
Total	121	833,221		7,224	100%

$\phi_{st} = 0,235$; $p=0,000$

Na análise de coordenadas principais (PCoA), as duas primeiras coordenadas foram responsáveis por 28,7% da variação total entre os indivíduos. A análise mostrou a separação da população 2 (Capão) mais evidente, todas no quadrante inferior da coordenada principal 2, e no quadrante à esquerda da primeira coordenada, e uma sutil separação da população 1 (Andaraí), principalmente alocadas no quadrante à esquerda da primeira coordenada, e no quadrante superior da segunda coordenada, sendo que as demais encontraram-se misturadas (Figura 11). Isso fica mais evidente na Figura 12, com o resultado plotado para populações, evidenciando as populações Andaraí e Capão bem separadas.

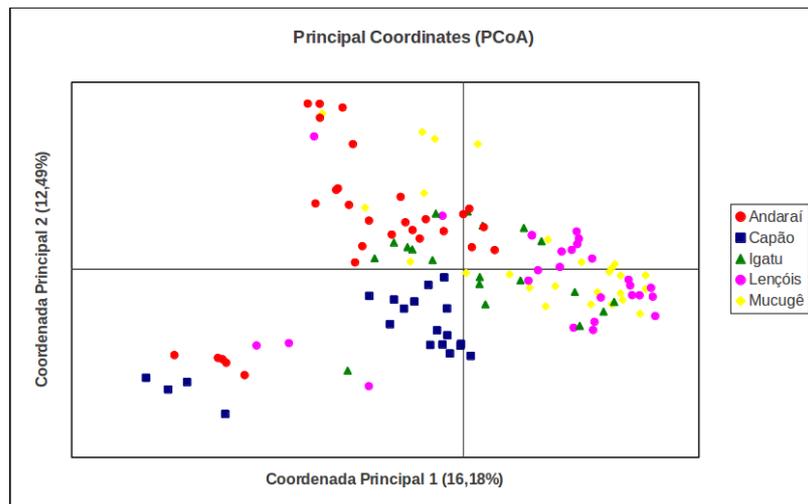


Figura 11 - Análise de Coordenadas Principais dos 122 indivíduos de *Ipomoea serrana*, batata-da-serra, com base em marcadores ISSR

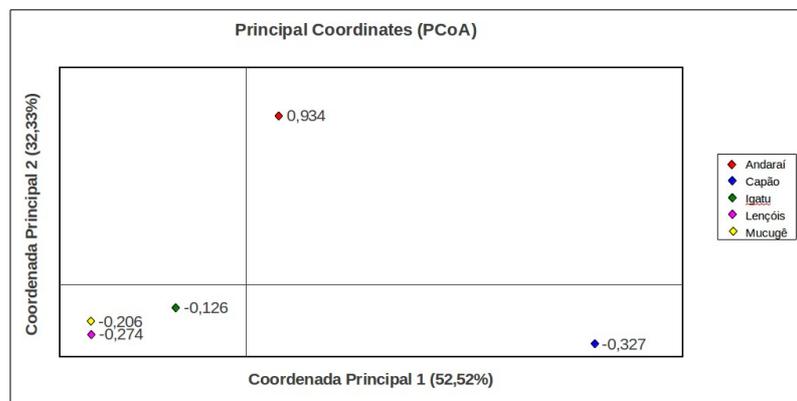


Figura 12 - Análise de Coordenadas Principais das cinco populações de *Ipomoea serrana*, batata-da-serra, com base em marcadores ISSR

As populações 1 (Andaraí) e 2 (Capão) também se separam das demais no dendrograma estimado pelo método Neighbor-Joining (Figura 13), a partir do coeficiente de dissimilaridade de Jaccard (S). No entanto não houve um bom suporte de *bootstrap* para a separação das populações.

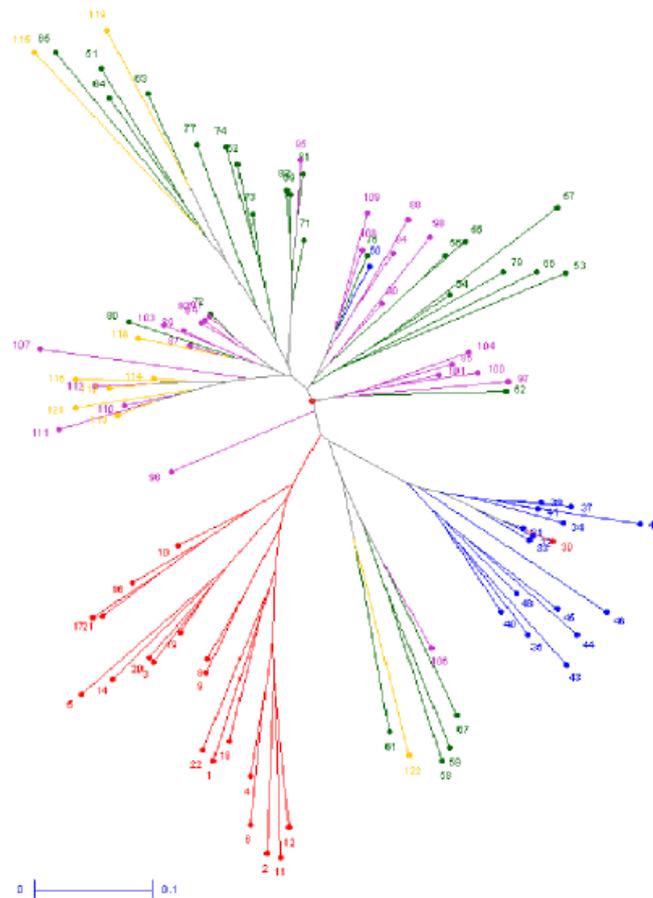


Figura 13 - Dendrograma estimado pelo método Neighbor-Joining, com robustez de 1.000 reamostragens *bootstraps*, a partir do coeficiente de dissimilaridade de Jaccard (S) para indivíduos de *Ipomoea serrana*, batata-da-serra. Vermelho: População 1 - Andaraí; Azul: População 2 - Capão; Verde: População 3 - Igatu; Rosa: População 4 - Lençóis e Amarelo: População 5 - Mucugê

A partir de simulações realizadas pelo programa Structure utilizando abordagem bayesiana, o número mais provável de K agrupamentos foi definido como quatro, segundo a metodologia de Evanno et al. (2005) (Figura 14). No entanto, o K definido como dois também pode ser utilizado como hipótese para agrupamentos.

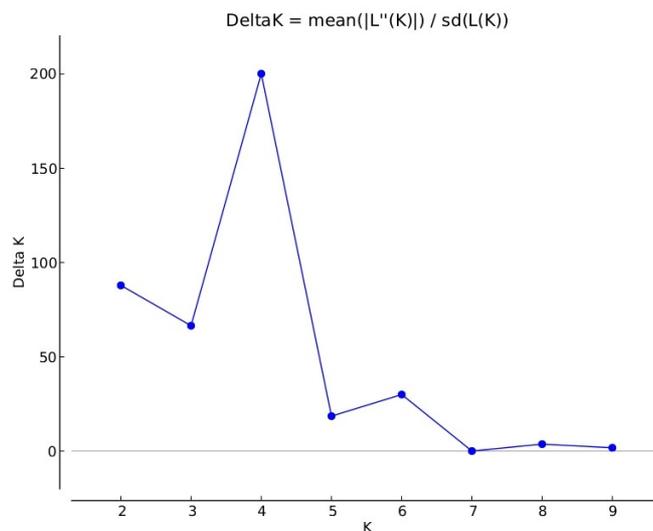


Figura 14 - Valores de ΔK para cada valor de K das populações prévias de *Ipomoea serrana*, batata-da-serra, conforme Evanno et al. (2005)

As duas hipóteses de agrupamento em dois grupos ($K = 2$) e quatro grupos ($K = 4$) podem ser interpretadas biologicamente. Para $K = 2$, indivíduos das populações 1 e 2 (Andaraí e Capão, respectivamente), foram agrupados em um subgrupo (vermelho) e as demais populações tiveram seus indivíduos alocados em ambos subgrupos (vermelho e azul), de maneira mais misturada (Figura 15). Para a hipótese $K = 4$, quatro subgrupos foram propostos, com os indivíduos de Andaraí em um subgrupo distinto (vermelho), com alguns indivíduos do subgrupo verde; os indivíduos de Capão foram alocados em outro subgrupo distinto (azul); e os indivíduos das populações de Igatu, Lençóis e Mucugê, mostraram-se distribuídos em outros dois subgrupos distintos dos demais (verde e rosa) (Figura 16), com algumas misturas.

Não houve correlação significativa das distâncias genéticas com as distâncias geográficas entre as populações, estimadas pelo teste de Mantel ($r = -0,252$, $p = 0,336$).

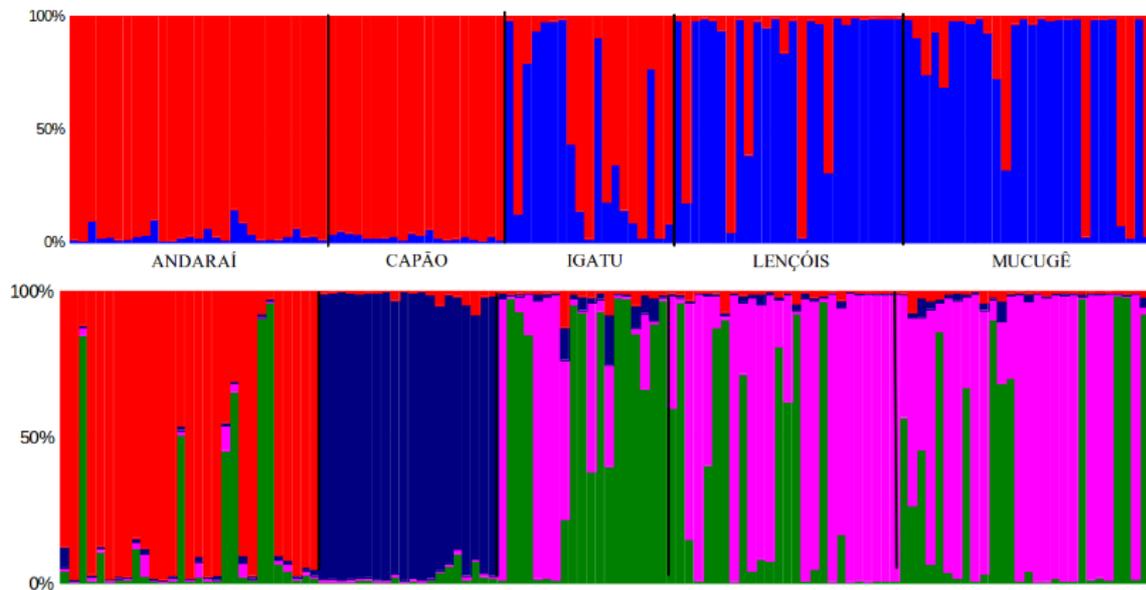


Figura 15 - Análise da estrutura genética de indivíduos de *Ipomoea serrana*, batata-da-serra, da Chapada Diamantina para dois agrupamentos ($K = 2$) e ($K = 4$)

5 DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de DNA genômico e otimização de iniciadores

Este é o primeiro trabalho molecular para a espécie *I. serrana*. Nem mesmo a *I. pintoii*, espécie muito semelhante que também ocorre nas proximidades da região de distribuição da *I. serrana* dispõe de estudos moleculares. Não havia, portanto, protocolos específicos ou adaptados para o isolamento e purificação de DNA.

O DNA obtido através de botões florais apresentou excelente qualidade com alta concentração e baixa viscosidade proporcionando alto rendimento. Possivelmente, se todas as amostras deste trabalho tivessem sido obtidas por meio de botões florais, haveria um número maior de iniciadores, já que a qualidade do DNA é importante para as amplificações (ALJANABI; MARTINEZ, 1997; KIM et al., 1997). A maioria das amostras, no entanto, foi obtida a partir de folhas, e apresentaram baixa concentração e alta viscosidade. Foi possível trabalhar com concentração baixa e assumindo algum nível de viscosidade. Isto teve impacto na otimização de iniciadores, pois, provavelmente, substâncias ficavam aderidas ao DNA dificultando a amplificação dos fragmentos desejados (BESSETTI, 2007; MOREIRA, 1998; WILSON, 1997). A elevada viscosidade dificulta a pipetagem bem como pode prejudicar a ação da enzima DNA polimerase, impedindo a amplificação (FANG; HAMMAR; GRUMET, 1992, *apud* POREBSKI; BAILEY; BAUM, 1997). O uso de BSA (FARELL; ALEXANDRE, 2012) facilitou a amplificação, embora alguns indivíduos não tenham amplificado mesmo com BSA, os quais foram retirados da análise. A presença de nectários extraflorais pode ter contribuído com substâncias viscosas aderidas ao DNA, embora durante as extrações a região proximal do pecíolo fosse descartada, no entanto isso se deu sem o auxílio de uma lupa para

exame individual do nectário para sua total remoção, o que seria difícil para o cumprimento dos prazos deste trabalho.

Os iniciadores, com exceção dos utilizados e dos monomórficos, não puderam ser otimizados neste trabalho por limitação de tempo, no entanto isso não quer dizer que eles não amplificam, mas sim que demanda um tempo maior para a sua otimização e uma melhora na qualidade das amostras de DNA.

5.2 Diversidade e estrutura genética

O polimorfismo médio de bandas para os iniciadores foi da ordem de 73,8% (Tabela 3) e pode ser considerado moderado. Estudos com outra espécie do gênero (*I. batatas*) apresentaram polimorfismo de bandas de 80,8% com 10 iniciadores ISSR (CAMARGO et al., 2013), 94,2% com 9 iniciadores ISSR (HE et al., 2005) e 62,2% com 15 iniciadores ISSR (HUANG; SUN, 2000).

O elevado índice Rp observado para o iniciador Omar (10,20) (Tabela 3) corroborou o maior número de bandas. O iniciador Manny com Rp 10,89 não evidenciou esta relação, mas todos os iniciadores, cuja variação de Rp foi de 6,51 a 10,89, tiveram níveis capazes de distinguir os genótipos e mostrar polimorfismo de bandas (DERBNATH, 2007), haja vista estudos com *Solanum tuberosum* de Prevost et al. (1999) com Rp entre 4,6 e 12,5, com *Cymbopogon* de Adhikari et al. (2015) com Rp entre 1,2 e 4,8, com *I. batatas* de Camargo et al. (2013) com Rp entre 0,44 e 6,18 e com *Vaccinium vitis-idaea* de Debnath (2007), com Rp de 2,1 a 9,4, utilizando ISSR, em que os iniciadores foram assumidos como relevantes para distinguir genótipos.

A variabilidade genética estimada pelo percentual de locos polimórficos para populações, índice de diversidade de Nei e índice de Shannon (PBP = 69,4%, $H_e = 0,264$, $I = 0,389$, valores médios) mostram uma variação genética moderada, em consonância com o estudo realizado por Huang e Sun (2000) com *I. batatas* e espécies aparentadas em que a PBP variou de 28% em *I. umbraticola* a 78,1% em *I. trifida*. No estudo com *Oeceoclades maculata*, uma orquídea terrestre com provável sistema reprodutivo por autogamia, Ueno et al. (2015) consideraram os índices $H_e = 0,2556$ e $I = 0,3869$, ambos estimados para o total de indivíduos avaliados, altos. A variabilidade genética moderada é diferente do esperado para lianas que geralmente apresentam baixa variabilidade pela alta taxa de propagação vegetativa (ENGEL; FONSECA; OLIVEIRA, 1998; GENTRY, 1991; PUTZ, 2012). A população de Lençóis apresentou maior H_e (0,408) coincidindo com o maior percentual de bandas polimórficas (73,5%) e alto índice de Shannon (0,275). A população Capão (PBP = 58,8%, $H_e = 0,341$, $I = 0,236$) apresentou os menores índices de diversidade, e foi a única que apresentou bandas privadas, talvez retratando algum isolamento já que os agrupamentos obtidos pelo Structure, PCoA e também dendrograma evidenciam uma separação maior desta população que está situada mais ao norte dentre as populações deste estudo. A diversidade genética da população Mucugê também apresentou moderada diversidade genética.

É possível que a heterozigosidade esteja sendo mantida por acúmulo de mutações somáticas e fecundação cruzada, como ocorre em lianas (GENTRY, 1991). A exuberância da flor, em cor, beleza e produção de néctar consistem em atrativos para polinizadores, um forte indício de alogamia e zoofilia, do contrário seria deveras dispendioso para o organismo a produção de tais características, pois trata-se de alocação de recursos para fins reprodutivos (KARLSSON; MENDEZ, 2005). Além disso, há mecanismo de autoincompatibilidade em *I. trifida* (TSUCHIYA, 2010), *I. batatas* (VEASEY, et al., 2007) e *I. pandurata* (STUCKY; BECKMANN, 1982), um mecanismo para privilegiar fecundação cruzada. Até o momento

não se conhecem estudos determinando o sistema reprodutivo da espécie em estudo, mas os dados discutidos acima, e também a observação de que a maior parte da variabilidade encontra-se dentro de populações, pode ser um indício de sistema reprodutivo por alogamia, ou sistema misto.

As análises de estrutura genética, Structure, PCoA e dendrograma, mostraram que além da separação da população Capão já discutida, a população Andaraí também destacou-se das demais. Já as populações Igatu, Lençóis e Mucugê mostraram-se distribuídas em outros dois grupos, com indivíduos de cada uma dessas três populações pertencentes a ambos os grupos. Uma das hipóteses desse trabalho era a de encontrar todas as populações estruturadas, mas houve uma certa mistura no caso dessas três últimas populações. A variação entre as populações detectada pela análise de variância neste estudo foi de 23% com ϕ_{st} de 0,235 ($p=0,000$), representando um alta estruturação.

A falta de correlação entre distâncias geográficas e genéticas fica evidenciada no fato de Capão e Andaraí compartilharem bandas, mas serem distantes geograficamente. As populações Igatu, Lençóis e Mucugê, apesar de distantes, compartilham muitas bandas, evidenciando uma grande mistura. Não se conhece ainda sobre polinização e dispersão da espécie, importantes aspectos para elucidar o padrão encontrado.

É possível que os garimpeiros tenham afetado a estruturação das populações, que tenha havido fluxo gênico no período do garimpo que teve início onde hoje situa-se a cidade de Mucugê se estendendo pela margem leste do PNCD, ao longo dos rios (MATTA, 2006), incluindo Andaraí, Igatu e Lençóis. Isso poderia explicar a mistura de alelos nas regiões mais manipuladas pelo garimpo, deixando a população de Capão mais separada.

A ação de coletores, com manejo inadequado, também pode estar afetando a variabilidade dentro das populações, pois a raridade da planta tem sido comentada por habitantes da região. Os coletores locais, geralmente ex-garimpeiros e guias turísticos, relatam

a ocorrência de muitas batatas por planta, ressaltando que não se deve retirar a batata principal, do contrário perde-se a planta. Os relatos tradicionais referem-se ainda à presença da planta ao longo da antiga rota do garimpo.

Também é possível que eventos estocásticos estejam operando nas populações por seu tamanho reduzido (FRANKHAM et al., 2008; HARTL; CLARCK, 2010; RIDLEY, 2006) causando estruturação detectada neste trabalho. Há registros⁴, produzidos pelo ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), de incêndios regulares na Chapada Diamantina nas estações secas, constituindo, pois, evento aleatório que pode estar atuando como pressão de deriva genética nestas populações pequenas.

Embora não seja uma espécie cultivada, provavelmente trata-se de uma espécie incipientemente domesticada (CLEMENT, 1999), sofrendo algum tipo de seleção e intervenção ao longo de sua utilização, uma vez que a planta é coletada para uso na culinária local, ou seja, de alguma forma ela vem sendo explorada pelo homem. É possível que a média fenotípica não tenha sido alterada em comparação com populações selvagens, tais como aquelas em regiões de difícil acesso e regiões protegidas. No entanto, é possível que haja variabilidade um pouco menor em regiões facilmente acessadas.

⁴ <https://drive.google.com/file/d/0BwDzbmbUzsm4eWdTRWdhX2tqNmM/view?usp=sharin>

6 CONCLUSÕES

Este estudo, por seu caráter pioneiro no campo molecular para a espécie *I. serrana*, constituiu o primeiro passo para o conhecimento da diversidade genética da espécie, tendo estabelecido uma forma de se obter DNA passível de utilização em técnicas moleculares.

Apesar da pressão antrópica decorrente do uso na gastronomia local, foi observado moderado nível de diversidade genética dentro das populações de *I. serrana*, com as análises a partir de ISSR. Também foi verificada diversidade entre as populações, revelando elevada estruturação genética.

O conhecimento da diversidade genética é importante para a conservação (FRANKHAM et al., 2008), e este trabalho constitui fonte de dados para o conhecimento da biodiversidade brasileira, estando de acordo com os artigos 12 – Pesquisa e treinamento – e 15 – Acesso a recursos genéticos – da Convenção sobre Diversidade Biológica – CDB⁵ - estabelecida durante a ECO-92, realizada no Rio de Janeiro em junho de 1992. Além disso, este estudo oferece dados referentes a espécie endêmica submetida a pressão antrópica.

Estudos futuros para esta espécie poderiam ampliar a amostragem, bem como avaliar características morfo-agronômicas, fenológicas, e maior número de marcadores moleculares, incluindo marcadores codominantes para inferências de maior espectro como o sistema reprodutivo. Além disso, a ampliação desse tipo de estudo poderá constituir base para a elaboração de um plano de manejo para a espécie que tem sido explorada na região.

⁵ http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_dpg/_arquivos/cdbport.pdf

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, S.; SAHA, S.; BANDYOPADHYAY, T.K.; GHOSH, P. Efficiency of ISSR marker for characterization of *Cymbopogon* germplasms and their suitability in molecular barcoding. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, n. 1, p. 439-450, 2015.
- ALAM, M.; JURAIMI, A.S.; RAFII, M.Y.; HAMID, A.A.; AROLU, I.W.; LATIF, M.A. Genetic diversity analysis among collected purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions using ISSR markers. **Comptes Rendus Biologies**, v. 338, n. 1, p. 1-11, 2015.
- ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- AUSTIN, D.F.; HUÁMAN, Z. A synopsis of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the Americas. **Taxon**, v. 45, n. 1, p. 3-38, Feb. 1996.
- AVISE, J.C. Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed. Sunderland: Sinauer, 2004. 684 p.
- AZEVEDO-GONÇALVES, C.F. de; GONÇALVES, C.N.; LIMA, L.H.A.; MESQUITA, F.W.; BERLINCK, C.N. Densidade populacional, número de estruturas reprodutivas e observações ecológicas em batata-da-serra (*Ipomoea* sp. Nov.). Anais do II Seminário de Pesquisa e Iniciação Científica do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade: biodiversidade e economia, ICMBio, 2010, p. 74. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/o-que-fazemos/anaisdoIIseminario2010icmbio.pdf>> Acesso em: 20 out. 2014.
- BATISTA, M.A.N. Estudo de caso: projeto sempre viva: Mucugê-Bahia. Rio de Janeiro: IBAM, 2007. 59p.
- BESSETTI, J.. An introduction to PCR inhibitors. **Journal of Microbiological Methods**, v. 28, p. 159-67, 2007.
- BETTENCOURT, S.X.; MENDONÇA, D.; LOPES, M.S.; ROCHA, S.; MONJARDINO, P.; MONTEIRO, L.; DA CÂMARA MACHADO, A. Genetic diversity and population structure of the endemic Azorean juniper, *Juniperus brevifolia* (Seub.) Antoine, inferred from SSRs and ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 314-324, 2015.
- BIANCHINI, R.S.; ROSÁRIO, A.S. do. Convolvulaceae. p. 147-149. In: GIULIETTI, A.M.; RAPINI, A.; ANDRADE, M.J.G. de; QUEIROZ, L.P. de; SILVA, J.M.C. da. (org.). Plantas raras do Brasil. Belo Horizonte, Conservação Internacional do Brasil, Feira de Santana, UEFS, 2009.
- BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: UFV, 1997, 547p.

- BRITO, A.F.; PRESLEY, S.J.; SANTOS, G.M.M. Temporal and trophic niche overlap in a guild of flower-visiting ants in a seasonal semi-arid tropical environment. **Journal of Arid Environments**, v. 87, p. 161-167, 2012
- BUSO, G.S.C; CIAMPI, A.Y.; MORETZOHN, M.D.C.; AMARAL, Z.D.S; BRONDANI, R. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Novas Aplicações para a Engenharia Genética**, v. 30, p. 46, 2003.
- BUTELER, M.I.; JARRET, R.L.; LABONTE, D.R. Sequence characterization of microsatellites in diploid and polyploid *Ipomoea*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 123-132, 1999.
- BUTELER, M.I.; LABONTE, D.R.; JARRET, R.L.; MACCHIAVELLI, R.E. Microsatellite-based paternity analysis in polyploid sweetpotato. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 127, n. 3, p. 392-396, 2002.
- CAETANO, Alexandre Rodrigues. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 8, p. 64-71, 2009.
- CARMARGO, L.K.P.; MOGOR, A.F.; RESENDE, J.T.V.; DA-SILVA, P.R. Establishment and molecular characterization of a sweet potato germplasm bank of the highlands of Parana State, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 5574-5588, 2013.
- CENNAME, P; DEL GUACCHIO, E.; PAINO, L.; DE CASTRO, O.; MENALE, B.; VAZQUEZ-TORRES M.; CAPUTO, P. Genetic structure of *Ipomoea imperati* (Convolvulaceae) in the Mediterranean region and implications for its conservation. **Phytotaxa**, v. 141, n. 1, p. 40–54, 2013.
- CLEMENT, C.R. 1942 and the loss of Amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. **Economic Botany**, v. 53, n. 2, p. 188–202, 1999.
- CONCEIÇÃO, A.A.; RAPINI, A.; PIRANI, J.R.; GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.; SILVA, T.R.S.; SANTOS, A.K.A.; CORREIA, C.; ANDRADE, I.M.; COSTA, J.A.S.; SOUZA, L.R.S.; ANDRADE, M.J.G.; FUNCH, R.R.; FREITAS, T.A.; FREITAS, Â.M.M.; OLIVEIRA, A.A. 2005. Campos Rupestres. In: Juncá, Flora A., Funch, Lígia & Rocha, Washington (Org.). 2005. Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina. Série Biodiversidade. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, p:153-180.
- COSTA, F.N.; TROVO, M.; SANO, P.T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, dez. 2008, p. 119-125.
- DEBNATH, S.C. Inter simple sequence repeat (ISSR) to assess genetic diversity within a collection of wild lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) clones. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 87, n. 2, p. 337-344, 2007.

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

DUNCAN, T.M.; RAUSHER, M.D. Morphological and genetic differentiation and reproductive isolation among closely related taxa in the *Ipomoeae* series batatas. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 11, p. 2183-2193, 2013.

EARL, D.A.; VON HOLDT, B.M. Structure harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, p. 359–361, 2012.

ENGEL, V.L.; FONSECA, R.C.B.; OLIVEIRA, R.E. Ecologia de lianas e o manejo de fragmentos florestais. **Série técnica IPEF**, v. 12, n. 32, p. 43-64, 1998.

ENNOS, R.A. Quantitative studies of the mating system in two sympatric species of *Ipomoea* (Convolvulaceae). **Genetica**, v. 57, n. 2, p. 93-98, 1981.

EPPERSON, B.K.; CLEGG, M.T. First-pollination primacy and pollen selection in the morning glory, *Ipomoea purpurea*. **Heredity**, v. 58, n. 1, p. 5-14, 1987.

ERBANO, M.; SCHNELL-E-SCHÜHLI, G.; SANTOS, É.P.D. Genetic variability and population structure of *Salvia lachnostachys*: implications for breeding and conservation Programs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 7839-7850, 2015.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479–491, 1992.

FAJARDO, D.S.; LA BONTE, D.R.; JARRET, R.L. Identifying and selecting for genetic diversity in Papua New Guinea sweetpotato *Ipomoea batatas* (L.) Lam. germplasm collected as botanical seed. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 49, n. 5, p. 463-470, 2002.

FAJARDO, C.G.; VIEIRA, F. de A.; MOLINA, W.F.. Interspecific genetic analysis of orchids in Brazil using molecular markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 8, p. 1825-1832, 2014.

FALEIRO, F.G. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2007.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null allele. **Molecular Ecology Notes**, v.7, p.574–578, 2007.

- FANG, G., HAMMAR, S.; GRUMET, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. **Biofeedback**, v. 13, n. 1, p. 52–54, 1992.
- FARELL, E.M.; ALEXANDRE, G. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 257, 2012.
- FERREIRA, P.P.A. **O gênero *Ipomoea* L. (Convolvulaceae) no Rio Grande do Sul**. 183 p. Dissertação Mestrado em Botânica. Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- FERREIRA, P.P.A., MIOTTO, T.S. Three new species of *Ipomoea* L. (Convolvulaceae) from Southern Brazil. **Kew Bulletin**, v. 66, p. 289-294, 2011.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. Fundamentos de genética da conservação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 280 p.
- FUNCH, L.S.; HARLEY, R.; FUNCH, R.; GIULIETTI, A.M.; MELO, E.de. Plantas úteis da Chapada Diamantina. São Carlos: Rima Editora, 2004. 204 p.
- GALETTI JR., P.M.; RODRIGUES, F.P.; SOLÉ-CAVA, A.M. et al. Genética da conservação na biodiversidade brasileira. In: FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. Fundamentos de genética da conservação. Ribeirão Preto, SP: SBG, 2008. 262 p.
- GAWEL, N.J.; JARRET, R.L. A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 9, n. 3, p. 262-266, 1991.
- GEIGER, J.H.; MEEROW, A.W.; LEWIS, C.; OVIEDO, R.; FRANCISCO-ORTEGA, J. Genetic diversity and conservation of *Ipomoea microdactyla* (Convolvulaceae): an endemic vine from the Bahamas, Cuba, and southeastern Florida. **Plant Species Biology**, v. 29, p. 2-15, 2014.
- GENTRY, A.H. The distribution and evolution of climbing plants. In: PUTZ, F.E.; MOONEY, H.A., ed. The biology of vines. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 3-49.
- GICHUKI, S.T.; BERENYL, M.; ZHANG, D.; HERMANN, M.; SCHMIDT, J.; GLOSSL, J.; BURG, K. Genetic diversity in sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] in relationship to geographic sources as assessed with RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, p. 429-437, 2003.
- GIULIETTI, A.M.; NETA, A.N.B.; CASTRO, A.A.J.F.; GAMARRA-ROJAS, C.F.L. et al (Org.). Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: SILVA, J.M.C. da.; TABARELLI, M.; FONSECA, M.T. da.; LINS, L.V. Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação – Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente: Universidade Federal de Pernambuco, 2003a. p. 47-90.
- GIULIETTI, A.M.; NETA, A.N.B.; PAULA, A.R.L.; BARBOSA, D.C. et al (Org.). Vegetação: áreas e ações prioritárias para a conservação da Caatinga. In: SILVA, J.M.C. da.;

TABARELLI, M.; FONSECA, M.T. da.; LINS, L.V. Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação – Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente: Universidade Federal de Pernambuco, 2003b. p. 113 - 131.

GRATIVOL, C.; FONSECA, L.C. da; HEMERLY, A.S.; FERREIRA, P.C.G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 7, p. 4245-4256, 2011.

GUIMARÃES, C.T.; MAGALHÃES, J.D.; LANZA, M.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 30, n. 253, p. 86-95, 2009.

GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora UFV, 1999. p.715-740.

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

GUSSON, E.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Diversity and spatial genetic structure in two *Eschweilera ovata* populations. **Scientia Forestalis**, n. 67, p.123-135, 2005.

hartl, D.L.; CLARK, A.G. Princípios de Genética de Populações. Tradução de L.R.P. Utz, M.R. Borges-Osório, N.J.R. Fagundes. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HE, X.Q; LIU, Q.C.; ZHAI, H.; WANG, Y.P. The use of RAPD, ISSR and AFLP markers for analyzing genetic relationships among sweetpotato cultivars with known origin. **Acta Agronomica Sinica**, v. 31, n. 10, p. 1300 - 1304, 2005.

HESSAM, N.A.; EL-HOMOBONO, A.; KARMA, A.H.; KHABEIN, M.A. Morphological and ISSR polymorphisms. **Academie Royale des Sciences D Outre-Mer Bulletin des Seances**, v. 4, n. 2, p. 178-184, 2015.

HIRAKAWA, H.; OKADA, Y.; TABUCHI, H.; SHIRASAWA, K.; WATANABE, A.; TSURUOKA, H.; MINAMI, C.; NAKAYAMA, S.; SASAMOTO, S.; KOHARA, M.; KISHIDA, Y.; FUJISHIRO, T.; KATO, M.; NANRI, K.; KOMAKI, A.; YOSHINAGA, M.; TAKAHATA, Y.; TANAKA, M.; TABATA, S.; ISOBE, S.N. Survey of genome sequences in a wild sweet potato, *Ipomoea trifida* (H. B. K.) G. Don. **DNA Research**, v. 22, n. 1, 2015.

HU, J.; NAKATANI, M.; LALUSIN, A.G.; KURANOUCHE, T.; FUJIMURA, T. Genetic analysis of sweetpotato and wild relatives using inter-simple sequence repeats (ISSRs). **Breeding Science**, v. 53, n. 4, p. 297-304, 2003.

- HU, J.; NAKATANI, M.; LALUSIN, A.G.; FUJIMURA, T. New microsatellite markers developed from reported *Ipomoea trifida* sequences and their application to sweetpotato and its related wild species. **Scientia Horticulturae**, v. 102, p. 375 - 386 , 2004a.
- HU, J.; NAKATANI, M.; MIZUNO, K.; FUJIMURA, T. Development and characterization of microsatellite markers in sweetpotato. **Breeding Science**, v. 54, p. 177-188, 2004b.
- HUANG, J.C.; SUN, M. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 7, p. 1050-1060, 2000.
- HULL-SANDERS, H.M.; EUBANKS, M.D.; CARR, D.E. Inbreeding depression and selfing rate of *Ipomoea hederacea* var. *integriuscula* (Convolvulaceae). **American Journal of Botany**, v. 92, n. 11, p. 1871-1877, 2005.
- HWANG, S.Y; TSENG, Y.T; LO, H.F. Application of simple sequence repeats in determining the genetic relationships of cultivars used in sweet potato polycross breeding in Taiwan. **Scientia Horticulturae**, v. 93, p. 215-224, 2002.
- ISLAM, S. Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf: its potential effect on human health and nutrition. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, p. R13-R121, 2006.
- JAVOID, A.; AKRAM, W.; SHOAI, A.; HAIDER, M.S.; AHMAD, A. ISSR analysis of genetic diversity in *Dalbergia sissoo* in Punjab, Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, n. 5, p. 1573-1576, 2014.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOUGHUE, M.J. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 632 p.
- KARLSSON, P.S.; MENDEZ, M. The resource economy of plant reproduction. **Reproductive allocation in plants**, (eds E.G.Reekie & F.A.Bazzaz), United States of America: Elsevier, 2005p. 1-49.
- KARURI, H.W.; ATEKA, E.M.; AMATA, R.; NYENDE, A.B.; MUIGAI, A.W.T. Characterization of Kenyan sweet potato genotypes for SPVD resistance and high dry matter content using simple sequence repeat markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 10, 2009.
- KARURI, H.W.; ATEKA, E.M.; AMATA, R.; NYENDE, A.B.; MUIGAI, A.W.T.; MUIGAI, E.; GICHUKI, S.T. Evaluating diversity among Kenyan sweet potato genotypes using morphological and SSR markers. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 12, n. 1, 2010.
- KHALIK, K.A.; OSMAN, G.; AL-AMOUDI, W. Genetic diversity and taxonomic relationships of some *Ipomoea* species based on analysis of RAPD-PCR and SDS-PAGE of seed proteins. **American Journal of Crop Science**, v. 6, n. 6, p. 1088-1093, 2012.

- KHOURY, C.K.; HEIDER, B.; CASTAÑEDA-ÁLVAREZ, N.P.; ACHICANOY, H.A.; SOSA, C.C., ... JARRET, R.L. Distributions, ex situ conservation priorities, and genetic resource potential of crop wild relatives of sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam., I. series Batatas]. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-14, 2015.
- KIM, C.S.; LEE, C.H.; SHIN, J.S.; CHUNG, Y.S.; HYUNG, N.I. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 5, p. 1085-1086, 1997.
- KRIEGNER, A.; CERVANTES, J.C.; BURG, K.; MWANGA, R.O.; ZHANG, D. A genetic linkage map of sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] based on AFLP markers. **Molecular Breeding**, v. 11, n. 3, p. 169-185, 2003.
- LIMA, D.F.; MAUAD, A.V.S.; DA SILVA-PEREIRA, V.; DE CAMARGO SMIDT, E.; GOLDENBERG, R. Species boundaries inferred from ISSR markers in the *Myrcia laruotteana* complex (Myrtaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, n. 1, p. 353-363, 2015.
- LINOS, A.; NIKOUDAKIS, N., KATSIOTIS, A.; HAGIDIMITRIOU, M. Genetic structure of the Greek olive germplasm revealed by RAPD, ISSR and SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 175, p. 33-43, 2014.
- LIU, Z.H.; XIE, Q.; LI, Z.Q. Genetic diversity and taxonomic status of *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis* revealed by ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 1034-1043, 2014.
- LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.D.O.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biociência**, v. 5, n. 29, p. 56-60, 2002.
- LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 2.ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1991. 440p.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 65-95, 1984.
- LY, T.; FUKUOKA, H.; OTAKA, A.; HOSHINO, A.; IIDA, S.; NITASAKA, E.; WATANABE, N. KUBOYAMA, T. Development of EST-SSR markers of *Ipomoea nil*. **Breeding Science**, v. 62, p. 99-104, 2012.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, p. 209-220, 1967.
- MARTINS, E.C.A.; PELUZIO, J.M.; COIMBRA, R.R.; SILVEIRA, M.A. da; OLIVEIRA, J.D.D.; OLIVEIRA-JUNIOR, W.P. Diversidade genética em batata-doce no Tocantins. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 429-435, mar./abr. 2014.

MATTA, P.M da. **O Garimpo na Chapada Diamantina e seus Impactos Ambientais: uma visão histórica e suas perspectivas futuras**. 2006. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado, Pós Graduação em Engenharia Ambiental–UFBA, 260p.

McMULLEN, C.K. Pollination biology of a night-flowering Galápagos endemic, *Ipomoea habeliana* (Convolvulaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 160, n. 1, p. 11-20, 2009.

MEIRA, M.; SILVA, E.P.D.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 682-713, 2012.

MILLER, R.E.; RAUSHER, M.D. & MANOS, P.S. Phylogenetic systematics of *Ipomoea* (Convolvulaceae) based on ITS and waxy sequences. **Systematic Botany**, v.24, n. 2, p. 209-227, 1999.

MILLER, R.E.; MCDONALD, A.; MANOS, P.S. Systematics of *Ipomoea* subgenus *Quamoclit* (Convolvulaceae) based on ITS sequence data and a Bayesian phylogenetic analysis. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 8, p. 1208-1218, 2004.

MMA. 2002. Biodiversidade Brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: MMA/SBF, 404 p.

MMA, 2007. Plano de Manejo Parque Nacional da Chapada Diamantina. Instituto Chico Mendes. Brasília, 657 p. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/imgs-unidades-coservacao/parna_chapada_diamantina.pdf>. Acesso em: 14 out. 2014.

MOHANRAJ, R.; SIVASANKAR, S. Sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam) - a valuable medicinal food: a review. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 7, p. 733-741, 2014.

MOREIRA, D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 13, p. 3309-3310, 1998.

MOULIN, M.M.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L.S.A.; SUDRÉ, C.P; PEREIRA, M.G. A comparison of RAPD and ISSR markers reveals genetic diversity among sweet potato landraces (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 34, n. 2, p. 139-147, 2012.

NASCIMENTO, K.O. do; ROCHA, D.G.C.M.; SILVA, E.B. da; JUNIOR, J.L.B.; BARBOSA, M.I.J. Caracterização química e informação nutricional de fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) orgânica e biofortificada. **Revista Verde**, Mossoró, RN, v. 8, n. 1, p. 132-138, 2013.

NASCIMENTO, W.F.; RODRIGUES, J.F.; KOEHLER, S.; GEPTS, P.; VEASEY, E.A. Spatially structured genetic diversity of the Amerindian yam (*Dioscorea trifida* L.) assessed

by SSR and ISSR markers in Southern Brazil. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, n. 8, p. 2405-2420, 2013.

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

NOLASCO, M.C.; MACEDO, A. 2005. Registros geológicos garimpeiros a diamantes: chaves de identificação de cicatrizes erosivas e depósitos tecnogênicos. Trabalho Apresentado no X Congresso da ABEQUA. Guarapari.

NOROOZISHARAF, A.; HATAMZADEH, A.; LAHIJI, H.S.; BAKHSHI, D. Genetic diversity of endangered primrose (*Primula heterochroma* Stapf.) accessions from Iran revealed by ISSR and IRAP markers. **Scientia Horticulturae**, v. 190, p. 173-178, 2015.

PAYEL, D.; MALA, P.; SUNITA, S. Inter-genus variation analysis in few members of Cucurbitaceae based on ISSR markers. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 5, p. 882-886, 2015.

PAZETO, M.S.R.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; CORRÊA, A.A.P.; VIANNA, V.F.; LEITE, D.C.; DI MAURO, A.O. Genetic diversity in *Jatropha* species from different regions of Brazil based on morphological characters and inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 25, p. 2066-2079, 2015.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.F. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537–2539, 2012.

PEREIRA, D.D.A.; CORRÊA, R.X.; DE OLIVEIRA, A.C. Molecular genetic diversity and differentiation of populations of ‘somnia’ passion fruit trees (*Passiflora setacea* DC): Implications for conservation and pre-breeding. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 12-21, 2015.

PHILLIPS, O.L.; MARTÍNEZ, R.V.; ARROYO, L.; BAKER, T.R.; KILLEEN, T.; LEWIS, S.L.; ... ALEXIADES, M. Increasing dominance of large lianas in Amazonian forests. **Nature**, v. 418, n. 6899, p. 770-774, 2002.

PINHEIRO, L.R.; RABBANI, A.R.C.; DA SILVA, A.V.C.; DA SILVA LEDO, A.; PEREIRA, K.L.G.; DINIZ, L.E.C. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, n. 10, p. 1815-1825, 2012.

PINTO, L.R.; VIEIRA, M.L.C; SOUZA, A.P. de; SOUZA-JUNIOR, C.L. de. Isoenzimas e microsatélites em plantas: aspectos técnicos e interpretação genética. **Biociência & Desenvolvimento**, n. 20, 2001.

POREBSKI, S.; BAILEY, L.G.; BAUM, B.R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 15, n. 1, p. 8-15, 1997

PREVOST, A.; WILKINSON, M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 1, p. 107-112, 1999.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

PUTZ, F.E. 2012. Vine Ecology. ECOLOGY.INFO 24 Disponível em: <<http://www.ecology.info/vines.htm>> Acesso em: 11 fev. 2016.

RAO, V.R.; HODGKIN, T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, n. 1, p. 1-19, 2002.

RAPINI, A.; RIBEIRO, P.L.; LAMBERT, A.; PIRANI, J.R. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 15-23, 2008.

REFULIO-RODRIGUEZ, N. F.; OLMSTEAD, R. G. Phylogeny of Lamiidae. **American Journal of Botany**, v. 101, n. 22, p. 287-299, 2014.

RICKLEFS, R.E. A Economia da Natureza. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2011. 470 p.

RIDLEY, M. Evolução. Tradução de H.B. Ferreira, L. Passaglia, R. Fischer. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ROCHA, A.B. **Caracterização bromatológica e avaliação de compostos bioativos presentes na batata-da-serra (*Ipomoea convolvulacea* L.) produzida na Chapada Diamantina-BA**. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

ROCHA, W.J.S.F.; JUNCÁ, F.A.; CHAVES, J.M.; FUNCH, L. Considerações finais e recomendações para conservação. In: JUNCÁ, F.A., FUNCH, L.; ROCHA, W. Biodiversidade e conservação da Chapada Diamantina. Brasília: Ministério do Meio Ambiente-MMA, 2005, p. 409-435.

RODRIGUES, J.F.; VAN DEN BERG, C.; ABREU, A.G.; NOVELLO, M.; VEASEY, E.A.; OLIVEIRA, G.C.; KOEHLER, S. Species delimitation of *Cattleya coccinea* and *C. mantiqueirae* (Orchidaceae): insights from phylogenetic and population genetics analyses. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, n. 5, p. 1345-1359, 2015.

RODRIGUEZ-BONILLA, L.; CUEVA, H.E; MONTERO-ROJAS, M.; BIRD-PICO, F.; LUCIANO-ROSARIO, D.; SIRITUNGA, D. Assessment of genetic diversity of sweet potato in Puerto Rico. **PloS One**, v. 9, n. 12, p. e116184, 2014.

ROGSTAD, S.H. Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses. **Taxon**, v. 41, n. 4, p. 701-708, 1992.

- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas. **Biotechnologia**, v. 9, p. 40-43, 1999.
- ROSA, João Guimarães. Grande Sertão: Veredas. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1986. 624 p.
- ROULLIER, C.; ROSSEL, G.; TAY, D.; MCKEY, D.; LEBOT, V. Combining chloroplast and nuclear microsatellites to investigate origin and dispersal of New World sweet potato landraces. **Molecular Ecology**, v. 20, p. 3963–3977, 2011.
- ROULLIER, C.; KAMBOUO, R.; PAOFA, J.; MAKEY, D.; LEBOT, V. On the origin of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) genetic diversity in New Guinea, a secondary centre of diversity. **Heredity**, v. 110, p. 594-604, 2013a.
- ROULLIER, C.; BENOITH, L.; MCKEY, D.B.; LEBOT, V. Historical collections reveal patterns of diffusion of sweet potato in Oceania obscured by modern plant movements and recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 6, p. 2205–2210, 2013b.
- SÁ, I.B.; RICHÉ, G.R.; FOTIUS, G.A. As paisagens e o processo de degradação do semi-árido nordestino. In: SILVA, J.M.C. da.; TABARELLI, M.; FONSECA, M.T. da.; LINS, L.V. Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação – Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente: Universidade Federal de Pernambuco, 2003. p. 17-36.
- SABIR, J.S.M.; ABO-ABA, S.; BAFEEL, S.; ZARI, T.A.; EDRIS, S.; SHOKRY, A.M.; ... BAHIELDIN, A. Characterization of ten date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia using AFLP and ISSR markers. **Comptes Rendus Biologies**, v. 337, n. 1, p. 6-18, 2014.
- SCHAFLEITNER, R.; TINCOPA, L.R.; PALOMINO, O.; ROSSEL, G.; ROBLEA, R.F.; ALAGON, R.; ... SOLIS, J. A sweetpotato gene index established by de novo assembly of pyrosequencing and Sanger sequences and mining for gene-based microsatellite markers. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 1, 2010.
- SCHMIDT, I.B.; TICKTIN, T. When lessons from population models and local ecological knowledge coincide – Effects of flower stalk harvesting in the Brazilian savanna. **Biological Conservation**, v. 152, p. 187-195, 2012.
- SHANNON, C.E. A mathematical theory of communication. **Bell System Technical Journal**, v. 27, p. 379–423, 1948.
- SILVA, A.V.C.; ANDRADE, L.N.T.; RABBANI, A.R.C.; NUNES, M.U.C.; PINHEIRO, L.R. Genetic diversity of sweet potatoes collection from Northeastern Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 10, p. 1109-1116, 2013.

SIMÃO-BIANCHINI, R. *Ipomoea* L. (Convolvulaceae) no sudeste do Brasil. 476 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

SIMÃO-BIANCHINI, R; PIRANI, J.R. Duas novas espécies de Convolvulaceae de Minas Gerais, Brasil. *Hoehnea*, v. 32, n. 2, p. 295-300, 2005.

SOUZA, G.A. de; CARVALHO, M.R. de; MARTINS, E.R.; GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA, L.O. de. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H.. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

STUCKY, J.M.; BECKMANN, R.L. Pollination biology, self-incompatibility, and sterility in *Ipomoea pandurata* (L.) G. F. W. Meyer (Convolvulaceae). *American Journal of Botany*, v. 69, n. 6, p. 1022–1031, 1982.

STUCKY, J.M. Pollination systems of sympatric *Ipomoea hederacea* and *I. purpurea* and the significance of interspecific pollen flow. *American Journal of Botany*, v. 72, n. 1, p. 32–43, 1985.

SUN, M.; WONG, K.C. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. *American Journal of Botany*, New York, v.88, p.2180-2188, 2001.

TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C.; LEAL, I.R. Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. Leal, I.R, J.M.C Silva & M. Tabarelli (Eds.), 2003, p. 777-796.

TALEBI, S.M.; SHEIDAI, M.; ATRI, M.; SHARIFNIA, F.; NOORMOHAMMADI, Z. Genetic diversity and structure analysis of *Linum glaucum* populations. *Environmental and Experimental Biology*, v. 13, p. 75–82, 2015.

TIAN, Y.; XING, C; CAO, Y.; WANG, C.; GUAN, F.; LI, R.; MENG, F.. Evaluation of genetic diversity on *Prunus mira* Koehne by using ISSR and RAPD markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 29, n. 6, p. 1053-1061, 2015.

TSUCHIYA, Tohru. Self-incompatibility system of *Ipomoea trifida*, a wild-type sweet potato. In: *Sexual Reproduction in Animals and Plants*. Springer Japan, 2014. p. 305-325.

UENO, S; RODRIGUES, J.F.; ALVES-PEREIRA, A.; PANSARIN, E.R.; VEASEY, E.A. Genetic variability within and among populations of an invasive, exotic orchid. *AoB Plants*, v. 7, p. plv077, 2015.

UENO, S. **Diversidade e estrutura genética de populações de *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl.** 2013, 75 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) -

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

VALE, R.C.M; LOBÃO, J., ROCHA, W., NOLASCO, M. Contribuições das geotecnologias ao zoneamento ambiental do setor Sul do Parque Nacional Chapada Diamantina, BA. **RA'E GA-O Espaço Geográfico em Análise**, v. 16, p. 149-165, 2008.

VASCONCELOS, L.V.; SIMÃO-BIANCHINI, R. Two new species of *Ipomoea* (Convolvulaceae) from the Chapada Diamantina of Bahia, Brazil. **Springer**, no prelo.

VEASEY, E.A.; BORGES, A.; ROSA, M.S.; QUEIROZ-SILVA, J.R.; BRESSAN, E.A.; PERONI, N. Genetic diversity in Brazilian sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Solanales, Convolvulaceae) landraces assessed with microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 725-733, 2008.

VEASEY, E.A.; SILVA, J.R.D.Q.; ROSA, M.S.; BORGES, A.; BRESSAN, E.D.A.; PERONI, N. Phenology and morphological diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas*) landraces of the Vale do Ribeira. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 4, p. 416-427, 2007.

VELLOSO, A.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; PAREYN, F.G.C. (eds.). Ecorregiões: propostas para o Bioma Caatinga. 1. ed. Recife: Associação Plantas do Nordeste / Instituto de Conservação Ambiental - The Nature Conservancy do Brasil, 2002. 76 p.

VIDAL, Á.M.; VIEIRA, L.J.; FERREIRA, C.F.; SOUZA, F.V.D.; SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S. Genetic fidelity and variability of micropropagated cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) evaluated using ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 7759, 2015.

VIDOR, M.A.; RUIZ, C.P.; MORENO, S.V.; FLOSS, P.A. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.): o sabor. **Ciência Rural**, v.32, n.3, p.415-420, 2002.

WALUYO, B.; ROOSDA, A.A.; ISTIFADAH, N.; RUSWANDI, D.; KARUNIAWAN, A. Identification of fifty sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) promising clones for bioethanol raw materials. **Energy Procedia**, v. 65, p. 22-28, 2015.

WANG, Z.; LI, J.; LUO, Z.; HUANG, L.; CHEN, X.; FANG, B.; ... ZHANG, X. Characterization and development of EST-derived SSR markers in cultivated sweetpotato (*Ipomoea batatas*). **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 139, 2011.

WANG, Q.;HUANG, M.; DOWNIE, S.R.; CHEN, Z.; CHEN, Y. Genetic diversity and structure of the noxious alien grass *Praxelis clematidea* in Southern China. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 183-189, 2015.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3741, 1997.

WOLFE, A.D. ISSR protocols. 2000. Disponível em: <<http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/protocols.ISSR.html>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

XAVIER, T.F.; KANNAN, M.; AUXILIA, A. Traditional medicinal plants used in the treatment of different skin diseases. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, p. 1043-1053, 2015.

YADA, B.; TUKAMUHABWA, P.; WANJALA, B.; KIM, D.J.; SKILTON, R.A.; ALAJO, A.; MWANGA, R.O. Characterization of Ugandan sweetpotato germplasm using fluorescent labeled simple sequence repeat markers. **HortScience**, v. 45, n. 2, p. 225-230, 2010.

YANG, X.; SU, W.; WANG, L.; LEI, J.; CHAI, S.; LIU, Q. Molecular diversity and genetic structure of 380 sweetpotato accessions as revealed by SSR markers. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 4, p. 633-641, 2015.

ZAPPI, D.C.; LUCAS, E.; STANNARD, B.L.; LUGHADHA, E.N.; PIRANI, J.R.; DE QUEIROZ, L.P.; ... DE CARVALHO, A.M. Lista das plantas vasculares de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 21, n. 2, p. 345–398, 2003.

ZAWEDDE, B.M.; HARRIS, C.; ALAJO, A.; HANCOCK, J.; GRUMET, R. Factors influencing diversity of farmers' varieties of sweet potato in Uganda: implications for conservation. **Economic Botany**, v. 68, n. 3, p. 337–349, 2014.

ZAYED, E.; SAYED, M.; OMAR, A. Genetic variations between two ecotypes of Egyptian clover by inter-simple sequence repeat (ISSR) techniques. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 23, p. 1947-1953, 2015.

ZHANG, D.P.; CARBAJULCA, D.; OJEDA, L.; ROSSEL, G.; MILLA, S.; HERRERA, C.; GHISLAIN, M. Microsatellite analysis of genetic diversity in sweetpotato varieties from Latin America. **CIP Program Report**, v. 2000, p. 295-301, 1999.

ZHANG, D.; GHISLAIN, M.; HUAMAN, Z.; GOLMIRZAIE, A.; HIJMANS, R. RAPD variation in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) cultivars from South America and Papua New Guinea. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 45, p. 271-277, 1998.

ZHANG, D.; CERVANTES, J.; HUAMAN, Z.; CAREY, E.; GHISLAIN, M. Assessing genetic diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars from tropical America using AFLP. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 47, p. 659-665, 2000.

ZHANG, K.; WU, Z.D.; LI, Y.H.; ZHANG, H.; WANG, L.P.; ZHOU, Q.L.; ... YANG, h.; WANG, J. ISSR-Based molecular characterization of an elite germplasm collection of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) in China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, n. 11, p. 2346-2361, 2014.

ZHOU, L.Y.; WANG, Z.N.; WANG, L.P.; CHEN, Y.Z.; JIANG, X.C. Genetic diversity of oil-tea camellia germplasms revealed by ISSR analysis. **International Journal of Biomathematics**, v. 8, n. 05, p. 1550070, 2015.

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.

ZORATTI, L.; PALMIERI, L.; JAAKOLA, L.; HÄGGMAN, H. Genetic diversity and population structure of an important wild berry crop. **AoB Plants**, v. 7, p. plv117, 2015.

ZUFALL, R.A.; RAUSHER, M.D. The genetic basis of a flower color polymorphism in the common morning glory (*Ipomoea purpurea*). **Journal of Heredity**, v. 94, n. 6, p. 442-448, 2003.