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

Diversidade e estrutura genética de populações de *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl.

Sueme Ueno

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

**Piracicaba
2013**

Sueme Ueno
Bióloga

**Diversidade e estrutura genética de populações de *Oeceoclades maculata*
(Lindl.) Lindl.**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2013**

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

Ueno, Sueme

Diversidade e estrutura genética de populações de *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. / Sueme Ueno.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
75 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. *Oeceoclades maculata* 2. Orchidaceae 3. Marcadores ISSR 4. Diversidade genética
5. Invasora I. Título

CDD 635.93415
U122d

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

DEDICO,

Aos meus pais, Masuyoshi e Sônia, pela liberdade de escolher meus caminhos, iluminando-os sempre com apoio e amor incondicionais. Aos meus irmãos Karen, Rui e Ayume, aos meus sobrinhos Lucas, Vinícius e Gabriel por serem a casa para onde eu sempre posso voltar.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), pelo apoio institucional e oportunidade de realização do curso de Mestrado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado;

À Professora Dr^a Elizabeth Ann Veasey, minha orientadora, pela confiança e apoio em minhas decisões, pelas discussões, esclarecimentos e elaboração deste trabalho. Muito obrigada Betty! Tive muita sorte de ter você como orientadora de mestrado;

Aos meus pais, Masuyoshi e Sônia, pelos valores, princípios e amor incondicional. O exemplo de persistência de seres que nunca se rendem é a minha força motriz;

Aos meus irmãos Rui, Karen e Ayume por serem o tempero da nossa família e pelo incentivo em todos os momentos;

Ao Acácio, por todo apoio, amor e paciência, por entender as minhas ausências e por me fazer rir e contemplar todas as voltas da vida, principalmente aquelas que parecem voltar para trás;

À Jucelene Fernandes Rodrigues pelo direcionamento na delimitação e redação do trabalho, o auxílio na sua execução, o incentivo quando tudo parecia errado e principalmente por esse brilho nos olhos quando fala de orquídeas e genética de populações. Esse brilho me contagiou na execução do trabalho;

Aos meus amigos que fiz Londrina, que sempre entenderam minhas ausências e que torcem muito por mim;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada, Wellington, Thiago, Jucelene, Mariana, Ana, Santiago, Thaís e Nancy pela amizade, paciência e pela ajuda durante o desenvolvimento deste projeto;

À todos os professores do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pelos grandes ensinamentos durante o curso de mestrado;

Aos funcionários do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em especial a Léia, por sempre ter auxiliado em tudo que foi necessário;

Ao Professor Dr. Giancarlo Conde Xavier Oliveira por disponibilizar o uso de seu laboratório para a execução do trabalho;

À Professora Dr^a Samantha Koehler da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) por disponibilizar equipamentos que foram essenciais na execução do trabalho;

Ao Professor Dr. Emerson Ricardo Pansarin da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/ USP) pelo auxílio nas coletas e colaborações no projeto;

Ao Josué Lemos de Pontes, do Orquidário do Departamento de Genética Prof. Paulo Soderó Martins, pelo auxílio nas coletas;

Ao técnico do laboratório, Marcos Cella (Marcão), pelo auxílio na realização dos experimentos, e por esse jeito sempre simpático que torna o laboratório um lugar mais agradável;

Aos amigos do Café, Mariana, Gabriel, Alessandro, Santiago e Glaucia, por tornarem meus dias muito mais divertidos e apetitosos;

Ao Alessandro Alves Pereira pelo grande auxílio nas análises estatísticas, pela disposição de tirar as minhas dúvidas a qualquer momento, por me chacoalhar nas minhas lamentações e sempre me incentivar. Por você agradeço até a Ele, embora não tenha uma concepção clara Dele, pois não sei se teria conseguido sem você!

A todos aqueles que de forma direta ou indireta tenham contribuído para a realização deste trabalho.

"... o tempo que temos, se estamos atentos, será sempre exato."

Caio Fernando Abreu

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Objetivos	21
1.2 Hipóteses	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Biologia das plantas invasoras	23
2.2 A família Orchidaceae	24
2.3 <i>Oeceoclades maculata</i> (Lindl.) Lindl	26
2.4 Marcadores moleculares ISSR	29
2.5 Diversidade e estrutura genética	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Material vegetal	35
3.2 Extração de DNA	37
3.3 Seleção e otimização de iniciadores de ISSR	38
3.4 Análise dos dados	40
4 RESULTADOS	43
4.1 Teste e seleção de iniciadores ISSR	43
4.2 Diversidade e estrutura genética	44
5 DISCUSSÃO	55
5.1 Baixa diversidade em populações de <i>Oeceoclades maculata</i>	55
5.2 Alta estruturação genética de populações de <i>Oeceoclades maculata</i>	57
5.3 Ausência de correlação entre distâncias genéticas e geográficas	59
6 CONCLUSÕES	61
REFERENCIAS	63

RESUMO

Diversidade e estrutura genética de populações de *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl.

Originária da África, a orquídea terrestre *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. é considerada uma espécie invasora com potencial de colonizar grandes áreas. A espécie se desenvolve tanto em ambientes secos quanto úmidos e está presente em áreas perturbadas e não perturbadas, sendo a única espécie do gênero presente no continente americano. Embora apresente um mecanismo passivo de autofertilização, estudos apontam para ocorrência de cruzamento entre populações brasileiras, indicando existência de variação na biologia reprodutiva da espécie através da sua extensão geográfica. Considerando a falta de informações de genética de populações da espécie, o objetivo do estudo foi avaliar a diversidade e a estrutura genética de populações brasileiras de *O. maculata* e obter informações sobre o sistema reprodutivo da espécie. Para tanto, foram utilizados 13 iniciadores ISSR para avaliar a diversidade genética de 152 indivíduos de *O. maculata* distribuídos em cinco populações naturais provenientes de três estados brasileiros (São Paulo, Mato Grosso e Paraná). As populações avaliadas apresentaram baixos índices de diversidade intrapopulacional, com estimativas do índice de Shannon (I) variando de 0,0094 a 0,1054 e estimativas de diversidade gênica de Nei (H_e) variando de 0,0054 a 0,0668. Entretanto, quando avaliadas em conjunto, as populações apresentaram estimativas de diversidade substancialmente mais altas ($I = 0,3869$; $H_e = 0,2556$). A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que a maior parte da diversidade encontra-se entre as populações ($\Phi_{ST} = 0,933$). Tanto a análise de coordenadas principais (PCoA) quanto a análise de agrupamento utilizando o método *Neighbor-Joining* indicam a existência de cinco grupos distintos, sem mistura de indivíduos de diferentes populações num mesmo grupo. A análise bayesiana realizada pelo programa Structure corroborou com os resultados obtidos pelo dendrograma e pela PCoA. Contudo, observou-se certa subestruturação da população do Campus da ESALQ (SP), sugerindo falta de fluxo gênico mesmo entre distâncias muito pequenas. Não houve correlação significativa, estimada pelo teste de Mantel, entre as distâncias genéticas e geográficas dos espécimes dado que populações mais próximas geograficamente foram mais distantes geneticamente. Os resultados sugerem predominante autofertilização e reprodução vegetativa, entretanto não exclui a possibilidade de ocorrência de cruzamento. A distribuição da diversidade genética nas populações da orquídea invasora *O. maculata* pode ser compreendida como resultado da interação das suas várias possíveis estratégias reprodutivas com sua história de colonização que envolve possíveis gargalos genéticos, deriva genética, pressões de seleção e múltiplas introduções.

Palavras chave: *Oeceoclades maculata*; Orchidaceae; Marcadores ISSR; Diversidade genética; Invasora

ABSTRACT

Genetic diversity and structure of *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. populations

Originally from Africa, the terrestrial orchid *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. is considered an invasive species with the potential to colonize large areas. The species grows both in dry and humid environments as it is present in disturbed and undisturbed areas, being the only species of the genus in American continent. Although presenting a passive mechanism of self-fertilization, studies point to the occurrence of cross-fertilization between Brazilian populations, indicating the existence of variation in the reproductive biology of the species across its geographic range. Considering the lack of information of population genetics of the species, the aim of the study was to evaluate the genetic diversity and structure of Brazilian populations of *O. maculata* and to obtain more information concerning the reproductive system of the species. Therefore, we used 13 ISSR primers to assess the genetic diversity of 152 individuals of *O. maculata* distributed in five natural populations from three Brazilian states (São Paulo, Mato Grosso and Paraná). The populations studied showed low diversity within populations, with estimates of the Shannon index (I) ranging from 0.0094 to 0.1054 and estimates of Nei's gene diversity (H_e) ranging from 0.0054 to 0.0668. However, when evaluated together, the populations showed substantially higher diversity estimates ($I = 0.3869$, $H_e = 0.2556$). The molecular analysis of variance (AMOVA) indicated that most of the diversity was found among populations ($\Phi_{ST} = 0.933$). Both principal coordinate analysis (PCoA) and the cluster analysis using Neighbor-Joining method indicate the existence of five distinct groups, without mixing of individuals from different populations in the same group. The Bayesian analysis performed by the program Structure corroborated the results obtained in the cluster analysis and PCoA. However, a substructure was observed for the Campus da ESALQ (SP) population, suggesting a lack of gene flow between even very small distances. No significant correlation estimated by the Mantel test between the genetic and geographic distances of specimens was found. The results suggest predominant self-fertilization and vegetative reproduction, however it does not exclude the possibility of outcrossing. The distribution of genetic diversity in populations of the invasive orchid *O. maculata* can be understood as the result of the interaction of several possible reproductive strategies with its history of colonization involving possible genetic bottlenecks, genetic drift, selection pressures and multiple introductions.

Keywords: *Oeceoclades maculata*; Orchidaceae; ISSR markers; Genetic diversity; Invasive species

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Ilustração da espécie *Oeceoclades maculata*. Disponível em <http://www.botanicus.org/page/131518>27
- Figura 2 – Detalhe da inflorescência da *Oeceoclades maculata*. Disponível em28
- Figura 3 – Local de coleta de *Oeceoclades maculata* num fragmento de mata no Campus da ESALQ-USP, em Piracicaba, SP36
- Figura 4 – Detalhe de um espécime de *Oeceoclades maculata* dentro de um fragmento de mata no Campus da ESALQ – USP, em Piracicaba, SP36
- Figura 5 – Mapa do Brasil com a identificação (pontos) dos locais onde foram realizadas as coletas de *Oeceoclades maculata*37
- Figura 6 – Padrão de bandas de marcadores ISSR amplificadas a partir da utilização do iniciador JOHN, para a população do Rio Piracicaba – Piracicaba, SP43
- Figura 7 – Diversidade gênica das populações avaliadas considerando o número total de bandas, o número de bandas polimórficas, o número de bandas exclusivas e índice de diversidade de Nei (com desvio padrão) de cada população de *Oeceoclades maculata*45
- Figura 8 – Proporção de haplótipos dentro de cada população de *Oeceoclades maculata*. As áreas brancas hachuradas representam as proporções de haplótipos únicos. As áreas coloridas representam as proporções de haplótipos que ocorrem em mais de um indivíduo da população. Os números representam o número de indivíduos de cada haplótipo.....46
- Figura 9 – Correlação entre as distâncias genéticas e geográficas inferida pela análise de isolamento por distância (MANTEL, 1967)47

- Figura 10 – Análise de coordenadas principais dos 152 indivíduos de *Oeceoclades maculata* com base em marcadores ISSR 48
- Figura 11 – Dendrograma obtido com o método aglomerativo Neighbor-Joining, baseado em índices de dissimilaridade de Jaccard para cinco populações de *Oeceoclades maculata*: Ribeirão Preto/ SP (verde), Cáceres/ MT (cor de rosa), ESALQ/ SP (amarelo), rio Piracicaba/ SP (azul) e Maringá/ PR (alaranjado) 49
- Figura 12 – Valores de ΔK para cada valor de K . O maior valor de ΔK representa o valor mais provável de K de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005)..... 50
- Figura 13 – Análise da estrutura genética dos 152 indivíduos provenientes das cinco populações coletadas de *Oeceoclades maculata*. Os indivíduos foram classificados em cinco grupos ($K = 5$) 50
- Figura 14 – Dendrograma obtido com o método *Neighbor-Joining*, baseado em índices de dissimilaridade de Jaccard para cinco populações de *Oeceoclades maculata*: Ribeirão Preto/ SP (verde), Cáceres/ MT (cor de rosa), ESALQ/ SP subdividida em três subpopulações (amarelo, vermelho e roxo), rio Piracicaba/ SP (azul) e Maringá/ PR (alaranjado).... 52
- Figura 15 – Valores de ΔK para cada valor de K . O maior valor de ΔK representa o valor mais provável de K de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005)..... 53
- Figura 16 – Análise da estrutura genética dos 38 indivíduos provenientes da população de *Oeceoclades maculata* do Campus da ESALQ em Piracicaba/SP. Os indivíduos foram classificados em dois ($K = 2$) 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Locais de coleta (município, estado e local de coleta); número de indivíduos coletados (n); coordenadas geográficas dos locais de coleta.....	35
Tabela 2 - Iniciadores ISSR testados em <i>Oeceoclades maculata</i> e suas respectivas sequências (WOLFE, 2000)	39
Tabela 3 – Iniciadores selecionados e suas respectivas temperaturas de anelamento e concentrações de $MgCl_2$ utilizadas para amplificação das populações de <i>Oeceoclades maculata</i>	44
Tabela 4 - Estimativas de diversidade genética das populações de <i>Oeceoclades maculata</i> avaliadas: número de indivíduos (N); número de genótipos distintos (NG); índice de Shannon (<i>I</i>); diversidade gênica de Nei (H_e) e porcentagem de locos polimórficos (P)	45
Tabela 5 - Análise de variância molecular (AMOVA) para dois níveis hierárquicos de populações de <i>Oeceoclades maculata</i>	46

1 INTRODUÇÃO

A genética de populações é um dos principais temas de estudos de processos microevolutivos, que no sentido estrito envolve a investigação de alterações das frequências alélicas e genotípicas de populações ao longo do espaço e do tempo (FUTUYMA, 1998). A estrutura genética, ou seja, a forma como a diversidade genética está distribuída entre e dentro das populações, é resultado da ação conjunta da mutação, migração, hibridação e deriva, que por sua vez operam dentro do contexto biológico e histórico de cada espécie (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

A redução da diversidade, devido à perda de alelos, pode diminuir a habilidade de resposta das populações frente a mudanças ambientais (PITHER; SHORE; KELLMAN, 2003). Desse modo, a definição da estrutura genética de populações é necessária para preservação da diversidade genética (BEKESSY, 2002). Estudos de diversidade também são de grande importância para o entendimento do potencial de colonização e estabelecimento de plantas invasoras, assim como seu potencial para respostas evolutivas a novos ambientes e possíveis práticas de manejo (SAKAI et al., 2001). Ma et al. (2011) afirmam que, embora a elucidação da importância da diversidade genética para as plantas invasoras seja essencial para o desenvolvimento de medidas efetivas de controle, poucos estudos vêm sendo realizados.

Ainda que muitas espécies da família Orchidaceae estejam em perigo de extinção devido à destruição e fragmentação de seus habitats e à extração predatória de plantas de seu ambiente natural (MUNOZ; WARNER; ALBERTAZZI, 2010), parte das orquídeas não corre risco de extinção e, algumas, se comportam como plantas daninhas (ACKERMAN, 2007). De acordo com Sun (1997), há poucas informações genéticas sobre espécies da família Orchidaceae que se comportam como colonizadoras, ou seja, aquelas que se estabelecem em habitats não antes ocupados por elas. Além da falta de informações, não há consenso sobre os efeitos de espécies de orquídeas colonizadoras, se é recomendado tolerar ou impedir o estabelecimento dessas espécies (ACKERMAN, 2007).

Com a finalidade de acessar informações sobre diversidade genética, marcadores moleculares vêm sendo muito utilizados e, nesse sentido, marcadores ISSR apresentam grande potencial para estudos de populações naturais (WOLFE;

XIANG; KEPHART, 1998). Este marcador tem sido também utilizado para estudos de genética de populações em espécies da família Orchidaceae (WANG et al., 2009; GEORGE; SHARMA; YADON, 2009; CRUZ et al., 2011; PINHEIRO et al. 2012).

No entanto, estudos abrangentes da estrutura genética populacional em plantas da família Orchidaceae têm se concentrado principalmente em espécies de clima temperado em detrimento de espécies tropicais (VEASEY; OLIVEIRA, 2006). Considerando que a orquídea *Oeceoclades maculata* é uma espécie tropical e invasora, a avaliação da diversidade genética de populações é relevante tanto para o esclarecimento da importância relativa da diversidade genética no potencial de expansão de espécies invasoras quanto para contribuir com o aumento de informações genéticas de espécies tropicais. Do mesmo modo, esse estudo é básico para possíveis ações de manejo da espécie.

1.1 Objetivos

Considerando a importância dos estudos de genética de populações, a escassez de informações desse âmbito sobre a espécie *Oeceoclades maculata*, e visto que os marcadores ISSR têm se mostrado adequados para o estudo dessa natureza, os objetivos do presente trabalho foram:

1. Caracterizar a diversidade e estrutura genética de populações de *Oeceoclades maculata* utilizando marcadores moleculares ISSR;
2. Fazer inferências sobre os eventos evolutivos que agem sobre orquídeas invasoras;
3. Obter maiores informações sobre o sistema reprodutivo da espécie utilizando marcadores moleculares ISSR.

1.2 Hipóteses

Devida à ampla distribuição geográfica da espécie e aos diferentes locais de origem das populações amostradas, espera-se encontrar elevados níveis de diversidade genética;

Em função da informação de que a espécie *O. maculata* se reproduz, principalmente, por autopolinização, espera-se encontrar maior diversidade entre populações do que dentro de populações.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biologia das plantas invasoras

O impacto causado por espécies invasoras sobre espécies nativas, comunidades e ecossistemas é amplamente conhecido e atualmente figura como um componente significativo das mudanças ambientais (SAKAI et al., 2001). Segundo Levine et al. (2003), as invasões biológicas são a segunda maior causa de ameaça de extinção de espécies nativas norte americanas. Além dos impactos biológicos, espécies invasoras podem causar grandes prejuízos à economia (SAKAI et al., 2001). Embora as espécies invasoras sejam comumente estudadas no contexto de perturbações ecológicas ou das atividades humanas que permitiram as invasões, componentes intrínsecos espécies invasoras como as alterações evolutivas durante as invasões podem facilitar ou limitar invasões (NOLTE, 2011). Desse modo, informações sobre suas rotas, múltiplas introduções e mecanismos de expansão são essenciais para definição do manejo adequado e para o desenvolvimento de princípios gerais para antever e prevenir a ocorrência de novas invasões (ABDELKRIM et al, 2007; YANG et al, 2012).

Os processos genéticos e evolutivos são os principais determinantes da capacidade de estabelecimento e disseminação de espécies invasoras (SAKAI et al., 2001). Fatores que afetam o potencial das plantas de colonizarem rápida e eficientemente novos habitats incluem ampla tolerância ambiental, níveis elevados de plasticidade fenotípica, capacidade de autogamia ou reprodução assexuada, dispersão eficaz, alta taxa de crescimento relativo e alta capacidade competitiva (BEEST et al., 2012).

Contudo, a relativa importância desses fatores é variável. Análises indicam que mesmo que as espécies invasoras geralmente apresentem maior plasticidade fenotípica que as nativas que habitam o mesmo ambiente, existem espécies nativas que apresentam melhor desempenho que as invasoras em situações de recursos limitados ou estresse ambiental (DAVIDSON; JENNIONS; NICOTRA, 2011). A capacidade e autofertilização ou reprodução assexuada também, apesar de comum, não é necessária visto que diversos trabalhos mostram invasoras alógamas (KELAGER; PEDERSEN; BRUUN, 2013; YANG et al, 2012).

Embora geralmente a colonização de uma nova área resulte em efeito do fundador e subsequente deriva genética, que reduz a variação dentro das populações e aumenta a diferenciação entre elas, elevados níveis de diversidade são encontrados em muitas espécies invasoras (MA et al., 2011). No entanto, a maioria dos estudos concentra-se em espécies bem estabelecidas, nas quais a alta diversidade pode ser resultado da acumulação ao longo das repetidas introduções. Portanto, estudos de espécies recém-invasoras são essenciais para inferir padrões de introdução e elucidar a importância relativa da diversidade genética na capacidade de expansão das espécies invasoras (KUROKAWA; KOBAYASHI; SENDA, 2009).

Espécies introduzidas geralmente exibem mudanças na variação genética, estrutura populacional, pressões de seleção e características fenotípicas que não ocorrem em condições de equilíbrio demográfico, podendo refletir histórias evolutivas prévias, eventos estocásticos, bem como seleção (KELLER; TAYLOR, 2008). Desse modo, invasões biológicas fornecem oportunidades valiosas para estudos evolutivos durante rápidos limites de tempo (BARRETT; COLAUTTI; ECKERT, 2008).

2.2 A família Orchidaceae

A família Orchidaceae abrange cerca de 7% das angiospermas, sendo considerada uma das maiores famílias desse grupo (PRIDGEON et al., 2001). Caracteriza-se por ser cosmopolita, embora apresente maior número de espécies na região tropical úmida (DRESSLER, 1981). Estima-se que a família seja constituída por cerca de 800 gêneros e cerca de 26.000 espécies (GOVAERTS et al., 2011).

Embora a maioria das orquídeas apresente hábito epifítico, existem as que se desenvolvem em condições húmica, terrícola, rupícola e saprofítica (DRESSLER, 1993). Além disso, possuem diversas estratégias de história de vida, como síndromes de polinização e diferentes morfologias, o que permite a ocupação de diferentes tipos de ambientes e formações vegetacionais (HOEHNE, 1949). Talvez a Orchidaceae apresente as especializações mais extremas do que qualquer outra família das angiospermas e, muitas vezes, são por meio de estudos de extremos que princípios gerais são mais claramente determinados (FAY; CHASE, 2009).

Ainda que muitas espécies de orquídeas estejam em perigo de extinção devido à destruição e fragmentação de seus habitats e à extração predatória de plantas de seu ambiente natural (MUNOZ; WARNER; ALBERTAZZI, 2010), e que muitos representantes da família apresentem especificidade ao habitat e aversão a ambientes perturbados (BERGMAN et al., 2006; PARRA-TABLA et al., 2011; TREMBLAY et al., 1998), parte das orquídeas não corre risco de extinção, e algumas se comportam como plantas invasoras (ACKERMAN, 2007). Estas podem ocorrer em habitats efêmeros ou frequentemente perturbados (ACKERMAN, 1983), como áreas ocupadas por pastagens ou beira de estradas.

Segundo Ackerman (2007), a combinação de alta capacidade de dispersão, conferida pela morfologia de suas sementes, e a preferência por ambientes efêmeros conferem um grau de resiliência às orquídeas que é geralmente subestimado. Avaliações das funções dos fungos micorrizos e dos fatores edáficos relacionadas à capacidade de colonização da orquídea invasora e terrestre *Microtis media*, suportam a idéia de que as orquídeas terrestres invasoras podem associar-se a uma grande diversidade de fungos de maior ocorrência, aumentando a germinação das sementes e a tolerância uma ampla gama de habitats, fornecendo a elas, portanto, vantagem competitiva sobre espécies de orquídeas nativas (De LONG et al, 2013). Entretanto, é muito difícil definir padrões claros relacionados a orquídeas invasoras pois elas ocupam uma variedade de habitats, possuem diversos modos de reprodução e relações simbióticas (ACKERMAN, 2007; COHEN; ACKERMAN, 2009).

Há poucas informações genéticas sobre espécies da família Orchidaceae que se comportam como colonizadoras, ou seja, aquelas que se estabelecem com populações em habitats não antes ocupados por elas (SUN, 1997). Além da falta de informações, não há consenso sobre os efeitos de espécies de orquídeas colonizadoras, se são negativos ou positivos, e se é recomendado tolerar ou impedir o estabelecimento das mesmas (ACKERMAN, 2007).

2.3 *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl.

Pertencente à tribo Cymbidieae e à subtribo Eulophiinae (tribo Cymbidieae, subfamília Epidendroideae), a espécie *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. foi inicialmente descrita por Lindley, em 1821, como *Angraecum maculatum* Lindl. Desde então, a espécie teve seu nome modificado diversas vezes, sendo transferida para o gênero *Oeceoclades* também por Lindley, em 1933 (STERN, 1988). Os nomes sinônimos para a espécie *Oeceoclades maculata* são: *Aerobion maculatum* (Lindl.) Sprengel; *Angraecum maculatum* Lindl.; *Eulophia maculata* (Lindl.) Rchb. F.; *Eulophidium maculatum* (Lindl.) Pfitzer; *Limodorum maculatum* (Lindl.) Loddiges; *Graphorkis maculata* (Lindley) Kuntze; *Geodorum pictum* Link & Otto; *Eulophidium warneckeanum* Kraenzlin; *Eulophidium nyassanum* Schlechter e *Oncidium pumilio* Rchb. F.

Originária das regiões tropicais da África, assim como todas as outras 38 espécies do mesmo gênero, *O. maculata* é a única que também habita o continente americano (GOVAERTS et al., 2012), apresentando a maior distribuição geográfica do gênero. A espécie cresce tanto em ambientes secos quanto úmidos e está presente em áreas perturbadas e não perturbadas (ACKERMAN, 1995), embora seja mais abundante com níveis de perturbação moderado (COHEN; ACKERMAN, 2009). No Brasil, a espécie é amplamente distribuída e ocorre em vários tipos de vegetação (PANSARIN E. R., comunicação pessoal¹).

O. maculata é caracterizada por pseudobulbos ovoides com uma folha apical elíptica. Os rizomas são muito curtos. Apresenta inflorescência racemosa lateral, ereta e geralmente produz até 20 flores que se abrem sucessivamente da base até o ápice. As flores são inodoras com sépalas e pétalas de coloração rosa-esverdeado (Figuras 1 e 2) (AGUIAR et al., 2012). Possui hábito terrestre e se reproduz por meio de sementes e pseudobulbos (PABST, 1977). González-Díaz e Ackerman (1988) verificaram que em Porto Rico a espécie apresentava um mecanismo passivo de autofertilização facilitado pela chuva, o que colaboraria para explicar seu deslocamento através do continente americano. Entretanto, estudos realizados por Aguiar et al. (2012) apontam para a ocorrência também de fertilização cruzada realizada por duas espécies de borboleta em populações brasileiras, indicando a

¹ Professor Dr. Emerson Ricardo Pansarin. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP- USP).

existência de variação da biologia reprodutiva da espécie ao longo de sua distribuição geográfica.

Estudos citogenéticos realizados por Felix e Guerra (2000) e por Daviña et al. (2009) consideraram a espécie *O. maculata* como octaplóide, sendo $x=7$ o número básico de cromossomos para sua tribo, Cymbidieae. Segundo Sun (1997), a poliploidia é característica comum a várias espécies colonizadoras bem sucedidas e pode colaborar com a ampla tolerância ambiental.

Figura 1 - Ilustração da espécie *Oeceoclades maculata*. Fonte: Lindley, Edwards (1822)

Cohen e Ackerman (2008) classificaram a espécie tanto como invasora quanto naturalizada, baseando-se nas terminologias propostas por Richardson et al.

(2000). Estas terminologias definem espécies naturalizadas como plantas estrangeiras que se reproduzem consistentemente e sustentam populações por muitos ciclos de vida sem intervenção humana direta e, geralmente, recrutam os juvenis livremente perto das plantas adultas e não invadem necessariamente ecossistemas naturais e seminaturais, ou que se reproduzem com total intervenção humana. E como plantas invasoras, pressupõem-se aquelas naturalizadas que produzem prole reprodutiva em grande número e que são recrutadas a considerável distância das plantas adultas e, portanto, apresentam potencial de se espalhar por uma grande área. No trabalho também foi encontrada uma associação negativa entre espécies nativas e *O. maculata*, o que pode refletir em diferenças entre necessidades no habitat ou interação negativa a nível de micorriza.

Figura 2 – Detalhe da inflorescência da *Oeceoclades maculata*. Fonte: Kew, Royal botanic gardens. Disponível em <http://www.kew.org/science/orchids/whystudy.html>

2.4 Marcadores moleculares ISSR

As tecnologias de análise molecular permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, denominados marcadores moleculares. Estes são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso das isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (CAIXETA et al., 2006). Marcadores moleculares são ferramentas úteis para detectar variações

no genoma, aumentando o poder de análise genética na quantificação da variabilidade genética existente entre e dentro de populações de plantas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

As isoenzimas, denominadas marcadores bioquímicos, foram os primeiros marcadores moleculares utilizados na caracterização da variabilidade genética de populações de plantas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996; SOLTIS; SOLTIS, 1998). A técnica possui uma série de vantagens como baixo custo, facilidade operacional e codominância, que permite que genótipos homozigóticos e heterozigóticos sejam facilmente diferenciados. Em contrapartida, os marcadores isoenzimáticos possuem reduzida cobertura dos genomas investigados, baixo nível de polimorfismo que pode ser identificado por loco e sofrem com influência ambiental na expressão de certas enzimas (CAIXETA et al., 2006).

Posteriormente, houve o desenvolvimento de marcadores que verificavam diferenças entre indivíduos diretamente do DNA, denominados RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Apesar de serem codominantes e oferecerem resultados estáveis e reproduzíveis em laboratório, o processo de desenvolvimento desses marcadores é caro e laborioso (CAIXETA et al., 2006), especialmente em plantas que possuem o genoma grande (NAGAOKA; OGIHARA, 1997).

Em meados da década de 1980, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*), permitiu a multiplicação em escala exponencial da quantidade de DNA de segmentos específicos do genoma (MULLIS; FALONA, 1987). Essa descoberta revolucionária possibilitou o surgimento de uma nova geração de marcadores moleculares. Estes podem ser divididos em dois grupos, de acordo com seu tipo de expressão: marcadores codominantes e dominantes. Marcadores SSR (*Single Sequence Repeat*) (TAUTZ; TRICK; DOVER, 1986) são codominantes, enquanto que os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VOS et al., 1995) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) (GUPTA et al., 1994; ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994) segregam como dominantes.

Marcadores dominantes não permitem distinguir locos em homozigose de locos em heterozigose, ao contrário dos codominantes que permitem essa distinção. Por esse motivo são considerados menos informativos que os marcadores moleculares codominantes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Entretanto, no

estudo de espécies poliplóides essa vantagem é perdida, pois os padrões de locos amplificados são geralmente analisados como marcadores dominantes (PFEIFFER et al., 2003).

Desenvolvidos por Gupta et al. (1994) e Zietkiewicz; Rafalski e Labuda (1994), a técnica dos marcadores ISSR é simples, rápida e possui alta reprodutibilidade. Os ISSRs são regiões que se encontram entre regiões microssatélites e apresentam satisfatória sensibilidade a baixos níveis de variação genética (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). A técnica baseia-se na amplificação de regiões que variam de 100 a 3000 pares de bases que se localizam entre regiões repetidas de microssatélites, idênticas e orientadas em direções opostas. Na reação de PCR é utilizado um único iniciador que contém de 16 a 18 pares de bases e é composto por dois a quatro nucleotídeos que ancoram na extremidade 5' ou 3' da fita de DNA (RAKOCZY-TROJANOWSKA; BOLIBOK, 2004).

Por não necessitar de conhecimento prévio das sequências que flanqueiam os microssatélites e, portanto, não exigindo a trabalhosa e cara construção de biblioteca genômica (RAKOCZY-TROJANOWSKA; BOLIBOK, 2004), a técnica ISSR é mais rápida de se aplicar em relação aos marcadores SSR. Ademais, os marcadores ISSR também são considerados mais robustos e confiáveis que os marcadores RAPD, muito utilizados em estudos de análise de diversidade genética (GEORGE; SHARMA; YADON, 2009; RODRIGUES, 2011), devido à maior temperatura de anelamento utilizada nas reações de ISSR em relação às reações de RAPD, que pode aumentar a especificidade dos iniciadores, e ao maior tamanho de seus iniciadores, ou seja, as condições de PCR são mais rigorosas (GODWIN; AITKEN; SMITH, 1997).

Os marcadores ISSR são considerados altamente informativos. Em arroz (*Oryza sativa*), foi produzida maior porcentagem de bandas polimórficas com ISSR em relação ao uso de marcadores AFLP (BLAIR; PANAUD; MCCOUCH, 1999). O mesmo aconteceu para trabalhos com cevada (*Hordeum vulgare*) (FERNANDEZ; FIGUEIRA; BENITO, 2002), zinia (*Zinnia elegans*) (YE et al., 2008), caju (*Anacardium occidentale* L.) (THIMMAPPAIAH et al., 2009) e *Arthrocnemum macrostachyum* (SALEH, 2011), onde observou-se que os ISSRs foram mais informativos que os RAPDs na avaliação de diversidade genética. Alguns trabalhos apresentam resultados contrários quando comparados com marcadores AFLP ou

SSR (LIN et al., 2011; REUNOVA et al., 2010; SAINI et al., 2004), Contudo, embora Saini et al. (2004) afirmem que os marcadores SSRs e AFLPs sejam mais confiáveis e reprodutíveis que os ISSRs, seu trabalho demonstrou que os marcadores ISSR são altamente polimórficos e indicados para identificação de variedades de arroz.

Segundo Godwin, Aitken e Smith (1997), os marcadores ISSR são ferramentas úteis em análises de diversidade, de caracterização de genótipos e de mapeamento genético. Consequentemente, vários trabalhos têm obtido êxito na caracterização de diversidade e estrutura genética de diversas espécies vegetais (GEORGE; SHARMA; YADON, 2009; GRATIVOL et al., 2010; JIA et al., 2011; PINHEIRO et al., 2012; RODRIGUES, 2011; SHARMA et al., 2012; VERMA e RANA, 2011; WANG et al., 2009; WANG et al., 2012; YU et al., 2011).

Portanto, apesar de apresentar menor nível de polimorfismo quando comparados a marcadores SSR e AFLP, os marcadores ISSR têm grande potencial para estudos de populações naturais (SHARMA et al., 2012; WOLF; XIANG; KEPHART, 1998), oferecendo uma atraente alternativa aos marcadores RAPD e uma técnica de mais fácil implementação que os AFLPs e SSRs (WOLF; LISTON, 1998).

2.5 Diversidade e estrutura genética

O estudo da diversidade genética em populações naturais implica na quantificação dos níveis de variação genética dentro de populações e a forma como ela está distribuída entre as populações (HAMRICK, 1983). Esta distribuição, a estrutura genética, é resultado da ação conjunta da mutação, migração e deriva, que por sua vez operam dentro do contexto biológico e histórico de cada espécie (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Fatores ecológicos relacionados aos padrões de reprodução e de dispersão são intimamente correlacionados com a estrutura genética de populações de plantas (CARTHEW, 1993). Pois, do mesmo modo que a distribuição espacial dos genótipos em uma população limita os potenciais cruzamentos, o sistema reprodutivo e de dispersão são importantes fatores na estruturação espacial de genes (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Segundo Hamrick (1983), populações de espécies predominantemente autógamas possuem menor diversidade de genótipos quando

comparadas a populações de espécies alógamas, entretanto são bastante divergentes entre si. Embora seja comum considerar o sistema reprodutivo das espécies como constante, essa suposição não é suportada pelas evidências disponíveis (HAMRICK, 1983). Trabalhos referentes à biologia reprodutiva de *Oeceoclades maculata* (GONZÁLEZ-DÍAZ; ACKERMAN, 1988; AGUIAR et al., 2012) indicam a existência de variação da biologia reprodutiva da espécie ao longo de sua distribuição geográfica.

O conhecimento da diversidade genética de populações vegetais é fundamental para embasar tanto esforços de conservação bem como programas de melhoramento genético de espécies com interesse econômico (MENDES, 2009). Com esses objetivos, vários trabalhos de diversidade e estrutura genética de populações têm sido realizados visando estratégias de conservação e manejo de espécies (ÀVILA-DIAZ; OYAMA, 2007; CHUNG; CHUNG, 2008; CRUZ et al., 2011; JUGRAN et al., 2011; MUNOZ; WARNER; ALBERTAZZI, 2010; RODRIGUES, 2011; SILVA et al., 2011;), além de estudos visando a caracterização de recursos genéticos para uso em programas de melhoramento (ALCANTARA, 2009; CORREA et al., 2011; KARASAWA et al., 2012; LOAISIGA et al., 2012; MOLIN et al. 2013; RAHEMI et al., 2012; SANTANA et al., 2011; SOENGAS et al., 2011; WANG et al., 2011).

Entretanto, estudos de diversidade também são úteis para o entendimento do potencial de colonização e estabelecimento de plantas invasoras, assim como seu potencial para respostas evolutivas a novos ambientes e possíveis práticas de manejo (SAKAI et al., 2001). Segundo Beest et al. (2012), devido ao crescente interesse de pesquisa sobre os impactos causados por espécies invasoras sobre espécies nativas, comunidades e ecossistemas, plantas invasoras vêm sendo, recentemente, foco de diversos estudos cuja questão central é o porquê certas espécies se tornam invasoras. Ma et al. (2011) afirmam que, embora a elucidação da importância da diversidade genética para as plantas invasoras seja essencial para o desenvolvimento de medidas efetivas de controle, poucos estudos vêm sendo realizados. Ainda sim, podem-se citar alguns trabalhos que se propuseram a avaliar a diversidade genética de plantas invasoras (AMSELLEM et al., 2000; KUROKAWA; KOBAYASHI; SENDA, 2009; LI; WANG; WANG, 2005; MA et al., 2011; MANDAK et al., 2009; POULIN; WELLER; SAKAI, 2005).

Durante as ultimas duas décadas, muitos trabalhos têm se concentrado na distribuição da variabilidade genética em populações de orquídeas (ALCANTARA et al., 2006; VEASEY; OLIVEIRA, 2006). Para esse fim, ampla gama de marcadores moleculares tem sido utilizada, como isoenzimas (BORBA et al., 2001; SHARMA; CLEMENTS; JONES, 2000; SUN, 1997), RAPD (OBARA- OKEYO; KAKO, 1998; SUN; WONG, 2001), AFLP (DUFFY et al., 2009; PILLON et al., 2007; RUSSELL et al., 2011), SSR (ALMEIDA et al., 2013; LÓPEZ-ROBERTS et al., 2012) e ISSR (CRUZ et al., 2011; GEORGE; SHARMA; YADON, 2009; PINHEIRO et al., 2012; SHARMA et al., 2013; VERMA et al., 2009; WANG et al., 2009).

Ao investigar a estrutura genética de populações de três espécies de orquídeas terrestres colonizadoras (*Eulophia sinensis*, *Spiranthes hongkongensis* e *Spiranthes strateumatica*), Sun (1997) observou que, embora as espécies apresentassem sistemas reprodutivos distintos, as três orquídeas apresentavam baixa diversidade isoenzimática tanto dentro como entre populações. Segundo o autor, a baixa diversidade dentro de populações pode ser consequência de repetidos eventos de colonização, associados com o efeito do fundador e deriva genética. Já quanto à falta de variação genética entre populações, sugere-se a existência de uma única ou pequena população colonizadora ancestral ou pela falta de diversidade genética dos espécimes fundadores.

Utilizando marcadores RAPD, Sun e Wong (2001) estudaram os níveis de variação genética e padrões de estrutura de população de três espécies de orquídeas com diferentes sistemas reprodutivos e habilidades de colonização (*Zeuxine gracilis*, *Zeuxine strateumatica* e *Eulophia sinensis*). Embora trabalhos anteriores indicassem falta de variação isoenzimática nas três espécies, o estudo verificou uma maior variação dentro de populações e um alto nível de diferenciação entre as espécies, revelando que os marcadores RAPD podem ser muito informativos. Os autores citam, contudo, que outros marcadores moleculares como AFLPs, ISSRs e SSRs também podem ser explorados em estudos de genética de população em orquídeas.

Pillon et al. (2007) utilizaram marcadores AFLP para estudar a diversidade e a estrutura genética de populações de *Liparis loeselii*, uma orquídea rara, que ocorre no noroeste da França e no Reino Unido. Apesar de a espécie apresentar autogamia e reprodução assexuada, os autores encontraram de moderada a alta variabilidade dentro de populações, indicação de fluxo gênico a longas distâncias e significativa

diferenciação genética entre populações de dois diferentes habitats correlacionadas com a forma das folhas. Esses resultados contribuem para uma melhor delimitação da espécie além de medidas de manejo mais eficientes.

Estudos de diversidade genética de populações naturais de *Piperia yadonii* (GEORGE; SHARMA; YADON, 2009), de populações de *Cattleya elongata* (CRUZ et al., 2011) e de cultivares de *Cymbidium goeringii* (WANG et al., 2009), demonstraram que os marcadores ISSR são ferramentas úteis para detecção de variação genética. Em *Piperia yadonii*, a alta divergência entre suas populações e a presença de locos não compartilhados entre elas apontam para a necessidade de proteção de várias populações a fim de preservar a diversidade da espécie. As diferenças morfológicas e as observadas por meio de marcadores ISSR e isoenzimas em *Cattleya elongata* indicam que o uso de um único parâmetro pode subestimar a variabilidade da espécie. Portanto um planejamento de manejo deve utilizar todas as informações possíveis. Já os resultados obtidos para cultivares de *Cymbidium goeringii* sugerem que a técnica ISSR é uma poderosa ferramenta para a identificação de cultivares e estabelecimento de relações genéticas entre eles, facilitando a implementação de programas de melhoramento e manejo de germoplasma.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Esse estudo foi realizado a partir de coletas de amostras de populações de *Oeceoclades maculata* realizadas nos estados brasileiros do Paraná (PR), de Mato Grosso (MT) e de São Paulo (SP) (Tabela 1; Figura 5). No Paraná foram coletados espécimes de uma população no município de Maringá. Em Mato Grosso, foi coletada uma população no município de Cáceres e no estado de São Paulo, foram amostradas uma população em Ribeirão Preto e duas em Piracicaba, sendo uma coleta realizada às margens do Rio Piracicaba e outra dentro do Campus da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP). Os locais de coleta se caracterizam por serem ambientes perturbados por ação antrópica (locais próximos à locais de cultivo, pastagens ou ambientes urbanos) (Figuras 3 e 4). Durante as coletas, foram registradas as coordenadas geográficas por meio de um aparelho GPS (Global Position System).

Tabela 1 - Locais de coleta (município, estado e local de coleta); número de indivíduos coletados (n); coordenadas geográficas dos locais de coleta

Local	n	Coordenadas	
Piracicaba- SP/ Rio Piracicaba	21	S 22° 42' 11"	W 47° 38' 30"
Ribeirão Preto- SP/ Campus USP	39	S 21° 10' 04"	W 47° 51' 19"
Maringá-PR/ Fazenda Experimental Iguatemi	19	S 23° 21' 38"	W 52° 03' 53"
Piracicaba- SP/ Campus ESALQ-USP	39	S 22° 42' 38"	W 47° 37' 57"
Cáceres- MT	34	S 16° 02' 40"	W 57° 38' 40"
Total de indivíduos	152		

Foram utilizados fragmentos de folhas jovens e sadias de cada indivíduo e procurou-se amostrar aproximadamente 30 indivíduos por população, dependendo do tamanho da área e da disponibilidade de espécimes. Como havia grande disponibilidade de espécimes nos municípios Ribeirão Preto e Piracicaba, no Campus da ESALQ, foram coletados 39 espécimes, já nas outras localidades foram coletados de 19 a 34 indivíduos por população. O material coletado foi armazenado e transportado em microtubos de 1,5 mL contendo gel CTAB, que é uma mistura de 3g de Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB), 35g NaCl e 70mL de água destilada

(van den Berg, comunicação pessoal²). Em seguida as amostras foram armazenadas a 4°C por, ao menos, sete dias para então serem submetidas à etapa de extração.

Figura 3 – Local de coleta de *Oeceoclades maculata* num fragmento de mata no Campus da ESALQ-USP, em Piracicaba, SP

Figura 4 – Detalhe de um espécime de *Oeceoclades maculata* dentro de um fragmento de mata no Campus da ESALQ-USP, em Piracicaba, SP

² Professor Dr. Cássio van den Berg. Universidade Estadual de Feira de Santana.

Figura 5 - Mapa do Brasil com a identificação (pontos) dos locais onde foram realizadas as coletas de *Oeceoclades maculata*

3.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo modificado de Doyle e Doyle (1987), incluindo uma etapa prévia para remoção do excesso do gel CTAB. Primeiramente, os fragmentos foliares foram retirados do tubo contendo o gel e eliminou-se o excesso de gel aderido à amostra com auxílio de papel toalha. Em

seguida, os fragmentos foram macerados em 1mL de tampão STE (Sacarose Tris-EDTA), transferidos para tubos de 1,5 mL e centrifugados a velocidade de 4.000 rpm por dez minutos. O sobrenadante de cada amostra foi então descartado cuidadosamente, sendo adicionado em seguida 1mL de CTAB 2% + PVP 1% (Polivinilpirrolidona) + 8 μ L de β -mercaptoetanol e colocado em banho-maria a 60°C por 1 hora. Após essa etapa, foram adicionados às amostras 500 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) gelado, as quais foram centrifugadas por 5 min à velocidade de 13.000 rpm. Cerca de 700 μ L do sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo tubo de 1,5mL e a etapa anterior foi repetida. Após a segunda transferência de 700 μ L para novos tubos, foram adicionados 500 μ L de isopropanol gelado e 30 μ L de acetato de sódio 3M. Em seguida as amostras permaneceram a -20°C por 12 a 72 horas. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas por 30 min em velocidade máxima (13.000 rpm). Por fim, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com etanol 70% gelado por três vezes, os tubos foram dispostos abertos em contato com o ar para evaporação do etanol residual e o pellet foi então ressuscitado em 50 μ L de tampão TE a 0,1 M de EDTA.

O sucesso da extração foi verificado no processo de quantificação do DNA realizado em gel de agarose 1,0% e corado com brometo de etídio. Durante a corrida eletroforética, o gel foi submerso em tampão TBE (Tris-HCl 90mM, Ácido Bórico 90mM e EDTA 2mM) diluído dez vezes a fim de aumentar a resolução e definição dos fragmentos separados. Em seguida as amostras foram purificadas utilizando o kit Qiagen® QIA PCR Purification Kit e ressuscitadas em 50 μ L de tampão EB (kit Qiagen®).

3.3 Seleção e otimização de iniciadores de ISSR

Foram testados 20 iniciadores, obtidos a partir dos protocolos de Wolfe (2000) (Tabela 2). Nesse teste foram utilizados quatro indivíduos de duas localidades distintas de forma a permitir a verificação da presença de polimorfismo, bem como a otimização das condições de amplificação. Para as otimizações das reações de PCR foram utilizados um coquetel contendo 10% (v/v) de tampão constituído de 20mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 1Mm DTT, estabilizadores, 50% (v/v) glicerol; 2,0 e 2,33 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de dNTP; 10 pmol de cada iniciador; 1 unidade de Taq DNA polimerase e 1 μ L de DNA, num volume final de 30 μ L.

As reações foram realizadas no termociclador modelo MyCycler Thermal Cycler da BioRad, de acordo com as seguintes condições de amplificação: 94°C/90 seg; 35 ciclos de 94°C/40 seg, 44 a 52°C/45 seg, 72°C/90 seg; 94°C/45 seg; 44°C/45 seg; e uma extensão final de 72°C/5 min. Os produtos resultantes da reação de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X, por 135 min a 90 V. Para auxiliar a análise das bandas, coradas com brometo de etídio, foram utilizados 3µg do marcador 100 bp DNA Ladder. Os géis foram posteriormente fotografados sobre fonte de luz ultravioleta com auxílio do sistema de fotodocumentação Syngene (Synoptics Ltda.). As genotipagens foram realizadas manualmente através de comparação dos padrões de bandas em gel de agarose.

Tabela 2 - Iniciadores ISSR testados em *Oeceoclades maculata* e suas respectivas sequências (WOLFE, 2000)

Nome do 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
UBC 814	(CT)8-TG
UBC 843	(CT)8-RA
UBC 844	(CT)8-RC
UBC 898	(CA)6-RY
UBC 899	(CA)6-RG
901	(GT)6-YR
902	(GT)6-AY
M1	CAA-(GA)5
M2	GGGC-(GA)8

3.3 Análises dos dados

A partir da leitura das fotografias dos géis, pelo método manual, foi gerada uma matriz binária em termos de presença (1) e ausência (0) de bandas, sendo consideradas apenas as bandas robustas e inequívocas. A matriz binária foi então submetida a análises estatísticas, incluindo uma análise descritiva dos dados (número de bandas, número de bandas polimórficas e número de bandas exclusivas).

A diversidade genética foi estimada pela porcentagem de locos polimórficos, diversidade genética de Nei (NEI, 1978) e pelo índice de diversidade de Shannon – Wiener (SHANNON, 1948). Originalmente desenvolvido para dados codominantes, o índice de diversidade de Nei (NEI, 1978) é baseado na heterozigosidade esperada, entretanto, como para marcadores dominantes esse conceito não é aplicável, ele torna-se uma medida de variabilidade genética estimada por $H_e = 1 - \sum p_i^2$, onde p_i é a frequência de cada alelo (0 ou 1) na população. Já o índice de Shannon - Weiner (SHANNON, 1948), tradicionalmente utilizado em estudos ecológicos para determinação de parâmetros de biodiversidade, mostra o grau de certeza em que se prevê a proximidade genética entre os indivíduos. A expressão utilizada é $H = - \sum p_i \log p_i$, sendo p_i a frequência de um dado alelo. Ambas estimativas de diversidade genética foram calculadas utilizando o programa POPGENE (YEH et al., 1997).

Para se avaliar a variabilidade genética entre e dentro de populações a partir de dados moleculares, além de possibilitar inferências a respeito da estrutura genética das populações estudadas, foi realizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) utilizando o programa Arlequin v.3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

Foram estimados os coeficiente de similaridade de Jaccard (S), que compara o número de presença de bandas comuns e o número total de bandas envolvidas, excluindo-se o número de ausências conjuntas. A partir dos coeficientes de similaridade foi calculada a dissimilaridade (D) entre os indivíduos par a par, sendo $D = 1 - S$. A análise de agrupamento de indivíduos, baseada nos valores de dissimilaridade, foi realizada com o método *Neighbor-Joining* utilizando o programa DARwin5 (PERRIER et al., 2003). A robustez dos agrupamentos foi verificada por meio de 1.000 reamostragens *bootstrap*.

A organização da diversidade genética também foi avaliada por meio da análise de coordenadas principais (PCoA), utilizando-se a distância Euclidiana, utilizando o programa GenAEx v.6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

Ainda no sentido de se avaliar de que forma as populações estão estruturadas, foi realizada a análise bayesiana por meio do programa Structure v.3.3 (FALUSH et al., 2007; PRITCHARD et al., 2000) para delimitar os grupos de populações ou indivíduos geneticamente mais relacionados, sem que seja fornecido, previamente, ao programa a definição das populações. Para esta análise foram realizadas dez simulações independentes feitas para cada valor de número de agrupamentos K (com K variando de 1 a 10). Em cada simulação, foram feitas 500.000 iterações de MCMC com um descarte inicial (*burn-in*) de 250.000. A análise foi realizada usando o modelo de ancestralidade sem mistura e utilizando frequências alélicas não correlacionadas, devido à natureza autógama da espécie. O número mais provável de agrupamentos foi estimado pelo método *ad hoc* ΔK de Evanno et al. (2005).

Além disso, foi utilizado o teste de Mantel (MANTEL, 1967), que possibilita avaliar o isolamento por distância entre as populações em estudo. Trata-se de um teste estatístico de correlação entre duas matrizes, uma resultante das estimativas das dissimilaridades (distâncias) genéticas entre todos os possíveis pares de populações pesquisados e a outra resultante das estimativas da distância geográfica entre populações. A análise foi realizada com o auxílio do programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

4 RESULTADOS

4.1 Teste e seleção de iniciadores ISSR

A partir do teste realizado com 20 iniciadores ISSR, 13 foram selecionados por apresentarem resultados satisfatórios (Tabela 3; Figura 6), com padrão de bandas mais nítidas e de fácil identificação. Devida a grande dificuldade na otimização dos iniciadores, apesar da realização vários testes com temperaturas que variaram de 44^o C a 58^o C e de concentrações de MgCl₂ que variam de 2,0 a 3,0uL, resultados adequados foram obtidos apenas com a menor temperatura e quantidades moderadas de MgCl₂. Os iniciadores utilizados geraram um total de 192 locos (bandas), havendo uma variação de 6 a 24 locos por iniciador.

Figura 6 - Padrão de bandas de marcadores ISSR amplificadas a partir da utilização do iniciador JOHN, para a população do Rio Piracicaba - Piracicaba, SP

Tabela 3 - Iniciadores selecionados e suas respectivas temperaturas de anelamento e concentrações de $MgCl_2$ utilizadas para amplificação das populações de *Oeceoclades maculata*

Nome do iniciador	Sequência (5' - 3')	Temperatura de Anelamento (°C)	Volume de $MgCl_2$ (μL)
BECKY	(CA)7-YC	44°C	2,4
GOOFY	(GT)7-YG	44°C	2,4
JOHN	(AG)7-YC	44°C	2,4
MANNY	(CAC)4-RC	44°C	2,4
MAO	(CTC)4-RC	44°C	2,4
OMAR	(GAG)4-RC	44°C	2,4
TERRY	(GTG)4-RC	44°C	2,4
UBC 814	(CT)8-TG	44°C	2,4
UBC 843	(CT)8-RA	44°C	2,4
UBC 844	(CT)8-RC	44°C	2,4
UBC 898	(CA)6-RY	44°C	2,4
UBC 899	(CA)6-RG	44°C	2,4
902	(GT)6-AY	44°C	2,4

4.2 Diversidade e estrutura genética

A porcentagem de locos polimórficos dentro de populações variou de 3,65% (Rio Piracicaba e Ribeirão Preto) a 27,60% (Campus ESALQ) e apresentou valor médio de 10%, o que indica baixa variabilidade intrapopulacional. Entretanto, quando consideradas todas as populações, uma alta porcentagem de locos polimórficos (85,94%) foi encontrada (Tabela 4).

Do total das 192 bandas encontradas, 189 foram polimórficas segundo o critério proposto por Nei (1987), que considera um loco polimórfico quando a frequência de seu alelo mais comum não ultrapassa 95%. As populações apresentaram de 82 (Ribeirão Preto) a 108 (Campus ESALQ) bandas polimórficas. A população do Campus da ESALQ apresentou maior número de bandas exclusivas (23) enquanto a de Cáceres apresentou o menor (5) (Figura 7).

As estimativas do índice de Shannon (H) mostraram-se baixas, variando de 0,0094 (Ribeirão Preto) a 0,1054 (Campus ESALQ). As estimativas de diversidade genética de Nei mostraram-se baixas, congruentes aos obtidos pelo índice de Shannon, variando de 0,0054 (Ribeirão Preto) a 0,0668 (Campus ESALQ), sendo que a diferença entre os valores obtidos pelo índice de Shannon e Nei é devida a maior sensibilidade do índice de Shannon aos alelos que ocorrem em baixa frequência na população. Entretanto, quando avaliadas em conjunto, as populações

apresentaram estimativas do índice de Shannon e de diversidade genética de Nei substancialmente mais altas ($I = 0,3869$; $H_e = 0,2556$) (Tabela 4).

Figura 7 – Diversidade gênica das populações avaliadas considerando o número total de bandas, o número de bandas polimórficas, o número de bandas exclusivas e índice de diversidade de Nei (com desvio padrão) de cada população de *Oeceoclades maculata*

Tabela 4 – Estimativas de diversidade genética das populações de *Oeceoclades maculata* avaliadas: número de indivíduos (N); número de genótipos distintos (NG); índice de Shannon (I); diversidade gênica de Nei (H_e) e porcentagem de locos polimórficos (P). Desvios padrões entre parênteses

Populações	N	NG	I	H_e	P
Rio Piracicaba/SP	21	8	0,0167 (0,0944)	0,0110 (0,0639)	3,65
Ribeirão Preto/SP	39	11	0,0094 (0,0591)	0,0054 (0,0357)	3,65
Maringá/PR	19	11	0,0378 (0,1344)	0,0241 (0,0905)	9,90
Campus ESALQ/SP	39	34	0,1054 (0,2047)	0,0668 (0,1363)	27,60
Cáceres/MT	34	17	0,0120 (0,0612)	0,0065 (0,0364)	5,21
Total	152	81	0,3869 (0,2573)	0,2556 (0,1847)	85,94

A análise de variância molecular (AMOVA) indicou forte estruturação entre as populações (Tabela 5), apresentando valor de Φ_{ST} de 0,933. Do total da variância genética molecular, 93,34 % foi decorrente de diferenças entre as populações, enquanto apenas 6,66% foi devida às diferenças entre indivíduos dentro de populações.

O número e distribuição de haplótipos encontrado nas populações (Figura 8) corroboram com resultados da AMOVA, índice de Shannon e Diversidade de Nei. As populações não compartilham nenhum dos 81 haplótipos encontrados, entretanto todas as populações apresentaram ao menos um haplótipo compartilhado por mais de um indivíduo.

Tabela 5 – Análise de variância molecular (AMOVA) para dois níveis hierárquicos de populações de *Oeceoclades maculata*.

Fonte de variação	GL ¹	SQ ²	Componentes de variância	Varição total (%)
Entre populações	4	3425,259	29,316	93,34
Dentro de populações	147	303,303	2,092	6,66
Total	151	3728,562	31,409	
Φ_{ST}	0,933			

¹ Graus de liberdade; ² Soma de quadrados

Figura 8 – Proporção de haplótipos dentro de cada população de *Oeceoclades maculata*. As áreas brancas hachuradas representam as proporções de haplotipos únicos. As áreas coloridas representam as proporções de haplótipos que ocorrem em mais de um indivíduo da população. Os números representam o número de indivíduos para cada haplótipo

O estudo da associação entre as distâncias genéticas de Nei (1978) com as distâncias geográficas entre as populações, estimada por meio do teste de Mantel, não apresentou correlação significativa entre as distâncias genéticas e geográficas ($r^2 = 0,0965$, $p = 0,7998$) (Figura 9).

Figura 9 - Correlação entre as distâncias genéticas e geográficas inferida pela análise de isolamento por distância (MANTEL, 1967)

A análise de coordenadas principais (PCoA), obtida por distância Euclidiana (Figura 10), mostrou que 58,2% da variação está acumulada nos seus dois primeiros eixos, revelando a existência de variabilidade genética significativa entre as populações, indicando maior isolamento da população de Ribeirão Preto, além de proximidade entre as populações coletadas no Campus da ESALQ e em Cáceres e entre as populações do Rio Piracicaba e Maringá.

A existência de diversidade genética significativa entre as populações também é observada pelo método *Neighbor-Joining* (Figura 11). Observa-se no dendrograma obtido a existência de cinco grupos distintos que correspondem aos locais de coleta, sem mistura de indivíduos de diferentes populações num mesmo grupo. Indica também maior proximidade entre as populações do Campus da ESALQ e Cáceres e entre as populações de Maringá e do Rio Piracicaba. Os ramos que separam os grupos apresentaram alta consistência, com valores de *bootstrap* maiores que 80%.

Figura 10 – Análise de coordenadas principais dos 152 indivíduos de *Oeceoclades maculata* com base em marcadores ISSR

Figura 11 – Dendrograma obtido com o método *Neighbor-Joining*, baseado em índices de dissimilaridade de Jaccard para cinco populações de *Oeceoclades maculata*: Ribeirão Preto/ SP (verde), Cáceres/ MT (cor de rosa), ESALQ/ SP (amarelo), rio Piracicaba/ SP (azul) e Maringá/ PR (alaranjado)

A partir de simulações realizadas pelo programa Structure utilizando abordagem bayesiana, o número mais provável de K agrupamentos foi definido como cinco, segundo a metodologia de Evanno et al. (2005) (Figura 12).

Figura 12 - Valores de ΔK para cada valor de K . O maior valor de ΔK representa o valor mais provável de K de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005)

O resultado correspondente ao número de agrupamentos mais provável ($K = 5$) mostra a divisão dos indivíduos de acordo com a localidade de coleta (Figura 13), sem presença de indivíduos potencialmente híbridos ou migrantes. Esse resultado corrobora os resultados obtidos pela análise de coordenadas principais e pela análise de agrupamento.

Figura 13 – Análise da estrutura genética dos 152 indivíduos provenientes das cinco populações coletadas de *Oeceoclades maculata*. Os indivíduos foram classificados em cinco grupos ($K = 5$)

Considerando que a população do Campus da ESALQ foi a que apresentou maior variabilidade e apesar da consistência do grupo (*bootstrap* = 100%), verifica-se mesmo assim que o dendrograma sugere certa subestruturação (Figura 14). Devido à dimensão da área de ocorrência dos indivíduos do Campus da ESALQ (raio de aproximadamente um quilômetro), os espécimes foram coletados separadamente e divididos em três sub-populações. O dendrograma da Figura 14 sugere diferenciação genética entre essas sub-populações, principalmente entre duas sub-populações que se mostraram próximas geneticamente e uma terceira que se mostrou diferente.

Em função desta subestruturação observada pelo dendrograma, uma nova análise utilizando o Structure foi realizada, com K variando de 1 a 10, apenas para a população do Campus da ESALQ. O número de grupos mais provável foi K igual a dois (Figura 15), confirmando a divisão dos dois sub-grupos no dendrograma, com a presença de um possível migrante (Figura 16).

Figura 14 – Dendrograma obtido com o método *Neighbor-Joining*, baseado em índices de dissimilaridade de Jaccard para cinco populações de *Oeceoclades maculata*: Ribeirão Preto/ SP (verde), Cáceres/ MT (cor de rosa), ESALQ/ SP subdivida em três subpopulações (amarelo, vermelho e roxo), rio Piracicaba/ SP (azul) e Maringá/ PR (alaranjado)

Figura 15 - Valores de ΔK para cada valor de K . O maior valor de ΔK representa o valor mais provável de K de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005)

Figura 16 – Análise da estrutura genética dos 38 indivíduos provenientes da população de *Oeceoclades maculata* do Campus da ESALQ em Piracicaba/SP. Os indivíduos foram classificados em dois ($K = 2$)

5 DISCUSSÃO

5.1 Baixa diversidade genética em populações de *Oeceoclades maculata*

Embora a espécie apresente ampla distribuição geográfica no Brasil (PANSARIN, E. R., comunicação pessoal) e que populações relativamente abundantes tenham sido encontradas durante as coletas, as espécimes de *Oeceoclades maculata* apresentaram baixa diversidade intrapopulacional. As populações apresentaram também ocorrência de indivíduos com haplótipos idênticos, o que contribuiu para os baixos índices apresentados. Dentro das populações avaliadas, a população do Campus da ESALQ foi a que apresentou maior diversidade e maior proporção de genótipos distintos, enquanto a população de Ribeirão Preto apresentou a menor diversidade e menor proporção de genótipos distintos.

Apesar de evidências de variação na biologia reprodutiva da espécie e de ocorrência de fertilização cruzada em populações brasileiras de *O. maculata* (AGUIAR et al., 2012), as análises de diversidade sugerem que a autofertilização e a reprodução vegetativa são as formas predominantes de reprodução. Devido à baixíssima diversidade intrapopulacional, é possível, ainda, que mesmo indivíduos oriundos de cruzamento sejam muito semelhantes a indivíduos oriundos de autogamia ou reprodução vegetativa (FORREST et al., 2004). No entanto, são necessários dados de marcadores codominantes para distinguir a influência relativa dessas possíveis explicações na dinâmica reprodutiva das populações avaliadas.

A baixa diversidade intrapopulacional é esperada para espécies predominantemente autógamas, como a *O. maculata*, pois a autofertilização diminui a proporção de locos em heterozigose nos indivíduos, levando à fixação de locos em homozigose (RICHARDS, 1990, p. 364). Além disso, o potencial para reprodução vegetativa por meio de seus bulbos pode levar à manutenção da baixa diversidade dentro das populações. Vários trabalhos relataram baixa diversidade intrapopulacional ligada à autogamia e à reprodução vegetativa (BRUTTING et al., 2012; MABLE; ADAM, 2007; YANG et al., 2012).

O comportamento colonizador de espécimes de *O. maculata* também pode ter exercido influência sobre os níveis de diversidade encontrados. Como as invasões biológicas envolvem dispersão por longas distâncias, a composição genética de uma

espécie introduzida geralmente é influenciada por sua história de introdução, características de história de vida, deriva genética, tamanho da população, sistema de reprodução e heterogeneidade ambiental (YE et al., 2004), sendo que baixos índices de diversidade intrapopulacional são geralmente associados a plantas invasoras (BARRETT, 1992). Gamskin et al. (2012), ao encontrarem valores mínimos de diversidade genética em populações de invasoras de erva pimenteira (*Lepidium latifolium*), sugeriram que esses baixos índices seriam devido a efeitos do fundador ou a fortes gargalos genéticos antes ou após as introduções. Sun e Wong (2001), utilizando marcadores RAPD, relacionaram os baixos índices de diversidade de Shannon (0,000 a 0,054) em populações de orquídea *Zeuxine strateumatica* (Linn), com sua reprodução assexuada e por serem colonizadoras, levando à diminuição da recombinação e fluxo gênico e à rápida fixação de genótipos apomíticos.

A amplamente conhecida relação positiva entre o desempenho e a variação genética intrapopulacional é válida apenas para espécies alógamas, sendo variáveis independentes em autógamas (LEIMU et al., 2006). Além disso, a diversidade genética de invasoras pode não ser um bom preditor de sucesso na colonização (SAKAI et al., 2001). As observações em campo somadas às informações sobre o rápido alastramento da espécie nas regiões tropicais e subtropicais do continente americano (AGUIAR et al., 2012; STERN, 1988) a ponto de ser considerada, por muitos, como uma espécie nativa brasileira (AGUIAR et al., 2012; MORRISON, 1997), sugerem que a espécie é muito bem sucedida como colonizadora.

A baixa diversidade encontrada dentro de populações de *O. maculata* corrobora com o que é esperado para espécies invasoras, autógamas e que se reproduzem vegetativamente, pois a reprodução uniparental (autopolinização e reprodução vegetativa) permite o estabelecimento e dispersão de grupos fundadores extremamente pequenos (BARRETT; COLAUTTI; ECKERT, 2008). Ademais, somado a esses efeitos estocásticos, a baixa diversidade pode ser resultado de pressões locais que favoreceram poucas ou linhagens similares, ou até mesmo uma única linhagem dentro de cada população (RICHARDS, 1990, p. 364).

5.2 Alta estruturação entre populações de *Oeceoclades maculata*

As análises da estrutura genética de *O. maculata* revelaram alta diferenciação genética entre populações. Os resultados da AMOVA indicam que a maior parte da variação genética ($\Phi_{ST} = 0,933$) encontra-se entre as populações, consistentes com a indicação das análises de variação intrapopulacional que sugerem autogamia predominante.

De acordo com as estimativas de Nybom e Bartish (2000), o valor médio de Φ_{ST} para espécies autógamas, utilizado marcadores RAPD, é de 0,70. Como as estimativas de Φ_{ST} obtidas por RAPD podem ser diretamente comparadas com as obtidas por ISSR (NYBOM, 2004), o índice de diferenciação encontrado para as populações de *O. maculata* avaliadas e o valor médio estimado para populações autógamas são de mesma magnitude, do mesmo modo que foi considerado por Hensen et al. (2009) ao comparar o valor de Φ_{ST} de 0,86 com o valor médio estimado.

O alto valor de Φ_{ST} (0,86) para populações de *Stipa capillata* L. (Poaceae), sugere que a espécie experimentou fortes gargalos genéticos, isolamento e autofecundação (HENSEN et al., 2009). Já populações europeias da orquídea *Spiranthes romanzoffiana* apresentaram valor de Φ_{ST} de 0,892 devido à falta de fluxo gênico entre as regiões avaliadas, aliado a diferentes estratégias reprodutivas entre as populações (autogamia, reprodução vegetativa e cruzamento) (FORREST et al., 2004). Outros trabalhos com espécies autógamas encontraram valores de diferenciação genética similares ao valor médio estimado (AGUAYO et al., 2012; VOSS; ECKSTEIN; DURKA, 2012; XIAO et al, 2006; ZHANG et al, 2006).

A análise descritiva dos dados indicou presença significativa de alelos exclusivos em todas as populações, sugerindo falta de fluxo gênico e ação da deriva genética (Figura 7). A presença de alelos exclusivos é importante, pois pode indicar trajetórias evolutivas diferentes (SENIOR et al., 1998; YANG et al., 2013). Utilizando informações de diversidade genética de populações nativas de *Alliaria petiolata* (Brassicaceae), aliadas a índices de diversidade genética associados à riqueza alélica total de populações colonizadoras, que é intimamente relacionada com a quantidade de alelos exclusivos, Durka et al. (2005) afirmaram que as populações colonizadoras seriam resultado de múltiplas introduções de várias populações

nativas. Infelizmente, não há informações disponíveis sobre a riqueza alélica de populações nativas de *O. maculata* que possibilite tal inferência.

Entretanto, os resultados obtidos podem sugerir múltiplas introduções. Sun (1997) sugere que a falta de diversidade entre populações de três espécies de orquídeas colonizadoras (*Eulophia sinensis*, *Spiranthes hongkongensis* e *Zeuxine strateumatica*) seja consequência da colonização por poucos indivíduos ou de indivíduos similares. Portanto, de modo contrário, a relevante diversidade entre populações pode sugerir colonização por indivíduos divergentes.

Tanto a análise de coordenadas principais quanto o dendrograma obtido com o método *Neighbor-Joining* mostraram que as cinco populações avaliadas pertencem a grupos distintos, sem ocorrência de grupos formados por indivíduos de origens distintas. Ambas as análises indicaram maior proximidade genética entre as populações do Campus da ESALQ e Cáceres e entre as populações de Maringá e do Rio Piracicaba. A população de Ribeirão Preto permaneceu geneticamente mais distante nas duas análises.

Dentro da população do Campus da ESALQ, no entanto, o dendrograma sugere uma subestruturação, confirmada pela análise da estrutura genética dentro desta população. Diferentes pressões de seleção ou eventos estocásticos podem levar a diferenças bem marcadas entre populações que se reproduzem por autofertilização. Em populações autógamas invasoras estas diferenças podem ocorrer em distâncias pequenas (RICHARDS, 1990, p. 364). No caso desta população, os indivíduos de duas sub-populações reuniram-se num mesmo subgrupo, enquanto os indivíduos da terceira sub-população formaram um subgrupo distinto. O dendrograma apresentado sugere, portanto, falta de fluxo gênico mesmo entre distâncias muito pequenas, contribuindo para subestruturação dentro do grupo.

A análise do Structure corroborou com as análises de coordenadas principais e de agrupamento, identificando cinco populações. O resultado correspondente ao número de grupos mais provável, $K = 5$, mostra que os indivíduos se dividem em grupos de acordo com a localidade de coleta sem ocorrência de indivíduos potencialmente híbridos ou migrantes. Contudo, devido à subestruturação observada na população do Campus da ESALQ, uma nova análise utilizando o programa Structure mostrou a divisão desta população em dois grupos, com a presença de um possível migrante.

O possível migrante indica a existência de certa continuidade no espaço de coleta, e que os indivíduos não estão totalmente isolados, como ocorre entre as cinco populações avaliadas. Essa população também apresenta a maior diversidade intrapopulacional e o dendrograma sugere que mesmo as subpopulações apresentam certa variabilidade. Essa variabilidade sugere diferenças nas estratégias relacionadas à reprodução ou múltiplas fontes de introdução.

5.3 Ausência de correlação entre distâncias genéticas e geográficas

O conhecimento da distribuição espacial da diversidade genética é importante para o melhor entendimento da relação entre as características de história de vida, fatores estocásticos, fluxo gênico, pressões de seleção e as influências ambientais (ESCUDERO; IRIONDO; TORRES, 2003).

Não houve evidencia de ocorrência de isolamento por distância entre as populações avaliadas de *O. maculata*. A ausência de correlação corrobora com os resultados obtidos pela análise de coordenadas principais e de agrupamento, que indicaram maior proximidade genética entre populações espacialmente mais distantes. Guggisberg et al. (2012) sugeriram que a falta de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas de populações invasoras de *Cirsium arvense* (Asteraceae) seja devida a múltiplos eventos de introdução e eventos de dispersão casuais, mediados pela ação humana. Portanto, a ausência de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas das populações avaliadas de *O. maculata* sugere que a distribuição espacial da diversidade genética dessa espécie deve ser considerada sob aspectos de seu sistema reprodutivo e história de colonização.

6 CONCLUSÕES

A partir das análises de diversidade e estrutura genética, utilizando marcadores moleculares ISSR, conclui-se que as populações avaliadas da orquídea terrestre e invasora *O. maculata* apresentaram baixa diversidade intrapopulacional e consistente estruturação. A autofecundação e reprodução vegetativa são provavelmente as principais formas de reprodução, contudo a possibilidade de cruzamento não pode ser descartada. Eventos de deriva, colonização por um ou poucos indivíduos, diferentes pressões de seleção, mesmo entre espaços geográficos pequenos, e múltiplas introduções podem ter influenciado a diversidade genética e a sua distribuição nas populações avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ABDELKRIM, J.; PASCAL, M.; SAMADI, S. Establishing causes of eradication failure based on genetics: case study of ship rat eradication in Ste. Anne Archipelago. **Conservation Biology**, Boston, v.21, p.719–730, 2007.
- ACKERMAN, J.D. On the evidence for a primitively epiphytic habit in orchids. **Systematic Botany**, Laramie, v.8, p.474-477, 1983.
- ACKERMAN, J.D. An orchid flora of Puerto Rico and the Virgin Islands. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, New York City, v.73, p.1–203, 1995.
- ACKERMAN, J.D. Invasive orchids: weeds we hate to love? **Lankesteriana**, Cartago, v.7, p.19–21, 2007.
- AGUAYO, J.; ADAMS, G.C.; HALKETT, F.; CATAL, M.; HUSSON, C.; NAGY, Z.Á.; HANSEN, E.M.; MARÇAIS, B.; FREY, P. Strong genetic differentiation between North American and European populations of *Phytophthora alni* subsp. *uniformis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.103, p.190-199, 2013.
- AGUIAR, J.M.R.B.V.; PANSARIN, L.M.; ACKERMAN, J.D.; PANSARIN, E R. Biotic versus abiotic pollination in *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. (Orchidaceae). **Plant Species Biology**, Kyoto, v.27, n.1, p. 86-95, 2012.
- ALCANTARA, B.K. de. **Caracterização da diversidade genética de Teca (*Tectona grandis*) de diferentes procedências usando marcadores microssatélites**. 2009. 93p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- ALCANTARA, S.; SEMIR, J.; SOLFERINI, V.N. Low genetic structure in an epiphytic Orchidaceae (*Oncidium hookeri*) in the Atlantic rainforest of south-eastern Brazil. **Annals of Botany**, Exeter, v.98, p.1207–1213, 2006.
- ALMEIDA, P.R.M.; LÓPEZ-ROBERTS, M.C.; VIGNA, B.B.Z.; SOUZA, A.P. ; GÓES-NETO, A.; VAN DEN BERG, C. Microsatellite markers for the endangered orchids *Cattleya labiata* Lindl. and *C. warneri* T. Moore (Orchidaceae). **Conservation Genetics Resources**. DOI 10.1007/s12686-013-9909-5
- AMSELLEM, L.; NOYER, J.L.; LE BOURGEOIS, T.; HOSSAERT-MCKEY, M. Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius* Poir. (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **Molecular Ecology**, Oxford v.9, p.443–455, 2000.
- ATWOOD, J.T. The size of orchidaceae and systematic distribution of epiphytic orchids. **Selbyana**, Sarasota, v. 9, p.171-186, 1986.

ÁVILA-DÍAZ, I.; OYAMA, K. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, Ohio, v.94, p. 184-193, 2007.

BARRETT, S.C.H.; COLAUTTI, R.I.; ECKERT, C.G. Reproductive systems and evolution during biological invasion. **Molecular Ecology**, Oxford, v.17, p.373–383, 2008.

BARRETT, S.C.H.; HUSBAND, B.C. The genetics of plant migration and colonization. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.E.; WEIR, B.S. Eds. **Plant population genetics, breeding, and genetic resources**. Sunderland: Sinauer Associates, 1992. p.254-277.

BEEST, M.; LE ROUX, J.J.; RICHARDSON, D M.; BRYSTING, A.K.; SUDA, J.; KUBESOVA, M.; PYSEK, P. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. **Annals of Botany**, Oxford, v.109, p.19–45, 2012.

BEKESSY, S.A.; ALLNUTT, T.R.; PREMOLI, A.C.; LARA, A.; ENNOS, R.A.; BURGMAN, M.A.; CORTES, M.; NEWTON, A.C. Genetic variation in the Monkey Puzzle tree (*Araucaria araucana* (Molina) K. Koch), detected using RAPD. **Heredity**, Oxford, v.88, p.243–249, 2002.

BERGMAN, E.; ACKERMAN, J.D.; THOMPSON, J.; ZIMMERMAN, J.K. Land use history affects the distribution of the saprophytic orchid *Wulfschlaegelia calcarata* in Puerto Rico. **Biotropica**, Washington, v.38, p. 492-499, 2006.

BLAIR, M.W.; PANAUD, O.; MCCOUCH, S.R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.98, p. 780-792, 1999.

BORBA, E.L.; FELIX, J.M.; SOLFERINI, V.N.; SEMIR, J. Flypollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. **American Journal of Botany**, Ohio, v.88, p.419–428, 2001.

BRÜTTING, C.; MEYER, S.; KÜHNE, P.; HENSEN, I.; WESCHE, K. Spatial genetic structure and low diversity of the rare arable plant *Bupleurum rotundifolium* L. in Central Europe . Agriculture, **Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.161, p.70-77, 2012.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. cap.1, p.9-78.

CARTHEW, S.M. Population genetic structure of *Banteia spinulosa*. **Heredity**, Oxford, v.70, p.566–573, 1993.

CAVALLARI NETO, M. **Efeito do manejo na diversidade genética de populações naturais de *Tabebuia cassinoides* LAM (DC), por marcadores isoenzimáticos.** 2004. 106 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CHUNG, M.Y.; CHUNG, M G. Conservation genetics of the endangered terrestrial orchid *Pogonia minor* in South Korea. **Annales Botanici Fennici**, Helsinki v.45, p.455–464, 2008.

COHEN, I.M.; ACKERMAN, J.D. *Oeceoclades maculata*, an alien tropical orchid in a Caribbean rainforest. **Annals of Botany**, Oxford, v.104, p.557–563, 2009.

CORREA, L.C.; SANTOS, C.A.F.; LIMA, G.P.P.; RODRIGUES, M.A.; COSTA, T. P.P. Similaridade genética entre acessos de goiabeiras e araçazeiros baseada em marcadores moleculares AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33,n.3), p.859-867, 2011.

CRUZ, D.T.; SCHNADELBACH, A.S.; LAMBERT, S.M.; RIBEIRO, P.L.; BORBA, E.L. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in Northeastern Brazil. **Plant Systematics and evolution**, Beijing, v.294, p.87-98, 2011.

DAVIDSON, A.M.; JENNIONS, M.; NICOTRA, A.B. Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive? A meta-analysis. **Ecology Letters**, Oxford, v.14, n4, p.419-431, 2011.

DAVIÑA, J.R.; GRABIELE, M.; CERUTTI, J.C.; HOJSGAARD, D.H.; ALMADA, R. D.; INSAURRALDE, I.S.; HONFI, A.I. Chromosome studies in Orchidaceae from Argentina. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.32, p.811–821, 2009.

DE LONG, J.R.; SWARTS, N.D.; DIXON, K.W.; EGERTON-WARBURTON, L.M. Mycorrhizal preference promotes habitat invasion by a native Australian orchid: *Microtis media*. **Annals of Botany**, Oxford, v.111,n.3), p. 409-418, 2013.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America**, Irvine, v.19, p. 11-15, 1987.

DRESSLER, L.R. **The orchids: natural history and classification.** Cambridge: Harvard University Press, 1981. 332p.

DRESSLER, R.L. **Phylogeny and classification of the orchid family.** Portland: Dioscorides Press, 1993. 316p.

DUFFY, K.J.; SCOPECE, G.; COZZOLINO, S. ;FAY, M.F.; SMITH, R.J.; STOUT, J.C. Ecology and genetic diversity of the dense-flowered orchid, *Neotinea maculata*, at the centre and edge of its range. **Annals of Botany**, Oxford, v.104, p.507-516, 2009.

DURKA, W.; BOSSDORF, O.; PRATI, D.; AUGÉ, H. Molecular evidence for multiple introductions of garlic mustard (*Alliaria petiolata*, Brassicaceae) to North America. **Molecular Ecology**, Oxford, v.14, n.6, p.1697-706, 2005.

ESCUADERO, A.; IRIONDO, J. M.; TORRES, E. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. **Biological Conservation**, Beijing, v. 113, p. 351-365, 2003.

ESSELMAN, E.J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D.J.; WINDUS, J.L.; WOLFE, A. D. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *inesperata* (Poaceae): Comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, Oxford v.8, p.443-451, 1999.

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

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

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Vancouver, v.10, p. 564-567, 2010.

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

FELIX, L.P.; GUERRA, M. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of *Cymbidioid* orchids. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto v.23, p. 1-27, 2000.

FERNÁNDEZ, M.E.; FIGUEIRAS, A.M.; BENITO, C. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.104, p. 845-851, 2002.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen. 1996. 220p.

FAY, M.F.; CHASE, M.W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. **Annals of Botany**, Oxford, v.104, p.359-364, 2009.

FORREST, A.D.; HOLLINGSWORTH, M.L.; HOLLINGSWORTH, P.M.; SYDES, C.; BATEMAN, R.M.; **Heredity**, Edinburg, v.92,n.3, p.218-27, 2004.

FUTUYMA, D.J. **Evolutionary Biology**. 3rd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 1998. 604p.

- GASKIN, J.F.; SCHWARZLAENDER, M.; WILLIAMS, L.; GERBER, E.; HINZ, H. Minimal genetic diversity in the facultatively outcrossing perennial pepperweed (*Lepidium latifolium*) invasion. **Biological Invasions**, Dordrecht, v.14, p.1797–1807, 2012.
- GEORGE, S.; SHARMA, J.; YADON, Y.L. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. **American Journal of Botany**, New York, v. 96, p.2022–2030, 2009.
- GODWIN, I D.; AITKEN, E.A.B.; SMITH, L.W. Application of intersimple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. **Electrophoresis**, Malden, v.18, p.1524-1528, 1997.
- GONZÁLEZ-DÍAZ, N.; ACKERMAN, J.D. Pollination, fruit set, and seed production in the orchid *Oeceoclades maculata*. **Lindleyana**, Palm Beach v.3, p.150–155, 1988.
- GOVAERTS, R.; CAMPACCI, M.A.; HOLLAND, B.D.; CRIBB, P.; GEORGE, A.; KREUZ, K.; WOOD, J. World Checklist of Orchidaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew, 2008. Disponível em: <http://www.kew.org/wcsp/> Acesso em: 20 jan.2012.
- GOVAERTS, R.; BERNET, P.; K. KRATOCHVIL, GERLACH, G.; CARR, C.; ALRICH, P.; PRIDGEON, A.M.; .PFAHL, J.; CAMPACCI, M.A.; HOLLAND BAPTISTA, D.; TIGGES, H.; SHAW, J.;CRIBB, P.; GEORGE, A.; KREUZ, K.; WOOD, J. World Checklist of Orchidaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew, 2008. Disponível em: <http://apps.kew.org/wcsp/> Acesso em: 25 abril 2013.
- GRATIVOL, C.; LIRA-MEDEIROS, C.F.; HERMERLY, A.S.; FERREIRA,P.C.G. High efficiency and of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Reports**, Basel, v.38, p.4245-4256, 2011.
- GUGGISBERG, A.; WELK, E.; SFORZA, R.; HORVATH, D.P.; ANDERSON, J.V.; FOLEY, M.E.; RIESEBERG, L.H. Invasion history of North American Canada thistle, *Cirsium arvense*. **Journal of Biogeography**, Oxford, v.39, p.1919-1931, 2012.
- 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**, Berlin, v.89, p.998–1006, 1994.
- HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.H.; MacBYDE, B.; THOMAS, L. **Genetics and conservation**. California: Benjamin Cummings, 1983. p.335-348.

HENSEN, I.; KILIAN, C.; WAGNER, V.; DURKA, W.; PUSCH, J. K. WESCHE (in press) Low genetic variability and strong differentiation among isolated populations of the rare steppe grass *Stipa capillata* L. in central Europe. **Plant Biology**, Malden, v.12, p.526–536, 2009.

HOEHNE, F.C. **Iconografia de Orchidaceas do Brasil**. São Paulo: Gráfica F. Lanzara, 1949. 601p.

JIA, X.D.; WANG, T.; ZHAI, M.; LI, Y.R.; GUO, Z.R. Genetic diversity and identification of Chinese- grown pecan using ISSR e SSR markers. **Molecules**, Basel, v.16, p.10078-10092, 2011.

JUGRAN, A.; BHATT, I. D.; RAWAT, S.; GIRI, L.; RAWAL, R. S.; DHAR, U. Genetic diversity and differentiation in *Hedychium spicatum*, a valuable medicinal plant of Indian Himalaya. **Biochemical Genetics**, New York, v.49, n.11/12), p.806-818, 2011.

KELAGER, A.; PEDERSEN, J.S.; BRUUN, H.H. Multiple introductions and no loss of genetic diversity: invasion history of Japanese Rose, *Rosa rugosa* , in Europe ' **Biological Invasions**, Dordrecht, vol. 15,n.5, p. 1125-1141, 2013.

KELLER, S. R.; TAYLOR, D. R. History, chance, and adaptation during biological invasion: separating stochastic phenotypic evolution from response to selection. **Ecology Letters**, Oxford, v.11, p.852-866, 2008.

KUROKAWA, S.; KOBAYASHI, H.; SENDA, T. Genetic diversity of *Sicyos angulatus* in central and north-eastern Japan by inter-simple sequence repeat analysis. **Weed Research**, Oxford, v.49, p.365–372, 2009.

LEIMU, R.; MUTIKAINEN, P.; KORICHEVA, J.; FISCHER, M. How General Are Positive Relationships between Plant Population Size, Fitness and Genetic Variation? **Journal Ecology**, London, v.94,n.5, p. 942-952, 2006.

LEVINE, J.M.; VILA, M.; D'ANTONIO, C.M.; DUKES, J.S.; GRIGULIS, K.; LAVOREL, S. Mechanisms underlying the impacts of exotic plant invasions. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v.270, p.775-781, 2003.

LI, W.; WANG, B.; WANG, J. Lack of genetic variation of an invasive clonal plant *Eichhornia crassipes* in China revealed by RAPD and ISSR markers. **Aquatic Botany**, Amsterdam v.84, n.2, p.176-180, 2006.

LIN, X.; LOU, Y.; ZHANG, Y.; YUAN, X.; HE' J.; FANG, W. Identification of genetic diversity among cultivars of *Phyllostachys violascens* using ISSR, SRAP and AFLP markers. **Russian Journal of Genetics**, Barysheva, v.46, n.8, p.938–947, 2010.

LOAISIGA, C. H.; ROCHA, O.; BRANTESTAM, A. K.; SALOMON, B.; MERKER, A. Genetic diversity and gene flow in six accessions of Meso-America teosintes. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.59, p.95–111, 2012.

LÓPEZ-ROBERTS, M. C.; ALMEIDA, P. R.; OLIVEIRA, E. J.; VAN DEN BERG, C. Microsatellite marker development for the threatened orchid *Masdevallia solomonii* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, Ohio, v.99, n.2, p.66-68, 2012.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.15, p. 65-95, 1984.

MA, W.; GENG, S. L.; WANG, S. B.; ZHANG, G. L.; FU, W. D.; SHU, B. Genetic diversity of the newly invasive weed *Flaveria bidentis* (Asteraceae) reveals consequences of its rapid range expansion in northern China. **Weed Research**, Oxford, v.51, p. 363-372, 2011.

MABLE, B.K.; ADAM, A. Patterns of genetic diversity in outcrossing and selfing populations of *Arabidopsis lyrata*. **Molecular Ecology**, Oxford, v.16, p.3565–3580, 2007.

MANDÁK, B.; ZÁKRAVSKÝ, P.; KORÍNKOVÁ, D.; DOSTÁL, P.; PLACKOVÁ, I. Low population differentiation and high genetic diversity in the invasive species *Carduus acanthoides* L. (Asteraceae) within its native range in the Czech Republic. **Biological Journal of the Linnean Society**, London v.98, p.596–607, 2009.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 27, p.209–220, 1967.

MENDES, F B.G. **Diversidade genética de populações de Cedro (*Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)) no Centro-Sul do Brasil.** 2009. 88p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MOLIN D.; COELHO, C. J.; MÁXIMO, D. S.; FERREIRA, F. S.; GARDINGO, J. R.; MATIELLO, R. R. Genetic diversity in the germplasm of tropical maize landraces determined using molecular markers. **Genetic Molecular Resources**, Ribeirão Preto, v.12 , n.1, p.99-114, 2013.

MORRISON, A. Oeceoclades In: PRIDGEON A. (Ed.). **The Illustrated Encyclopedia of Orchids**. Oregon : Timber Press, 1997. p. 191

MULLIS, K.; FALLOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain restriction. **Methods in Enzymology**, Pasadena, v.55, p.335-350, 1987.

MUNOZ , M.; WARNER , J.; ALBERTAZZI, F.J. Genetic diversity analysis of the endangered slipper orchid *Phragmipedium longifolium* in Costa Rica. **Plant Systematics and Evolution**, Beijing, v.290, p. 217-223, 2010.

NAGAOKA, T.; OGIHARA, Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, p.597–602, 1997.

NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.76, p.5269-5273, 1979.

NOLTE, A.W. Dispersal in the course of an invasion. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, n.9, p. 1803-1804, 2011.

NYBON, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, Oxford, v.13, p. 1143-1155, 2004.

NYBON, N.; BARTISH, I. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Zurich, v.3, p.93-114, 2000.

OBARA-OKEYO, P.; KAKO, S. Genetic diversity of *Cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Euphytica**, Wageningen, v.99, p.95–101, 1998.

PABST, G.F.J.; DUNGS, F. **Orchidaceae brasiliensis II**. Hildesheim: Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, 1977. 418p.

PARRA-TABLA, V.; VARGAS, C. F.; NAVAL, C.; CALVO, L. M.; OLLERTON, J. Population status and reproductive success of an endangered epiphytic orchid in a fragmented landscape. **Biotropica**, Washington, v. 43, p.640–647, 2011.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.6, p.288-295, 2006.

PERRIER, X.; FLORI, A.; BONNOT, F. Data analysis methods. In: HAMON, P.; SEGUIN, M.; PERRIER, X.; GLASZMANN, J.C. (Ed.), **Genetic diversity of cultivated tropical plants**. Enfield, Montpellier: Science Publishers, 2003. p. 43 - 76.

PFEIFFER, T.; ROSCHANSKI, A. M.; PANNELL, J. R.; KORBECKA, G.; SCHNITTNER, M. Characterization of microsatellite loci and reliable genotyping in a polyploid plant, *Mercurialis perennis* (Euphorbiaceae). **Journal of Heredity**, Oxford, v.102, n.4, p.479-488, 2011.

PILLON, Y.; QAMARUZ-ZAMAN, F.; FAY, M.F.; HENDOUX, F.; PIQUOT, Y. Genetic diversity and ecological differentiation in the endangered fen orchid (*Liparis loeselii*). **Conservation Genetics**, Cambridge v.8, p.177-184, 2007.

PINHEIRO, L.R.; RABBANI, A.R.C.; MUNIZ, A.V.C. da S.; LEDO, A. da S.; PEREIRAM, 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**, Beijing, v. 12, p.1815-1828, 2012,

PITHER, R.; SHORE, J.S.; KELLMAN, M. Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazonia* (Combrataceae) in naturally fragmented populations. **Heredity**, Edinburg, v.91, p.307–313, 2003.

POULIN, J.; WELLER, S.G.; SAKAI, A.K. Genetic diversity does not affect the invasiveness of fountain grass (*Pennisetum setaceum*) in Arizona, California and Hawaii. **Diversity and Distributions**, London, v.11, p.241–247, 2005.

PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W.; RASMUSSEN, F.N. (Ed.). **Genera Orchidacearum**: General introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. Oxford: Oxford University Press, 1999. v.1, 197p.

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

RAHEMI, A.; FATAHI, R.; EBADI, A.; TAGHAVI, T.; HASSANI, D.; GRADZIEL, T.; FOLTA, K.; CHAPARRO, J. Genetic diversity of some wild almonds and related *Prunus* species Revealed by SSR and EST-SSR molecular markers. **Plant Systematics and Evolution**, Beijing, v.298, p.173–192, 2012.

RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cellular and Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v.9, p.221-238, 2004.

REJMANEK, M.; RICHARDSON, D. M. What attributes make some plant species more invasive? **Ecology**, Washington v. 77, p.1655-1660, 1996.

REUNOVA, G.D.; KATS, I.L.; MUZAROK, T.I.; ZHURAVLEV, Y.N. Polymorphism of RAPD, ISSR and AFLP Markers of the *Panax ginseng* C. A. Meyer (Araliaceae) Genome. **Russian Journal of Genetics**, Barysheva, v.46, n.8, p.938–947, 2010.

RICHARDS, A.J. **Plant breeding systems**. 2nd ed. London: Chapman, Hall. 1990. 529p.

RICHARDSON, D. M.; PYSEK, P.; REJMANEK, M.; BARBOUR, M. G.; PANETTA, F. D.; WEST, C. J. 2000. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. **Diversity and Distributions**, Amsterdam, v.6, p.93–107, 2000.

RODRIGUES, J.F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. 2011, 84p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

RUSSELL, A.; SAMUEL, R.; BOGARÍN, D.; FERNANDO, S.; WIJESUNDERA, S.; KLEJNA, V. CHASE, M, W. Genetic variation and phylogenetic relationships of a pantropical species group in *Polystachya* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.165, p.235–250, 2011.

SAINI, N.; JAIN, N.; JAIN, S.; JAIN, R.K. Assessment of genetic diversity within and among Basmati and non Basmati rice varieties using AFLP, ISSR, and SSR markers. **Euphytica**, Wageningen, v.140, p.133–146, 2004.

SAKAI, A.K.; ALLENDORF, F.W.; HOLT, J.S.; LODGE, D.M.; MOLOFSKY, J.; WITH, K.A.; BAUGHMAN, S.; CABIN, R.J.; COHEN, J.E.; ELLSTRAND, N.C.; MCCAULEY, D.E.; O'NEIL, P.; PARKER, I.M.; THOMPSON, J. N.; WELLER, S.G. The population biology of invasive species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.32, p.305–332, 2001.

SALEH, B. Efficiency of RAPD and ISSR markers in assessing genetic variation in *Anthrocnemum macrostachyum* (Chenopodiaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.54, n.5, p.859-866, 2011.

SANTANA, I.B.B.; OLIVEIRA, E.J.; SOARES FILHO, W.S.; RITZINGER, R.; AMORIM, E.P.; COSTA, M.A.P.C.; MOREIRA, R.F.C. Variabilidade genética entre acessos de Umbu-Cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.3, p.868-876, 2011.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2000: a software for population data analysis** (software). Geneva: University of Geneva, Genetic and Biometry Laboratory, 2000. Disponível em: < <http://anthropologie.unige.ch/arlequin> > Acesso em: 3. Jan. 2012.

SENIOR, M L.; MURPHY, J.P.; GOODMAN, M M.; STUBER, C.W. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. **Crop Science**, Madison, v.38, p.1088–1098, 1998.

SHANNON, C.E. A mathematical theory of communication. **Bell System Technical Journal**, New York, v.27, p.379-423, 1948.

SHARMA, I.K.; CLEMENTS, M.A.; JONES, D.L. Observations of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa* R. Br. (Orchidaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Beijing, v.28, p.651–663, 2000.

SHARMA, S.K.S. ;KUMARIA, P. ;TANDON S.R. RAO, Analysis of genetic variation and identification of species-diagnostic ISSR markers in five species of *Cymbidium* (Orchidaceae). **Plant Biochemical Biotechnology**, Nova Delhi v.22, p 250-255, 2012

SILVA, L.; ELIAS, R.B.; MOURA, M.; MEIMBERG, H.; DIAS, E. Genetic variability and differentiation among populations of the Azorean endemic gymnosperm *Juniperus brevifolia*: baseline information for a conservation and restoration perspective. **Biochemical Genetics**, New York, v.49, p.715–734, 2011.

SOENGAS, P.; CARTEA, M.E.; FRANCISCO, M.; LEMA, M.; VELASCO, P. Genetic structure and diversity of a collection of *Brassica rapa* subsp. *rapa* L. revealed by simple sequence repeat markers. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v.149, p.617–624, 2011.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In: SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E.; DOYLE, J.J. (Ed.) **Molecular systematics of plants**. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers. 1998. v.2. p.1-42.

STERN, W.L. The long– distance dispersal of *Oeceoclades maculata*. **American Orchid Society Bulletin**, Cambridge, v.57, n.9, p. 960-971, 1988.

SUN, M. Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating systems. **American Journal of Botany**, New York, v.84, p. 224–232, 1997.

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.

TAYLOR, J.S.; BURNETT, R.M. DARWIN: A program for docking flexible molecules. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v.41, p.173–191, 2000.

TAUTZ, D.; TRICK, M.; DOVER, G.A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature**, London, v.322, p.652–656, 1986.

TERZOPULOS, P.J.; BEBELI, P.J. Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. **Fields Crop Research**, Amsterdam, v. 108, p. 39-44, 2008.

TREMBLAY, R. L.; ZIMMERMAN, J. K.; LEBRÓN, L.; BAYMAN, P.; SASTRE, I.; AXELROD, F.; ALERS-GARCÍA, J. Host specificity and low reproductive success in the rare endemic Puerto Rican orchid *Lepanthes caritensis* (Orchidaceae). **Biological Conservation**, London, v.85, p.297-304, 1998.

THIMMAPPAIAH, W.G.; SANTHOSH, D.; SHOBHA; MELWYN, G.S. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.11, n.22, p.1-7, 2008.

VEASEY, E.A. ; OLIVEIRA, G.C.X. Genome evolution and population biology in the Orchidaceae. In: SHARMA, A.K.; SHARMA, A. (Org.). **Plant genome: biodiversity and evolution**. Enfield, New Hampshire, USA: Science Publishers, 2006, v.1, p. 151-200.

VERMA, S.; RANA, T.S. Genetic diversity within and among the wild populations of *Murraya koenigii* (L.) Spreng., as revealed by ISSR analysis. **Biochemical Systematics and Ecology**, London, v.39, n.2, p.139-144, 2011.

VERMA, P.C.; CHAKRABARTY, D.; JENA, S.N.; MISHRA, D.K.; SINGH, P.K.; SAWANT, S.V.; TULI, R. The extent of genetic diversity among *Vanilla* species: Comparative results for RAPD and ISSR. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v.29, p.581-589, 2009.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for a DNA fingerprint. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, p.4407-4414, 1995.

VOSS, N.; ECKSTEIN, R.L.; DURKA, W. Range expansion of a selfing polyploid plant despite widespread genetic uniformity. **Annals of Botany**, Oxford, v.110,n.3), p.585-593, 2012.

XIAO, M.; LI, Q.;WANG, L.;GUO, L.; LI, J,TANG, J.; CHEN, F. ISSR Analysis of the Genetic Diversity of the Endangered Species *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying from Western Sichuan Province, China. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v.48 , n.10, p. 1140–1146, 2006.

WANG, H.Z.; LU, J.J.; HU, X.; LIU, J.J. Genetic variation and cultivar identification in *Cymbidium ensifolium*. **Plant Systematics and Evolution**, Beijing, v.293, p.101–110, 2011.

WANG, H.Z.; WU, Z.X.; LU, J.J.; SHI, N.N., ZHAO, Y.; ZHANG, Z.T.; LIU, J.J. Molecular diversity and relationships among *Cymbidium goeringii* cultivars based on inter- simple sequence repeat (ISSR) markers. **Genetica**, Den Haag, v.136, p.391-399, 2009.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.;RAFALSKI, J.A.;TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p.6531- 6535, 1990.

WOLFE, A.D. **ISSR protocols**. 2000. Disponível em: <<http://www.biosci.ohiostate.edu/~awolfe/ISSR/protocols.ISSR.html>>. Acesso em: 2. jan. 2012.

WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; DOYLE, J.J. (Eds)**Molecular systematics of plants II: DNA sequencing**. Boston: Kluwer, 1998. p.43-86.

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

YANG, J.; TANG, L.; GUAN, Y.; SUN, W. Genetic Diversity of an Alien Invasive Plant Mexican Sunflower (*Tithonia diversifolia*) in China. **Weed Science**, Davis, v.60, n.4, p.552-557, 2012.

YANG, M.; LIU, F.; HAN, H.; XU, L.;JUNTAWONG, N.; LIU, Y. Genetic diversity and structure in populations of *Nelumbo* from America, Thailand and China: Implications for conservation and breeding. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v.107, p. 1– 7, 2013.

YE, W.H.; MU, H.P.; CAO, H.L.; GE, X.J. Genetic structure of the invasive *Chromolaena odorata* in China. **Weed Research**, Oxford, v.44,n.2, p.129–135, 2004.

YE, Y.M.; ZHANG, J.W.; NING, G.G.; BAO, M.Z. A comparative analysis of the genetic diversity between inbred lines of *Zinnia elegans* using morphological traits and RAPD and ISSR markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam v.118, n.1, p.1-7, 2008.

YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T.B.J.; YE, Z.H.; MAO, J.X. **POPGENE, the userfriendly shareware for population genetic analysis**. Canada, Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, 1997. Disponível em: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2012.

YU, H.H.; YANG, Z.L.; SUN, B.; LIU, R.N. Genetic diversity and relationship of endangered plant *Magnolia officinalis* (Magnoliaceae) assessed with ISSR polymorphisms. **Biochemical Systematics and Ecology**, London, v.39, p.71-78. 2011.

ZHANG, L.; LI, Q.; LI, H.; CHEN, J.; LI, D. Genetic Diversity and Geographic Differentiation in *Tacca chantrieri* (Taccaceae): an Autonomous Selfing Plant with Showy Floral Display. **Annals of Botany**, Oxford, v.98, p.449–457, 2006.

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