

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**  
*Campus de Botucatu*

**ESTRUTURA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Solanum lycocarpum* ST HIL  
(SOLANACEAE) DO ESTADO DE SÃO PAULO**

**EDNA MARIA ZELANDI**

**BOTUCATU - SP**  
**2006**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**  
*Campus de Botucatu*

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Solanum lycocarpum* ST HIL (SOLANACEAE) DO ESTADO DE SÃO PAULO**

**ALUNA: EDNA MARIA ZELANDI**

**ORIENTADORA: Profa Dra CATALINA ROMERO LOPES**

**Tese apresentada à Universidade Paulista  
Júlio de Mesquita Filho, UNESP, para a  
obtenção do Título de Doutor em Ciências  
Biológicas, Área de concentração: Genética**

**BOTUCATU - SP**

**2006**

Aos meus pais Joanna e Carlos, aos meus filhos Paola e Giovanne e aos meus irmãos  
Ednéia e Carlos, pelo amor que nos une, apesar da distância,

Aos amigos de todas as horas, que compartilham as alegrias e os dias difíceis, pelo apoio,  
companheirismo e carinho,

**DEDICO**

## Agradecimentos

A Deus, por criar em nossas vidas, rodovias a partir de becos sem saída.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Catalina Romero Lopes, por todo empenho, disposição, paciência e por acreditar sempre.

Ao Prof Dr Marcos Gimenes, por todo apoio nos procedimentos de laboratório.

Ao Dr Marcos Machado, aos amigos e colegas do Centro de Citricultura de Cordeirópolis, pelas colaborações no seqüenciamento.

À Profa Dra Sílvia Rogatto e aos pós-graduandos do Laboratório Neogene Priscila e Rodrigo pela disponibilidade em colaborar com os processos de seqüenciamento.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e aos meus filhos, pela compreensão, que me permitiram a continuidade deste projeto.

Aos meus irmãos Ednéia e Carlos por todo companheirismo e toda colaboração, de toda espécie e natureza.

Às amigas Andréa Gobbi, Paula Nóbile, Adriana Sartori, Andréa Akemi, Cristiane Teixeira e Tatiany Barata, pela amizade, presença constante, apoio e “paciência”. Agradecimentos especiais à Adriana Sartori, também pela colaboração na coleta em campo e no laboratório e à Andréa Akemi, pelo grande apoio na conferência, impressão e organização da tese.

Ao Darío Palmieri, pelas sugestões e pela colaboração na etapa de construção de biblioteca de SSR.

Ao Furlan, do Instituto Florestal de Assis, por auxiliar em coletas de material naquela unidade.

A todos os companheiros pós-graduandos, pela boa convivência.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Genética.

Aos funcionários da Pós-graduação: Maria Helena, Luciene e Serginho.

A todos que, de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), pela concessão de bolsa e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelo auxílio pesquisa, os quais permitiram a realização deste trabalho.

## INDICE

RESUMO .....	01
INTRODUÇÃO.....	03
OBJETIVOS.....	05
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	06
▪ Informações Botânicas e Aplicações Medicinais .....	06
▪ O Bioma Cerrado.....	10
▪ Fragmentação de ecossistemas e efeitos genéticos.....	11
▪ Variabilidade Genética .....	13
▪ Marcadores Moleculares Microssatélites e Aplicações.....	14
ARTIGO:.....	17

### **“Estrutura genética de populações naturais de *Solanum lycocarpum* St Hil (Solanaceae) do Estado de São Paulo”**

RESUMO .....	17
INTRODUÇÃO.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
▪ Material vegetal e extração de DNA .....	21
▪ Construção das bibliotecas genômicas .....	21
▪ Enriquecimento das bibliotecas genômicas.....	22
▪ Clonagem, confirmação dos insertos e manutenção dos clones.....	22
▪ Inoculação e extração plasmidial.....	22
▪ Seqüenciamento.....	23
▪ Desenho de <i>primers</i> (iniciadores).....	23
▪ Amplificação de DNA e eletroforese .....	23
▪ Amostragem e Condições ambientais.....	24
▪ Genética Descritiva.....	25
▪ Coleta e análise dos dados .....	24
RESULTADOS .....	26
▪ Identificação dos microssatélites e desenho dos <i>primers</i> .....	26
▪ Avaliação dos iniciadores e detecção de polimorfismo.....	26
▪ Diversidade Genética.....	27
▪ Estrutura Genética .....	29

DISCUSSÃO .....	31
▪ Avaliação das bibliotecas enriquecidas para microssatélites .....	31
▪ Condições ambientais das populações.....	32
▪ Diversidade genética e Estrutura genética.....	33
▪ Conclusões.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS.....	41

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 01. Coordenadas geográficas definidas por GPS e número de indivíduos amostrados para as populações de *Solanum lycocarpum* St. Hil. nos municípios paulistas de Assis, Botucatu e Martinópolis .....53
- Tabela 02. *Primers* de microssatélites (SSR) genômicos desenvolvidos para *Solanum lycocarpum* St Hil, seqüências dos *primers forward* e *reverse*, *motifs*, amplitudes alélicas e tamanho da amostra (N). .....54
- Tabela 03. Descrição dos alelos amplificados em cada loco de microssatélite pelos oito pares de *primers* desenvolvidos para *Solanum lycocarpum* St Hil e número de alelos observados para cada loco. ....55
- Tabela 04. Probabilidades de equilíbrio das freqüências genotípicas em 8 locos de microssatélites analisados em três populações de *Solanum lycocarpum*, submetidas ao Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. ....56
- Tabela 05. Freqüências alélicas estimadas para três diferentes populações de *S. Lycocarpum* do Estado de São Paulo .....57
- Tabela 06. Heterozigosidade em todos os locos de microssatélites em cada população de *Solanum lycocarpum*. .....58
- Tabela 07. Índice de fixação ( $F_{IS}$ ) de Wright (1978) como uma medida de deficiência ou excesso de heterozigotos em cada população de *Solanum lycocarpum*, para oito locos SSR. ....59
- Tabela 08. Parâmetros de diversidade genética estimada com oito locos de microssatélites. Tamanho da amostra total (N), Número de alelos observados (na), Número de alelos efetivos (ne), Heterozigosidade observada ( $H_o$ ), Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), Índice de fixação (f) de Wright (1965) ou Coeficiente de endogamia,

calculado com base na fórmula  $f = 1 - \frac{H_o}{H_e}$ , taxa de cruzamento aparente (ta),  
calculada a partir da fórmula  $ta = \frac{1-f}{1+f}$  .....60

Tabela 09. Tamanho efetivo (Ne) de cada população, número de alelos observados (na) e número de alelos efetivos (ne) em cada população de <i>Solanum lycocarpum</i> .....	61
Tabela 10. Heterozigosidade média nos oito locos de microssatélites para o conjunto das três populações de <i>Solanum lycocarpum</i> . ....	62
Tabela 11. Índice de fixação (F <sub>IS</sub> ) de Wright (1978) geral dos alelos no conjunto das populações de <i>Solanum lycocarpum</i> , como uma medida de deficiência ou excesso de heterozigotos. ....	63
Tabela 12. Estatísticas-F e fluxo gênico estimado para o conjunto de populações de <i>Solanum lycocarpum</i> a partir da análise de oito locos de microssatélites. ....	64



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01. Dendrograma mostrando as distâncias genéticas entre três populações de *Solanum lycocarpum* St Hil baseado na Distância Genética de Nei (1972), utilizando-se o critério de agrupamento UPGMA, modificado de NEIGHBOR procedente de PHYLIP, Versão 3.5.....65

## RESUMO

*Solanum lycocarpum* St. Hil é uma Solanaceae, do Gênero *Solanum*, ao qual pertencem várias espécies longamente conhecidas e utilizadas, sobretudo, na alimentação humana, tais como a batata (*Solanum tuberosum*) e a berinjela (*S. melongena*). A *S. lycocarpum* é uma espécie diplóide ( $2n=24$ ), predominantemente alógama e estudos anteriores sugerem que os cruzamentos entre parentes não são comuns. É uma planta nativa do Cerrado (a Savana brasileira, um Bioma rico em biodiversidade e em endemismo), mas sua ocorrência se dá especificamente em áreas abertas, de vegetação baixa e com maior incidência de luminosidade. A espécie apresenta um comportamento ruderal e é considerada pioneira, podendo ser utilizada para recuperação de áreas degradadas. Conhecida por fruta-do-lobo ou lobeira, é um componente fundamental da dieta de vários animais do Cerrado, especialmente do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), um importante dispersor da espécie. *S. lycocarpum* é considerada medicinal e aos seus compostos bioativos são atribuídas ações hipoglicemiantes e antiinflamatórias, entre outras. Da mesma maneira que outras espécies do Gênero *Solanum*, a *S. lycocarpum*, contém glicoalcalóides como a solasodina, um potencial precursor para a síntese de estrógenos e solamargina, cuja atividade demonstrou-se eficiente no tratamento de linhagens de células cancerígenas resistentes a quimioterápicos, relacionando-a com a interrupção da expressão de alguns oncogenes responsáveis pelo desenvolvimento desta resistência. Devido a sua potencial importância medicinal e a comprovada importância ambiental, a estrutura genética de populações de *S. lycocarpum* foi investigada utilizando-se marcadores moleculares microssatélites desenvolvidos exclusivamente para esta espécie. De um total de vinte e oito iniciadores desenhados a partir de bibliotecas enriquecidas para microssatélites, oito deles amplificaram locos polimórficos analisáveis, gerando um total de trinta e nove alelos (média de 4,87 alelos/loco) quando avaliados em três populações de *S. lycocarpum* geograficamente distantes localizadas no Estado de São Paulo. As análises estatísticas obtidas por meio dos programas computacionais PopGene e TFPGA, revelaram que dentro das populações o número efetivo de alelos ( $n_e$ ) variou, ocorrem oscilações nas frequências alélicas, mostrando que alguns alelos estão se fixando, e outros são raros, as médias de heterozigosidade observadas foram menores que as esperadas nas três populações, e a média total foi de 0,3136. Os resultados das análises multipopulacionais revelaram, por meio das Estatísticas-F, valores médios de 0,3900 para a endogamia intrapopulacional ( $F_{IS}$ ), 0,4848 para a endogamia total da espécie ( $F_{IT}$ ) e 0,1554 para a divergência genética entre as populações ( $F_{ST}$ ). De acordo com valores de distâncias e identidades de Nei (1972) e

utilizando-se o critério de agrupamento UPGMA, dois grupos foram formados. Um dos grupos formou-se pelas populações de Assis e Botucatu, as quais se revelaram geneticamente menos distantes. No segundo grupo localizou-se a população de Martinópolis, separada por apresentar maior distância genética. Comparando-se os dados obtidos por meio de SSR com dados prévios de RAPD, observou-se que, mesmo com o aumento do tamanho populacional, a população de *S. lycocarpum* de Martinópolis é a mais endogâmica, enquanto que, apesar da redução do tamanho populacional e das aparentes injúrias, a população de Assis continua dispondo de maior diversidade genética.

## INTRODUÇÃO

A família Solanaceae é bastante conhecida pelo fato de comportar gêneros de grande interesse econômico devido às suas propriedades nutritivas, dentre esses se encontra o Gênero *Solanum*, ao qual pertencem espécies cultivadas há séculos devido à sua histórica utilização na alimentação humana, tais como a *Solanum tuberosum* (batata) e a *Solanum melongena* (berinjela). Muitas outras espécies desse gênero são ainda pouco conhecidas e têm potencial pouco explorado, como por exemplo, a *S. saponaceum*, cuja utilização pelos peruanos, como alvejante natural para roupas (devido à presença de saponinas na sua constituição) foi descrita por Hoehne em 1939.

A *S. lycocarpum* St. Hil, por sua vez, apresenta compostos bioativos que auxiliam no tratamento do *Diabetes mellitus* tipo 2 (Bragança, 1996) e que tem revelado seu potencial para síntese de estrógenos devido à presença de solasodina, que é uma substância intermediária na síntese desses hormônios e que pode substituir a diosgenina (Sato *et al*, 1957; 1960; Suvarov, Murashewa, 1959; Motidome *et al*, 1970, Jaggi & Kapoor, 1994, Vieira, 1998). Além da solasodina se encontra também o glicoalcalóide solamargina que apresenta ação inibidora da proliferação de linhagens de células tumorais de câncer de pulmão resistentes aos quimioterápicos, interferindo na expressão de determinados oncogenes, uma vez que leva as células tumorais à apoptose (Liang *et al.*, 2004).

A *Solanum lycocarpum* St. Hil é uma planta pioneira (Santos *et al*, 2002), nativa do Cerrado (Savana brasileira) e é conhecida como fruta-do-lobo ou lobeira devido ao fato de fazer parte da dieta alimentar natural do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), um canídeo que habita os cerrados e que se encontra em risco de extinção.

O Cerrado é um Bioma caracterizado pela elevada diversidade biológica, mas atualmente é o Bioma mais atingido pelas interferências antrópicas, sendo pressionado pela imposição de monoculturas, por atividades agropecuárias e pelos reflorestamentos monoespecíficos, o que é agravado por ser considerado como área de expansão agrícola. A conservação dos Biomas, inclusive o Bioma Cerrado, embora seja conflitante com os interesses socioeconômicos, é uma necessidade para a garantia da biodiversidade e do equilíbrio biológico e conseqüentemente, das espécies pertencentes a esses Biomas, das quais muitas são endêmicas.

Um dos fatores mais importantes para a conservação é o conhecimento da diversidade genética e da estrutura genética das populações naturais, bem como a avaliação das alterações ocorridas nesta estrutura devido às modificações dos ecossistemas e uma das maneiras de se

obter esse conhecimento é a investigação a partir do emprego de marcadores genéticos. Este tipo de marcadores detecta padrões de estrutura de populações que dependem de forças que afetam igualmente todos os locos, tais como o fluxo gênico e deriva genética, mas também de fatores que agem diferentemente em cada loco, tais como as forças seletivas, processos de mutação e tipo de herança (Freville *et al.*, 2001). Dentre os marcadores genéticos, encontram-se os marcadores moleculares microssatélites, também denominados SSR (*Simple Sequence Repeats*), que têm sido amplamente utilizados para análise genética por causa de sua abundância, facilidade de ser reconhecido no genoma, seu alto nível de polimorfismo e sua fácil detecção via sistemas automatizados (Rafalsky & Tingey, 1993) e também devido ao fato de permitir a análise de locos codominantes (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Pinto *et al.*, 2001), fator que os tornam muito mais informativos. Na área de Biologia da Conservação esses marcadores têm sido usados em investigações de espécies raras, pois muitas vezes os resultados são limitados quando utilizados outros marcadores genéticos (Goldstein & Schlötterer, 1999). Com base nestas informações e com o intuito de se obter um melhor conhecimento sobre a diversidade genética e a estrutura genética de populações da espécie *S. lycocarpum*, bem como verificar sua resposta frente às modificações ambientais, foram desenvolvidos marcadores microssatélites específicos para *S. lycocarpum* e a análise da sua estrutura genética por meio destes poderão sugerir os efeitos da fragmentação, da redução do habitat e do isolamento de populações desta espécie. Essas informações poderão ser úteis para desenvolvimento de programas de manejo e conservação, bem como para o possível cultivo e aproveitamento econômico da espécie de forma racional, sejam eles direcionados à indústria farmacêutica brasileira (isolamento de compostos), à medicina natural bem fundamentada e orientada (atendimento primário) ou para recuperação de áreas degradadas.

## **OBJETIVO**

O presente trabalho tem por objetivo, partindo-se da aplicação de marcador molecular microssatélite, obter conhecimentos sobre a estrutura genética das populações naturais de *S. lycocarpum* St Hil. Estes conhecimentos consistem na estimativa da variação dentro das populações (frequências genotípicas e alélicas, número de alelos por loco, porcentagem de locos polimórficos, heterozigosidade esperada e observada, índice de fixação de Wright e desequilíbrio de ligação) e da variação entre populações. Visa também, despertar o interesse pelo possível desenvolvimento de programas de manejo sustentável da espécie *S. lycocarpum* St Hil ou mesmo de cultivo, de forma adequada à manutenção e conservação do bioma cerrado, ao qual pertence e que é de fundamental importância ecológica.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Desenvolvimento de iniciadores (pares de *primers*) específicos para *Solanum lycocarpum*;
- 2) Estudo da diversidade genética dentro das 3 populações distantes (isoladas) desta espécie;
- 3) Estudo da estrutura genética das populações de *S. lycocarpum* consideradas neste trabalho

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Informações Botânicas e Aplicações Mediciniais

*Solanum lycocarpum*, popularmente conhecida por fruta-do-lobo e lobeira, é uma espécie de solanácea do Gênero *Solanum* (Família Solanaceae), nativa do Cerrado brasileiro e que ocorre de forma espontânea nas margens de estradas, podendo ser encontrada desde o Nordeste brasileiro até o Sul do Estado de São Paulo. Esta espécie é caracterizada por exibir arbustos de ramificações freqüentemente irregulares e tortuosas, providas de fortes espinhos, folhas alternas, ovais e sinuosas, corolas 5-partida de coloração azul-violácea. Os frutos são do tipo baga grande, revestida de pilosidade (Ferri, 1969), ligeiramente achatada e de coloração verde quando jovens, com polpa amarela e de forte aroma quando maduros, envolvendo numerosas sementes. O cultivo de *S. lycocarpum* foi incentivado por Corrêa (1952) e Hoehne (1939), uma vez que seus frutos maduros podem ser utilizados no preparo de doces, geléias ou consumidos *in natura* e estão disponíveis o ano todo, com maior produção entre os meses de janeiro e julho.

*Solanum lycocarpum* é uma espécie fundamental na dieta alimentar de pássaros, roedores e mamíferos de pequeno e médio porte. Muito provavelmente seu nome popular advém do fato de ser consumida pelo lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), o maior canídeo brasileiro que habita regiões de Cerrado e se encontra sob ameaça de extinção, sendo que em determinadas épocas do ano a fruta chega a responder por 70% da dieta natural deste mamífero. Pesquisas realizadas pelo Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia indicaram que algumas substâncias contidas na fruta-do-lobo seriam muito importantes para a manutenção do equilíbrio biológico do lobo-guará (Lombardi & Motta-Junior, 1993).

Dentro do Gênero *Solanum* se encontram a batata (*S. tuberosum*) e a berinjela (*S. melongena*), dois exemplos de solanáceas de considerável valor econômico e nutricional, especialmente para a espécie humana, enquanto que outras espécies deste gênero são consideradas medicinais, como por exemplo, a jurubeba (*S. paniculatum*), a quina-branca (*S. pseudoquina*) e a fruta-do-lobo, ou lobeira (*S. lycocarpum*). As espécies de solanáceas pertencentes ao Gênero *Solanum* são assim classificadas devido às semelhanças na morfologia de suas flores e dos compostos presentes nos seus tecidos e frutos, como por exemplo, os alcalóides e glicosídeos. Dentre os alcalóides existentes na Família Solanaceae, se encontram os alcalóides esteroidais que podem ser utilizados como fontes precursoras para a síntese

parcial de medicamentos a base de esteróides, sendo que em frutos verdes estes mesmos alcalóides podem ser tóxicos ao ser humano, aos predadores e aos parasitas naturais das plantas (Heftmann, 1983), pois estão envolvidos no mecanismo de defesa das plantas. As análises bioquímicas de extratos aquosos e alcoólicos de *S. lycocarpum* revelaram, além de alcalóides, esteróides e taninos, a presença de flavonóides nesta espécie (Sá *et al.*, 2000).

Na medicina popular um polvilho preparado a partir de frutos verdes de lobeira é utilizado como terapia alternativa no tratamento do *Diabetes mellitus* tipo 2, não insulina-dependente (Bragança, 1996). Este polvilho de lobeira, como é conhecido, é comercializado em drogarias na forma de cápsulas, na concentração de 500 mg, como descrevem Dall'AgnoL & Poser (2000). *Diabetes mellitus* é uma doença provocada pela deficiência de produção e/ou de ação da insulina, que leva a sintomas agudos e a complicações crônicas características. O distúrbio envolve o metabolismo da glicose, das gorduras e das proteínas e tem graves conseqüências tanto quando surge rapidamente como quando se instala lentamente, se tornando um problema de saúde pública.

Além do potencial bioativo utilizado de forma alternativa no tratamento da diabetes, estudos dos produtos secundários, mais precisamente dos glicoalcalóides foram realizados por Sato *et al.* (1957; 1960) e Suvarov & Murashewa (1959) que isolaram do Gênero *Solanum* a solasodina (aglicona dos glicoalcalóides solamargina e solasonina), da qual foi possível obter uma substância chamada 3 B-acetoxipregna-5,16-dien-20-ona, intermediária na síntese de hormônios sexuais. Jaggi & Kapoor (1994) denominaram 16-dehydropregnenolona a substância precursora da síntese de medicamentos esteroidais. A demonstração de que a *S. lycocarpum* St Hil, abundante no Cerrado do Brasil Central, contém solamargina e solasonina (Motidome *et al.*, 1970) tornou desejável o estudo da possibilidade do aproveitamento econômico dos seus frutos.

Os esteróides fazem parte da vida cotidiana do ser humano, estando presentes em membranas celulares, exercendo funções hormonais, intervindo no metabolismo de lipídios, além de serem utilizados na produção de fármacos. A característica básica dos esteróides é o esqueleto do ciclopentano perhidro fenantreno, diferenciando-se pela orientação dos anéis e a natureza de seus radicais, o que lhes confere grande variedade de ações biológicas (Azevedo & Lima, 1987).

Estudos mais recentes sobre os alcalóides, realizados com várias espécies do Gênero *Solanum*, ressaltaram a importância, principalmente da solasodina, pelo seu considerável potencial como precursor para a síntese de esteróides (devido às semelhanças entre suas



estruturas e a possibilitando de degradação de sua cadeia lateral para a obtenção da substância 16-dehidropregnenolona, precursora de vários hormônios sexuais), podendo substituir a diosgenina, a atual fonte para essa obtenção e cujo maior produtor é o México. Atualmente, cerca de 77% da produção mundial de esteróides são provenientes de plantas e somente 13% provêm de síntese total (Vieira, 1999).

Dentro da classe dos metabólitos secundários encontram-se também os flavonóides, que são compostos derivados de Inalnil CoA e do aminoácido aromático fenilalanina, encontrados em todo o reino vegetal e com cerca de 4.000 diferentes flavonóides já identificados. A existência de uma grande diversidade estrutural nos flavonóides pode ser explicada pelas modificações que podem sofrer, tais como hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, etc (Lopes *et al.*, 2001). Os flavonóides têm por funções fornecer pigmentação para atrair polinizadores, proteger plantas do ataque de patógenos, atuar como moléculas sinalizadoras nas interações entre plantas e micróbios e proteger as plantas contra radiação U.V. (Dooner *et al.*, 1991, Koes *et al.*, 1993, Shirley, 1996), etc. Os passos envolvidos na biossíntese de flavonóides já estão bioquimicamente bem caracterizados e genes codificadores de enzimas estruturais e proteínas reguladoras já foram clonados, a partir de um grande número de espécies vegetais.

Embora os flavonóides não ocorram na espécie humana, eles possuem propriedades farmacológicas capazes de atuar benéficamente sobre os sistemas biológicos humanos e estão subdivididos em diferentes classes, a saber: antocianinas, flavanas, flavanonas, flavonas, chalconas, auronas, flavonóis e isoflavonóides (Peterson & Dwyer, 1998). Estes compostos são encontrados em legumes, frutas, chás de ervas, cereais e no mel (Lopes, 2001), em vegetais em geral. Dentre os efeitos benéficos dos flavonóides destacam-se as capacidades antioxidativa, antiinflamatória, vasodilatadora, antialérgica, anti-tumoral, anti-hepatotóxica, anti-ulcerogênica, antiplaquetária, antimicrobiana e antiviral (Lin *et al.*, 1997, Vieira Jr, 2003). Aos flavonóides foi atribuída também a atividade antiandrogênica, reduzindo a fertilidade em cães machos (Bhargava, 1989) e em primatas (Dixit *et al.*, 1989). Pesquisas têm investigado a ação de alguns flavonóides na inibição da replicação viral do agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Humana (Lin *et al.*, 1997), podendo também inibir vários estágios diretamente envolvidos com os processos desencadeadores da aterosclerose, além de apresentar atividades hipolipidêmicas (Lin *et al.*, 1986).

Investigando o potencial terapêutico para o tratamento de úlceras, Ferreira *et al.* (2002) realizaram experimentos administrando extrato etanólico das folhas de *S. lycocarpum*

a ratos *Winstar* machos com úlceras estomacais induzidas por inibição da síntese de prostaglandinas. Os resultados sugeriram que o extrato etanólico possui princípios ativos com ação antiulcerogênica, possivelmente relacionada a um bloqueio colinérgico não competitivo, ocasionando a redução da secreção de ácido gástrico.

A ação anticâncer da solamargina foi observada por Kuo. *et al.* (2000) para câncer de fígado e sua ação inibidora do crescimento de células tumorais também foi observada por Maruo *et al.* (2003) para tumores de cólon, de próstata e de mama. Em estudos mais recentes, realizados por Liang *et al.* (2004), linhagens de células tumorais de câncer de pulmão resistentes a agentes quimioterápicos (A549) foram tratadas com solamargina combinada com cisplatina e observou-se que esta combinação aumentou significativamente a toxicidade para as células A549, evitando sua proliferação e levando-as a apoptose por bloquear a expressão de determinados oncogenes responsáveis pela resistência desenvolvida aos quimioterápicos. Estes resultados sugerem que a solamargina pode ser um agente potencial para o tratamento de Fatores de Necrose Tumorais (TNF) e de câncer de pulmão resistente à cisplatina.

Visando detectar uma possível ação genotóxica desta planta, Lima (1996) empregaram testes de indução da ação de bactérias lisogênicas incubadas com diferentes concentrações de extrato obtido a partir da polpa do fruto da planta. Os resultados destes testes não evidenciaram ação genotóxica para essa planta. Testes de toxicidade realizados com ratos e camundongos, utilizando-se as concentrações de *S. lycocarpum* usadas pela população humana, apesar da detecção de baixa no peso de próstata de camundongos *Swiss*, não demonstraram efeitos tóxicos para aqueles animais (Sá *et al.*, 2000, Peters *et al.*, 2001).

No conceito da OMS (Organização Mundial da Saúde), o uso judicioso de ervas, fungos, flores, frutos e raízes em atenção primária à saúde, significaria importante contribuição à redução das despesas com remédios nos países em desenvolvimento, porém, grande parte da atual tecnologia de pesquisas de produtos naturais está sendo desenvolvida por grandes indústrias farmacêuticas. Desta maneira os países do terceiro mundo se verão obrigados a gastar mais ainda na reimportação de suas plantas e extratos vegetais, fator este que impede a legitimação da medicina tradicional em diferentes sociedades (Bragança, 1996) e que é agravado pela biopirataria existente devido às falhas na política de proteção da biodiversidade e à falta de fiscalização efetiva e eficiente das fronteiras.

Considerando-se a grande riqueza da flora brasileira com potencial medicinal, a produção de medicamentos a baixos custos e o investimento em pesquisas sobre a conservação, produção e manejo destas plantas poderia significar uma grande economia para

o país, reduzindo-se consideravelmente os gastos com importações de matéria-prima para a produção de hormônios e outros tantos medicamentos.

### **O Bioma Cerrado**

O **Cerrado** é uma formação do tipo **Savana Tropical** que ocupa uma área de cerca de 22% do território nacional (aproximadamente dois milhões de Km<sup>2</sup>) na região central do Brasil, abrangendo os Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Goiás, Tocantins, Maranhão, Piauí, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e o Distrito Federal, com uma pequena inclusão na Bolívia (Paiva, 2000, [www.bdt.org.br](http://www.bdt.org.br)).

A ONG ambientalista *Conservation International* em estudos para montar uma categorização da importância biológica das principais regiões ameaçadas no mundo, classificou o Cerrado como o bioma de maior diversidade do mundo, sendo responsável pela manutenção de 1/3 da biodiversidade brasileira e onde podem ser encontradas onze biotas distintas (Paiva, 2000). O conceito de biodiversidade pode ser entendido como a variabilidade de organismos de todas as origens e os complexos ecológicos de que fazem parte, compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas (SMA – Secretaria do Meio Ambiente, 1996a, Amaral *et al.*, 2006). Apesar das dificuldades impostas pelo tipo de solo e clima da região, a evolução da vida ao longo de milhões de anos produziu uma grande diversidade de plantas e animais totalmente adaptados à vida nestas condições. As discussões sobre nutrição mineral das plantas nativas do Cerrado, muitas vezes enfocam os aspectos de baixa fertilidade dos solos da região, sem a devida atenção às adaptações das plantas nativas, reservas de nutrientes na biomassa vegetal e os processos envolvidos na ciclagem de nutrientes nos ecossistemas naturais (Paiva, 2000).

No Cerrado a fecundação cruzada é predominante ocorrendo, freqüentemente, aliada à reprodução assexuada. O transporte do pólen e a disseminação das sementes são realizados comumente por animais. A distribuição espacial das populações vegetais no Cerrado é geralmente do tipo agregado e a ocorrência de incêndios em períodos de seca pode favorecer os episódios de re-colonização, contribuindo para o mosaicismo genético e espacial. De acordo com estudos da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia ([www.cenargen.embrapa.br](http://www.cenargen.embrapa.br)), o Cerrado é o Bioma que vem sofrendo maior pressão antrópica no Brasil, pressão essa que ocorre primordialmente, pela expansão da fronteira agrícola, onde a vegetação natural é substituída por monoculturas agrícolas, reflorestamentos monoespecíficos e pastagens, sem deixar amostras das formações de vegetações que possam

funcionar como banco genético e refúgio da fauna e da flora. Deste modo a conservação *in situ* é uma alternativa que prioriza a proteção do habitat, permitindo a contínua evolução de espécies e a manutenção da diversidade intra e interespecífica de populações, indivíduos e genes.

### **Fragmentação de ecossistemas e efeitos genéticos**

A constante ocupação humana de sistemas naturais, bem como a utilização indiscriminada dos recursos, aliada à expansão agrícola, resultam em crescente fragmentação dos ecossistemas naturais e degradação dos solos. Entre as principais conseqüências da fragmentação estão a perda de diversidade e o aumento expressivo de taxas de extinção das espécies. A diminuição das áreas e o isolamento inviabilizam as relações ecológicas e criam barreiras que diminuem a dispersão dos organismos entre os remanescentes de vegetação, diminuindo o número de dispersores de sementes e de polinizadores o que afeta diretamente comunidades vegetais que dependem destes vetores (Brooker *et al.*, 1999, Castro, 2004). O isolamento tem efeito negativo sobre a riqueza, diminuindo a taxa (ou o potencial) de imigração ou recolonização (Hanson *et al.*, 1990). Dessa forma, essas “ilhas” de fragmentos encontram-se em equilíbrio quando há um balanço dinâmico entre espécies em termo de migração e extinção local. O empobrecimento gradativo dos remanescentes em diversidade biológica, em funções ecológicas e em qualidade de vida das populações originais, também pode ser citado como conseqüência da fragmentação (Viana, 1990, Souza & Silva, 1994, Viana & Tabanez, 1996, Castro, 2004).

A destruição de habitats e a conseqüente fragmentação de populações naturais podem acarretar uma limitação evolutiva para as espécies que os compõem, devido à perda de variabilidade genética e a conseqüente redução da capacidade de adaptação às mudanças ambientais (Barret & Kohn, 1991). A fragmentação de habitats pode levar à perda de variação genética por duas vias, i) a redução do tamanho populacional cria gargalos genéticos, uma vez que os indivíduos remanescentes contêm apenas uma pequena amostra do conjunto gênico original e ii) como conseqüência, a pequena população remanescente, caso permaneça isolada por muitas gerações, terá contínua perda de alelos devido à deriva genética. O gargalo genético contribui para a perda de alelos, especialmente os raros e isso é mais efetivo do que a perda de heterozigidade (Barret & Korn, 1991, Charlesworth & Charlesworth, 1987, Souza *et al.*, 2004).

De acordo com estudos sobre a fragmentação de ecossistemas, publicados pelo Ministério do Meio Ambiente em 2003, as maiores causas antrópicas de fragmentação são a extração de madeira; a supressão da floresta por meio de queimadas; a substituição da cobertura florestal nativa por reflorestamento com espécies exóticas; a expansão das atividades agropecuárias que substituem os remanescentes por pastagens e áreas de cultivo; práticas agrícolas cada vez mais mecanizadas; a ocupação de terras por movimentos sociais que tem dificuldades em manter a cobertura florestal; o padrão da estrutura fundiária existente que dificulta a proteção das florestas e propicia a ações que geram perturbações nas áreas dos remanescentes florestais; a política de Reforma Agrária do Ministério do Desenvolvimento Agrário/INCRA; o crescimento urbano desordenado; pressão de turismo; a caça e a captura de animais silvestres e as obras de saneamento ambiental que alteram cursos de rios (Colli *et al*, 2003).

Nas últimas décadas verificou-se uma preocupação crescente com questões ambientais globais, decorrentes principalmente pela degradação do meio ambiente, práticas não-sustentáveis de uso dos recursos naturais, e acarretando perda acelerada da diversidade biológica. Em consequência, diversos documentos na área de meio ambiente foram elaborados e negociados em diversos países e a necessidade de efetuar esforços destinados à proteção, conservação e uso sustentável da diversidade biológica passou a ser definida como uma prioridade internacional, assim como é fundamental elaborar-se instrumentos legais que envolvam todos os aspectos e componentes relacionados à biodiversidade (Amaral, 2006).

A partir de 1990 ocorreram várias negociações sobre a Meio Ambiente entre vários países e criou-se a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), cujos três princípios norteadores são: i) a diversidade biológica deve ser conservada; ii) a utilização dos recursos genéticos deve se dar de maneira sustentável e iii) os benefícios advindos da utilização dos recursos genéticos devem ser repartidos de modo justo e equitativo (Dias, 1996, Glowka, 1996).

Partindo destes princípios, leis e decretos adicionais foram criados no Brasil de acordo com a CDB, mas apesar de todo esse arcabouço legal, as taxas de desmatamento e perdas de biodiversidade continuam alarmantes, levando a perdas irreversíveis de habitat e de espécies, seja no Cerrado, seja na Mata Atlântica ou na Floresta Amazônica.

## Variabilidade Genética

Nos últimos anos tem crescido a preocupação com o conhecimento da nossa biodiversidade no que diz respeito a sua variabilidade genética, principalmente em função do crescente aumento da erosão dos recursos genéticos (Ehrlich, 1997).

A variação genética dentro das espécies é um componente fundamental da diversidade biológica. A distribuição desta variação dentro das espécies é modelada por processos extrínsecos, tais como eventos ecológicos ou regimes seletivos, bem como por fatores intrínsecos, tais como o sistema reprodutivo. Quando considerada em um contexto geográfico, a estrutura desta variação é um produto do fluxo de troca genética, bem como das relações históricas entre as populações (Caicedo, A.L e Schaal, B.A, 2004).

Em alguns estudos da caracterização da taxa de cruzamento em diferentes locais e/ou anos, algumas espécies revelaram uma constância no padrão de movimento caracterizado pela taxa de cruzamento, enquanto outras mostraram variações associadas a fatores abióticos ou bióticos, dentre eles a densidade de floração, a presença de polinizadores e as variações climáticas (Murawsky *et al.*, 1990, Murawsky e Hamrick, 1991, Reis, 1996). Muitas vezes a baixa freqüência de indivíduos floridos implica um aumento da endogamia e/ou da apomixia. Além disso, diversos trabalhos (Murawsky *et al.*, 1990, Murawsky e Hamrick, 1991, 1992a,b e Gandara, 1996) têm revelado heterogeneidade de freqüências alélicas entre pólen e óvulo, indicando que os cruzamentos não aleatórios são relativamente comuns em espécies tropicais. Uma elevada taxa de cruzamento, aliada à alta heterozigosidade (estimadas para a maioria das espécies tropicais) tem um papel relevante, pois a geração posterior poderá apresentar novos recombinantes ou mais recombinantes, o que permitirá adaptação a micro-ambientes e a manutenção da dinâmica populacional (Martins & Jain, 1977, Jain & Martins, 1979). Estes estudos indicam a existência de uma dinâmica movimentação dos alelos dentro das populações. Entretanto, a caracterização das variações existentes, associadas com variações de ambientes (anos, locais) e com a densidade de floração, tem sido enfatizada em diversos estudos que apresentam resultados divergentes.

A expressão “estrutura genética” tem sido empregada em trabalhos que caracterizam os níveis de diversidade genética (porcentagem de polimórficos, número de alelos por loco e heterozigosidade média) e a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações, caracterizando:  $H_T$ ,  $H_S$ , e  $G_{ST}$  (Nei, 1973);  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  e  $F_{ST}$  (Wright, 1951) ou  $F$ ,  $f$  e  $\theta$  (Cockerhan, 1969). No entanto, ainda que esta caracterização possa refletir, de forma razoável, uma organização no espaço, ela é pontual no tempo (Reis, 1996).

Diversos trabalhos têm caracterizado o sistema reprodutivo, em especial a taxa de cruzamento, em populações naturais. Estes estudos são de suma importância porque o sistema reprodutivo é um dos fatores mais diretamente associados aos níveis de diversidade genética e à distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações (Hamrick *et al.*, 1979; Hamrick & Godt, 1990). Além disso, a caracterização da taxa de cruzamento dá uma idéia da movimentação dos alelos no tempo ou entre duas gerações num nível espacial restrito.

O padrão de movimentação dos alelos dentro das populações, caracterizado pela taxa de cruzamento, pode ser mais constante ou apresentar variações associadas com fatores abióticos ou bióticos, tais como a densidade de floração, presença de polinizadores e variações climáticas. O fluxo gênico caracteriza um movimento de alelos de forma mais ampla no espaço (Reis, 1996) e de acordo com Slatkin (1985), fluxo gênico é um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam na movimentação dos alelos de uma população para outra. Futuyma (1997) descreve que, se a taxa de fluxo gênico entre duas populações for muito alta (em torno de 0,5), as duas populações são, na verdade, uma população panmítica, cujo tamanho total é a soma das duas. Portanto, a taxa de fluxo gênico influencia o tamanho efetivo da população.

Considerando a importância de *S. lycocarpum* como planta pioneira e potencialmente útil na recuperação de áreas degradadas bem como sua ampla distribuição no território brasileiro torna-se importante conhecer sua diversidade. Esta informação pode ser útil na identificação de populações que tenham maior capacidade de ocupar áreas desprovidas de vegetação.

### **Marcadores Moleculares Microsatélites e Aplicações**

Microsatélites são seqüências de DNA constituídas por 1 a 6 nucleotídeos, repetidas lado a lado (em *tandem*), e representam regiões instáveis do genoma. Os alelos diferem porque mostram números distintos destas repetições, oriundos de permuta desigual durante a meiose ou do deslize da DNA polimerase durante a duplicação da molécula (Pinto *et al.*, 2001). As variações no número de repetições (*motifs* ou motivos) são reveladas por PCR usando iniciadores (*primers*) específicos para reconhecer as regiões que flanqueiam a seqüência do microsatélite. O elevado conteúdo informativo dos locos de microsatélites aliado à segregação codominante, o alto grau de polimorfismo, o potencial de automação e a necessidade de baixas concentrações de DNA para iniciar a amplificação em PCR, conferem a este tipo de marcador genético uma ampla utilização em muitos processos de investigação genética (Goldstein & Schlötterer, 2000). A grande vantagem do uso de marcadores

microssatélites está associada ao fato destes revelarem um único loco, freqüentemente multialélico. A relativa abundância e cobertura extensiva do genoma, que, ao lado de sua facilidade de detecção e de análise, tem permitido o intercâmbio de dados entre laboratórios (Pinto *et al.*, 2001).

Microssatélites podem estar localizados tanto em regiões que codificam para proteínas quanto em regiões não codificantes (Tóth *et al.*, 2000, Morgante *et al.*, 2002). Pesquisas mais recentes mostraram que nas plantas, as seqüências microssatélites estão associadas, preferencialmente, a regiões não codificantes do genoma, sendo rara sua ocorrência em regiões codificadoras de proteínas (Li *et al.*, 2002, Morgante *et al.*, 2002).

A aplicação de marcadores moleculares tem sido muito comum em estudos de diversidade genética, estrutura e diferenciação de populações, fluxo gênico, introgressão, filogenia e evolução gênica. Várias análises populacionais baseadas em marcadores têm esclarecido a história evolucionária de muitas espécies arbóreas (Wang & Szmid, 2001). Os marcadores microssatélites podem ser utilizados sozinhos ou em conjunto com outros marcadores na avaliação do impacto causado pela fragmentação do habitat na estrutura destas populações endêmicas ou não, além de ser uma valiosa ferramenta que auxilia programas de melhoramento vegetal de espécies comerciais a partir da caracterização de germoplasma, na seleção de progênies, na construção de mapas genéticos e na identificação de cultivares. Eles podem auxiliar nos esforços de se entender o passado, o presente e as possibilidades futuras do fluxo gênico. Os séculos de domesticação da batata nos Andes, por exemplo, foi um complexo processo de fluxo gênico ligado ao início da hibridação inter e intra-específica de *Solanum stenotomum* cultivado com espécies selvagens, como a *S. sparsipilum*, ou pela autoploidização (Ghislain *et al.*, 2000). Em um estudo sobre a estruturação genética de populações, utilizando marcadores genéticos diferentes, Freville *et al.* (2001) analisaram seis locos microssatélite e cinco locos de aloenzimas, cujos resultados revelaram uma grande diferenciação entre as populações restritas da planta endêmica *Centaurea corymbosa* Porret (Asteraceae).

O crescente número de estudos realizados a partir de marcadores genéticos moleculares visando à compreensão da distribuição de alelos e de sua movimentação dentro e entre populações só vem corroborar com sua importância e eficiência no estudo das relações genéticas que descrevem a estrutura das populações em diversos meios e em sob diferentes condições.



Muitos trabalhos enfocando as propriedades medicinais têm sido conduzidos para *Solanum lycocarpum*, entretanto, são raros os trabalhos sobre a investigação genética da espécie. Um estudo de caracterização da variabilidade genética de três populações de *S. lycocarpum*, realizado por Zelandi (2001) a partir do emprego de marcadores moleculares do RAPD, revelou diferenças nas quantidades de variabilidade dentro das populações e grande variabilidade entre elas para este tipo de marcador, separando completamente seus indivíduos em grupos bem definidos e diferenciando-as. Santos *et al* (2002), a partir de marcadores morfológicos verificou a existência de variabilidade genética para porcentagem de germinação, média de comprimento de cotilédones e média de número de folhas entre populações desta espécie (Santos, 2002). Recentemente a transferência de microssatélites nucleares de *Capsicum annuum* e de microssatélites cloroplastidiais para *Solanum lycocarpum* foi realizada por Martins *et al.* (2006), em investigação sobre a diversidade genética de populações naturais dessa espécie localizadas em Goiás, os quais permitiram a quantificação do fluxo gênico total. Entretanto, a transferência de microssatélites nucleares heterólogos apresentou-se trabalhosa e o nível de polimorfismo obtido para eles foi menor que o polimorfismo detectado para um mesmo número de microssatélites cloroplastidiais.

**ARTIGO (redigido conforme as normas do periódico *Molecular Ecology*)**

## ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Solanum lycocarpum* St Hil (SOLANACEAE). DO ESTADO DE SÃO PAULO

**Edna Maria Zelandi**<sup>1</sup>, Marcos Aparecido Gimenes<sup>1,2</sup>, Catalina Romero Lopes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Instituto Agrônômico de Campina (IAC), Campinas, SP, Brasil.

### RESUMO

*Solanum lycocarpum* St Hil, uma solanácea considerada medicinal e conhecida por fruta-do-lobo ou lobeira, é um componente fundamental da dieta de vários animais do Cerrado, especialmente do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), considerado o maior dispersor da espécie. Dentre os compostos bioativos encontrados na *S. lycocarpum*, aos quais são atribuídas ações hipoglicemiantes e antiinflamatórias, encontram-se também os glicoalcalóides - característicos do Gênero *Solanum* -, tais como a solasodina, um potencial precursor para a síntese de estrógenos e solamargina, cuja atividade demonstrou-se eficiente no tratamento de linhagens de células cancerígenas resistentes a quimioterápicos, relacionando-a com a interrupção da expressão de alguns oncogenes responsáveis pelo desenvolvimento desta resistência. Devido ao seu promissor potencial medicinal e a comprovada importância ambiental, a estrutura genética de populações de *S. lycocarpum* foi investigada utilizando-se marcadores moleculares microssatélites (SSR) desenvolvidos exclusivamente para esta espécie. De um total de vinte e oito iniciadores (*primers*) desenhados a partir de bibliotecas enriquecidas para microssatélites, oito deles amplificaram locos polimórficos analisáveis, gerando um total de trinta e nove alelos (média de 4,87 alelos/loco) quando avaliados em três populações de *S. lycocarpum* geograficamente distantes localizadas no Estado de São Paulo. As análises estatísticas obtidas por meio dos programas computacionais PopGene e TFPGA revelaram que dentro das populações o número efetivo de alelos ( $n_e$ ) variou, ocorreram oscilações nas frequências alélicas, mostrando que alguns alelos estão se fixando, e outros são raros, as médias de heterozigosidade observadas foram menores que as esperadas nas três populações, e a média geral de heterozigosidade para o conjunto de

populações foi de 0,3136. As análises multipopulacionais realizadas por meio das Estatísticas-F, revelaram os seguintes valores: 0,3900 para o Coeficiente de Endogamia intrapopulacional ( $F_{IS}$  ou  $f$ ), 0,4848 para a Endogamia total da espécie ( $F_{IT}$  ou  $F$ ) e 0,1554 para a Divergência Genética (variação) entre as populações ( $F_{ST}$  ou  $\theta$ ), indicando elevados índices de endogamia nessas populações de *S. lycocarpum*, embora estudos relatem que não é comum nesta espécie o cruzamento entre parentes. Talvez consista uma estratégia de sobrevivência frente ao isolamento e à falta, tanto de polinizadores quanto de dispersores de longa distância. De acordo com valores de distâncias de Nei (1972) obtidos das análises multipopulacionais realizadas pelo programa Popgene e utilizando-se o método de agrupamento UPGMA, dois grupos foram formados, um comportando as populações de Assis e Botucatu que se revelaram geneticamente menos distantes e o outro formado pela população de Martinópolis, cujas distâncias genéticas foram maiores. A comparação dos dados obtidos por meio de SSR com dados prévios de RAPD foram complementares, mostrando que, mesmo com o aumento do tamanho populacional, a população de *S. lycocarpum* de Martinópolis é a mais endogâmica, tendo apresentado, anteriormente, menor variabilidade genética para marcadores RAPD, enquanto que, apesar da redução do tamanho populacional e das aparentes injúrias morfológicas, a população de Assis continua dispondo de maior diversidade genética, apresentando menor índice de endogamia e maior índice de heterozigosidade em relação à população de Martinópolis, para os marcadores SSR. Análises anteriores utilizando-se marcadores RAPD haviam revelado menor variabilidade genética para a população de *S. lycocarpum* de Martinópolis.

**Palavras –chave:** *Solanum lycocarpum*, bibliotecas enriquecidas, microssatélites, genética de populações

## INTRODUÇÃO

Solanaceae é uma grande família de vegetais que comporta Gêneros de grande interesse econômico devido às suas propriedades nutritivas, dentre esses se encontra o Gênero *Solanum*, ao qual pertencem espécies cultivadas há séculos devido à sua histórica utilização na alimentação humana, tais como a *Solanum tuberosum* (batata) e a *Solanum melongena* (berinjela). Muitas outras espécies desse gênero são ainda pouco conhecidas e têm potencial pouco explorado, como por exemplo, a *S. saponaceum*, a qual é utilizada no Peru como um alvejante natural para roupas, devido à presença de saponinas na sua constituição (Hoehne, 1939).

A *S. lycocarpum* St. Hil, por sua vez, apresenta compostos bioativos que auxiliam no tratamento do *Diabetes mellitus* tipo 2 (Bragança, 1996) e que tem revelado seu potencial para síntese de estrógenos devido à presença de solasodina, que é uma substância intermediária na síntese desses hormônios e que pode substituir a diosgenina (Sato *et al*, 1957; 1960; Suvarov, Murashewa, 1959; Motidome *et al*, 1970, Jaggi & Kapoor, 1994, Vieira, 1999). Além da solasodina se encontra também o glicoalcalóide solamargina que apresenta ação inibidora da proliferação de linhagens de células tumorais de câncer de pulmão resistentes aos quimioterápicos, interferindo na expressão de determinados oncogenes, uma vez que leva as células tumorais à apoptose (Liang *et al.*, 2004).

A *Solanum lycocarpum* St. Hil é uma planta pioneira (Santos *et al*, 2002), nativa do Cerrado (Savana brasileira) e é conhecida como fruta-do-lobo ou lobeira devido ao fato de fazer parte da dieta alimentar natural do lobo-guará (*Chrysocyum brachyurus*), um canídeo que habita os cerrados e que se encontra em risco de extinção.

O Cerrado é um Bioma caracterizado pela elevada diversidade biológica, mas atualmente é o Bioma mais atingido pelas interferências antrópicas, sendo pressionado pela imposição de monoculturas, por atividades agropecuárias e pelos reflorestamentos monoespecíficos ([www.cenargen.embrapa.br](http://www.cenargen.embrapa.br)), o que é agravado por ser considerado como área de expansão agrícola. A conservação dos Biomas, inclusive o Bioma Cerrado, embora seja conflitante com os interesses socioeconômicos, é uma necessidade para a garantia da biodiversidade e do equilíbrio biológico e conseqüentemente, das espécies pertencentes a esses Biomas, das quais muitas são endêmicas.

Um dos fatores mais importantes para a conservação é o conhecimento da diversidade genética e da estrutura genética das populações naturais, bem como a avaliação das alterações

ocorridas nesta estrutura devido às modificações dos ecossistemas e uma das maneiras de se obter esse conhecimento é a investigação a partir do emprego de marcadores genéticos. Este tipo de marcadores detecta padrões de estrutura de populações que dependem de forças que afetam igualmente todos os locos, tais como o fluxo gênico e deriva genética, mas também de fatores que agem diferentemente em cada loco, tais como as forças seletivas, processos de mutação e tipo de herança (Freville *et al.*, 2001). Dentre os marcadores genéticos, encontram-se os marcadores moleculares microssatélites, também denominados SSR (*Simple Sequence Repeats*), que têm sido amplamente utilizados para análise genética por causa de sua abundância, facilidade de ser reconhecido no genoma, seu alto nível de polimorfismo e sua fácil detecção via sistemas automatizados (Rafalsky & Tingey, 1993) e também devido ao fato de permitir a análise de locos codominantes (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Pinto *et al.*, 2001), fator que os tornam muito mais informativos. Na área de Biologia da Conservação esses marcadores têm sido usados em investigações de espécies raras, pois muitas vezes os resultados são limitados quando utilizados outros marcadores genéticos (Goldstein & Schlötterer, 1999). Com base nestas informações e com intuito de se obter um melhor conhecimento sobre a diversidade genética e a estrutura genética de populações da espécie *S. lycocarpum*, bem como verificar sua resposta frente às modificações ambientais, foram desenvolvidos marcadores microssatélites específicos para *S. lycocarpum* e a análise da sua estrutura genética por meio destes poderão sugerir os efeitos da fragmentação, da redução do habitat e do isolamento de populações desta espécie. Essas informações poderão ser úteis para desenvolvimento de programas de manejo e conservação, bem como para o possível cultivo e aproveitamento econômico da espécie de forma racional, sejam eles direcionados à indústria farmacêutica brasileira (isolamento de compostos), à medicina natural bem fundamentada e orientada (atendimento primário) ou para recuperação de áreas degradadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal e extração de DNA

Para a construção das bibliotecas genômicas, para o teste de polimorfismo e análise da estrutura genética de populações, por meio dos locos microssatélites, foram coletadas amostras foliares de 35 indivíduos de uma população de *Solanum lycocarpum* St Hil de margens de estrada e adjacências do município de Martinópolis e 39 indivíduos de uma população do município de Botucatu e 35 indivíduos de uma população do Instituto Florestal de Assis todos do Estado de São Paulo. Cada indivíduo amostrado foi georeferenciado com o auxílio de aparelho GPS (modelo Geko 101, Garmin). As coordenadas geográficas aproximadas de cada população podem ser observadas na Tabela 01. Todas as coletas foram realizadas com autorização do IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e da COTEC (Comissão Técnica Científica/Secretaria do Meio Ambiente). Os DNA genômicos foram extraídos de acordo com protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1996), com modificações do tampão utilizados (CTAB 3%), preparado de acordo com Manual de Laboratório *Cold Spring Harbor Laboratory* (volume 1). A qualidade e a quantidade dos DNA foram estimadas por meio de comparações com DNA lambda de pesos conhecidos em gel de agarose 1%.

### Construção das bibliotecas genômicas enriquecidas para microssatélites

As bibliotecas genômicas foram construídas a partir de dois protocolos de enriquecimento para microssatélites, um adaptado de Cristofani *et al.* (1998) e outro adaptado de protocolo utilizado pelo Laboratório de Análise Genética e Molecular – CBMEG – UNICAMP/IAC (Billote *et al.*, 1999). O enriquecimento realizado de acordo com o protocolo de Cristofani *et al.* (1998) partiu da digestão paralela de 6µg de DNA genômico com 10U de enzimas de restrição *Sau3AI* (Amersham Biosciences) e *RsaI* (Promega). O resgate e a purificação dos fragmentos entre 400 e 1000bp, foram realizados a partir de protocolo de extração fenol/clorofórmio. Os fragmentos resgatados foram ligados aos adaptadores 5'**pho**-cagcctagagccgaattcacc3' e 5'gatcggtgaattcggctctaggctg3' específicos para fragmentos oriundos de cortes com enzimas de restrição *Sau3AI* ou aos adaptadores 5'**pho**-gcttctgctagcaaggccttaga3' e 5'gtaaggccttgctagcagaagc3', compatíveis com os cortes da enzima *RsaI*. O enriquecimento realizado de acordo com o protocolo utilizado pelo Laboratório de Análise Genética e Molecular - CBMEG (UNICAMP/IAC – Campinas)

requeriu a digestão de 5µg de DNA genômico de *S. lycocarpum* com 50U de enzima de restrição *RsaI*. A purificação do material digerido foi realizada após uma pré-amplificação via PCR, utilizando-se o *kit* de purificação de DNA *Quiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen), já com os fragmentos aos adaptadores específicos.

### **Enriquecimento das bibliotecas genômicas**

No protocolo de enriquecimento das bibliotecas para microssatélites baseado em Cristofani, os fragmentos foram hibridados com “sondas” de oligonucleotídeos biotinizados (AC)<sub>15</sub> e (TTC)<sub>10</sub>, em tratamentos separados. No enriquecimento a partir do protocolo utilizado de Billote *et al.* (1999), foram adicionados dois tipos de oligonucleotídeos (GT)<sub>8</sub> e (CT)<sub>8</sub>, simultaneamente, num mesmo tratamento. Em ambos protocolos a recuperação das frações enriquecidas foram realizadas com partículas magnéticas ligadas com estreptavidina (*Streptavidin Magnetsphere Paramagnetic Particle*) da Promega (Madison, WI, USA), possibilita toda manipulação devido à atração da biotina com a estreptavidina

### **Clonagem, confirmação dos insertos e manutenção dos clones**

Alíquotas dos DNA enriquecidos foram submetidas à amplificação utilizando-se o adaptador de seqüência curta como *primer*, com a finalidade de se obter maior quantidade de fragmentos de fita dupla para serem clonados. Os fragmentos amplificados foram inseridos em vetor plasmidial pGEM-T (Promega - Madison, WI, USA) e clonados em células competentes da linhagem DH5α de *Escherichia coli* (Life Technologies), conforme protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). As células “transformadas” foram plaqueadas em meio LB-agar contendo ampicilina (100µg/ml), 100mM de IPTG e X-gal (50 mg/ml), incubadas por 16 horas a 37° C e os clones positivos foram transferidos para placas ELISA contendo meio 2YT-HMFM + ampicilina (100µg/ml), incubados por 16 horas a 37°C e armazenadas em freezer -80°C. Alíquotas dos clones positivos estocados foram amplificadas em reação de PCR a 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 10µM do adaptador curto *Rsa* 21 utilizado como *primer* (ou M13). Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio.

### **Inoculação e extração plasmidial**

A extração plasmidial foi realizada somente para as bibliotecas construídas a partir do protocolo de Billote *et al.* (1999). Dez microlitros de solução contendo clones positivos foram

transferidos das placas ELISA para megaplaças contendo 1 ml de meio *Circle Grow* + ampicilina (100µg/ml) por poço. Foram incubados por 22h a 37° C em *shaker* a 250rpm. A extração de DNA plasmidial foi realizada conforme protocolo de Billote *et al.* (1999). Os DNA plasmidiais foram confirmados por visualização em gel de agarose 1% após eletroforese 120V/30 minutos, em seguida foram purificados e amplificados por reação de PCR e seqüenciados.

### **Seqüenciamento**

Os DNA plasmidiais foram amplificados conforme indicado para o *Kit Big Dye Terminator* (Applied Biosystems, CA, USA). Para amplificação dos produtos obtidos da biblioteca construída conforme Cristofani *et al.* (1998) utilizou-se os *primers* M13 *forward* e *reverse* e o seqüenciamento foi realizado no Laboratório BIOGEM – Departamento de Genética – IBB (UNESP/Botucatu) em seqüenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Os DNA plasmidiais obtidos dos clones das bibliotecas construídas conforme protocolo do Laboratório de Análise Genética e Molecular (CBMEG – UNICAMP/IAC – Campinas) foram amplificados com o *primer* SP6 e as reações seqüenciadas no Centro de Citricultura (IAC/Cordeirópolis) em seqüenciador ABI Prism 3700 (Applied Biosystems).

### **Desenho de *primers* (iniciadores) para microssatélites espécie-específicos**

As seqüências obtidas foram submetidas à análise de qualidade e à eliminação das seqüências do vetor e dos adaptadores, com o auxílio do programas computacionais PhrePhrap e *Sequencer* (Genecodes Corp., Ann Arbor, MI, USA). Os pares de *primers forward* e *reverse* foram desenhados com o auxílio do programa computacional *Primer 3* (Rozen & Skaletsky, 1997), respeitando-se os seguintes critérios: Tm (temperatura de anelamento) entre 50 e 60° C; máximo 55% de conteúdo CG, tamanho mínimo esperado dos produtos de PCR de 150 a 350bp e terem no mínimo 18 e no máximo 24 nucleotídeos sem seqüências repetitivas. Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen e pela Dialab.

### **Amplificação de DNA e eletroforese**

As reações de amplificação foram realizadas com 15 ng de DNA genômico, 1U de *Taq* DNA polimerase (Biotools), tampão de PCR 1X (200mM Tris pH 8,4, 500mM KCl), 1,5 a 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP e 0,3 µM de cada *primer* em um volume final de 10 µl. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research, Inc.,



Watertown, MA, USA) e os programas de amplificação seguiram as seguintes condições: 95° C por 5 minutos, seguidos de 33 ciclos de 94° C por 45 segundos, 1 minuto a temperatura específica de cada *primer* (Tabela 02), 72° C por 1 minuto e após os ciclos, uma extensão final de 10 minutos a 72° C. Os produtos da amplificação receberam 5µl de tampão de carregamento (contendo 95% de formamida) e foram desnaturados a 95° C por 10 minutos. Imediatamente após, foram colocados em gelo e carregados em gel de acrilamida desnaturante (5%), previamente aquecido por 1 hora. O processo de separação dos fragmentos por eletroforese foi realizado com tampão TBE 1X, por 1 hora e 30 minutos a 2 horas a 60W. Os fragmentos foram visualizados após coloração com nitrato de prata, realizada conforme protocolo descrito por Creste *et al.* (2001), os géis foram fotografados com câmera digital e as fotos arquivadas em computador.

### **Amostragem e Condições ambientais**

As amostragens dos indivíduos da espécie *S. lycocarpum* foram realizadas em populações geograficamente distantes umas das outras, sendo aproximadamente 130km entre a população de Martinópolis e a população de Assis e de aproximadamente 230km separando as populações de Assis e de Botucatu. Observou-se uma diferença na estrutura física das populações de *S. lycocarpum* de Assis e de Martinópolis, quando comparadas ao que se observava há seis anos (Zelandi, 2001). A população de Assis, embora se encontre em uma área pertencente ao Instituto Florestal de Assis, teve seu tamanho reduzido. Por ser uma espécie que prefere espaços abertos, de vegetação baixa e muita luz, normalmente ela é encontrada nas proximidades de áreas perturbadas, onde a vegetação densa foi removida ou onde ocorram espécies herbáceas, como pastagens. Esta população se encontra no entorno da Sede do Instituto Florestal e teve seu espaço físico reduzido por intervenções de remodelagem do acesso ao Instituto, com ampliação da estrada e por construções de faixas de segurança contra incêndios. Observou-se que nesta população a maioria dos indivíduos é bem jovem e alguns indivíduos estão injuriados, acometidos por manchas circulares pequenas e pretas na face abaxial das folhas, podendo ser alguma infecção fúngica, fator que também dificultou a coleta. A maioria dos indivíduos não apresentava flores e alguns poucos se apresentavam bem floridos e com quantidade razoável de frutos. A população de Martinópolis está localizada às margens de uma estrada e em áreas circundantes compostas por pastos e espécies esparsas características de Campos Cerrados. Esta população aumentou e os indivíduos estão saudáveis, apresentando mais indivíduos floridos, mas poucos com frutos, o que não se

percebia há seis anos, quando se encontravam injuriados devido a uma aparente competição com um tipo de trepadeira que crescia sobre elas. A população de Botucatu é a que ocupa a maior área, é a mais diversificada com relação à etapa de desenvolvimento dos seus indivíduos e se encontra nas margens de uma estrada e seus arredores, cuja composição varia entre áreas de cultivo de espécies exóticas, pastagens ou áreas que parecem abandonadas. Esta população parece muito saudável, muito florida e com mais indivíduos frutificando.

### **Genética Descritiva**

As análises estatísticas da diversidade genética e da estrutura genética foram realizadas através da interpretação dos valores estimados pela avaliação dos padrões de polimorfismo detectados a partir dos oito locos de microssatélites nas três populações de *S. lycocarpum*, por meio dos programas computacionais PopGene 1.31 (Yeh, 1999) e TFGA 1.3 (Miller, 1997).

### **Coleta e análise dos dados**

Os fragmentos visualizados nos géis foram estimados em pares de base, por comparação com DNA padrão de peso molecular conhecido (*ladder* 10bp, Invitrogen), cuja amplitude é de 10bp a 330bp. As bandas que apresentaram mesma mobilidade foram consideradas idênticas, a presença de banda única foi considerada como alelos em homozigose e alelos nulos não foram considerados para as análises. Os alelos foram identificados com letras alfabéticas de acordo com escala decrescente do tamanho dos fragmentos, ou seja, de A a F, do mais pesado para o mais leve. Os dados coletados foram organizados em planilhas e convertidos para os formatos exigidos para as análises computacionais. Os seguintes parâmetros foram estimados por meio dos programas PopGene versão 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) e TFGA versão 1.3 (Miller, 1997) para a quantificação da diversidade genética dentro das populações de *S. lycocarpum*: frequências alélicas, heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), porcentagem de locos polimórficos (P), índice de fixação de Wright (f) 1965 e número de alelos observados ( $n_a$ ) e efetivos ( $n_e$ ) por loco ( $n_e = \frac{1}{\sum p^2}$ ). Enquanto que a estrutura genética foi caracterizada pela análise da variância das frequências alélicas, pelos resultados obtidos das Estatísticas-F, sendo o índice de fixação total dentro das populações ( $F_{IS}$ ); índice de fixação total das populações ( $F_{IT}$ ) e divergência genética entre populações ( $F_{ST}$ ) de acordo com método de Hartl & Clark (1989), o número observado ( $n_o$ ) e efetivo ( $n_e$ ) de alelos por loco, fluxo gênico aparente ( $Nm_a$ ) e

número de locos polimórficos. A partir das identidades e distâncias de Nei (1972, 1978) as populações foram organizadas e agrupadas de acordo com suas relações genéticas pelo critério de agrupamento UPGMA.

## **RESULTADOS**

### **Identificação dos microssatélites e desenho dos *primers***

Foram seqüenciados no sentido *forward*, 131 clones obtidos das bibliotecas construídas a partir do protocolo de enriquecimento de Cristofani *et al* (2001). De 103 clones de bibliotecas enriquecidas para TTC, 46 continham seqüências SSR (44,7%) e de 28 clones enriquecidos para AC, 22 continham repetições SSR (78%). Destas 131 seqüências, foi possível desenhar 9 pares de *primers* (6,9%). Das bibliotecas enriquecidas a partir do protocolo de Billote *et al.* (1999), 96 clones foram amplificados. Destes, 58 seqüências foram examinadas, das quais 27 continham repetições SSR (46,5%) a partir das quais foi possível desenhar 21 pares de *primers* (36,2%), totalizando 30 pares de *primers* oriundos dos dois métodos de enriquecimento. Várias das seqüências oriundas de enriquecimento para TTC apresentaram repetições muito longas, chegando até a 60 repetições, algumas vezes intercaladas por repetições da seqüência TTCCTC. A maioria das seqüências que apresentaram repetições foi curta e/ou as repetições se encontravam muito próximas dos adaptadores ou do vetor, impossibilitando o desenho de *primers*. Do total de 227 clones positivos foram desenhados e sintetizados 30 pares de *primers*, o que equivale a 13,2% de aproveitamento das bibliotecas.

### **Avaliação dos iniciadores e detecção de polimorfismo em *S. lycocarpum***

Os *primers* sintetizados foram identificados pela primeira letra do gênero em letra maiúscula, seguida pelas duas primeiras letras da espécie em letra minúscula e o número da seqüência de desenho. Os 30 pares de *primers* foram sintetizados e testados para a avaliação dos padrões de amplificação em 10 indivíduos de cada uma das três populações investigadas. Estes *primers* foram testados quanto a sua capacidade de amplificação e de detecção de polimorfismo, sendo que somente 10 deles amplificaram locos polimórficos (33,3%), 12 não amplificaram (40%), 6 apresentaram padrões de bandas não analisáveis (20%) mesmo após os esforços de padronização e 2 amplificaram locos monomórficos (6,7%). Dos dez locos polimórficos, dois foram excluídos das análises finais, uma vez que o loco Sly21 apresentou

um polimorfismo muito baixo quanto à distribuição dos alelos nas três populações e o Sly06 mostrou ser redundante com o par de *primer* Sly07. O *primer* Sly04 amplificou loco duplicado, mesmo depois de várias tentativas de otimização das reações. Os *primers* selecionados para a análise apresentaram tipos e constituições nucleotídicas diferentes, sendo 4 dinucleotídicos e 2 trinucleotídicos perfeitos (75%), 1 dinucleotídico imperfeito (12,5%) e 1 composto imperfeito (12,5%) e podem ser observados na Tabela 03. As seqüências de cada par de *primers*, seus respectivos *motifs* (motivos que se repetem), as temperaturas de anelamento e as concentrações de MgCl<sub>2</sub> e suas amplitudes alélicas, específicas de cada loco, podem ser observados na Tabela 02. Os locos de microssatélites apresentaram padrões de amplificação contendo um ou dois fragmentos. Os fragmentos únicos foram considerados alelos em homozigose e os fragmentos duplos considerados heterozigotos, por se tratar de marcadores codominantes e por ser a *S. lycocarpum* uma espécie diplóide. Foram observados 39 alelos diferentes para o conjunto de oito locos polimórficos e o número de alelos por loco variou de 3, nos locos Sly02 e Sly23, a 6 nos locos Sly04, Sly07, Sly13, Sly27, apresentando uma média de 4,87 alelos por loco (Tabela 03).

### **Diversidade Genética**

Uma observação comum às três populações é que alguns indivíduos apresentam muitos frutos, mas o número de indivíduos que frutificam é baixo, pelo menos nestas populações. Observou-se, de maneira geral, que alguns indivíduos têm bem menos espinhos e que há uma variação na textura das folhas, sendo algumas muito coreáceas e outras mais finas e macias, independente da aparente idade desses indivíduos.

As análises da variabilidade genética existente dentro das populações de *S. lycocarpum* a partir das estatísticas estimadas pelos programas computacionais revelaram que, com exceção dos locos Sly02, Sly07 e Sly25 da população de Assis, Sly02 de Botucatu e Sly02, Sly07 e Sly23 da população de Martinópolis, os locos restantes (70,8%) apresentaram desvios entre as freqüências genotípicas esperadas e as observadas, com valores insignificantes quando sujeitos ao Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 04), o que pode ser efeito de deriva genética aliada ao sistema reprodutivo ou da fragmentação, devido ao isolamento e ao tamanho limitado das populações. As freqüências alélicas oscilaram na maioria dos locos e estes dados podem ser observados nas Tabelas 05 (a, b e c). A freqüência dos alelos A, B e C do loco Sly02 foram idênticas nas populações de Assis e de Martinópolis, tendo o alelo B as freqüências mais elevadas nas três populações (0,7963 em Assis e

Martinópolis e 0,8276 em Botucatu). O loco Sly04 apresentou frequências bem baixas para os alelos A (0,0312) presente somente na população de Botucatu e F (0,0312) observado somente na população de Martinópolis. No loco Sly07 observou-se frequência elevada para o alelo E nas populações de Assis (0,7969) e de Martinópolis (0,8281) e uma baixa frequência para o alelo A (0,0938) exclusivo da população de Martinópolis. No loco Sly13, com exceção do alelo D (cuja frequência na população de Martinópolis foi de 0,6250), todos os demais alelos estiveram presentes em frequências que variaram entre 0,0385 e 0,3269. O alelo C do loco Sly23 apresentou a mais alta frequência para o alelo C na população de Martinópolis, seguida pelo alelo B na população de Botucatu, sendo 0,5417 para Assis e 0,7917 para Martinópolis. O número de alelos no loco Sly25 variou nas três populações, apresentando na população de Assis somente dois alelos, o D com frequência de 0,1429 e o B com frequência de 0,8571 (a mais elevada nas três populações), enquanto que a população de Botucatu apresentou os quatro alelos do loco em frequências mais equilibradas. A população de Martinópolis apresentou os cinco alelos do loco Sly26, dentre eles o alelo E, cuja frequência foi a menor (0,0156) para o conjunto de populações e o alelo A foi exclusivo da população de Martinópolis, ocorrendo em baixa frequência (0,0312). As frequências dos alelos no loco Sly27 não apresentaram grandes discrepâncias, e com exceção pelo alelo F (exclusivo da população de Assis), os demais alelos estiveram presentes nas três populações. De uma maneira geral as médias de heterozigosidade observadas ( $H_o$ ) nas três populações foram menores do que as médias de heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), tanto as estimadas por Levene (1949) quanto as estimadas por Nei (1973). A população de Botucatu apresentou a maior média de  $H_o$  (0,3417), seguida pelas populações de Assis (0,3278) e Martinópolis (0,2590). Alguns locos apresentaram heterozigosidade observada maior que a esperada como, por exemplo, o loco Sly07 que apresentou  $H_o$  maior que  $H_e$  nas três populações, sendo especialmente elevado na população de Botucatu ( $H_o = 0,9677$ ) e o loco Sly25 cuja  $H_o$  foi maior que a  $H_e$  na população de Assis. Em contra-partida, os locos Sly04 e Sly23 na população de Assis e o loco Sly26 na população de Botucatu apresentaram-se em homozigose ( $H_o = 0$ ), mas, apesar desses valores extremos para alguns locos, a média de heterozigosidade observada para o conjunto de população foi de 0,3136, considerando-se um desvio padrão de 0,1654 (Tabelas 7 **a**, **b** e **c**). O índice de fixação de Wright (1978) ou  $F_{IS}$ , como uma medida de deficiência ou de excesso de heterozigotos, foi calculado para cada um dos alelos de cada um dos locos para cada uma das três populações estudadas. De maneira geral observou-se uma oscilação dos índices de fixação dos mesmos alelos, referentes aos mesmos locos, nas

diferentes populações, como por exemplo, o loco Sly04, cujos alelos (B, C, D e E) estão fixados e o alelo A está ausente na população de Assis, os alelos A e E são raros na população de Botucatu, (podendo ser eliminados do loco com o tempo), enquanto que na população de Martinópolis os alelos B e C também parecem estar em processo de fixação ao passo que os alelos A, D e E já não estão mais presentes. Situações semelhantes ocorrem nos locos Sly23, Sly25 e Sly26, enquanto o loco Sly07 apresenta valores negativos para todos os alelos nas três populações, com exceção do alelo B da população de Botucatu (0,6497) e os alelos B, C e D desapareceram do loco nas populações de Assis e de Martinópolis (Tabelas 07 **a**, **b**, e **c**). O índice de fixação de Wright ou coeficiente de endogamia ( $f$ ) em cada uma das populações foi calculado através da aplicação da equação  $f = 1 - \frac{H_o}{H_e}$  a partir das médias de  $H_e$  e de  $H_o$  de cada população e cujos valores obtidos foram de 0,3558 para a população de Assis, 0,4063 para a população de Botucatu e 0,4453 para a população de Martinópolis. Com base nos valores dos índices de fixação de Wright obtidos para cada população foram calculadas as taxas de cruzamento aparente ( $ta$ ) de cada população a partir da aplicação da equação  $ta = \frac{1-f}{1+f}$ , cujos valores obtidos foram de 0,4751 para Assis, 0,4222 para Botucatu e 0,3838 para Martinópolis (Tabela 08). O número de alelos observados ( $n_a$ ) e de alelos efetivos ( $n_e$ ) por loco, foram estimados de acordo com Kimura e Crow (1964), enquanto que os índices de informação de Shannon, como uma medida de diversidade gênica, foram obtidos de acordo com estimativas de Shannon (1949). O tamanho efetivo ( $N_e$ ) das populações também foi estimado e os respectivos valores para  $N_e$ ,  $n_a$ ,  $n_e$  e  $I$  podem ser vistos na Tabela 09.

### **Estrutura Genética**

A partir das estatísticas estimadas pelos programas computacionais para os parâmetros utilizados na análise da estrutura genética das populações de *Solanum lycocarpum*, observou-se que a distribuição total dos alelos amplificados no conjunto de populações ocorre da seguinte maneira: a maior freqüência observada foi para o alelo B do loco Sly02 (0,8072) seguido pelo alelo E do loco Sly07 e as freqüências mais baixas foram para os alelos E do loco Sly26 (0,0058) seguido pelos alelos A e F do loco Sly04, ambos ocorrendo na mesma freqüência (0,0110) e o loco Sly13 sugere a distribuição dos seus alelos em freqüências mais equilibradas (Tabela 05). A heterozigosidade média observada ( $H_o=0,3136$ ) para o conjunto das populações ( $N=168$ ) foi menor que a média de heterozigosidade esperada ( $H_e=0,6019$ )

para elas (Tabela 10). O índice de fixação de Wright ( $F_{IS}$ ) estimado para o conjunto de populações, como uma medida de deficiência ou de excesso de heterozigotos revelou o menor valor para o loco Sly07 (-0,2030) onde 5 dos 6 alelos que o compõem apresentaram valores negativos ( $F_{IS} < 0$ ), porém o alelo B apresentou um índice de 0,6613. O loco Sly25 apresentou o índice de fixação total mais elevado para o conjunto das populações (0,7627), seguido pelos locos Sly23 (0,7334) e Sly26 (0,7160). Os locos Sly13 e Sly27 sugerem uma distribuição mais equilibrada dos índices de fixação dos alelos, cujos valores totais são de 0,4158 e 0,3703, respectivamente (Tabela 11). O número de alelos observados ( $n_a$ ) e efetivos ( $n_e$ ) para o conjunto de populações, estimados por Kimura e Crow (1964) foram de 4,8750 e 2,8214, respectivamente e o tamanho efetivo do conjunto de populações ( $N_e$ ) foi 168. A análise das Estatísticas-F permitiu ver a distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações estudadas, revelando que o loco Sly07 apresentou o menor índice de fixação (endogamia intrapopulacional) dentro das populações ( $F_{IS} = -0,4203$ ) e também o menor índice de fixação total (endogamia total da espécie) das populações ( $F_{IT} = -0,2051$ ) enquanto que o menor índice de diversidade genética entre as populações ( $F_{ST}$ ) foi apresentado pelo loco Sly02. Em contrapartida, o maior índice de  $F_{IS}$  foi apresentado pelo loco Sly26 (0,7016), enquanto que o maior índice de  $F_{IT}$  foi observado para o loco Sly25 (0,7684) e o loco que apresentou o maior índice de divergência genética entre as populações foi o Sly25. As médias gerais atribuídas aos índices das Estatísticas-F descreveram uma considerável ação endogâmica dentro das populações (0,3900), com uma situação mais crítica ainda com relação à fixação total de alelos entre as populações (0,4848) levando a uma significativa divergência genética entre essas populações (0,1554) consideradas (Tabela 12). Essa diferenciação pôde ser visualizada a partir do tipo de agrupamento permitido para as três populações, a partir das distâncias genéticas de Nei (1972, 1978), utilizando-se o critério de agrupamento UPGMA (Figura 01).

## DISCUSSÃO

### Avaliação das bibliotecas enriquecidas para microssatélites

O protocolo de Billote *et al.* (1999) enriquecimento de bibliotecas de DNA genômico para microssatélites possibilitou um maior aproveitamento com relação à obtenção de *primers* específicos para *Solanum lycocarpum* (36,2%), quando comparado com o rendimento das bibliotecas construídas a partir do protocolo adaptado de Cristofani *et al.* (2001) que foi cerca de 7%. Ambos protocolos foram eficientes no enriquecimento com as seqüências microssatélites, porém muitas seqüências contendo microssatélites não possibilitaram o desenho de *primers* por terem apresentado um comprimento insuficiente enquanto que outras foram interrompidas logo após a seqüência de microssatélite. A proporção entre quantidade inicial de seqüências e a obtenção de pares de *primers* declinou também em bibliotecas construídas para quatro espécies do Gênero *Brassica*, para as quais 39,9% das seqüências apresentaram seqüência flanqueadora de tamanho insuficiente para desenho de *primers* (Squirrell *et al.*, 2003). Seqüências flanqueadoras curtas também dificultaram o desenvolvimento de *primers* para *Echinochloa colona*, sendo elas equivalente a 33% do total das seqüências (Danquah *et al.*, 2002). Alguns clones seqüenciados podem não conter seqüências (falso positivos) ou as seqüências podem ser redundantes e/ou quiméricas (Squirrell *et al.*, 2003) e fatores como esses colaboram com a redução na quantidade de *primers* desenhados, dentre os quais nem todos têm uma amplificação satisfatória ou serão polimórficos. Melhores rendimentos foram conseguidos por Numome *et al.* (2003) que obtiveram uma média de aproveitamento de 70% de 52 seqüências que continham microssatélites para o desenho de *primers*, entretanto caiu para 44% na etapa de otimização dos *primers* e o polimorfismo apresentado para esta solanácea foi baixo, quando comparado a espécies relacionadas. Talvez sejam necessários alguns ajustes da técnica de enriquecimento e de construção das bibliotecas, pelo menos para espécie *S. lycocarpum*, tendo em vista que, se os resultados se dividissem entre locos polimórficos e monomórficos, seriam considerados normais, o inesperado foi a quantidade de pares de *primers* que não amplificaram. A transferabilidade de *primers* de *Solanum melongena* para *S. lycocarpum* foi testada e ocorreu facilmente, porém os *primers* transferidos amplificaram locos monomórficos. Pares de *primers* de *Arachis* também foram testados quanto à transferência e de um total de 91 pares, 7 amplificaram produtos polimórficos em agarose 1,5%.



### **Condições ambientais das populações**

As populações amostradas estão localizadas em áreas distantes umas das outras e, embora a espécie ocorra naturalmente, estão em áreas muitas vezes por ação antrópica, onde a vegetação original foi parcialmente removida permitindo por isso, maior índice de luminosidade. Duas condições contrastantes foram observadas nas populações de *Solanum lycocarpum* de Assis e na de Martinópolis, entre a primeira visita para coleta de material a ser utilizado na avaliação da variabilidade genética por marcadores RAPD e a atual, num espaço de seis anos. Estas modificações da estrutura física das populações descrevem uma dinâmica que pode tanto beneficiar a capacidade de regeneração da espécie, pelo menos no que se refere às características morfológicas e que foram visíveis na atual população de Martinópolis, quanto intervir de forma negativa, dependendo da origem destas mudanças, como foi observado na atual população de Assis. Neste caso, a degradação que se viu foi desencadeada, provavelmente pelas mudanças em seu ambiente original, reduzindo-a e levando a aparentes injúrias morfológicas e conseqüentemente, a perdas genéticas. Estudos anteriores utilizando marcadores RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) detectaram alto grau de polimorfismo e conseqüentemente alta diversidade genética e maior diversidade quando foram comparadas as três populações. (Zelandi, 2001). Observou-se no estudo com RAPD uma expressiva diversidade genética nas três populações, com maior proximidade genética entre as populações de Botucatu e Martinópolis. A população de Assis apresentou-se isolada das outras duas e com diversidade genética ligeiramente maior. No estudo atual, com marcadores SSR, as populações de Assis e de Botucatu apresentaram-se mais próximas e com as diversidades intrapopulacionais ligeiramente reduzidas, o que sugere que as perdas sofridas pela população de Assis (redução de área, redução de número de indivíduos, etc) aproximaram-na da população de Botucatu, que se manteve relativamente estável. Por sua vez, a população de Martinópolis apresentou-se isolada das outras duas com divergência genética ligeiramente aumentada. Embora os marcadores utilizados nos dois diferentes estudos tenham natureza molecular e base genética diferentes, a diminuição da diversidade observada pode ser conseqüência direta da fragmentação da população que reduziu sua capacidade adaptativa às mudanças. A redução do habitat pode levar à perda de variabilidade genética porque pode criar gargalos genéticos ou porque o tamanho reduzido das populações, aliado ao isolamento, pode promover uma perda contínua de alelos pela deriva genética (Barret & Kohn, 1991). A redução do ambiente natural afeta principalmente as espécies

vegetais, porque elas são sésseis e a maioria das espécies tropicais depende de outros organismos que funcionam como vetor de polinização e de dispersão, cuja quantidade também diminui quando o habitat é reduzido. *S. lycocarpum* é uma espécie preferencialmente alógama e a polinização vibrátil é realizada por abelhas do Gênero *Xylocopa*, que tem o hábito de visitar flores próximas polinizando devido a vibração, flores de um mesmo indivíduo (Martins *et al.*, 2006). Como também foi observado por Martins *et al.* (2003), a estruturação espacial está associada principalmente às características do sistema de reprodução das espécies (Loveless & Hamrick, 1984), que resultam em dispersão de genes restrita, tanto em decorrência da pequena capacidade de migração de pólen, como pela dispersão de sementes a curtas distâncias (Levin, 1981; Loveless & Hamrick, 1984). A redução na disponibilidade de polinizadores reduz a capacidade reprodutiva da espécie, além disso, o fato das espécies estarem em fragmentos distantes e a necessidade de sobrevivência levam ao cruzamento entre aparentados elevando a taxa de endogamia com o passar do tempo.

### **Diversidade genética e Estrutura genética**

O número de marcadores microssatélites otimizados para a *S. lycocarpum* foi menor que o esperado, sendo equivalente a 27% do total de *primers* desenhados e o polimorfismo detectado por eles foi baixo. A média aritmética de alelos por loco foi de 4,87, mas o número efetivo de alelos por loco, estimados nas análises computacionais foi 2,82. A grande maioria dos locos de microssatélites mostrou-se em desequilíbrio de Hardy-Weinberg nas três populações, ou seja, 62,5% dos locos da população de Assis, 87,5% da população de Botucatu e 62,5% da população de Martinópolis (Tabela 04), porém, devido às condições ambientais onde elas se encontram e também pelo fato de *S. lycocarpum* ser uma espécie pioneira, é compreensível observar esta situação. O Teste de Hardy-Weinberg é um excelente modelo comparativo, mas as populações reais não são panmítica, são finitas, isoladas, fragmentadas, e sofrem interferências ambientais (antrópicas), sendo, portanto, bem distintas do modelo ideal de equilíbrio. A heterozigosidade observada foi menor do que a esperada para marcadores microssatélites, mas foi consistente devido às estruturas ambientais em que encontram. Em oposição a esse resultado os marcadores moleculares do tipo RAPD apresentaram diversidade genética muito maior, embora não se possa comparar os resultados quanto a heterozigosidade, por serem marcadores moleculares distintos, é possível se comparar estatísticas. A população de Martinópolis apresentou o maior coeficiente de endogamia ( $f=0,4453$ ) e a menor

heterozigosidade observada ( $H_o=0,2590$ ) e esses valores podem ser vistos na Tabela 07, valores que condizem com os dados já obtidos pela análise de marcadores moleculares RAPD, quando se apresentou como a população de menor variabilidade genética quando comparada às populações de Assis e de Botucatu. Se considerarmos que esta população apresentou a menor diversidade genética há seis anos e que está em evidente recuperação morfológica, o crescimento populacional observado atualmente deve ser consequência de cruzamentos entre indivíduos aparentados. Embora Martins *et al.*, (2006) tenham sugerido que o cruzamento entre parentes não seja comum nesta espécie, isso pode estar acontecendo na população de Martinópolis devido às condições ambientais, às características de fragmentação, ao isolamento e à dificuldade de migração de indivíduos de outras populações e à impossibilidade de fluxo gênico. Na população de Assis, embora tenham ocorrido mudanças ambientais drásticas, a heterozigosidade observada para ela ( $H_o=0,3278$ ) foi maior do que a observada para a população de Martinópolis ( $H_o=0,2590$ ) e o coeficiente de endogamia observado ( $f=0,3558$ ) foi o menor das três populações. Esses valores também condizem com os dados obtidos pelos marcadores RAPD, os quais revelaram uma maior diversidade genética na população de Assis, de tal modo que, quando foram submetidas ao programa computacional Treecon (Van de Peer, 1997) usando-se Coeficiente de Distâncias Genéticas de Link (Link *et al.*, 1972) e critério de agrupamento UPGMA (Sneath & Sokal, 1973) esta população se separou das populações de Botucatu e de Martinópolis, formando um grupo isolado. As condições desfavoráveis em que a população de Assis se encontra atualmente, embora esteja afetando sua estrutura física e morfológica devido às injúrias e à redução do tamanho populacional, não provocou maiores perdas a nível genético, supostamente pela elevada diversidade genética apresentada há seis anos. A atual situação da população de Botucatu não pôde ser comparada com sua situação no passado, pois a coleta dos indivíduos não ocorreu no mesmo local, não sendo, portanto, a mesma população. As oscilações nas frequências alélicas entre populações são inerentes às populações que estão sob efeito da deriva genética (populações pequenas). A deriva é causada pela redução do tamanho populacional, levando à flutuação aleatória das frequências alélicas e, conseqüentemente, à perda e fixação de alelos (Souza *et al.*, 2004) e pode ocorrer em toda população finita, mas é tanto mais rápida quanto menor a população (Futuyma, 1997). Os resultados das Estatísticas-F para o conjunto das populações revelaram elevados índices de fixação tanto dentro das populações ( $F_{IS}=0,3900$ ) quanto entre elas ( $F_{IT}=0,4848$ ), indicando altos níveis significativos de endogamia na espécie e reforçando a hipótese de deriva genética. A divergência genética

(variação) entre as populações ( $F_{ST}=0,1554$ ) foi alta e significativa, segundo valores considerados por Yeh (2000). Maior diversidade genética entre populações é uma característica de populações, fragmentadas e levadas ao isolamento. A diversidade apresentada pelas três populações de *S. lycocarpum* pode ser visualizada no dendrograma (Figura 01), onde a população de Martinópolis se mostra geneticamente mais distante das populações de Assis e de Botucatu, não por ter uma maior variabilidade genética (como foi o caso da população de Assis quando avaliada por meio dos marcadores RAPD), mas por divergir geneticamente das outras populações (Figura 01), uma vez que, nas análises de diversidade genética utilizando-se SSR, foi a população que apresentou a menor heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e, conseqüentemente o maior coeficiente de endogamia ( $f$ ) e a menor taxa de cruzamento aparente ( $ta$ ) estimada (Tabela 08). Investigações sobre a estrutura genética de populações podem auxiliar o delineamento de estratégias para projetos de manejo e de conservação da espécie, bem como para cultivo sustentável.

## CONCLUSÕES

Os protocolos de enriquecimento das bibliotecas genômicas para microssatélites foram muito eficientes no isolamento dos mesmos e a quantidade de *primers* desenhados foi razoável. Entretanto, o a amplificação de produtos polimórficos foi bastante reduzida;

Há uma elevada endogamia acompanhada de elevado índice de cruzamento aparente dentro das populações, com fixação de alguns alelos e perda de outros;

A endogamia maior está sendo causada mais pelo sistema reprodutivo do que pela deriva genética;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barret SCH, Kohn JR (1991) Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: Falk, DA, Holsinger KE. *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford: Oxford University Press, p. 3-30.
- Billote N, Lagoda PJJ, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54, 277-288.
- Bragança LAR (1996) *Plantas Mediciniais Antidiabéticas* (Editora da Universidade Federal Fluminense ) 1ª Edição. EDUFF, Niterói, RJ, 300p.
- Brooker L, Brooker M, Cale P (1999) Animal dispersal in fragmented habitat: measuring habitat connectivity, corridor use, and dispersal mortality. *Conservation Ecology*, 1: 4.
- Creste S, Tulmann-Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 299-306.
- Cristofani MA, Brondani RV, Novelli VM, Machado MA (1998) Desenvolvimento de marcadores microssatélites para análise genética em citros. *Genetic Molecular Biology*, 21: 222.
- Danquah EY, Hanley SJ, Brookes RC, Aldam C, Karp A (2002) Isolation and characterization of microsatellites in *Echinochloa* (L) Beauv. Ssp. *Molecular Ecology Notes*, 2: 54-56.
- EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Cenargen Disponível em: [<http://www.cenargen.embrapa.br>]. Acesso: 17/09/2001.
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1996) *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares RAPD e RFLP em Análise Genética*. Brasília - EMBRAPA-CENARGEN, 2nd ed., 220p.

- Freville H, Justy F, Olivieri I (2001) Comparative allozyme and microsatellite population structure in a narrow endemic plant species, *Centaurea corymbosa* Pourret (Asteraceae). *Molecular Ecology*, 10: 879-889.
- Futuyma DJ (1997) *Biologia evolutiva*. 2nd ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 646 p.
- Goldstein DB, Schlötterer C (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York.
- Hartl DL, Clark AG (1989) *Principles of population genetics*. Sunderland: Sinauer Associates, 681p.
- Hoehne FC (1939) *Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Mediciniais*, SP/RJ: Editora "Graphicars", 212-214, 252-265.
- Jaggi RK, Kapoor VK (1994) Solasodine its occurrence in natura and production. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 53: 34-42.
- Kimura M, Crow JF (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49:725-738.
- Levene H (1949) On a matching problem in genetics. *The Annals of Mathematical Statistics*, 20: 91-94.
- Levin DA (1981) Dispersal versus gene flow in plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 68: 233-253.
- Liang CH, Liu LF, Shiu LY, Huang YS, Chang LC (2004) Action of solamargine on TNFs and cisplatin-resistant human lung cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322: 751-758.

- Link W, Dixens C, Singh M, Schwall M, Melchinger AE (1995) Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 90, 27-32.
- Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15: 65-95.
- Martins K, Chaves, LJ, Buso, GSC, Kageyama, PY (2006) Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St Hil (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. *Conservation Genetics*, DOI 10.1007/s10592-006-9140-y
- Martins PS, Jain SK (1977) Role of genetic variation in colonizing ability of rose clover (*Trifolium hirtum* All.). *The American Naturalist*, 111: 591-595.
- Miller MP (1997) Tools for population genetics analyses (TFPGA). Version 1.3 – A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, USA.
- Motidome M, Leekning ME, Gottlieb OR (1970) A química de solanáceas brasileiras I - A presença de solamargina e de solasonina no Juá e na Lobeira. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 42: 375-376.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106: 283-292.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70: 3321-3323.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nunome T, Suwabe K, Iketani H, Hirai M (2003) Identification and characterization of microsatellites in eggplant. *Plant Breeding*, 122: 256-262.

- Pinto LR, Vieira MLC, Souza AP, Souza Jr CL (2001) Isoenzimas e microssatélites em plantas. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 20: 16-19.
- Rafalsky JA, Tingey SV (1993) Genetic diagnostics in plant breeding, RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genetics*, 9: 275-279.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Santos OM, Coelho ADF, Montanari RM, Pinto ES, Viccini LF (2002) Variabilidade genética entre populações de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.). *Floresta e Ambiente*, 9: 158-164.
- Sato Y, Ikekawa N, Mosetting E (1960) The Chemistry of the Spiroaminoketal Side Chain of Solasodine and Tomatidine. I.1 Improved Preparation of 3 $\beta$ -Acetoxy-5,16-pregnadien-20-one and 3 $\beta$ -Acetoxy-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-one from Solasodine and Tomatidine. *Journal of Organic Chemistry*, 25: 783-786.
- Sato Y, Latham HG, Mosetting E (1957) Some Reactions of Solasodine. *Journal of Organic Chemistry*, 22: 1496-1500.
- Shannon CE, Weaver W (1949) The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco: WH Freeman. 573 p.
- Souza LMFI, Kageyama PY, Sebbenn AM (2004). Genetic structure in fragmented populations of *Chorisia speciosa* St Hil. *Scientia Forestalis*, 65: 70-79.



- Squirrell J, Hollingsworth PM, Woodhead M, Russel J, Lowe AJ, Gibby M, Powell W (2003) How much effort is required to isolate nuclear microsatellite from plants? *Molecular Ecology* 12: 1339-1348.
- Suvarov NM, Murashewa SA (1959) Zhur. Obschei. Khin., 29: 329.
- Vieira RF (1999) Alcalóides esteroidais do gênero *Solanum*: Avaliação Quantitativa do teor de solasodina em frutos verdes de *Solanum mauritianum* Scop. In: *Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares*. UNESP/BOTUCATU/SP, V.2: 169-191.
- Van de Peer Y, De Wachter Y (1994) TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer applications in the biosciences*, 10: 569-570.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 395-420.
- Wright S (1965) The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. *Evolution*, 19(3): 395-420.
- Wright S (1978) *Variability within and among natural populations*. Vol. 4 The University of Chicago Press, Chicago.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T (1999) Popgene version 1.32. Microsoft Windows – Based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta, Canada.
- Zelandi EM (2001) Caracterização da variabilidade genética intraespecífica em *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) e em *Eugenia jambolana* Lamark (Myrtaceae) por meio de marcador molecular tipo RAPD. Dissertação de mestrado - Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS

Albuquerque JM (1989) *Plantas Medicinais de Uso Popular*. Editora ABEAS/MEC, Brasília, DF. 63p.

Amaral WAN, Brito MCW, Assad ALD, Manfio GP (2006) *Políticas públicas em biodiversidade: Conservação e uso sustentado no País da megadiversidade*. Disponível em: [http://www.hottopos.com/harvard1/politicas\_publicas\_em\_biodiversi.htm]. Acesso em 24/04/2006.

Azevedo ZMBS, Lima DAM (1987) Algumas notas sobre esteróides. *Revista Portuguesa de Farmácia*, 37: 149-157.

Barret SCH, Kohn JR (1991) Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: Falk, DA, Holsinger KE. *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford: Oxford University Press, p. 3-30.

BDT – Base de Dados Tropical – Estratégia nacional de diversidade biológica. Disponível em [http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/politica/gtt/gtt9]. Acesso em 26.jul.2005 e [www.bdt.org.br/workshop/cerrado/br/projeto]. Acesso em 13/10/2002.

Bhargava SK (1989) Anti-androgenic effects of a flavonoid rich fraction of *Vitex negundo* seeds: a histological and histochemical study in dogs. *Journal of Ethnopharmacology*, 27: 327-330.

Billote N, Lagoda PJL, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54, 277-288.

Bragança LAR (1996) *Plantas Medicinais Antidiabéticas* (Editora da Universidade Federal Fluminense ) 1ª Edição. EDUFF, Niterói, RJ, 300p.

- Brooker L, Brooker M, Cale P (1999) Animal dispersal in fragmented habitat: measuring habitat connectivity, corridor use, and dispersal mortality. *Conservation Ecology*, 1: 4.
- Caicedo A, Schaal B (2004) Population structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear marker. *Molecular Ecology*, 13: 1871-1882.
- Castro ER, Galletti, M (2004) Frugivoria e dispersão de sementes pelo lagarto teiú *Tapinambis merianae* (Reptilia: Teiidae) Papéis avulso da Zoologia, 44(6): 91-97.
- Charlesworth D, Charlesworth, B (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual review of ecology and systematics*, 8: 237-268.
- Cockerham CC (1969) Variance of gene frequencies. *Evolution*, 23: 72-84.
- Colli GR, Accacio GM, Antonini Y, Constantino R, Franceschinelli EV, Laps RR, Scariot A, Vieira MV, Wiederhecker, HC (2003) A fragmentação dos ecossistemas e a biodiversidade brasileira: Uma síntese. In: Fragmentação de Ecossistemas: Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. Brasília: MMA/SBF, 510p. Disponível em [\[http://www.unb.br/ib/zoo/grcolli/publicacoes\\_pdf/Collietal2003\\_4.pdf\]](http://www.unb.br/ib/zoo/grcolli/publicacoes_pdf/Collietal2003_4.pdf). Acesso em 24/04/2006.
- Corrêa MP (1952) *Dicionário de plantas úteis do Brasil*. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 325-327.
- Creste S, Tulmann-Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 299-306.
- Cristofani MA, Brondani RV, Novelli VM, Machado MA (1998) Desenvolvimento de marcadores microssatélites para análise genética em citros. *Genetic Molecular Biology*, 21: 222.

- Cristofani M, Novelli VM, Oliveira AC, Otaviano AR, Souza AA, Machado MA (2001) Identificação de híbridos de cruzamentos interespecíficos em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. *Laranja*, 22: 231-241.
- Dall’Agnol R, Poser GL (2000) The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, 71: 337-341.
- Danquah EY, Hanley SJ, Brookes RC, Aldam C, Karp A (2002) Isolation and characterization of microsatellites in *Echinochloa* (L) Beauv. Ssp. *Molecular Ecology Notes*, 2: 54-56.
- Dias, BFS (1996) *A implementação da Convenção sobre Diversidade Biológica no Brasil: desafios e oportunidades*. Fundação André Tosello, Campinas, SP.
- Dixit VP, Gupta RS, Gupta S (1989) Antifertility plant products: testicular cell population dynamics following solasodine administration in rhesus monkey (*Macacca mulatta*). *Andrologia*, 21: 542-546.
- Dooner HK, Robbins TP, Jorgensen RA (1991) Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annual Review of Genetics*, 25: 173-199.
- Ehrlich, PR (1997) A perda da biodiversidade – causas e conseqüências. In: Wilson, EO (Ed.). *Biodiversidade*. Rio de Janeiro - Nova Fronteira, 27-35.
- EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Cenargen Disponível em: [<http://www.cenargen.embrapa.br>]. Acesso: 17/09/2001.
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1996) *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares RAPD e RFLP em Análise Genética*. Brasília - EMBRAPA-CENARGEN, 2nd ed., 220p.
- Ferri MG (1969) *Plantas do Brasil - Espécies do Cerrado*. EDUSP, p.186-187.

- Freville H, Justy F, Olivieri I (2001) Comparative allozyme and microsatellite population structure in a narrow endemic plant species, *Centaurea corymbosa* Pourret (Asteraceae). *Molecular Ecology*, 10: 879-889.
- Futuyma DJ (1997) *Biologia evolutiva*. 2nd ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 646p.
- Gandara FB (1996) Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos de uma população natural de *Cedrella fissilis* Vell. (*Meliaceae*). Dissertação de mestrado, UNICAMP, Campinas, SP.
- Ghislain M, Rodríguez F, Vilamón F, Núñez J, Waugh R, Bonierbale M (2000) Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. *CIP Program Report 1999-2000*, 167-174.
- Goldstein DB, Schlötterer C (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York.
- Glowka L (1996) The Convention on Biologic Diversity: issues of interest to the microbial scientist and microbial culture collections. In: Sampson RA, Stalpers JA, Van der Mei D, Stouthamer AH (Ed) *Culture collections to improve the quality of life*. Netherlands, WFCC and AGBAARN, 36-60.
- Hamrick KL, Linhart YB, Mitton JB (1979) Relationship between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annual review of ecology and systematics*, 10:173-200.
- Hamrick KL, Godt MJW (1990) Allozyme diversity in plant species. In: Brown ADH, Clegg MT, Kahler AI, Weir BS (eds) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland: Sinauer Associates, Massachusetts, 43-63.
- Hanson JS, Malason GP, Armstrong MP (1990) Landscape fragmentation and dispersal in a model of riparian forest dynamics. *Ecological Modeling*, 49(4): 277-296.

- Hartl DL, Clark AG (1989) Principles of population genetics. Sunderland: Sinauer Associates, 681p.
- Hoehne FC (1939) *Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais*, SP/RJ: Editora "Graphicars", 212-214, 252-265.
- Jaggi RK, Kapoor VK (1994) Solasodine its occurrence in natura and production. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 53: 34-42.
- Jain SK, Martins PS (1979) Ecological genetics of the colonizing ability of rose clover (*Trifolium hirtum* All.). *American Journal of Botany*, 66: 361-366.
- Joly AB (1993) *Botânica - Introdução à taxonomia vegetal*. 11<sup>a</sup> edição. São Paulo: Cia. Editora Nacional. 504-505, 738-739.
- Kimura M, Crow JF (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49:725-738.
- Kuo KW, Hsu SH, Li YP, Lin LW, Liu LF, Chang LC, Lin CC, Lin CN, Sheu HM (2000) Anticancer activity evaluation of the *Solanum glycoalkaloid solamargine*. Triggering apoptosis in human hepatoma cells, *Biochemical pharmacology*, 60: 1865-1873.
- Levene H (1949) On a matching problem in genetics. *The Annals of Mathematical Statistics*, 20: 91-94.
- Levin DA (1981) Dispersal versus gene flow in plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 68: 233-253.
- Liang CH, Liu LF, Shiu LY, Huang YS, Chang LC (2004) Action of solamargine on TNFs and cisplatin-resistant human lung cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322: 751-758.

- Lima VS (1996) Estudo do Potencial Genotóxico da Planta Medicinal *Solanum grandiflorum* (lobeira) em Células Bacterianas. *Brazilian Journal of Genetics*, 19: 181.
- Lin BB, Chen HL, Huang PC (1986) Effects on instant Pauchong Tea, Cathecin and Caffeine on serum cholesterol and serum low-density-lipoprotein in mice. *Nutrition reports international*, 34: 821-829.
- Lin M, Anderson H, Flavin MT, Pai YS (1997) In vitro anti-HIV activity of bioflavonoids isolated from *Rhus sucedanea* and *Garcinia multiflora*. *Journal Natural Products*, 60: 884-888.
- Link W, Dixens C, Singh M, Schwall M, Melchinger AE (1995) Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 90, 27-32.
- Lombardi JA, Motta-Junior JC (1993) Seed dispersal of *Solanum lycocarpum* St Hil (Solanaceae) by the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus* Illiger (Mammalia, Canidae) *Ciência e Cultura*, 45, 126-127.
- Lopes RM (2001) Flavonóides. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 17: 18-22.
- Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15: 65-95.
- Maruo VM, Bernardi MM, Spinoso HS (2003) Toxicological evaluations of long-term consumption of *Solanum lycocarpum* St. Hill fruits in male and female adult rats. *Phytomedicine* 10: 48-52.
- Martins K, Chaves, LJ, Buso, GSC, Kageyama, PY (2006) Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St Hil (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. *Conservation Genetics*, DOI 10.1007/s10592-006-9140-y

- Martins PS, Jain SK (1977) Role of genetic variation in colonizing ability of rose clover (*Trifolium hirtum* All.). *The American Naturalist*, 111: 591-595.
- Miller MP (1997) Tools for population genetics analyses (TFPGA). Version 1.3 – A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, USA.
- Morgante M, Hanafey M, Powell W (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 30, 194-200.
- Motidome M, Leekning ME, Gottlieb OR (1970) A química de solanáceas brasileiras I - A presença de solamargina e de solasonina no Juá e na Lobeira. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 42: 375-376.
- Murawsky DA, Hamrick JL, Hubbell SP, Foster RB (1990) Mating systems of two Bonbacaceous trees of a neotropical moist forest. *Oecologia*, 82: 501-506.
- Murawsky DA, Hamrick JL (1991) The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. *Heredity*, 67: 167-174.
- Murawsky DA, Hamrick JL (1992a) Mating system and phenology of *Ceiba pentandra* (*Bonbacaceae*) in Central Panama. *Journal of Heredity*, 83: 401-404.
- Murawsky DA, Hamrick JL (1992b) The mating system of *Cavanillesia platanifolia* under extremes of flowering tree density: a test of predictions. *Biotropica*, 24: 99-101.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106: 283-292.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70: 3321-3323.



- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nunome T, Suwabe K, Iketani H, Hirai M (2003) Identification and characterization of microsatellites in eggplant. *Plant Breeding*, 122: 256-262.
- Paiva PHV (2000) A reserva da biosfera do cerrado: fase II. Tópicos atuais em Botânica: Palestras convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica. Brasília, Sociedade Botânica do Brasil/EMBRAPA-Cenargen.
- Peters VM, Pinheiro NL, Reis JEP, Guerra MO (2001) Absence of interceptive effect in rats treated with *Solanum lycocarpum* (St. Hil.). *Contraception*, 63: 53-55.
- Peterson J, Dwyer J (1998) Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18: 1995-2018.
- Pinto LR, Vieira MLC, Souza AP, Souza Jr CL (2001) Isoenzimas e microssatélites em plantas. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 20: 16-19.
- Rafalsky JA, Tingey SV (1993) Genetic diagnostics in plant breeding, RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genetics*, 9: 275-279.
- Rallo P, Dorado G, Martín A (2000) Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 984-989.
- Reis MS (1996) Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais em plantas. *Brazilian Journal of Genetics*, 19: 37-47.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.

- Sá RCS, Vireque AA, Reis JEP, Guerra MO (200) Evaluation of the toxicity of *Solanum lycocarpum* in the reproductive system of male mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 283-287.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Santos OM, Coelho ADF, Montanari RM, Pinto ES, Viccini LF (2002) Variabilidade genética entre populações de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.). *Floresta e Ambiente*, 9: 158-164.
- Sato Y, Ikekawa N, Mosetting E (1960) The Chemistry of the Spiroaminoketal Side Chain of Solasodine and Tomatidine. I.1 Improved Preparation of 3 $\beta$ -Acetoxy-5,16-pregnadien-20-one and 3 $\beta$ -Acetoxy-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-one from Solasodine and Tomatidine. *Journal of Organic Chemistry*, 25: 783-786.
- Sato Y, Latham HG, Mosetting E (1957) Some Reactions of Solasodine. *Journal of Organic Chemistry*, 22: 1496-1500.
- Scribner KT, Petersen MR, Fields RL, Talbot SL, Pearce JM, Chesser RK (2001) Sexbiased gene flow in spectacled eiders (*Anatidae*): Inferences from molecular markers with contrasting modes of inheritance. *Evolution*, 55: 2105-2115.
- Secretaria do Meio Ambiente (1996a) Entendendo o meio ambiente. Vol 1. São Paulo, Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- Shannon CE, Weaver W (1949) The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.
- Shirley BW (1996) Flavonoid biosynthesis: “new” functions for a “old” pathway. *Trends Plant Science*, 1: 377-382.

- Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. *Annual review of ecology and systematics*, 16: 393-430.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco: WH Freeman. 573 p.
- Souza LMFI, Kageyama PY, Sebbenn AM (2004). Genetic structure in fragmented populations of *Chorisia speciosa* St Hil. *Scientia Forestalis*, 65: 70-79.
- Souza AL, Silva E (1994) Manejo para a conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. *Informativo SIF*, 2: 1-2, Cruz das Almas.
- Squirrell J, Hollingsworth PM, Woodhead M, Russel J, Lowe AJ, Gibby M, Powell W (2003) How much effort is required to isolate nuclear microsatellite from plants? *Molecular Ecology* 12: 1339-1348.
- Sum GL, Díaz O, Salomon B, Bothme R (2001) Genetic diversity and structure in a natural *Elymus caninus* population from Denmark based on microsatellite. *Plant Systematics and Evolution*, 227: 235-244.
- Suvarov NM, Murashewa SA (1959) Zhur. Obschei. Khin., 29: 329.
- Toth G, Gáspari Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 967-981.
- Van de Peer Y, De Wachter Y (1994) TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer applications in the biosciences*, 10: 569-570.
- Viana VM (1990) Biologia e manejo de fragmentos florestais. In *Annais VI Congresso Florestal Brasileiro*, Campos do Jordão, Curitiba: Sociedade Brasileira de Silvicultura/Sociedade de Engenheiros Florestais, 113-118.

- Viana VM, Tabanez AAJ (1996) Biology and conservation of forest fragments in the Brazilian Atlantic moist forest. In: *Forest patches in tropical landscapes*. Washington: Island Press, 151-167.
- Vieira RF (1998) Alcalóides esteroidais do gênero *Solanum*: Avaliação Quantitativa do teor de solasodina em frutos verdes de *Solanum mauritianum* Scop. In: *Plantas Mediciniais Aromáticas e Condimentares*. UNESP/BOTUCATU/SP, V.2: 169-191.
- Vieira RF (2000) Importância da Variabilidade Genética para a Produção de Metabólitos Secundário. *Tópicos Atuais em Botânica* - EMBRAPA/SBG, 304-307.
- Vieira Jr G, Ferreira PM, Matos LG, Ferreira EC, Rodovalho W, Ferri PH, Ferreira HD, Costa EA (2003) Anti-inflammatory effect of *Solanum lycocarpum* fruits. *Phytotherapy research*, 17: 892-896.
- Wang XR, Szmidt AE (2001) Molecular markers in population genetics of Forest trees. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 16: 199-220.
- Wieczorek AM, Geber A (2002) Microsatellite loci four studies of population differentiation and range expression in *Solidago sempervirens* L (*Asteraceae*) *Molecular Ecology Notes*, 2: 544-556.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 395-420.
- Wright S (1965) The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. *Evolution*, 19(3): 395-420.
- Wright S (1978) *Variability within and among natural populations*. Vol. 4 The University of Chicago Press, Chicago.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T (1999) Popgene version 1.32. Microsoft Windows – Based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta, Canada.

Zelandi EM (2001) Caracterização da variabilidade genética intraespecífica em *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) e em *Eugenia jambolana* Lamark (Myrtaceae) por meio de marcador molecular tipo RAPD. Dissertação de mestrado - Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu.

Tabela 01. Coordenadas geográficas definidas por GPS e número de indivíduos amostrados para as populações de *Solanum lycocarpum* St. Hil. nos municípios paulistas de Assis, Botucatu e Martinópolis.

População	Coordenadas geográficas			N
	Latitude (S)	Longitude (HO)	Altitude (Elev)	
Assis	22° 35'	50° 25'	530m	35
Botucatu	23° 03'	48° 30'	860m	39
Martinópolis	22° 12'	51° 11'	466m	35

N: Número de indivíduos.

Tabela 02. *Primers* de microssatélites (SSR) genômicos desenvolvidos para *Solanum lycocarpum* St Hil, seqüências dos *primers forward* e *reverse*, *motifs*, amplitudes alélicas e número de alelos efetivos.

<b>Locos SSR</b>	<b>Seqüências dos <i>Primers</i></b>	<b><i>Motif</i></b>	<b>Tm (° C)</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>	<b>Amplitude alélica (pb)</b>	<b>ne</b>
SLY02	F:5'GGAAAAGCTCAGGGTGGCTGA3' R:5'CGACTCTATAGGGCGAATTG3'	(GT) <sub>20</sub>	60	1,5	174-180	1,4611
SLY04	F:5'CAGAAGCAAAGAGCCACAAA3' R:5'CAAAAAGGCACAAACACACA3'	(TTG) <sub>6</sub>	60	1,5	180-210	3,5193
SLY07	F:5'ÁGGATAATGTGTTTTATCGAGCA3' R:5'AGCACTTCCTCCTTTGGTCA3'	(AAG) <sub>8</sub>	60	1,5	236-260	1,8958
SLY13	F:5'TCACCTTTCTCTGTGACCC3' R:5'CGCGAGGAGATGAAGAGAAC3'	(CT) <sub>14... (CT)<sub>7</sub></sub>	60	2,5	222-234	4,3523
SLY23	F:5'GCTTACGCGTGGACTAACCT3' R:5'CCAGGTGCAATGTATCCAA3'	(CT) <sub>20</sub>	57	2,0	184-194	2,1548
SLY25	F:5'CACTACTCCCTCCACATCACTG3' R:5'GAGACCTAGCTGGGAGAGCA3'	(CT) <sub>21</sub>	60	2,0	242-268	2,5600
SLY26	F:5'CCGTTAGCATATGGGGGATA3' R:5'GGGCGGTCATTATGAGGTA3'	(AAAAAT) <sub>7... (GA)<sub>7</sub>GG(GA)<sub>5</sub>TA(GA)<sub>4</sub></sub>	60	1,5	174-180	2,5915
SLY27	F:5'GAACAAATCCCAAGTCGCAT3' R:5'TTGGCTTAGTTGAGCACACG3'	(CT) <sub>19</sub>	60	2,0	165-180	4,0363

Tabela 03. Descrição dos alelos amplificados em cada loco de microsatélite pelos oito pares de *primers* desenvolvidos para *Solanum lycocarpum* St Hil. e número de alelos observados para cada loco

Locos SSR	Alelos e seus tamanhos observados em pares de base (pb)						Número de alelos / loco
	A	B	C	D	E	F	
<b>Sly02</b>	180	176	174	-	-	-	03
<b>Sly04</b>	210	108	205	200	198	180	06
<b>Sly07</b>	260	250	244	240	238	236	06
<b>Sly13</b>	234	232	230	228	226	222	06
<b>Sly23</b>	194	186	184	-	-	-	03
<b>Sly25</b>	268	265	262	242	-	-	04
<b>Sly26</b>	180	178	176	174	172	-	05
<b>Sly27</b>	180	178	175	170	168	165	06
<b>Total de alelos</b>	-	-	-	-	-	-	<b>39</b>



Tabela 04. Probabilidades de equilíbrio das frequências genótípicas em 8 locos de microssatélites analisados em três populações de *Solanum lycocarpum*, submetidas ao teste de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, usando-se o algoritmo de Levene (1949).

Locos	Probabilidade p* para cada loco em cada população		
	ASSIS	BOTUCATU	MARTINÓPOLIS
Sly02	0,967178	0,778068	0,967178
Sly04	0,000000	0,000304	0,001536
Sly07	0,168474	0,000000	0,744073
Sly13	0,000005	0,000020	0,001861
Sly23	0,000001	0,000006	0,703523
Sly25	0,412977	0,000000	0,000015
Sly26	0,008206	0,000000	0,000000
Sly27	0,000694	0,000110	0,000000

\* Probabilidade obtida pela distribuição de valores do  $X^2$ , para frequências genótípicas em população de acasalamento aleatório, considerando-se significante os valores de  $p > 0,05$ .

Tabela 05. Frequências alélicas estimadas para três diferentes populações de *S. Lycocarpum* do Estado de São Paulo.

Tabela 05a Assis

<b>Alelo \ Loco</b>	<b>Sly02</b>	<b>Sly04</b>	<b>Sly07</b>	<b>Sly13</b>	<b>Sly23</b>	<b>Sly25</b>	<b>Sly26</b>	<b>Sly27</b>
Alelo A	0.0185			0.2500				0.1481
Alelo B	0.7963	0.0741		0.0385	0,4583	0,8571	0.6094	0.0741
Alelo C	0.1852	0.1111		0.2500	0,5417		0.3438	0.5370
Alelo D		0.2963		0.1731		0,1429	0.0469	0.0926
Alelo E		0.5185	0.7969	0.1538				0.0926
Alelo F			0.2031	0.1346				0.0556

Tabela 05b Botucatu

<b>Alelo \ Loco</b>	<b>Sly02</b>	<b>Sly04</b>	<b>Sly07</b>	<b>Sly13</b>	<b>Sly23</b>	<b>Sly25</b>	<b>Sly26</b>	<b>Sly27</b>
Alelo A		0.0312		0.1346	0.0517	0.3800		0.1538
Alelo B	0.8276		0.0484	0.3269	0.7241	0.4400	0.0455	0.0577
Alelo C	0.1724	0.3438	0.0323	0.2692	0.2241	0.1600	0.6364	0.3269
Alelo D		0.4062	0.4194	0.2692		0.0200	0.3182	0.0577
Alelo E		0.2188	0.4839					0.4038
Alelo F			0.0161					

Tabela 05c Martinópolis

<b>Alelo \ Loco</b>	<b>Sly02</b>	<b>Sly04</b>	<b>Sly07</b>	<b>Sly13</b>	<b>Sly23</b>	<b>Sly25</b>	<b>Sly26</b>	<b>Sly27</b>
Alelo A	0.0185		0.0938		0.0625		0.0312	0.0217
Alelo B	0.7963	0.2500			0.1458	0.3167	0.5625	0.3913
Alelo C	0.1852	0.7188		0.1964	0.7917	0.6833	0.3281	0.2174
Alelo D				0.6250			0.0625	0.0870
Alelo E			0.8281	0.0714			0.0156	0.2826
Alelo F		0.0312	0.0781	0.1071				

Tabela 06. Heterozigosidade em todos os locos de microssatélites em cada população de *Solanum lycocarpum*.

Tabela 06a Assis

Loco	N	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub> *	Nei**	Ĥ
Sly02	54	0.3333	0.3375	0.3313	0.3160
Sly04	64	0.1875	0.4266	0.4199	0.5711
Sly07	64	0.3438	0.3041	0.2993	0.4031
Sly13	56	0.3571	0.5643	0.5542	0.6953
Sly23	48	0.3333	0.3555	0.3481	0.4224
Sly25	60	0.1000	0.4401	0.4328	0.4379
Sly26	64	0.1562	0.5799	0.5708	0.5236
Sly27	46	0.2609	0.7275	0.7117	0.6918
<b>Média</b>	<b>57</b>	<b>0.2590</b>	<b>0.4669</b>	<b>0.4585</b>	<b>0.5077</b>
Desvio padrão	*	0.0992	0.1455	0.1423	0.1379

Tabela 06b Botucatu

Loco	N	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub> *	Nei**	Ĥ
Sly02	58	0.2759	0.2904	0.2854	0.3160
Sly04	64	0.5000	0.6786	0.6680	0.5711
Sly07	62	0.9677	0.5960	0.5864	0.4031
Sly13	52	0.3077	0.7443	0.7300	0.6953
Sly23	58	0.1034	0.4301	0.4227	0.4224
Sly25	50	0.0400	0.6490	0.6360	0.4379
Sly26	44	0.0000	0.5032	0.4917	0.5236
Sly27	52	0.5385	0.7134	0.6997	0.6918
<b>Média</b>	<b>55</b>	<b>0.3417</b>	<b>0.5756</b>	<b>0.5650</b>	<b>0.5077</b>
Desvio padrão	*	0.3220	0.1566	0.1537	0.1379

Tabela 06c Martinópolis

Loco	N	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub> *	Nei**	Ĥ
Sly02	54	0.3333	0.3375	0.3313	0.3160
Sly04	64	0.1875	0.4266	0.4199	0.5711
Sly07	64	0.3438	0.3041	0.2993	0.4031
Sly13	56	0.3571	0.5643	0.5542	0.6953
Sly23	48	0.3333	0.3555	0.3481	0.4224
Sly25	60	0.1000	0.4401	0.4328	0.4379
Sly26	64	0.1562	0.5799	0.5708	0.5236
Sly27	46	0.2609	0.7275	0.7117	0.6918
<b>Média</b>	<b>57</b>	<b>0.2590</b>	<b>0.4669</b>	<b>0.4585</b>	<b>0.5077</b>
Desvio padrão	*	0.0992	0.1455	0.1423	0.1379

\* Heterozigosidade esperada de Levene (1949)

\*\* Heterozigosidade esperada de Nei (1973)

Tabela 07. Índice de fixação ( $F_{IS}$ ) de Wright (1978) como uma medida de deficiência ou excesso de heterozigotos em cada população de *Solanum lycocarpum*, para oito locos SSR.

Tabela 07a Assis

<b>Alelo \ Loco</b>	<b>Sly02</b>	<b>Sly04</b>	<b>Sly07</b>	<b>Sly13</b>	<b>Sly23</b>	<b>Sly25</b>	<b>Sly26</b>	<b>Sly27</b>
Alelo A	-0.0189	****	****	0.4872	****	****	****	-0.1739
Alelo B	-0.0275	1.0000	****	-0.0400	1.0000	-0.1667	0.5405	0.4600
Alelo C	0.0182	1.0000	****	0.0769	1.0000	****	0.3074	0.0317
Alelo D	****	1.0000	****	0.0594	****	-0.1667	-0.0492	-0.1020
Alelo E	****	1.0000	-0.2549	-0.1818	****	****	****	0.3388
Alelo F	****	****	-0.2549	0.1746	****	****	****	0.6471
<b>Total</b>	<b>-0.0062</b>	<b>1.0000</b>	<b>-0.2549</b>	<b>0.1365</b>	<b>1.0000</b>	<b>-0.1667</b>	<b>0.3852</b>	<b>0.1074</b>

Tabela 07b Botucatu

<b>Alelo \ Loco</b>	<b>Sly02</b>	<b>Sly04</b>	<b>Sly07</b>	<b>Sly13</b>	<b>Sly23</b>	<b>Sly25</b>	<b>Sly26</b>	<b>Sly27</b>
Alelo A	****	-0.0323	****	0.5048	-0.0545	0.9151	****	0.7045
Alelo B	0.0333	****	0.6497	0.5630	0.8274	1.0000	1.0000	0.6463
Alelo C	0.0333	0.3074	-0.0333	0.8045	0.9009	1.0000	1.0000	0.2134
Alelo D	****	0.6113	-0.7222	0.4135	****	-0.0204	1.0000	-0.0612
Alelo E	****	-0.2800	-0.9375	****	****	****	****	-0.0384
Alelo F	****	****	-0.0164	****	****	****	****	****
<b>Total</b>	<b>0.0333</b>	<b>0.2515</b>	<b>-0.6504</b>	<b>0.5785</b>	<b>0.7553</b>	<b>0.9371</b>	<b>1.0000</b>	<b>0.2304</b>

Tabela 07c Martinópolis

<b>Alelo \ Loco</b>	<b>Sly02</b>	<b>Sly04</b>	<b>Sly07</b>	<b>Sly13</b>	<b>Sly23</b>	<b>Sly25</b>	<b>Sly26</b>	<b>Sly27</b>
Alelo A	-0.0189	****	-0.1034	****	-0.0667	****	1.0000	-0.0222
Alelo B	-0.0275	0.6667	****	****	0.1638	0.7689	0.7460	0.6349
Alelo C	0.0182	0.5362	****	0.4343	-0.0105	0.7689	0.9291	0.7444
Alelo D	****	****	****	0.6190	****	****	-0.0667	1.0000
Alelo E	****	****	-0.2075	-0.0769	****	****	-0.0159	0.4639
Alelo F	****	-0.0323	-0.0847	-0.1200	****	****	****	****
<b>Total</b>	<b>-0.0062</b>	<b>0.5535</b>	<b>-0.1485</b>	<b>0.3556</b>	<b>0.0424</b>	<b>0.7689</b>	<b>0.7263</b>	<b>0.6335</b>



Tabela 08. Parâmetros de diversidade genética estimada com oito locos de microssatélites.

Tamanho da amostra total (N), Número de alelos observados (na), Número de alelos efetivos (ne), Heterozigosidade observada ( $H_o$ ), Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), Índice de fixação (f) de Wright (1965) ou Coeficiente de endogamia, calculado com base na fórmula  $f = 1 - \frac{H_o}{H_e}$ , taxa de cruzamento

aparente (ta), calculada a partir da fórmula  $ta = \frac{1-f}{1+f}$

<b>População</b>	<b>N</b>	<b>na</b>	<b>ne</b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_e</math></b>	<b>f</b>	<b>ta</b>
Assis	56	3,50	2,38	0,3278	0,5788	0,3558	0,4751
Botucatu	55	3,75	2,54	0,3417	0,5756	0,4063	0,4222
Martinópolis	57	3,50	2,00	0,2590	0,4669	0,4453	0,3838
<b>Média</b>	<b>168</b>	<b>4,87</b>	<b>2,82</b>	<b>0,3136</b>	<b>0,6019</b>	<b>0,4789</b>	<b>0,3523</b>



Tabela 09. Tamanho efetivo ( $N_e$ ) de cada população, número de alelos observados ( $na$ ) e número de alelos efetivos ( $ne$ ) em cada população de *Solanum lycocarpum*.

Tabela 09a Assis

<b>Loco</b>	<b><math>N_e</math></b>	<b><math>na^*</math></b>	<b><math>ne^*</math></b>	<b><math>I^*</math></b>
Sly02	54	3,0000	1,4954	0,5675
Sly04	54	4,0000	2,6703	1,1379
Sly07	64	2,0000	1,4787	0,5047
Sly13	52	6,0000	5,0448	1,6800
Sly23	48	2,0000	1,9862	0,6897
Sly25	56	2,0000	1,3243	0,4101
Sly26	64	3,0000	2,0338	0,8124
Sly27	54	6,0000	2,9755	1,4108
<b>Média</b>	<b>56</b>	<b>3,5000</b>	<b>2,3761</b>	<b>0,9016</b>
Desvio padrão		1,6903	1,2262	0,4605

Tabela 09b Botucatu

<b>Loco</b>	<b><math>N_e</math></b>	<b><math>na^*</math></b>	<b><math>ne^*</math></b>	<b><math>I^*</math></b>
Sly02	58	2,0000	1,3993	0,4597
Sly04	64	4,0000	3,0118	1,1738
Sly07	62	5,0000	2,4176	1,0396
Sly13	52	4,0000	3,7041	1,3420
Sly23	58	3,0000	1,7322	0,7221
Sly25	50	4,0000	2,7473	1,1004
Sly26	44	3,0000	1,9675	0,7925
Sly27	52	5,0000	3,3300	1,3488
<b>Média</b>	<b>55</b>	<b>3,7500</b>	<b>2,5387</b>	<b>0,9974</b>
Desvio padrão		1,0351	0,8054	0,3146

Tabela 06c Martinópolis

<b>Loco</b>	<b><math>N_e</math></b>	<b><math>na^*</math></b>	<b><math>ne^*</math></b>	<b><math>I^*</math></b>
Sly02	54	3,0000	1,4954	0,5675
Sly04	64	3,0000	1,7239	0,6922
Sly07	64	3,0000	1,4272	0,5773
Sly13	56	4,0000	2,2432	1,0412
Sly23	48	3,0000	1,5340	0,6390
Sly25	60	2,0000	1,7630	0,6243
Sly26	64	5,0000	2,3299	1,0359
Sly27	46	5,0000	3,4689	1,3516
<b>Média</b>	<b>57</b>	<b>3,5000</b>	<b>1,9982</b>	<b>0,8161</b>
Desvio padrão		1,0690	0,6822	0,2898

$N_e$ : Tamanho da amostra;  $na$ : Número de alelos observados;  $ne$ : Número de alelos efetivos (Kimura e Crow, 1963),  $I^*$ : Índice de informação de Shannon (Lewontin, 1972)



Tabela 10. Heterozigosidade média nos oito locos de microssatélites para o conjunto das três populações de *Solanum lycocarpum*.

<b>Loco</b>	<b>N</b>	<b>H<sub>o</sub></b>	<b>H<sub>e</sub>*</b>	<b>Nei**</b>	<b>Ĥ</b>
Sly02	166	0,3133	0,3175	0,3156	0,3160
Sly04	182	0,2418	0,7198	0,7159	0,5711
Sly07	190	0,5684	0,4750	0,4725	0,4031
Sly13	160	0,4500	0,7751	0,7702	0,6953
Sly23	154	0,1429	0,5394	0,5359	0,4224
Sly25	166	0,1446	0,6131	0,6094	0,4379
Sly26	172	0,1744	0,6177	0,6141	0,5236
Sly27	152	0,4737	0,7572	0,7523	0,6918
<b>Média</b>	<b>168</b>	<b>0,3136</b>	<b>0,6019</b>	<b>0,5982</b>	<b>0,5077</b>
Desvio padrão		0,1654	0,1555	0,1545	0,1379

\* Heterozigosidade esperada de Levene (1949)

\*\* Heterozigosidade esperada de Nei (1973)

Tabela 11. Índice de fixação ( $F_{IS}$ ) de Wright (1978) geral dos alelos no conjunto das populações de *Solanum lycocarpum*, como uma medida de deficiência ou excesso de heterozigotos.

<b>Alelo \ Loco</b>	<b>Sly02</b>	<b>Sly04</b>	<b>Sly07</b>	<b>Sly13</b>	<b>Sly23</b>	<b>Sly25</b>	<b>Sly26</b>	<b>Sly27</b>
Alelo A	-0,0122	-0,0111	-0,0326	0,5429	-0,0405	0,9406	1,0000	0,2715
Alelo B	0,0065	0,7753	0,6613	0,5819	0,8171	0,7335	0,7414	0,6649
Alelo C	0,0235	0,6356	-0,0106	0,4478	0,7662	0,9131	0,7362	0,3214
Alelo D	****	0,8143	-0,1585	0,5132	****	-0,0573	0,6203	0,2762
Alelo E	****	0,5667	-0,3673	-0,0811	****	****	-0,0058	0,2757
Alelo F	****	-0,0111	-0,1111	0,0790	****	****	****	0,6600
<b>Total</b>	<b>0,0074</b>	<b>0,6623</b>	<b>-0,2030</b>	<b>0,4158</b>	<b>0,7334</b>	<b>0,7627</b>	<b>0,7160</b>	<b>0,3703</b>

Tabela 12. Estatísticas-F e fluxo gênico estimado para o conjunto de populações de *Solanum lycocarpum* a partir da análise de oito locos de microssatélites.

<b>Loco</b>	<b>N</b>	<b>F<sub>IS</sub> (f)</b>	<b>F<sub>IT</sub> (F)</b>	<b>F<sub>ST</sub> (θ)</b>	<b>Nm<sub>a</sub>*</b>
Sly02	166	0,0057	0,0067	0,0010	239,3587
Sly04	182	0,5988	0,6816	0,2066	0,9602
Sly07	190	-0,4203	-0,2051	0,1515	1,3999
Sly13	160	0,3494	0,4149	0,1006	2,2350
Sly23	154	0,6554	0,7268	0,2074	0,9554
Sly25	166	0,6759	0,7684	0,2852	0,6266
Sly26	172	0,7016	0,7499	0,1619	1,2945
Sly27	152	0,3293	0,3846	0,0825	2,7798
<b>Média</b>	<b>168</b>	<b>0,3900</b>	<b>0,4848</b>	<b>0,1554</b>	<b>1,3588</b>

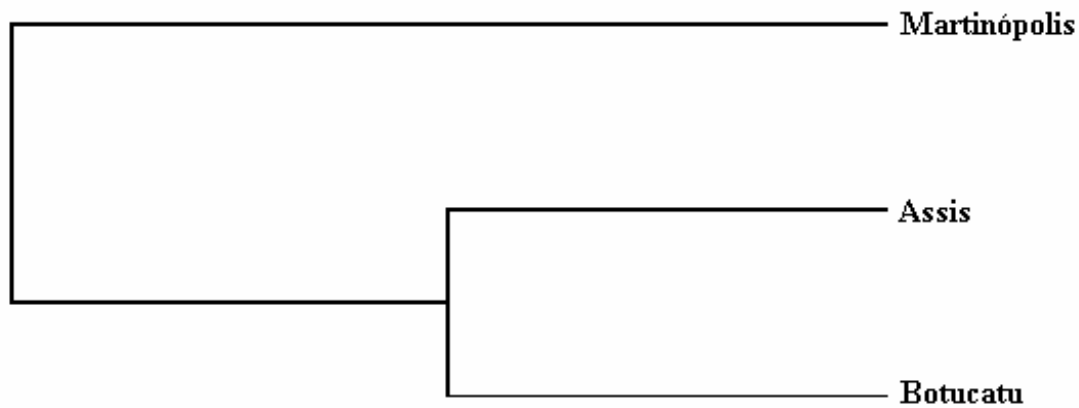
**F<sub>IS</sub> (f):** Índice de fixação ou Coeficiente de endogamia intrapopulacional (endogamia devido ao sistema reprodutivo)

**F<sub>IT</sub> (F):** Índice de fixação total entre populações (endogamia total da espécie)

**F<sub>ST</sub> (θ):** Divergência genética entre populações ou Variância entre populações (endogamia devido à subdivisão)

**\*Nm<sub>a</sub>:** Fluxo gênico estimado por  $F_{ST} = 0,25(1 - F_{ST})/F_{ST}$

Figura 01. Dendrograma mostrando as distâncias genéticas entre três populações de *Solanum lycocarpum* St Hil baseado na Distância Genética de Nei (1972), utilizando-se o critério de agrupamento UPGMA, modificado de NEIGHBOR procedente de PHYLIP, Versão 3.5.



Populações	Assis (1)	Botucatu (2)	Martinópolis (3)
Assis (1)	****	<b>0.7640</b>	<b>0.7286</b>
Botucatu (2)	<b>0.2692</b>	****	<b>0.6610</b>
Martinópolis (3)	<b>0.3167</b>	<b>0.4140</b>	****

Medidas de Identidade e Distância Genéticas originais de Nei (1972). Observa-se a Identidade Genética (acima da diagonal) e Distância Genética (abaixo da diagonal)