

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

Maria de Fatima Ribeiro Chicatte Lima

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE *Helosis
brasiliensis* SCHOTT & ENDL. (BALANOPHORACEAE) DO RIO GRANDE DO SUL**

Santa Maria, RS
2021

Maria de Fatima Ribeiro Chicatte Lima

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE *Helosis
brasiliensis* SCHOTT & ENDL. (BALANOPHORACEAE) DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Agrobiologia**.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Liliana Essi

Santa Maria, RS

2021

Lima, Maria de Fatima Ribeiro Chicatte
DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE
Helosis brasiliensis SCHOTT & ENDL. (BALANOPHORACEAE) DO
RIO GRANDE DO SUL / Maria de Fatima Ribeiro Chicatte
Lima.- 2021.
68 p.; 30 cm

Orientadora: Liliana Essi
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2021

1. Helosis brasiliensis 2. marcadores moleculares 3.
diversidade genética 4. biogeografia 5. plantas
parasitas I. Essi, Liliana II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, MARIA DE FATIMA RIBEIRO CHICATTE LIMA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Maria de Fatima Ribeiro Chicatte Lima

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE *Helosis
brasiliensis* SCHOTT & ENDL. (BALANOPHORACEAE) DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Agrobiologia**.

Aprovado em 01 de outubro de 2021:

Liliana Essi, Dra. (UFSM)

(Presidente/Orientadora)

Antônio Carlos Ferreira da Silva, Dr. (UFSM)

Leonardo Nogueira da Silva, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, RS

2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu esposo Charleston, cuja presença foi essencial para a conclusão dessa pesquisa. Grata pelo seu incentivo e carinho.

Amo você.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde e todo conhecimento adquirido nesse tempo. Agradeço por ser meu guia, e pela oportunidade de construir uma vida acadêmica em uma universidade pública e por conseguir realizar essa pesquisa.

Aos meus pais Pedro e Maria por todas as orações, incentivos e recursos em todos os momentos da minha vida, sinto orgulho em ser filha de vocês, pois sei que vocês venceram várias batalhas na vida para que eu e meus irmão fossemos o que somos hoje, aos meus irmãos Maicon e Narlos que sempre me apoiaram e torceram para que meus objetivos, fossem realizados. Aos meus sogros Rosane e Antônio que sem dúvida alguma estiveram comigo em toda essa trajetória, contribuindo e apoiando sempre. Como também aos demais familiares que mesmo de longe sempre torceram por mim. Agradeço em especial ao meu esposo Charleston por todo amor, carinho, dedicação, incentivo, parceria na vida nos campos e no laboratório. Enfim, as mais belas e sinceras palavras do mundo são poucas por tudo o que você fez por mim.

Minha eterna gratidão a minha orientadora professora Liliana, a qual não mede esforços para motivar seus alunos, sendo uma referência de trabalho e dedicação. Obrigada professora pelo acolhimento e oportunidade de participar do grupo de pesquisa, por todo conhecimento transferido, paciência, incentivo e recursos para que essa pesquisa fosse realizada. Aos meus colegas de laboratório Leandro e Leticia por todos os momentos que compartilhamos. Agradeço também a minha colega e amiga Cassiane, que mesmo a distância esteve sempre presente, me incentivando e acreditando no meu potencial. Não poderia deixar de agradecer a professora Elisete Freitas e Juliana Schaefer pelas indicações de coletas realizadas em Teutônia e Passa Sete.

Minha gratidão ao Laboratório de Manejo Integrado de Pragas sobre a responsabilidade do professor Jerson Guedes, pelo fornecimento de equipamentos para a realização do trabalho. Agradeço em especial ao técnico Gustavo Ugalde pela parceria, incentivo e disponibilidade de tempo, conhecimentos e cafés compartilhados em todos os momentos. Agradeço também a querida Nayomi Andrade, por toda ajuda, carinho, incentivo, companheirismo e por fazer meus dias no 44G mais felizes e coloridos.

Enfim nesse momento o que sinto é uma mistura de gratidão e saudade por todas as pessoas e coisas que aconteceram na minha vida nesse tempo, tenho certeza que jamais esquecerei. Tenho a convicção que estou findando esse ciclo, com uma grande bagagem de conhecimento e com certeza sou uma pessoa melhor em todos os sentidos da minha vida.

*“Os dois mais importantes dias da sua vida são o dia que
você nasce e o dia que você descobre o porquê”*

Mark Twain

RESUMO

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE *Helosis brasiliensis* SCHOTT & ENDL. (BALANOPHORACEAE) DO RIO GRANDE DO SUL

AUTOR: Maria de Fatima Ribeiro Chicatte Lima

ORIENTADORA: Liliana Essi

Helosis brasiliensis (Balanophoraceae) é uma planta parasita, com ocorrência nas regiões sul, sudoeste e nordeste do Brasil, associada ao Bioma Mata Atlântica. É encontrada sobre solos rochosos próximos a córregos e em florestas de transição, em locais úmidos, com pouca incidência de luz solar e com disponibilidade de matéria orgânica. É conhecida popularmente como espiga-de-dragão, e caracteriza-se por ser uma erva holoparasita geófito, com um corpo vegetativo subterrâneo, o qual se agrega à planta hospedeira. Possui uma estrutura rizomatosa, e não apresenta folhas e raízes. Sua inflorescência, com cerca de 5-10 cm, aparece em um curto período quando o clima é propício para sua emergência. Na literatura encontramos poucos estudos morfológicos e moleculares envolvendo a espécie. Assim, o objetivo desse trabalho é avaliar a diversidade genética e estrutura de populações de *Helosis brasiliensis* do Rio Grande do Sul, bem como identificar as espécies que podem ser parasitadas por ela. Foram feitas coletas de quatro populações de *H. brasiliensis* nos municípios de Silveira Martins, Passa Sete, Candelária e Teutônia, totalizando 52 indivíduos. No laboratório de Genética Vegetal foram realizadas extrações de DNA total, seguido das reações de PCR utilizando dois tipos de marcadores moleculares para a avaliação da diversidade genética e estrutura populacional: o espaçador ribossomal nuclear ITS e ISSR. As amostras amplificadas para a região do ITS foram sequenciadas analisadas nos softwares Clustal X, MEGA, Structure X e GenAlEx. As amostras amplificadas com ISSR foram visualizadas em gel de agarose e analisadas no software GenAlEx e Structure X. Também foram coletadas amostras de espécies de plantas arbóreas e arbustivas fotossintetizantes em um raio de 3 metros das populações de *H. brasiliensis* para posterior identificação taxonômica das espécies potencialmente parasitadas, além de algumas raízes que estavam próximas aos indivíduos de *Helosis*. Os índices de diversidade genética foram mais altos dentro das populações que entre as populações. A análise de PCoA revelou cinco grupos genéticos nas populações amostradas. Os indivíduos na população de Teutônia se dividiram em dois grupos. A forma geral, a espécie apresenta níveis de diversidade genética moderados ($I: 0,529$) e polimorfismo alto (89,42%). A partir das análises taxonômicas, conseguimos relatar que a espécie em estudo possui em seu habitat 6 espécies de 6 famílias, sendo elas: Gramineae, Lauraceae, Meliaceae, Piperaceae e Sapindaceae, que foram identificadas em mais de um local de amostragens possuindo alta probabilidade de serem hospedeiras da espécie no Rio Grande do Sul. Conclui-se que *H. brasiliensis* possui alta diversidade genética nas populações analisadas. Ainda não foi possível determinar quais espécies são parasitadas por *Helosis brasiliensis* no Rio Grande do Sul, mas os resultados obtidos até o momento sugerem que a espécie pode parasitar mais de uma espécie de plantas florestais.

Palavras chaves: *Helosis brasiliensis*, marcadores moleculares, diversidade genética, biogeografia, plantas parasitas.

ABSTRACT
GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE OF *Helosis brasiliensis*
SCHOTT & ENDL. (BALANOPHORACEAE) OF RIO GRANDE DO SUL

AUTHOR: Maria De Fatima Ribeiro Chicatte Lima
ADVISOR: Liliana Essi

Helosis brasiliensis (Balanophoraceae) is a parasitic plant, occurring in the south, southwest and northeast regions of Brazil, associated with the Atlantic Forest Biome. It is found on rocky soils close to streams and in transitional forests, in humid places, with little sunlight and with availability of organic matter. It is popularly known as the spike-of-dragon, and is characterized by being a holoparasitic geophyte herb, with an underground vegetative body, which is attached to the host plant. It has a rhizomatous structure and does not have leaves and roots. Its inflorescence, about 5-10 cm, appears in a short period when the climate is favorable for its emergence. In the literature we find few morphological and molecular studies involving the species. Thus, the objective of this work is to evaluate the genetic diversity and population structure of *Helosis brasiliensis* from Rio Grande do Sul, as well as to identify the species that can be parasitized by it. Four populations of *H. brasiliensis* were collected in the municipalities of Silveira Martins, Passa Sete, Candelária and Teutônia, totaling 52 individuals. At the Plant Genetics laboratory, total DNA extractions were performed, followed by PCR reactions using two types of molecular markers for the evaluation of genetic diversity and population structure: the nuclear ribosomal spacer ITS and ISSR. The amplified samples for the ITS region were sequenced and analyzed in Clustal X, MEGA, Structure X and GenAlEx software. Samples amplified with ISSR were visualized on an agarose gel and analyzed in GenAlEx and Structure X software. Samples of photosynthetic tree and shrub plant species were also collected within a radius of 3 meters from the populations of *H. brasiliensis* for further taxonomic identification of the species. potentially parasitized, in addition to some roots that were close to the individuals of *Helosis*. Genetic diversity indices were higher within populations than among populations. PCoA analysis revealed five genetic groups in the sampled populations. Individuals in the population of Teutônia divided into two groups. Overall, the species has moderate levels of genetic diversity (I: 0.529) and high polymorphism (89.42%). From the taxonomic analyses, we were able to report that the species under study has in its habitat 6 species from 6 families, namely: Gramineae, Lauraceae, Meliaceae, Piperaceae and Sapindaceae, which were identified in more than one sampling site with a high probability of be hosts of the species in Rio Grande do Sul. It is concluded that *H. brasiliensis* has high genetic diversity in the populations analyzed. It was still not possible to determine which species are parasitized by *Helosis brasiliensis* in Rio Grande do Sul, but the results obtained so far suggest that the species can parasitize more than one species of forest plants.

Keywords: *Helosis brasiliensis*, molecular markers, genetic diversity, biogeography, parasitic plants.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- *Helosis brasiliensis* em fenofase reprodutiva. Figura A apresenta a inflorescência. Figura B apresenta o haustório e a inflorescência.....18
- Figura 2 – Representação esquemática das regiões de DNA amplificadas na técnica de ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Um único primer com sequência conhecida de microssatélite é utilizado na reação. São amplificados fragmentos em que o mesmo primer anela em regiões próximas da fita de DNA no sentido direto e reverso. SSR=Simple Sequence Repeat (microssatélite).....21
- Figura 3 – Representação esquemática dos espaçadores nucleares ITS 1 e ITS 2. O espaçador ITS1 situa-se entre o gene 18S e o gene 5,8S do rDNA. Já o espaçador ITS2 situa-se entre o gene 5,8S e 26S do rDNA. Para análises, normalmente amplifica-se desde o trecho 3' do gene 18S até a extremidade 5' do gene 26S.....21

Manuscrito I:

- Figura 1- *Helosis brasiliensis* em floração.....29
- Figura 2- População de *H. brasiliensis*.....29
- Figura 3 - Mapa com os locais de amostragem de *Helosis brasiliensis*.....30
- Figura 4 - Padrão de bandas entre as populações de *H. brasiliensis*.....34
- Figura 5 -Teste de Mantel produzido pelo software GenAlEx mostrando a correlação entre a Distância Genética e a Distância Geográfica de 4 populações de *H. brasiliensis*.....35
- Figura 6 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) em quatro populações.....35
- Figura 7 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA), em populações de *H. brasiliensis*.....36
- Figura 8 - Estimativa do melhor K pela estatística Delta K, inferida pelo software Structure.....37
- Figura 9-Análise bayesiana de agrupamentos genéticos entre populações de *Helosis brasiliensis*, obtidas através do software STRUCTURE X para K=537
- Figura 10 - Análise de similaridade genética de ITS de *H. brasiliensis*, produzida através do software MEGA X, com o método Neighbor-Joining.....39
- Figura 11 - Análise de similaridade genética de sequências de ITS de *H. brasiliensis*, produzida através do software MEGA X, com o método UPGMA.....40

Manuscrito II:

- Figura 1 – Indivíduos de *Helosis brasiliensis*.....49
- Figura 2 - Mapa das populações amostradas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, para coletas das potenciais plantas hospedeiras de *H. brasiliensis*.50
- Figura 3 - Raízes das espécies hospedeiras sendo envolvida pela espécie holoparasita.....53
- Figura 4 - Imagens de potenciais hospedeiras de *Helosis brasiliensis*, coletadas e herborizadas a campo no município de Silveira Martins. 1: Rubiaceae- *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltdl; 2: Lauraceae- *Helietta apiculata* Benth; 3: Thelypteridaceae- *Thelyptris denadata* (G. Forst.) E.P.St. John; 4: Sapindaceae- *Serjania laruotheana* Cambess; 5: Piperaceae- *Piper arboretum* Aubl.; 6: Piperaceae- *Piper arboretum* Aubl.....54
- Figura 5 - Imagens de potenciais hospedeiras de *Helosis brasiliensis*, coletadas e herborizadas a campo no município de Passa Sete. 1; 1.1; 1.2;1.3; 1.4: Dicksoniaceae- *Dicksonia*

sellowiana Hook; 2; 2.1: Graminae- *Merostachys* sp.; 3: Euphobiaceae-*Acalypha gracilis* (Spreng.) Mull. Arg.; 4: Piperaceae- *Piper arboreum* Aubl; 5: Cardiopteridaceae- *Citronella paniculata* (Mart.) Howard; 6: *Myrsine coriacea* (Sw) R. Br; 7: *Campomanesia xanthocarpa* Berg.....55

Figura 6 - Imagens de potenciais hospedeiras de *Helosis brasiliensis*, coletadas e herborizadas a campo no município de Candelária. 1:Euphorbiaceae-*Acalypha gracilis* Spreng; 2; Malvaceae- *Pavonia sepium* A.St.-Hil; 3: Graminae- *Phyllostachys* sp.; 4: Malvaceae-*Pavonia sepium* A.St.-Hil; 5: Monimeaceae- *Mollinedia achottiana* (Spreng.) Perkins; 6: Sapindaceae- *Cupania vernalis* Cambess; 7: Meliaceae- *Trichilia clausenii* C.DC.; 8: Piperaceae- *Piper arboreum* Aubl.; 9: Euphorbiaceae- *Gymnanthes concolor* Spreng.; 10: Moraceae- *Sorocea bonplandii* (Baill.) W.C. Burger, Lanjouw & Boer; 11: Meliaceae- *Trichilia elegans* A. Juss; 12: Meliaceae- *Trichilia elegans* A. Juss.56

Figura 7 - Imagens de potenciais hospedeiras de *Helosis brasiliensis*, coletadas e herborizadas a campo no município de Teutônia. 1:Urticaceae- *Boehmeria caudata* Sw.; 2; Graminae- *Merostachys* sp.; 3: Canabaceae- *Trema micrantha* (L) Blume.; 4: Sapindaceae- *Cupania vernalis* Cambess; 5: Lauraceae- *Nectandra megapotamica*; 6:Piperaceae- *Piper arboreum* Aubl; 7: Lauraceae- *Nectandra megapotamica*.(Spreng) Mez.....58

LISTA DE TABELAS

Manuscrito I:

Tabela 1 - Coordenadas geográficas, município e <i>voucher</i> (número tombo no herbário SMDB) para as populações amostradas de <i>Helosis brasiliensis</i> no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.....	30
Tabela 2 - Números das sequências submetidas ao GenBank.....	32
Tabela 3 - <i>Primers</i> selecionados, suas sequências e referências, número das bandas polimórficas.....	33
Tabela 4 - Média dos índices de diversidade genética, calculadas pelo programa GenAlEx para sete primers de ISSR.....	35
Tabela 5 - Variância molecular dentro das populações, e entre as populações.....	36
Tabela 6 – Diversidade genética obtida no programa MEGA X.....	40

Manuscrito II:

Tabela 1 - Número de coletor, coordenadas e <i>voucher</i> correspondente de amostras das potenciais hospedeiras tombadas no herbário SMDB.....	49
Tabela 2 - Espécies de plantas que estavam em um raio de 3 metros das manchas de <i>H. brasiliensis</i> coletadas no momento da amostragem.....	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL:	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 PARASITISMO EM PLANTAS.....	17
3.2 BALANOPHORACEAE E <i>Helosis brasiliensis</i>	17
3.3 MARCADORES MOLECULARES	19
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6 Manuscrito I - DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE <i>Helosis brasiliensis</i> SCHOTT & ENDL. (BALANOPHORACEAE) NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL	27
6.1 INTRODUÇÃO	29
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
6.2.1 Material vegetal	30
6.2.3 Extração de DNA	31
6.2.4 PCR e sequenciamento	32
6.2.5 Análise dos dados moleculares.....	33
6.2.5.1 Análise dos ISSRs	33
6.2.5.2 Análise dos ITS	33
6.2 RESULTADOS	34
6.4 DISCUSSÃO	42
6.5 CONCLUSÃO	44
6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
7 Manuscrito II – POTENCIAIS PLANTAS HOSPEDEIRAS DE <i>Helosis brasiliensis</i> SCOTT & ENDL (BALANOPHORACEAE) NO RIO GRANDE DO SUL	48
7.1 INTRODUÇÃO	50
7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
7.2.1 Procedimentos e materiais de campo	51
7.2.2 Procedimentos e materiais de laboratório	53
7.2.2.1 Extração e quantificação do DNA genômico	53

7.2.2.2 Reação de PCR	53
7.2.2.3 Procedimento de identificação taxonômica:	54
7.3 RESULTADOS	54
7.4 DISCUSSÃO	61
7. 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
APÊNDICE I – Alinhamento das sequências de nucleotídeos do fragmento ITS (Internal Transcribed Spacer), incluindo os trechos ITS 1, 5,8S e ITS 2.	67

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um país de grande biodiversidade, por apresentar diferentes biomas que permitem o desenvolvimento, reprodução e propagação de diferentes espécies de plantas e animais. As plantas compõem um dos grupos mais estudados no Brasil, por sua grande diversidade, importância ecológica e seus diversos usos pelos humanos. O Brasil apresenta 4.993 espécies de Algas, 35.547 espécies de Angiospermas, 1.610 espécies de Briófitas, 114 espécies Gimnospermas e 1.403 espécies de Pteridófitas, totalizando 43.667 espécies de plantas descritas até o momento (FLORA DO BRASIL, 2020).

Algumas espécies de plantas são endêmicas de um local ou região, ou seja, especializadas a um determinado ambiente apenas, que permite a ela se desenvolver e se propagar (GARRAFFONI; MOURA; LOURENÇO, 2017; VITÓRIA; ALVES; SANTIAGO, 2019). O Bioma Mata Atlântica, por exemplo, apresenta uma grande diversidade de espécies endêmicas, que permite o desenvolvimento das mais diferentes espécies de plantas que precisam de um equilíbrio climático, solo fértil e ecossistema variado (SCARANO; CEOTTO, 2015).

O Bioma Mata Atlântica apresenta uma grande diversidade de ambientes e microambientes, o que resulta em diferentes espécies que se adaptam nestes locais, ocorrendo o desenvolvimento e propagação desses indivíduos (SCARANO; CEOTTO, 2015). Originando então, diferentes tipos de relações ecológicas, ou seja, diferentes tipos de interações entre os seres vivos. Interações essas que podem ser feitas em organismos da mesma espécie ou em indivíduos de espécies diferentes. Uma relação ecológica bastante peculiar entre as plantas e pouco investigada é o parasitismo. No Brasil, há grande diversidade de espécies de plantas parasitas, as quais dependem de nutrientes de outras espécies de plantas para seu desenvolvimento e reprodução. Algumas espécies parasitas podem afetar significativamente ou não o desenvolvimento da espécie hospedeira. O parasitismo se constitui em dois grandes tipos: indivíduos hemiparasitas e holoparasitas. O que as diferencia é o quanto elas necessitam da hospedeira para sobreviver (YOSHIDA et al., 2016; MEDINA, 2017). As holoparasitas de raízes são plantas fotoheterotróficas, ou seja, não produzem seu próprio fotoassimilado, são aclorofilas, e até onde se sabe, dependem inteiramente dos recursos retirados do xilema e do floema de seu hospedeiro. Nesta classificação, incluem-se espécies de Balanophoraceae (MELO; ALVES, 2013) como *Helosis brasiliensis* Schott & Endl.

Balonophoraceae é uma família constituída exclusivamente por espécies holoparasitas de raízes, caracterizam-se por possuírem corpo vegetativo subterrâneo, ausência de clorofila e por se assemelharem com fungos. Indivíduos dessa família emergem do solo em época reprodutiva, sendo encontradas em quase todo território brasileiro, em locais com matéria orgânica e disponibilidade de luz (MEIRELLES, 2016; SAMPAIO et al., 2016; SU et al., 2019)

Helosis brasiliensis, popularmente conhecida como espiga-de-dragão, é uma espécie holoparasita de raízes de plantas. Sua inflorescência tem cerca de 5 cm, podendo ser confundida com fungos por sua semelhança de coloração e tamanho. *Helosis brasiliensis* possui um corpo vegetativo subterrâneo que emerge somente na época de reprodução. Ao longo do ano, ela retira da planta hospedeira todos os recursos necessários para seu desenvolvimento e propagação (GONZALEZ; SATO; MARAZZI, 2019; MEIRELLES, 2016).

Para melhor entendimento e conhecimento do parasitismo em plantas, e principalmente sobre a planta foco deste estudo, são necessárias observações da morfologia externa e ecologia e estudos contendo aspectos moleculares, os quais contribuem no conhecimento da diversidade genética. Estudos sobre diversidade genética e estrutura populacional são importantes para a caracterização dessa espécie, mas ainda são escassos ou inexistentes. Os estudos de diversidade genética permitem acessar a estrutura das populações e como a diversidade está distribuída na espécie, compreender as formas de reprodução e dispersão e fomentar estratégias de conservação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a diversidade genética e estrutura populacional de *Helosis brasiliensis* no Rio Grande do Sul, bem como identificar seus potenciais hospedeiros

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a estrutura populacional de *Helosis brasiliensis* em populações do Rio Grande do Sul;
- Avaliar a diversidade genética de *Helosis brasiliensis* em populações do Rio Grande do Sul;
- Determinar as potenciais espécies parasitadas por *H. brasiliensis* no Rio Grande do Sul.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PARASITISMO EM PLANTAS

As plantas parasitas constituem um grande grupo ecológico da flora mundial já descritas, sendo cerca de 4.500 espécies, pertencentes a 28 famílias. Essas espécies de plantas são provenientes de eventos evolutivos independentes, que alteraram a diversidade e os aspectos morfológicos das mesmas e convergiram para relações ecológicas parasíticas (YOSHIDA et al., 2016).

São classificadas pelo local em que ocorrem, pela dependência da planta hospedeira e por conseguir ou não completar seu ciclo de vida sem a planta hospedeira. Conforme o local em que ocorrem, podem ser caracterizadas em parasitas de caule ou de raízes. Possuem uma estrutura de ligação com o hospedeiro (haustório) que fica preso às raízes ou aos caules das plantas, funcionando para a retirada de água e nutrientes diretamente do xilema e /ou floema da hospedeira. Quanto à dependência da planta hospedeira, podem ser classificadas em dois grupos: as hemiparasitas (que apresentam atividade fotossintética) e holoparasitas (que não apresentam pigmentos fotossintetizantes). Referente ao ciclo de vida, algumas espécies parasitas são facultativas, e conseguem completar seu ciclo de vida sem uma planta hospedeira; enquanto outras são parasitas obrigatórias, e não completam seu ciclo de vida na ausência de uma planta hospedeira (YOSHIDA et al., 2016; ZHANG; LI; SUN, 2018).

Em geral, as angiospermas apresentam cloroplasto com genoma altamente conservado, com exceção das plantas holoparasitas que não realizam atividade fotossintética, já que não possuem cloroplasto. A redução dos plastídios ou a ausência dos mesmos em plantas holoparasitas resultaram em uma diminuição do DNA plastidial (MOLINA et al., 2014). Incluem-se nesse caso *H. brasiliensis*, Balanophoraceae, que apresentam uma redução do genoma plastidial (SU et al., 2019).

3.2 BALANOPHORACEAE E *Helosis brasiliensis*

Balanophoraceae é uma família de angiospermas composta por espécies herbáceas, dioicas, eventualmente monoicas, aclorofiladas e holoparasitas de raízes (MEIRELLES, 2016; SAMPAIO et al., 2016; SU et al., 2019). Os indivíduos são formados basicamente por um rizoma subterrâneo possuindo um haustório. As inflorescências são carnosas, unissexuais ou

hermafroditas, contornadas por folhas modificadas em brácteas, possuindo um aspecto coriáceo, tal como o rizoma, e não contêm clorofila nem estômatos (PELSER; TANDANG; BARCELONA, 2014; CHHETRI; O'NEIL; CHHETRI, 2018).

As florestas tropicais constituem um excelente habitat para o desenvolvimento das espécies desta família, por possuírem grande diversidade de hospedeiros e clima propício para o desenvolvimento (LEHN; SALIS; MATTOS, 2015).

Balanophoraceae está representada no Brasil por seis gêneros e 14 espécies (MEIRELLES, 2016). Uma das espécies, ainda pouco conhecida e estudada desta família, seja sobre a diversidade genética e morfologia externa, é *Helosis brasiliensis* (Figura 1, A e B).

Há poucos dados na literatura sobre esse táxon, pois trata-se de uma espécie que já foi considerada, segundo Cardoso e Braga (2018), como sinônimo de *Helosis cayanensis* (Sw.) Spreng. *sensu lato*. Em recente revisão, o grupo passou por uma mudança nomenclatural que separou *H. brasiliensis* de *H. cayanensis sensu stricto*. Considera-se, atualmente, que *H. brasiliensis* seja restrita ao sul, sudeste e nordeste do Brasil, e não mais de ampla ocorrência como se pensava antes. Já *H. cayanensis sensu stricto* fica restrita aos exemplares da Amazônia, centro-oeste e norte do país. Portarias antigas listavam *H. cayanensis* como vulnerável nas listas de espécies ameaçadas de extinção (IBAMA, 1992), porém nas atuais listas vermelhas essa espécie não se qualifica como ameaçada, por sua grande abundância e distribuição (CNC FLORA, 2020).

Figura 1 - *Helosis brasiliensis* em fenofase reprodutiva. Figura A apresenta a inflorescência. Figura B apresenta o haustório e a inflorescência.

A:

B:



Fonte: LIMA; ESSI, 2021.

Helosis brasiliensis possui ocorrência na maioria das regiões do Brasil, associada ao Bioma Mata Atlântica (CNC FLORA, 2020; CARDOSOS; BRAGA, 2018). É encontrada sobre solos rochosos próximos a córregos e em florestas de transição (MEIRELLES, 2016). De acordo com Silva et al. (2015), ocorrem em locais úmidos, com pouca incidência de luz solar e com disponibilidade de matéria orgânica.

Esta erva mede cerca de 5-10 cm de altura, e sua floração ocorre em um curto período quando o clima é propício para sua emergência, com relatos pontuais nos meses de janeiro, abril, outubro, novembro e dezembro (GONZALEZ; SATO; MARAZZI, 2019). Não existem estudos de genética de populações sobre a espécie, os quais poderiam fornecer importantes informações para compreensão da mesma em seus habitats, suas estratégias de proliferação e os possíveis impactos da redução populacional sobre sua sobrevivência. Tampouco, há informações sobre seus hospedeiros, não se sabe ao certo o impacto de sua presença na sobrevivência das árvores parasitadas, informação essa que pode ser obtida através de uma abordagem molecular, com a utilização de sequenciamento de amostras de potenciais plantas hospedeiras.

3.3 MARCADORES MOLECULARES

Os estudos utilizando marcadores moleculares estão sendo cada vez mais requisitados para compreender melhor a variabilidade genética, identificação, variações na sequências de bases nitrogenadas do DNA, entre outros aspectos, dos diferentes organismos de estudos. Nos últimos anos, os estudos utilizando marcadores tem avançado, permitindo entender polimorfismos e variações que existem no DNA dos organismos, permitindo encontrar informações importantes sobre a genética e as relações taxonômicas e evolutivas de diversos indivíduos (GROVER; SHARMA, 2016).

Um marcador molecular de DNA é uma sequência de DNA que geralmente possui um local conhecido em um determinado cromossomo, associado a um determinado gene ou característica de um indivíduo ou de uma espécie. Essa determinada sequência é separada em regiões intergênicas e gênicas. As regiões intergênicas podem apresentar polimorfismos de tamanho ou polimorfismos de nucleotídeo único. No caso dos genes, podem ser SNPs sinônimos ou não-sinônimos (YADAV et al., 2017; NADEEM et al., 2018). As bases do polimorfismo são variações genéticas entre indivíduos de uma mesma espécie, fruto de mutações, inserções, deleções, translocações e duplicações que ocorrem nas sequências de DNA dos indivíduos (NADEEM et al., 2018).

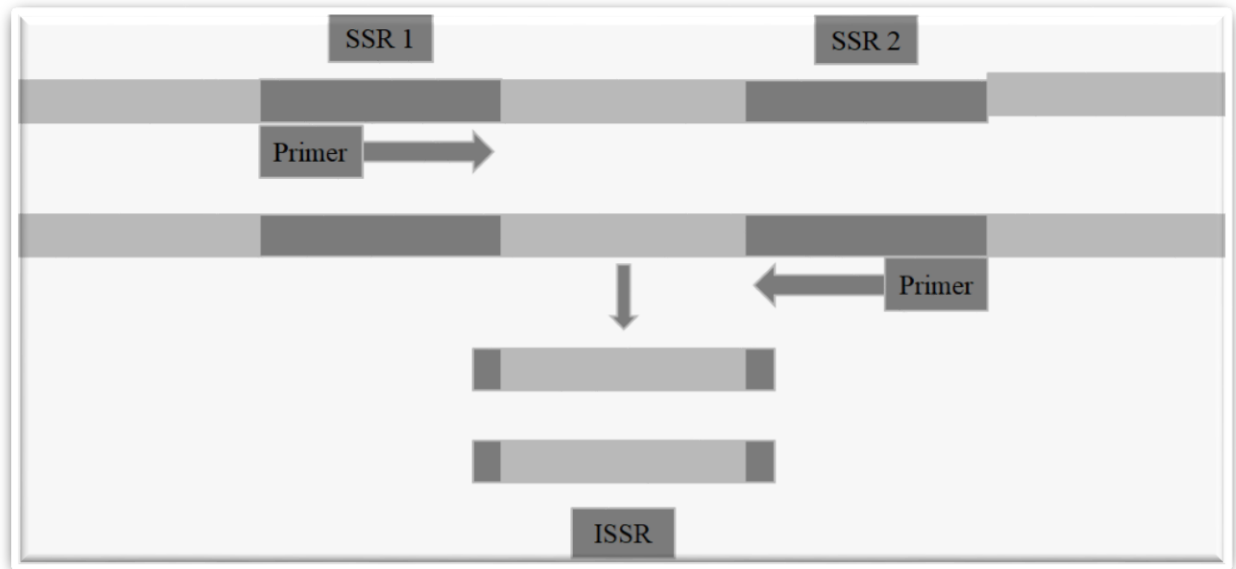
Marcadores moleculares são de extrema importância para distinguir genótipos, sendo assim, através das técnicas de DNA, pode-se conseguir informações relevantes sobre a diversidade genética, variações estruturais em proteínas, polimorfismo, diferenças nas sequências de DNA, como também identificação de indivíduos. Os marcadores são fundamentados em produtos de expressão gênica, como por exemplo, proteínas e enzimas, como diferentes bases em um determinado fragmento de DNA, podem ser também sequências não transcritas (SASAI et al., 2019). São definidos em dois principais grupos: marcadores dominantes e codominantes. Os marcadores de DNA dominantes permitem a existência ou ausência de determinados fragmentos, enquanto os marcadores codominantes permitem a determinação de frequências alélicas nos *loci* (FU et al., 2013; NADEEM et al., 2018).

As análises usando as informações contidas nos marcadores moleculares, permitem conhecer os dados de fluxo gênico, estruturas populacionais e polimorfismos genéticos das espécies (ARIF et al., 2011). Existem diferentes marcadores moleculares baseados em polimorfismo, como por exemplo, polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFPL), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFPL), polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), repetições de sequências simples (SSR), amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), inter sequência simples (ISSR), polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) e marcadores de diversidade de matrizes (DArT) (NADEEM et al., 2018).

Os marcadores moleculares do tipo ISSR (Figura 2) são sequências de nucleotídeos que são ancorados entre os microssatélites (SSR), sendo fragmentos de fácil amplificação, baixo custo e alta reprodutibilidade devido ao uso de primer mais longos que amplificam de 200 a 2000 pb (CHEN et al., 2017; FELIX et al., 2020; WAHYUDI; FIFLIYAH; USLAN, 2020). Esse tipo de marcador é amplamente utilizado para avaliação genética populacional de diferentes plantas, sem a necessidade de sequenciamento do DNA (SANTOS et al., 2011; NIKANTA et al., 2017)

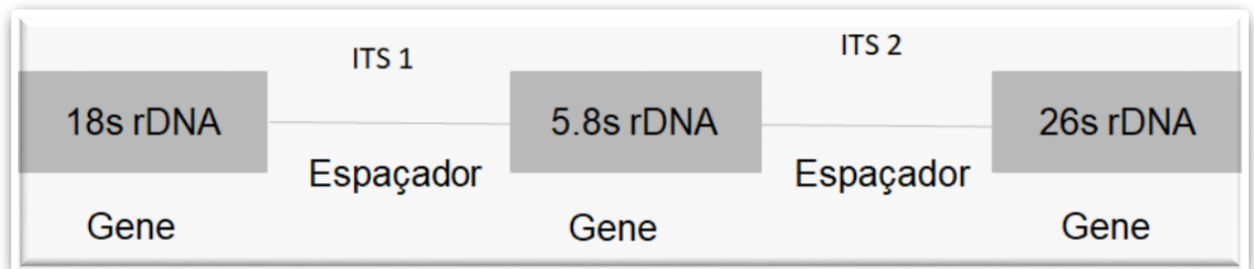
Os marcadores nucleares ITS (ITS 1 e ITS 2, figura 3) constituem um trecho de DNA amplamente utilizado na biologia molecular para identificação de espécies de vegetais. Marcadores esse que possuem locais altamente repetidas que contêm regiões de DNA flanqueadas por sequências mais conservadas, que são os genes responsáveis pela síntese ribossomal (PATWARDHAN; RAY; ROY, 2014; MANOKAR; BALASUBRAMANI; VENKATASUBRAMANIAN, 2017; RAJA et al., 2021).

Figura 2 - Representação esquemática das regiões de DNA amplificadas na técnica de ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Um único primer com sequência conhecida de microssatélite é utilizado na reação. São amplificados fragmentos em que o mesmo primer anela em regiões próximas da fita de DNA no sentido direto e reverso. SSR=Simple Sequence Repeat (microssatélite).



Fonte: LIMA; ESSI, 2021.

Figura 3 – Representação esquemática dos espaçadores nucleares ITS 1 e ITS 2. O espaçador ITS1 situa-se entre o gene 18S e o gene 5,8S do rDNA. Já o espaçador ITS2 situa-se entre o gene 5,8S e 26S do rDNA. Para análises, normalmente amplifica-se desde o trecho 3' do gene 18S até a extremidade 5' do gene 26S.



Fonte: LIMA; ESSI, 2021.

Somando a isso existem muitas lacunas na caracterização das espécies de plantas holoparasitas a serem preenchidas, sendo o caso da *H. brasiliensis*. O presente trabalho possui muitas informações que contribuirão para esclarecer várias informações de diversidade genética

e estrutura populacional da espécie em questão, através da utilização da taxonomia e marcadores moleculares.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIF, I. A. et al. DNA marker technology for wildlife conservation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, p. 219-225, 2011.

CARDOSO, L. J. T.; BRAGA, J. M. A. Typifications and nomenclatural notes on Neotropical Balanophoraceae. **Phytotaxa**, v. 340, p.263–270, 2018.

CHEN, Y. et al. Genetic diversity and variation of Chinese fir from Fujian province and Taiwan, China, based on ISSR markers. **Plos One**, v. 12, e. 4, 2017.

CHHETRI, P. K.; O'NEIL, A. R.; CHHETRI B. Root holoparasite *Balanophora polyandra* Griff. (Balanophoraceae) in eastern Himalaya (Sikkim, India): distribution, range, status and threats. **Journal of Threatened Taxa**, v. 10, p. 12123–12129, 2018.

CNCFlora. **Helosis cayennensis in Lista Vermelha da flora brasileira. Centro Nacional de Conservação da Flora**. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Helosis cayennensis](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Helosis_cayennensis)>. Acessado em 17 de mar de 2020.

FELIX, F.C. et al. Applications of ISSR markers in studies of genetic diversity of *Pityrocarpa moniliformis*. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 4, p. 1017 – 1024, 2020.

FLORA DO BRASIL 2020. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em 15 de mar de 2020.

FU X. et al. RADtyping: An Integrated Package for Accurate De Novo Codominant and Dominant RAD Genotyping in Mapping Populations. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

GONZALEZ, A. M.; SATO, H. A.; MARAZZI B. Embryology in *Helosis cayennensis* (Balanophoraceae): Structure of Female Flowers, Fruit, Endosperm and Embryo. **Plants**, v. 8, 2019.

GARRAFFONI, A. R.S.; MOURA, F. R.; LOURENÇO, A. P. Areas of endemism in the Atlantic Forest: quantitative biogeography insights from orchid bees (Apidae: Euglossini). **Apidologie**, v. 48, p. 513–522, 2017.

GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 290-302, 2016.

IBAMA. Lista Oficial da Flora Ameaçada de Extinção. Nº 06-N, de 15 de janeiro de 1992. Disponível em:<https://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008033646.pdf> Acessado em 20 de mar de 2020.

LEHN, C. R.; SALIS, S. M.; MATTOS, P. P. Ecological aspects of *Langsdorffia hypogaea* (Balanophoraceae) parasitism in the Pantanal wetlands. **Acta Botanica Brasilica**, v. 29, p. 608-612, 2015.

- MANOKAR, J.; BALASUBRAMANI, S.P.; VENKATASUBRAMANIAN, P. Nuclear ribosomal DNA e ITS region based molecular marker to distinguish the medicinal plant *Gmelina arborea* Roxb. Ex Sm. from its substitutes and adulterants. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, 2017.
- MEDINA, E. *Escobedia grandiflora* (L.f.) Kuntze (Orobanchaceae): **Estrutura e ultraestrutura seminal e pós-seminal no parasitismo com *Pennisetum purpureum***. 2017. 96 p. Tese (mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.
- MEIRELLES, J. Flora of the cangas of the Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Balanophoraceae. **Rodriguésia** v. 65, n. 5, p. 1243-1245, 2016.
- MELO, A.; ALVES, M. Sinopse das ervas aclorofiladas ocorrentes no norte da Floresta Atlântica, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 11, p. 29-38, 2013.
- MOLINA, J. et al. Possible Loss of the Chloroplast Genome in the Parasitic Flowering Plant *Rafflesia lagascae* (Rafflesiaceae). **Molecular Biology and Evolution** v. 31, p. 793–803, 2014.
- NADEEM, M. A. et al. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 32, n. 2, p. 261-285, 2018.
- NIKANTA, H. et al. ISSR Marker Based Population Genetic Study of *Melocanna baccifera* (Roxb.) Kurz: A Commercially Important Bamboo of Manipur, North-East India. **Scientifica**, v. 9, 2017.
- PELSER, P. B.; TANDANG D. N.; BARCELONA, J. F. *Balanophora coralliformis* (Balanophoraceae), a new species from Mt. Mingan, Luzon, Philippines. **Phytotaxa**, v. 170, p. 291–295, 2014.
- PATWARDHAN, A.; RAY, S.; ROY, A. Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. **Phylogenetics & Evolutionary Biology**, v. 2, e. 2, 2014.
- RAJA, H. A. et al. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. **Jornal of Natural Products**, v. 80, p. 756-770, 2021.
- SAMPAIO, A. F. et al. Balanophoraceae of Ecological Cuniã Station, Porto Velho, RO, Brazil. **Acta Biológica Catarinense**, v. 3, p. 73-79, 2016.
- SANTOS, L. F. et al. ISSR Markers as a Tool for the Assessment of Genetic Diversity in *Passiflora*. **Biochemical genetics**, v. 49, e. 7-8, p. 550-554, 2011.
- SASAI, R. et al. Development of molecular markers associated with resistance to *Meloidogyne incognita* by performing quantitative trait locus analysis and genome-wide association study in sweetpotato. **DNA Research**, v. 26, p.399–409, 2019.
- SCARANO, F. R.; CEOTTO, P. Brazilian Atlantic forest: impact, vulnerability, and adaptation to climate change. **Biodivers Conserv**, v. 24, p. 2319–2331, 2015.

SILVA, T. C. et al. **Ocorrência de *Helosis cayennensis* (sw.) Spreng. (Balanophoraceae) fragmento florestal, no município de alta floresta, Mato Grosso, Brasil. In: XII Congresso de Ecologia do Brasil.** São Lourenço-MG, 2015.

SU, H-J. et al. Novel genetic code and record-setting AT-richness in the highly reduced plastid genome of the holoparasitic plant *Balanophora*. **PNAS**, v. 116, n. 3, p. 934-943, 2019.

VITÓRIA, A. P.; ALVES, L. F.; SANTIAGO, L. S. Atlantic forest and leaf traits: an overview. **Trees**, v. 33, p. 1535–1547, 2019.

WAHYUDI, D.; RIFLIYAH, K.; USLAN. Genome evaluation of banana cultivars based on morphological character and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) molecular marker. **Biodiveritas**, v. 21, n. 7, p. 2982-2990, 2020.

YADAV, M. K. et al. Use of molecular markers in identification and characterization of resistance to rice blast in India. **PLOS ONE**, v. 12, 2017.

YOSHIDA, S. et al. The haustorium, a specialized invasive organ in parasitic plants. *Annual Review Plant Biology*, v. 67. p. 643–67, 2016.

ZHANG, G.; LI, Q.; SUN, S. Diversity and distribution of parasitic angiosperms in China. **Ecology and Evolution**, v. 8, p. 4378–4386, 2018.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão deste trabalho serão apresentados em dois manuscritos, organizados como artigos originais completos, com introdução, material e métodos, resultados e conclusões, como segue:

Manuscrito I: **DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Helosis brasiliensis* SCHOTT & ENDL. (BALANOPHORACEAE) NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Manuscrito II: **POTENCIAIS PLANTAS HOSPEDEIRAS DE *Helosis brasiliensis* SCHOTT & ENDL. (BALANOPHORACEAE) NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

6 Manuscrito I - DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Helosis brasiliensis* SCHOTT & ENDL. (BALANOPHORACEAE) NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

RESUMO: *Helosis brasiliensis* (Balanophoraceae) é uma erva holoparasita de raízes de plantas, sua inflorescência mede cerca de 5 a 10 cm, a qual só é possível identificar nos meses mais quentes do ano, durante o período de reprodução. É encontrada sobre a serapilheira, com pouca incidência de luz, próximo a córregos e rochas. Até pouco tempo, *H. brasiliensis* era considerada sinônimo de *H. cayennensis*. Em revisões recentes, *H. brasiliensis* foi segregada de *H. cayennensis*, ficando restrita ao Sul e Sudeste do Brasil, enquanto *H. cayennensis* ocorre nas demais regiões do país. Por esta razão, não existem estudos sobre a diversidade genética desta espécie, que até o momento não possui interesses econômicos além da conservação. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade genética e a estrutura populacional de *H. brasiliensis* no Rio Grande do Sul, com usando dois tipos de marcadores moleculares: ITS e ISSR. Quatro populações foram amostradas, localizadas em Silveira Martins, Passa Sete, Candelária e Teutônia, após isso as amostras foram conduzidas ao Laboratório de Genética Vegetal na Universidade Federal de Santa Maria, onde foi realizada a extração de DNA total e reações de PCR com dois fragmentos moleculares: ISSR e ITS. As amostras amplificadas com os fragmentos ISSR foram padronizadas em gel de agarose, colocadas em planilhas no Excel e analisadas nos softwares GenAlEx e Structure X. As amostras amplificadas com os fragmentos nucleares ITS foram purificadas com PEG (polietileno glicol), enviadas para sequenciamento terceirizado, e analisadas no software MEGA. Os resultados obtidos revelam níveis moderados de diversidade genética dentro das populações, e cinco grupos genéticos foram identificados pela análise de Structure. De forma geral. A espécie possui níveis de diversidade genética moderados ($I= 0,411-0,529$) e alto polimorfismo (75 - 89,42%). Os marcadores moleculares utilizados foram eficientes para acessar a diversidade genética da espécie, caracterizando altos níveis de diversidade e afinidades entre grupos genéticos.

Palavras-chave: diversidade genética, marcadores moleculares, espiga-de-dragão, plantas parasitas.

**GENETIC DIVERSITY OF *Helosis brasiliensis* SCHOTT & ENDL.
(BALANOPHORACEAE) IN RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL**

Abstract: *Helosis brasiliensis* (Balanophoraceae) is a holoparasitic herb of plant roots, its inflorescence measures about 5 to 10 cm, which can only be identified in the hottest months of the year, during the reproduction period. It is found on litter, with little incidence of light, near streams and rocks. Until recently, *H. brasiliensis* was considered synonymous with *H. cayennensis*. In recent reviews, *H. brasiliensis* was segregated from *H. cayennensis*, being restricted to the South and Southeast of Brazil, while *H. cayennensis* occurs in other regions of the country. For this reason, there are no studies on the genetic diversity of this species, which so far has no economic interests beyond conservation. The objective of this work was to evaluate the genetic diversity and population structure of *H. brasiliensis* in Rio Grande do Sul, using two types of molecular markers (name which ones). Four populations were sampled, located in Silveira Martins, Passa Sete, Candelária and Teutônia, after which the samples were taken to the Laboratory of Plant Genetics at the Federal University of Santa Maria, where DNA extraction and PCR reactions were performed with two molecular fragments: ISSR and ITS. Samples amplified with ISSR fragments were standardized on an agarose gel, placed in Excel spreadsheets and analyzed in GenAlEx and Structure X software. Samples amplified with ITS nuclear fragments were purified with PEG (polyethylene glycol), sent for outsourced sequencing, and analyzed in the MEGA software. The results obtained reveal high levels of genetic diversity within populations, and five genetic groups were identified by Structure analysis. In general. The species has moderate levels of genetic diversity ($I= 0.411-0.529$) and high polymorphism (75 - 89.42%). The molecular markers used were efficient to access the genetic diversity of the species, characterizing high levels of diversity and affinities between genetic groups.

Keywords: genetic diversity, molecular markers, *espiga-de-dragão*, parasitic plants.

6.1 INTRODUÇÃO

Helosis brasiliensis Schott & Endl. (Balanophoraceae) é uma espécie de planta holoparasita, nativa do Sul, Sudeste e parte do Nordeste do Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020). Possui um corpo vegetativo formado basicamente por um rizoma subterrâneo de onde partem os haustórios, que fazem sua ligação com a planta hospedeira. As inflorescências são unissexuais ou hermafroditas, sendo contornadas por folhas modificadas em brácteas, possuindo um aspecto carnosos (FREITAS, 2012; PELSER; TANDANG; BARCELONA, 2014; CHHETRI; O'NEILL; CHHETRI, 2018).

Essa espécie é endêmica do Bioma Mata Atlântica (CNC FLORA, 2013; CARDOSO; BRAGA, 2018), sendo encontrada em solos rochosos, locais úmidos, com pouca incidência de luz e sobre a serapilheira, ambientes onde apresentam grande disponibilidade de matéria orgânica (MEIRELLES, 2016). Ainda não foi avaliada quanto ao risco de ameaça de extinção. No estado do Rio Grande do Sul, esta espécie era tradicionalmente conhecida como *Helosis cayanensis* (Sw.) Spreng., da qual foi recentemente desmembrada, e sob esta sinonímia já foi incluída na lista de espécies ameaçadas do estado (IBAMA, 1992). Segundo Cardoso (2020), *Helosis brasiliensis* se distingue de *H. cayanensis* pelo formato da inflorescência, sendo cônica em *H. cayanensis*, e esféricas, ovais a obovais em *H. brasiliensis*, além de diferenças nas brácteas e no perigônio das flores pistiladas.

Os estudos sobre *H. brasiliensis* são escassos, e ainda não existem estudos de genética de populações envolvendo a espécie. Estudos envolvendo genética de populações podem fornecer importantes informações para compreensão da dinâmica da espécie em seus habitats, suas estratégias de reprodução e dispersão, fluxo gênico e os possíveis impactos da redução populacional sobre sua sobrevivência, subsidiando assim estratégias para a conservação (SUNDE et al., 2020).

Nesse estudo utilizamos dois tipos de marcadores moleculares para acessar a diversidade genética de *Helosis brasiliensis*: marcadores do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e sequências de DNA da região ribossomal ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Os ISSR são marcadores de grande eficiência e alta reprodutibilidade, já que os *primers* se anelam em regiões específicas do genoma e apresentam padrões de bandas bastante variáveis (LORENZONI et al., 2014; SILVA et al., 2016; ARAÚJO et al., 2016; ABDELAZIZ et al., 2020). Os ITS se localizam entre os genes 18S 5.8S e 28S, essas regiões podem variar na sequência de bases e no comprimento, contribuindo com informações importantes para taxonomia de indivíduos (MENEZES et al., 2010; HAO et al., 2015; BADOTTI et al., 2017).

O objetivo deste estudo foi avaliar os índices de diversidade genética e a estrutura populacional em *H. brasiliensis* no Rio Grande do Sul, Brasil, através da utilização dos marcadores ISSR e ITS, contribuindo assim para futuros estudos moleculares, como também para conservação da espécie.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

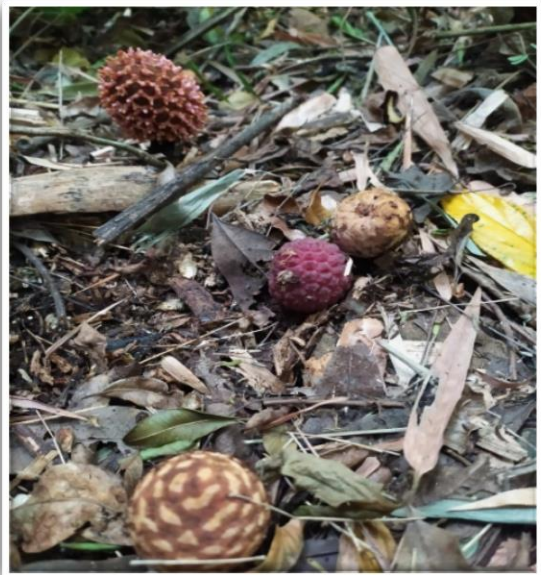
6.2.1 Material vegetal

Cinquenta e duas amostras de *H. brasiliensis* (Figura 1 e 2) foram coletados em quatro municípios do Rio Grande do Sul, Brasil (Silveira Martins, Passa Sete, Candelária e Teutônia) (Figura 3). As populações encontradas eram relativamente pequenas, variando de nove a dezenove indivíduos. As amostras foram obtidas com a remoção dos indivíduos do solo, respeitando um espaçamento de aproximadamente 30 cm entre inflorescências para evitar a coleta de clones. Após a coleta, parte das amostras foi armazenada em sacos plásticos para extração ainda fresca, e parte das amostras foi armazenada em sílica gel, em temperatura ambiente. Para cada população amostrada, foi coletado um *voucher* para confirmação da identificação e para tombamento em herbário. Os *vouchers* foram tombados no herbário SMDB (Universidade Federal de Santa Maria) (Tabela 1).

Figura 1 - *Helosis brasiliensis* em floração.

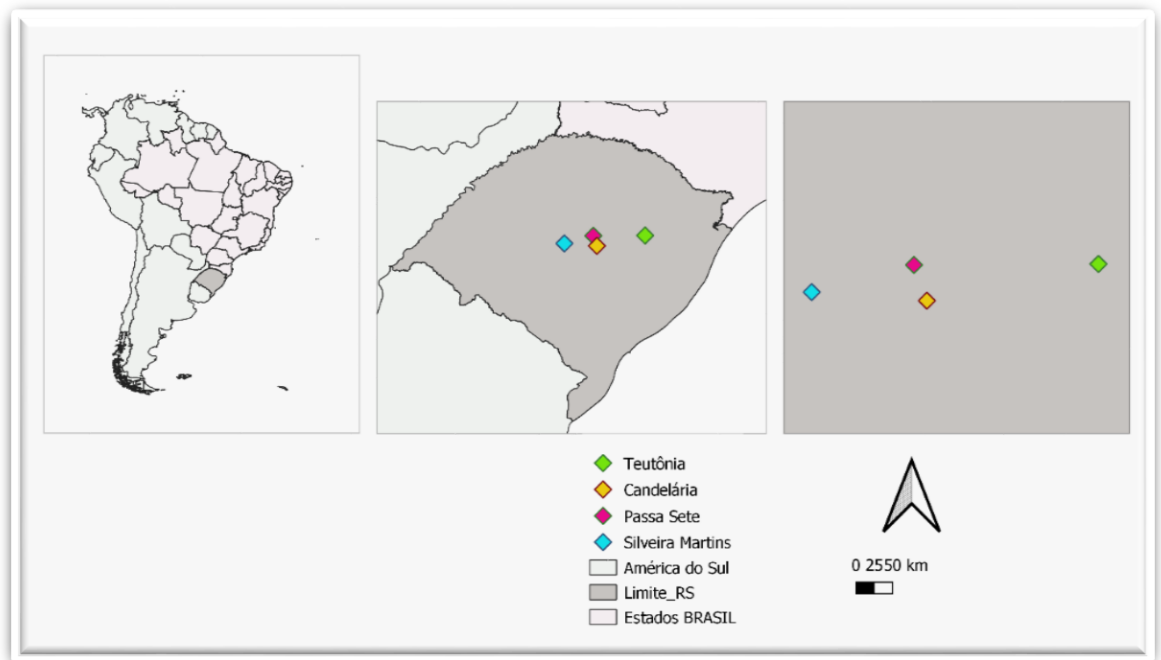


Figura 2 - população de *H. brasiliensis*



Fonte: LIMA; ESSI, 2021

Figura 3 - Mapa com os locais de amostragem de *Helosis brasiliensis*.



6.2.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Genética Vegetal da Universidade Federal de Santa Maria, utilizando o método CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987).

Tabela 1 – Coordenadas geográficas, município e *voucher* (número tombo no herbário SMDB) para as populações amostradas de *Helosis brasiliensis* no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Código da pop.	Latitude	Longitude	Município	Voucher
1	29°39'16,7"	053°35'41.1"	Silveira Martins	20159
2	29°28'38.1"	052°55'36.5"	Passa Sete	20160
3	29°42'37.9"	052°50'33.7"	Candelária	20161
4	29°28'17.0"	051°43'41.8"	Teutônia	20162

Foram utilizados 0,5 g da parte interna da inflorescência das amostras frescas. O DNA total foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, padronizadas alíquotas com cerca de 25 ng/μL de DNA, e foram armazenadas em freezer -20°C até o momento do uso. Repetições foram realizadas a partir de material armazenado em sílica gel.

6.2.4 PCR e sequenciamento

Para amplificação das reações de ISSR, foram testados 16 *primers* de ISSR. As reações de PCR foram preparadas em volumes finais de 25 μ L, contendo 20-25 ng de DNA total, 9,2 mM $MgCl_2$ (50mM), 2X de tampão (10X), 0,4 mM de iniciador (10mM)(Tabela 3, 0,4 mM de mistura dNTPs (40 mM) (cada dNTP 10mM), 0,08% de DMSO 2%, 0,04U de Taq DNA polimerase (5U/ μ L) e água ultrapura estéril. A amplificação foi realizada em um termociclador Minicycler (Marshall Scientific, New Hampshire, EUA), sendo realizado 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 50° C, 2 minutos a 72°C, seguidos de 5 minutos a 92°C, e completado com uma extensão final de 5 minutos a 72°C. A temperatura de anelamento usada para todos os *primers* foi 50 °C. Após o término da reação os produtos de PCR foram corados com GelRed e submetidos a eletroforese utilizando gel de agarose 1,3%. Os resultados foram visualizados em transiluminador e fotografados em câmera digital para posterior análise e montagem da matriz binária. O tamanho dos fragmentos amplificados foi feito por comparação com DNA Ladder de 100 pb (Cellco) e 1000 pb (Promega).

As reações da região do ITS1 e ITS2 foram realizadas com volumes finais de 25 μ L, contendo 1 μ L de DNA total (20-25 ng), 3 mM de $MgCl_2$ (50 mM), 2 X de tampão (10X), 0,2 mM de iniciador direto (10 mM) (TCCGTAGGTGAACCTGCGG), 0,2 mM de iniciador reverso (10 mM) (TCCTCCGCTTATTGATATGC), 0,8 mM de mistura dNTPs (40 mM) (cada dNTP 10mM), 0,02 U de Taq DNA polimerase (5U/ μ l), 0,08% DMSO 2% e água ultrapura estéril. A amplificação foi realizada em um termociclador Minicycler (Marshall Scientific, New Hampshire, EUA), para o fragmento ITS foi realizado 38 ciclos de 5 minutos a 94 °C, 1 minuto a 58 °C, 1 minuto a 72 °C, seguidos de 7 minutos a 72 °C, e completado com uma extensão final de 7 minutos a 72 °C.

Os produtos do PCR foram corados com Gel Red e analisados gel de agarose 1,2%. Após a eletroforese os fragmentos foram visualizados em luz ultravioleta e comparados com marcadores de 1 Kb e 100 pb. Após as amostras foram purificadas com solução PEG (polietileno glicol) e enviadas para sequenciamento terceirizado na empresa ACTGene para posterior análise de diversidade genética. Como também as sequenciadas foram submetidas a plataforma GenBank (Tabela 2).

Tabela 2 - Números das sequências submetidas ao GenBank (sequências em etapa de submissão)

Amostra	Número GenBank
MB22I	OL639722
MB22H	OL639723
SM10H	OL639719
SM8H	OL639718
SM5H	OL639717
SM2H	OL639716
SM2I	OL639715
TTI	OL639724
TTH	OL639725
PS14H	OL639721
PS14I	OL639720

6.2.5 Análise dos dados moleculares

6.2.5.1 Análise dos ISSRs

Os fragmentos de ISSR amplificados foram compilados em uma matriz binária no Excel, que será disponibilizada quando solicitada, com presença (1) e ausência (0) de bandas. Foram consideradas apenas as bandas bem definidas. A partir disso, matrizes foram geradas para análise nos softwares GenAlEx 6.5 (PEAKAL; SMOUSE, 2012) e Structure X (PORRAS-HURTADO et al., 2013).

Análise de diversidade genética de populações, Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e Análise de Variância Molecular (AMOVA), foram realizadas através do software GenAlEx X 6.5 utilizando uma matriz que continha todos os *primers*, sem a inclusão das amostras que possuem dados faltantes. Além disso, foi feita uma matriz com todas os indivíduos, incluindo aqueles com dados faltantes, em seguida os dados foram rodados e analisados utilizando o software Structure e Structure Harvester, com $K = 12$ e 2 interações.

6.2.5.2 Análise dos ITS

Após o recebimento dos eletroferogramas, foi feita uma etapa de conferência de sequências, alinhamento de sequências usando o programa Clustal X (LARKIN et al., 2007), e edição das sequências no software GeneDoc (Apêndice I). As análises de diversidade genética foram realizadas utilizando o software MEGA X, com a utilização do método Neighbor-Joining e UPGMA (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2018).

6.2 RESULTADOS

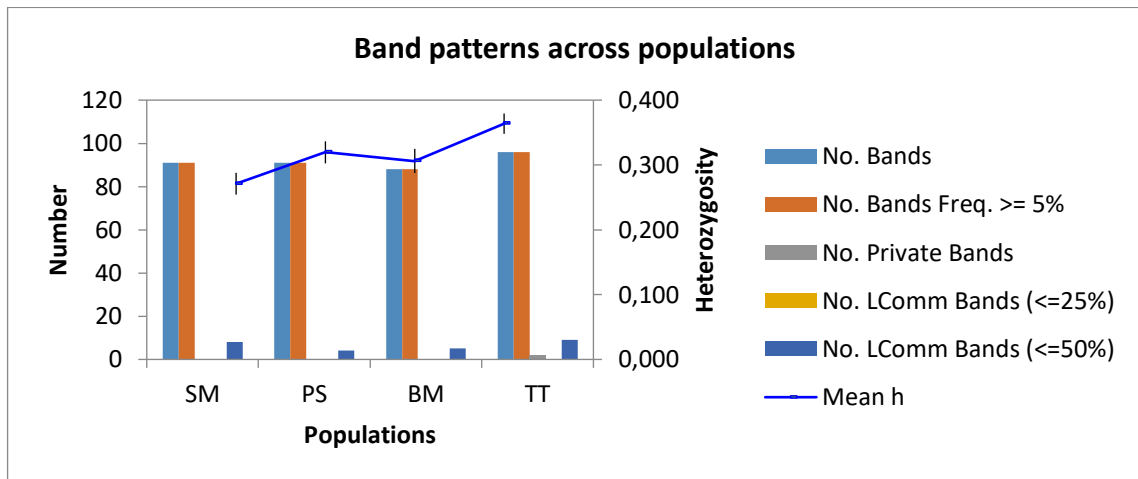
Dos iniciadores utilizados nas reações de PCR, sete se mostraram eficientes na amplificação da reação, (F7, O3, O4, O6, P2, P4, I4), apresentando clareza e bandas polimórficas, sendo utilizados então nesse estudo (Tabela 3).

Tabela 3 - *Primers* selecionados, suas sequências e referências, número das bandas polimórficas.

Primer	Sequência	Número de bandas
F7	GTGTGTGTGTGTGTGTA	10
O3	CACACACACACACAT	14
O4	ACACACACACACACC	9
O6	GGAGAGGAGAGGAGA	19
P2	GAGAGAGAGAGAGAGAT	10
P4	CTCTCTCTCTCTCTG	5
I4	GACACGACACGACAC	14

Os sete *primers* selecionados amplificaram por 51 indivíduos de *H. brasiliensis* geraram cerca de 104 bandas polimórficas. Os fragmentos amplificados variaram entre 500 pb a 2080 pb, em média um total de 80 a 100 bandas foram amplificados por população (Figura 4).

Figura 4 - Padrão de bandas entre as populações. SM: Silveira Martins, PS: Passa Sete, BM: Candelária (Morro Botucaraí), TT: Teutônia.



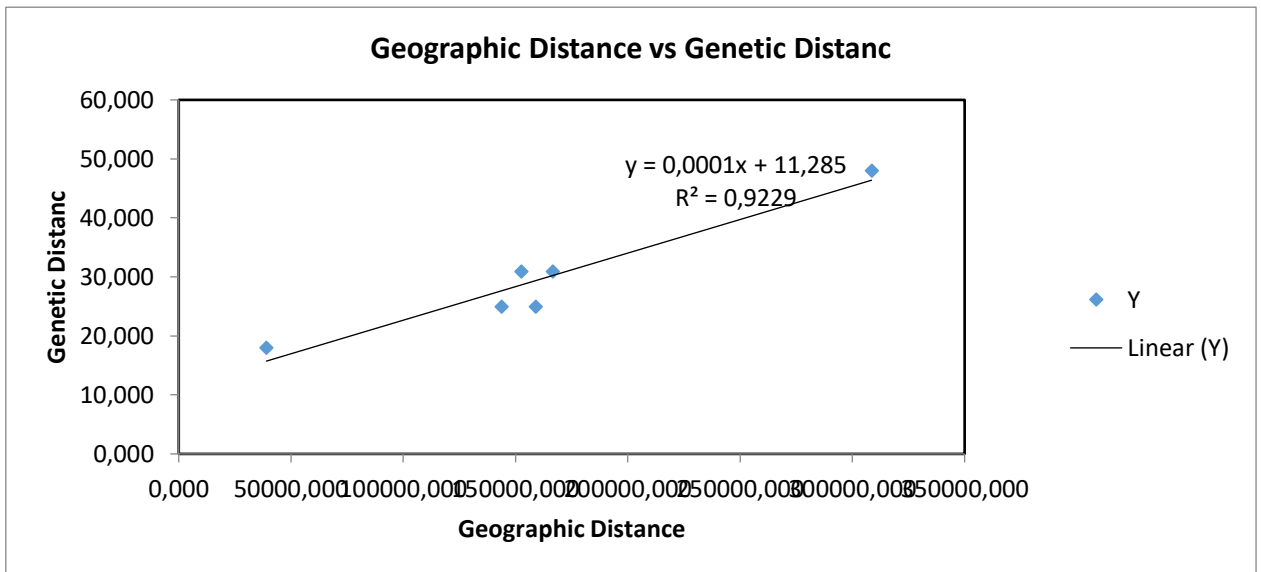
A porcentagem de polimorfismo variou de acordo com o local amostrado, com valor menor para a população de Candelária (75,00%) e valor maior de polimorfismo para Teutônia (89,42%). A população de Teutônia apresentou maior índice de diversidade genética ($h=0,364$, $I=0,529$), enquanto a população de Silveira Martins apresentou o menor índice de diversidade genética ($h=0,271$, $I=0,411$) (Tabela 4). O Teste de Mantel revelou alta correlação entre a distância genética e a distância geográfica ($R = 0,92$) (Figura 5).

Tabela 4 - Média dos índices de diversidade genética, calculadas pelo programa GenAlEx para sete primers de ISSR.

População	P (%)	Na	Ne	I	H
Silveira Martins	78,85	1,663	1,448	0,411	0,271
Passa Sete	82,69	1,702	1,556	0,471	0,319
Candelária	75,00	1,596	1,540	0,447	0,306
Teutônia	89,42	1,817	1,653	0,529	0,364

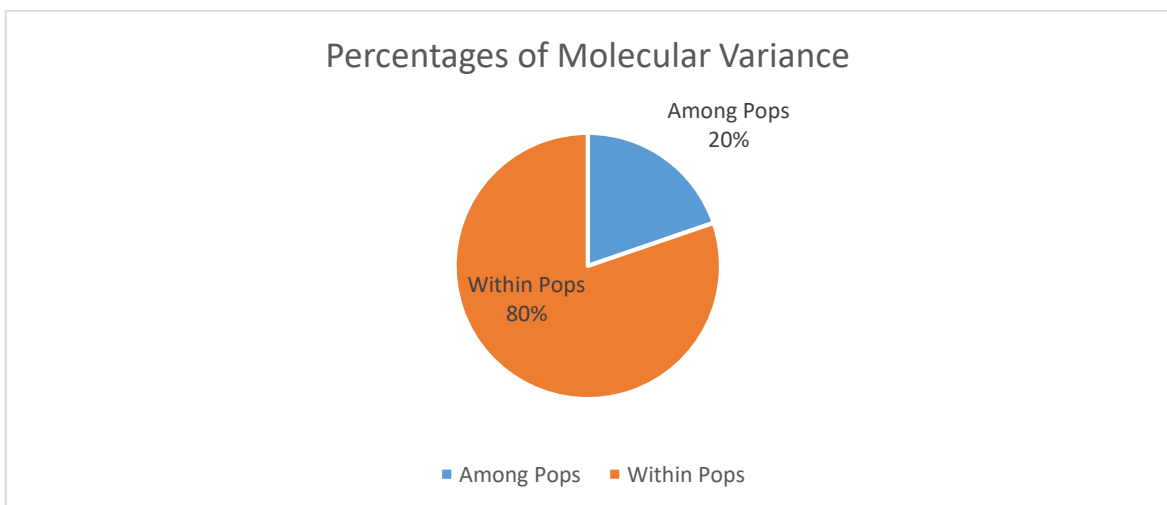
P (porcentagem de laço polimórfico); Na (número de alelos diferentes); Ne (número efetivos de alelos); I (índice Shannon); h (diversidade genética).

Figura 5 - Teste de Mantel produzido pelo software GenAlEx, mostrando a correlação entre a Distância Genética e a Distância Geográfica de 4 populações de *H. brasiliensis*.



A partir do teste de AMOVA (Figura 6), podemos perceber que a maior variação ocorreu dentro das populações sendo 80%, que entre as populações sendo 20%, ou seja, a maior parte das variações estão internamente nas populações (Tabela 5).

Figura 6 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) em quatro populações.



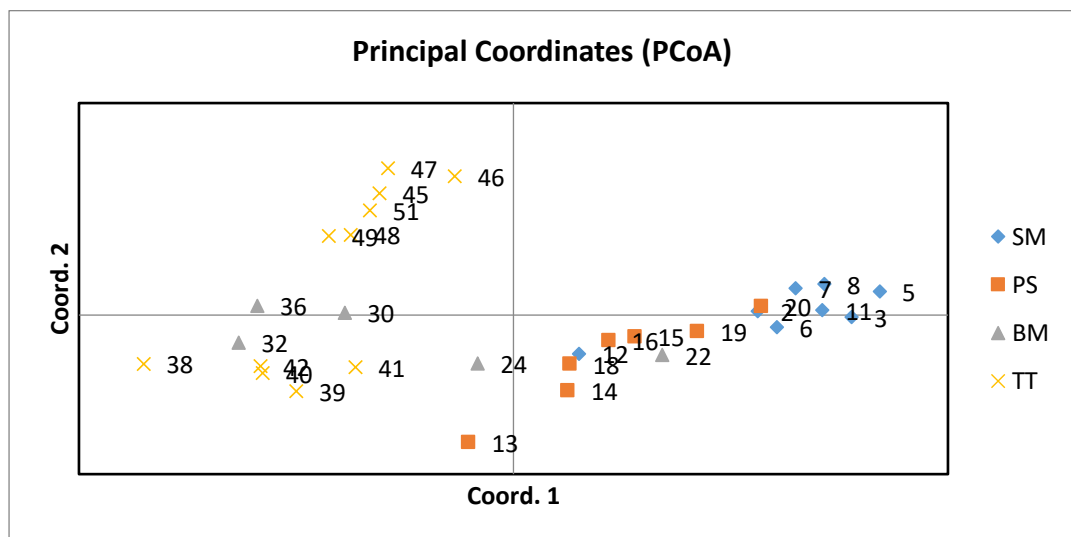
A através das Análise das Coordenadas Principais (PCoA), podemos observar a distribuição espacial das populações e como os indivíduos se apresentam dentro das populações. A população de Teutônia está bem separada no gráfico das demais populações analisadas, como também

possuindo uma separação interna na própria população, já que alguns estão na extremidade superior e outros na extremidade inferior do eixo. Silveira Martins está ocupando o segundo e quarto quadrante, demonstrando certa homogeneidade na população, os indivíduos dessa população ocorrem de forma semelhante aos indivíduos da população de Passa Sete, que também se apresenta nos mesmos quadrantes (Figura 7).

Tabela 5 - Variância molecular dentro das populações, e entre as populações.

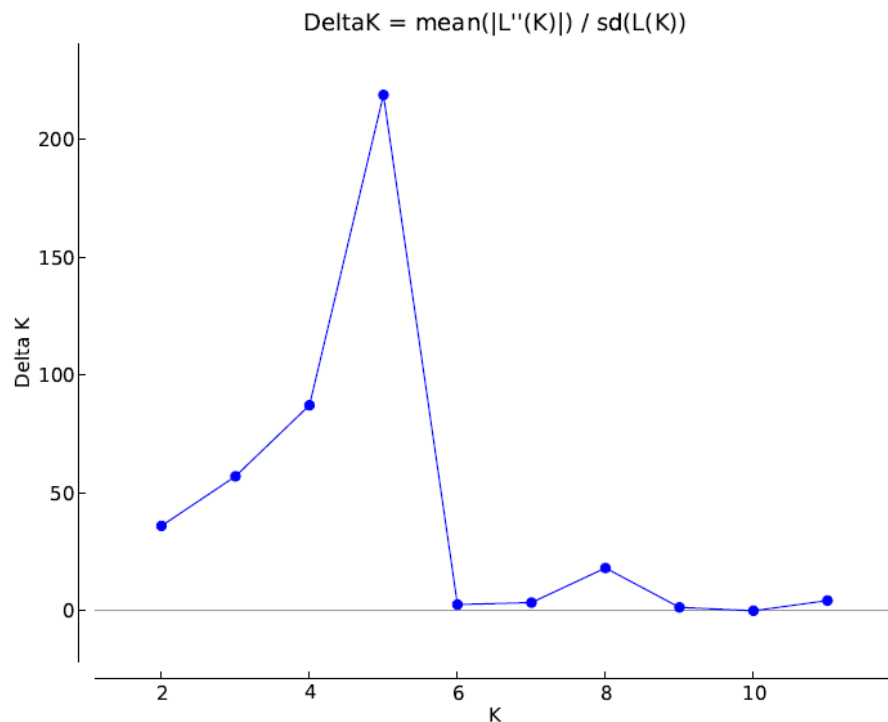
Fonte	df	SS	MS	Est. Var.	%
Entre populações	3	164,009	54,670	4,708	20%
Dentro das Populações	27	516,636	19,135	19,135	80%
Total	30	680,645		23,842	100%

Figura 7 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA), em populações de *H. brasiliensis*. As cores identificam as populações. SM: Silveira Martins, PS: Passa Sete, BM: Candelária (Morro Botucaraí), TT: Teutônia.



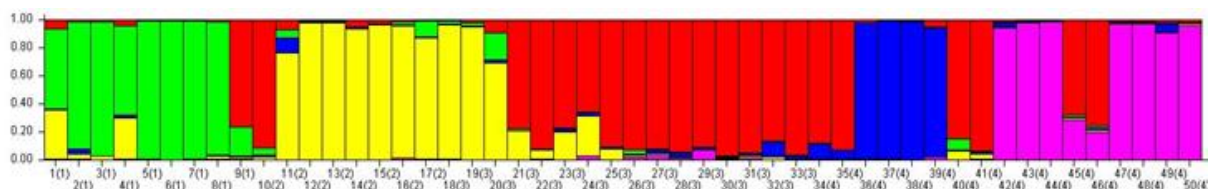
A inferência bayesiana realizada pelos softwares Structure e Structure Harvester, em que revelou através de agrupamentos o K=5 (Figura 8).

Figura 8 - Estimativa do melhor K pela estatística Delta K, inferida pelo software Structure Harvester.



Segundo a Análise Bayesiana (Figura 9), onde cada grupo genético está representado por uma cor, podemos observar que existe uma pequena mistura genética entre as populações, mas no geral as populações são geneticamente estruturadas. Já a população de Passa Sete se apresenta de forma mais homogênea no gráfico.

Figura 9 - Análise bayesiana de agrupamentos genéticos entre populações de *Helosis brasiliensis*, obtidas através do software STRUCTURE para K=5. (1): Silveira Martins, (2) Passa Sete, (3) Candelária, (4): Teutônia.



A matriz da região do ITS incluiu 16 indivíduos das quatro populações. O alinhamento possui um comprimento total de 658 pb, sendo 41 caracteres variáveis. Conforme as análises de similaridade genética através do método Neighbor-Joining baseado nas sequências de ITS

(Figura 10), os indivíduos de Silveira Martins, Candelária e Passa Sete, estão agrupados, porém também podemos observar que algumas amostras estão dispostas de forma misturadas nos dendrogramas, apresentando similaridade genética entre as amostras e as populações. A população de Teutônia se mostrou geneticamente mais distante das demais nesta análise, o que está de acordo com o observado para a PCoA com os marcadores ISSR. A aparente mistura genética também se confirma através da análise de UPGMA (Figura 11) onde os grupos genéticos de forma geral, se mostraram de maneira homogênea. Considerando as análises de diversidade feita no MEGA com ITS (Tabela 6), obtivemos algumas variações de média comparadas com as análises obtidas do programa Structure, onde a média de diversidade genética foi menor do que a obtida através dos ISSR em todos os parâmetros analisados.

Figura 10 – Análise de similaridade genética de ITS de *H. brasiliensis*, produzida através do software MEGA X, com o método Neighbor-Joining.

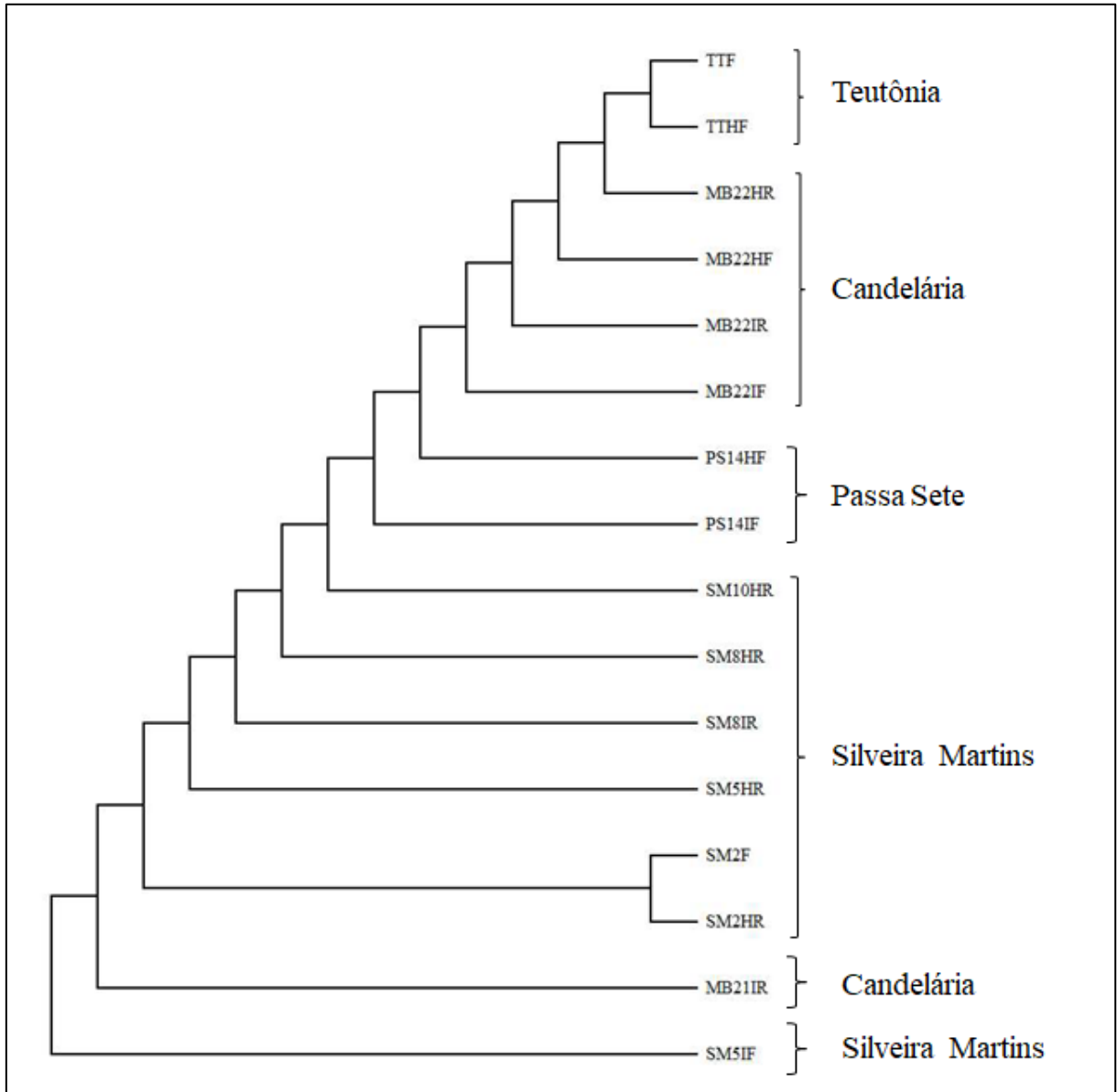


Figura 11 - Análise de similaridade genética de sequências de ITS de *H. brasiliensis*, produzida através do software MEGA X, com o método UPGMA.

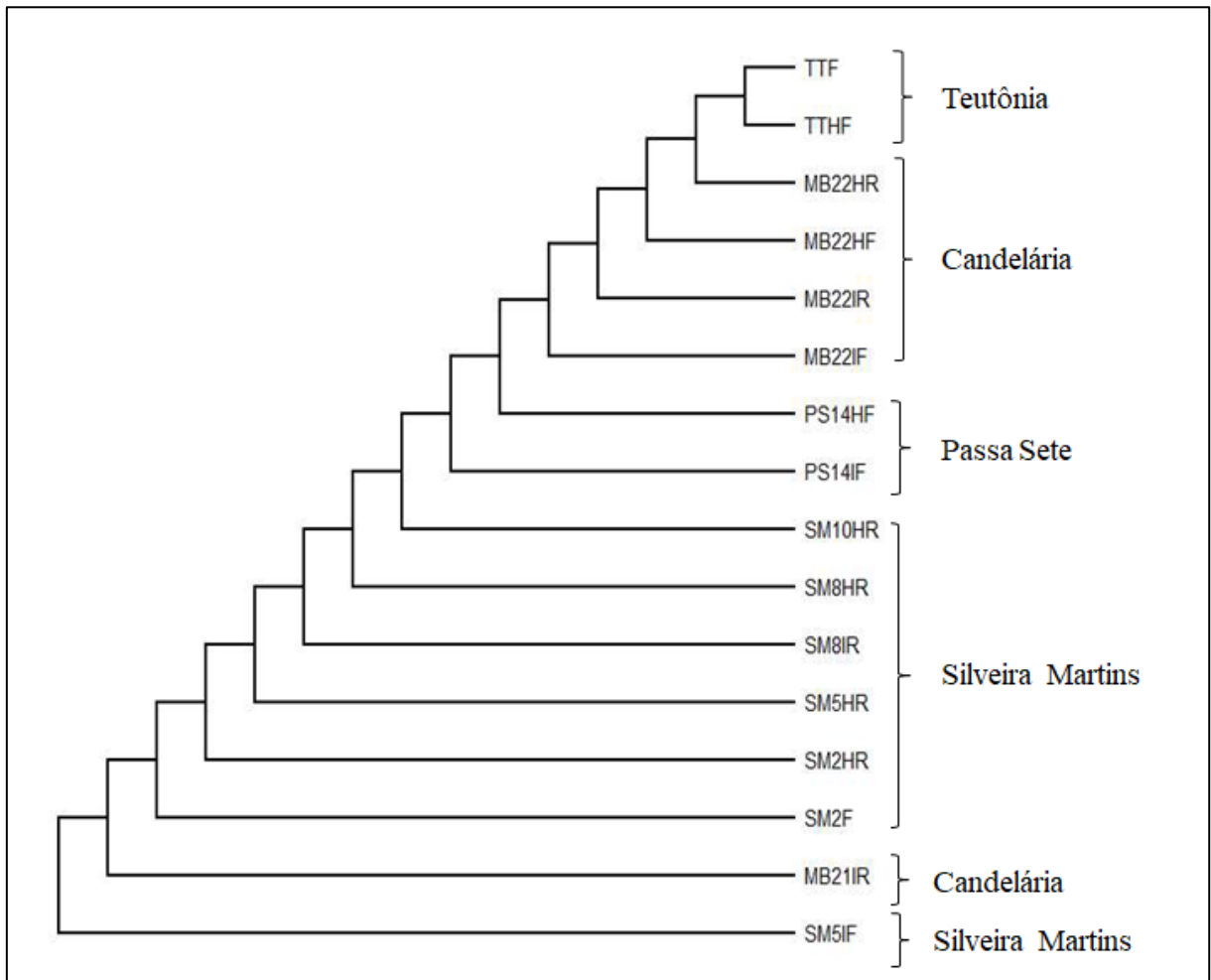


Tabela 6 – Diversidade genética obtida no programa MEGA X.

Diversidade genética	Média
População inteira	0,02
Entre populações	0,01

6.4 DISCUSSÃO

Marcadores moleculares como os ISSRs e os ITS são ferramentas extremamente importantes para avaliar a diversidade genética e a estrutura populacional de diferentes espécies (DOMINGUES et al., 2017; NILKANTA, 2017; GUIZADO et al., 2020). Como também, as análises realizadas ajudam da descrição molecular de espécies que não possuem estudos genéticos (FELIX et al., 2020), sendo o caso da espécie em foco nesse estudo.

Os resultados obtidos através do GenAlEx (Tabela 5) confirmam que a espécie possui uma diversidade genética moderada entre as populações, em todos os padrões analisados, resultados similares foram encontrados por Costa et al. (2017) em populações de *Dactylis glomerata* L. (Poaceae), Imarhiagbe e Aigbokhan (2019) obtiveram resultados semelhantes em *Thonningia sanguinea* (Balanophoraceae) no Sul da Nigéria. Essa informação não foi observada nos dados obtidos através do programa MEGA (Tabela 6), onde a média de diversidade genética foi baixa, sugere-se que isso ocorreu pela natureza do próprio marcado molecular utilizado, comparado com os padrões de bandas obtidas com os ISSRs. Além disso, conforme esperado os fragmentos amplificados através dos marcadores ISSRs apresentaram maior percentual de *loci* polimórficos (Tabela 4) do que com a utilização dos marcadores ITS, já era esperada uma maior conservação das sequências de DNA.

Um número amostral pequeno pode apresentar variância mais alta, entretanto o número de indivíduos amostrados reflete o tamanho efetivo das populações a campo. A espécie foi encontrada em manchas pequenas, e um espaçamento mínimo de 30 cm entre os indivíduos precisou ser respeitado, para evitar a coleta repetida de indivíduos (LI et al., 2009). Vale ressaltar que a partir das análises da matriz binária não obtivemos indivíduos com padrões de bandas repetidas, comprovando que não coletamos clones dos indivíduos.

A maior porcentagem da variação é encontrada dentro das populações que entre as populações, existindo muito indivíduos que desviam da média dentro dos próprios grupos genéticos, resultados semelhantes foram encontrados por Bastos-Záchia et al. (2020), em populações de *Colletia paradoxa* (Ramnaceae), Linares-Holguín, Sánchez-Peña e Molina-Freaner (2016) obtiveram dados similares ao analisarem *Pholisma culiacanum* (Boraginaceae). Isso pode ser explicado através de mudanças bióticas ou abióticas, que reduzem o tamanho populacional, fazendo com que ocorra fragmentações, mas ainda assim parte da diversidade genética se mantém (ROSSI et al., 2014). Outra hipótese é a manutenção de uma diversidade ancestral, onde *H. brasiliensis* apresentava uma distribuição mais ampla, possibilitando uma conectividade entre todas estas populações, que atualmente se encontram isoladas. Essas

possibilidades se confirmam através do gráfico (Figura 9) gerado no programa STRUCTURE, onde o grupo genético de Candelária, do Morro Botucará, se apresenta realizando uma conexão com todas as populações amostradas

Embora tenham sido identificadas, *a priori*, quatro populações baseadas nas localidades de coleta, foi obtido um $K=5$ pelo Structure Harvester (Figura 4), devido à população de Teutônia apresentar dois grupos genéticos diferentes. A análise de PCoA (Figura 7) confirma que esta população se apresenta isolada das demais. Para as demais populações amostradas, apesar de existir mistura entre os indivíduos, ainda assim se observa a prevalência de um pool gênico único, sugerindo que sejam boas populações naturais.

A população de Teutônia apresenta indícios de que seja formada por dois pools gênicos que tenham vindos de outras localidades, já que segundo Cardoso et al. (2015) a dispersão das espécies da família Balanophoraceae se dá por ombrocoria ou por animais frugívoros. Esta população aparece bem separada espacialmente no gráfico (Figura 7) das demais populações, no entanto os indivíduos dessa população são menos distantes geneticamente entre si do que das demais populações, ou seja, existe uma grande variação dentro da população. As populações não são fortemente estruturadas, mas possuem uma identidade genética marcada por local. Existe uma correlação entre distância genética e distância geográfica, observado pelas populações de Silveira Martins e Passa Sete que possuem uma distribuição espacial no gráfico semelhante.

A Análise de Coordenadas Principais confirma uma tendência apresentada pelo Teste de Mantel de diferenças geográficas entre as populações. Mas também, a variância vista na AMOVA se apresenta no gráfico da PCoA na forma de mistura das populações, com exceção dos grupos genéticos de Teutônia que se divide em dois grupos, sendo que um está afastado dos demais. As informações obtidas na análise de similaridade genética contribuem para a caracterização da espécie em questão, como podemos observar existe uma mistura de grupos genéticos nos ramos, ou seja, existe afinidades genéticas entre os grupos genéticos analisados, dados esses que corroboram com os aspectos apresentados no gráfico de PCoA e da Análise Bayesiana.

6.5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e discutidos aqui nesse estudo, podemos concluir que os marcadores moleculares ISSR e ITS foram eficientes na identificação da diversidade genética entre as populações de *H. brasiliensis*. Como também, observou-se que existe maior diversidade genética dentro das populações que entre elas, as populações possuem um valor moderado de diversidade genética, tal como existe uma correlação entre a diversidade genética e a distância geográfica, além disso, podemos observar afinidades genéticas entre as amostras e as populações. Em termos de risco de ameaça de extinção, a espécie aparenta ter uma situação genética de menor preocupação, por apresentar alta diversidade genética.

6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELAZIZ, S. M. et al. Inter simple sequence repeat markers to assess genetic diversity of the desert date (*Balanites aegyptiaca* Del.) for Sahelian ecosystem restoration. **Scientific Reports**, v. 10, p. 14948, 2020.

ARAÚJO, F. S. et al. ISSR molecular markers for the study of the genetic diversity of *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. **Idesia**, v. 34, n. 3, 2016.

BADOTTI, F. et al. Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). **BMC Microbiology**, v. 17, e. 42, 2017.

BASTOS-ZÁCHIA, N. R. et al. Genetic diversity and population structure of *Colletia paradoxa* (Rhamnaceae) a medicinal species threatened with extinction in Brazil. **PLANT BIOSYSTEMS**, 2020.

CARDOSO, L. J. T.; BRAGA, J. M. A. A New Caribbean Species of *Helosis* (Balanophoraceae) with a Revised Key to the Genus. **Systematic Botany**, v. 40, e. 2, 2015.

CARDOSO, L. J. T.; BRAGA J. M. A. Typifications and nomenclatural notes on Neotropical Balanophoraceae. **Phytotaxa**. v. 340, e. 3, p. 263–270, 2018.

CARDOSO, L.J.T. 2020. *Balanophoraceae in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB138300>>. Acesso em: 30 ago. 2021.

CHHETRI, P.K.; O'NEILL A.R.; CHHETRI B. Root holoparasite *Balanophora polyandra* Griff. (Balanophoraceae) in eastern Himalaya (Sikkim, India): distribution, range, status and threats. **Journal of Threatened Taxa**. v. 10, e. 8, p. 12123–12129, 2018.

CNCFlora. *Helosis cayennensis* in **Lista Vermelha da flora brasileira**. **Centro Nacional de Conservação da Flora**. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Helosis cayennensis](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Helosis_cayennensis)>. Acessado em 17 de mar de 2020.

DOMINGUES, S. D. et al. Selection of primers for Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) in *Cereus* sp. (Cactaceae). **Revista Biotecnologia & Ciência** v.6, n.2, p. 46-54, 2017.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. CTAB DNA extraction in plants. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

FELIX, F.C. et al. Applications of issr markers in studies of genetic diversity of *Pityrocarpa moniliformis*. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 4, p. 1017 – 1024, 2020.

FREITAS, L.S. Inflorescências da holoparasita de raízes *Langsdorffia Hypogaea* (Balanophoraceae) como recurso chave para uma fauna generalista na estação seca [manuscrito] / Luana da Silva Freitas - 2012.

GUIZADO, S. J. V. et al. Genetic diversity and population structure of endangered rosewood from the Peruvian Amazon using ISSR markers. **Acta amazonica**, v. 50, e. 3, p. 204-212, 2020.

HAO, C.; GU, X.; XIÃO, P. G. *Potentilla and Rubus* medicinal plants: potential non-*Camellia* tea resources. **Medicinal Plants Chemistry**, p. 373–430, 2015.

IBAMA. Lista Oficial da Flora Ameaçada de Extinção. Nº 06-N, de 15 de janeiro de 1992. Disponível

em:<https://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008033646.pdf> Acessado em 20 de mar de 2020.

IMARHIAGBE, O.; AIGBOKHAN, E. I.; Thonningia sanguinea Vahl. (Balanophoraceae) in Southern Nigeria: II. Patterns of Genetic Diversity and Population Structure within and between Populations. **Makara Journal of Science**, v. 23, e. 4, 2019.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

LARKIN M.A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23. p. 2947-2948, 2007.

LI, M. et al. Clonal genetic diversity and populational genetic differentiation in *Phragmites australis* distributed in the Songnen Prairie in northeast China as revealed by amplified fragment length polymorphism and sequence-specific amplification polymorphism molecular markers. **Annals of Applied Biology**, v. 154, e. 1, p.43–55, 2009.

LINARES-HOLGUÍN, O; SÁNCHEZ-PEÑA, P.; MOLINA-FREANER, F. Genetic diversity of the chloroplast (trnI-f) region among populations of *Pholisma culiacanum* Y. **Agrociencia**, v. 50, p. 799-809, 2016.

LORENZONI, R. M. et al. Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 36, e, edição especial, p. 251-257, 2014.

MEIRELLES, J. Flora of the cangas of the Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Balanophoraceae. **Rodriguésia**, v. 67, n. 5 (Especial), p. 1243-1245, 2016.

MENEZES, J. P. et al. Genetic variability in rDNA ITS region of *Trichoderma* spp. (biocontrole agent) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* isolates. **Ciência e agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 132-139, 2010.

NILKANTA, H. ISSR Marker Based Population Genetic Study of *Melocanna baccifera* (Roxb.) Kurz: A Commercially Important Bamboo of Manipur, North-East India. **Scientifica**, 2017.

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

PELSER, P. B; TANDANG, D. N.; BARCELONA J. F. *Balanophora coralliformis* (Balanophoraceae), a new species from Mt. Mingan, Luzon, Philippines. **Phytotaxa**. v. 170, e. 4, p. 291–295, 2014.

PORRAS-HURTADO, L. et al. No overview of *STRUCTURE*: applications, parameter settings, and supporting software. **Frontiers in Genetics**, v.4, 2013.

ROSSI, F. S. et al. Genetic diversity in natural populations of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) using ISSR markers. **Scientia Forestalis**, v. 42, e. 104, p. 631–639, 2014.

SILVA, M. B. et al. Diversidade genética estimada com marcadores entre sequências simples repetidas em cultivos comerciais de Cupuaçuzeiro. **Ciência Rural**, v.46, n.1, p.108-113, 2016.

SUNDE J. et al. **Comparing the performance of microsatellites and RADseq in population genetic studies: analysis of data for pike (*Esox lucius*) and a synthesis of previous studies.** **Frontiers in Genetics**, v. 11, e. 218, 2020.

7 Manuscrito II – POTENCIAIS PLANTAS HOSPEDEIRAS DE *Helosis brasiliensis* SCOTT & ENDL (BALANOPHORACEAE) NO RIO GRANDE DO SUL

Resumo: O fitoparasitismo é a prática nutricional de plantas com estruturas modificadas especialmente para a nutrição heterotrófica sobre os tecidos de plantas hospedeiras, sendo o caso da espécie *Helosis brasiliensis* (Balanophoraceae), uma erva holoparasita de rizomas subterrâneos. Estudos sobre essa espécie são escassos, e não há informações concretas sobre as hospedeiras da mesma, ou se ela possui hospedeiras preferenciais. O objetivo deste trabalho foi a identificação das potenciais espécies hospedeiras de *H. brasiliensis* através da utilização de marcadores moleculares e identificação taxonômica. Foi realizada a coleta das potenciais plantas hospedeiras em populações nos municípios de Silveira Martins, Passa Sete, Candelária e Teutônia, no Rio Grande do Sul, dentro de um raio de 3 metros das manchas de *H. brasiliensis*. Após isso as amostras foram conduzidas ao Laboratório de Genética Vegetal na Universidade Federal de Santa Maria, onde foi feita a extração de DNA total com o método CTAB, seguido de dosagem do DNA genômico, diluições e reações de PCR com os marcadores plastidiais (trnL-trnF) e nucleares (ITS). Dentre as famílias botânicas identificadas, as mais comuns foram: Poaceae, Lauraceae, Meliaceae, Piperaceae e Sapindaceae. Contudo, não foi possível identificar no nível molecular as espécies que *Helosis brasiliensis* estava efetivamente parasitando. Por outro lado, foi possível identificar espécies com maior chance de representarem as hospedeiras de *H. brasiliensis*. Novas estratégias para amplificação de fragmentos de DNA e sequenciamento das raízes das plantas parasitadas poderão auxiliar na determinação das espécies hospedeiras.

Palavras chave: fitoparasitismo, plantas hospedeiras, biodiversidade

**POTENTIAL HOST PLANTS OF *Helosis brasiliensis* SCOTT & ENDL
(BALANOPHORACEAE) IN RIO GRANDE DO SUL**

ABSTRACT: Phytoparasitism is the nutritional practice of plants with structures specially modified for heterotrophic nutrition on host plant tissues, such as *Helosis brasiliensis* (Balanophoraceae), a holoparasitic herb from underground rhizomes. Studies on this species are scarce, and there is no concrete information about its hosts, or whether it has preferred hosts. The objective of this work was to identify potential host species of *H. brasiliensis* by molecular markers and taxonomic identification. Potential host plants were collected in populations in the municipalities of Silveira Martins, Passa Sete, Candelária and Teutônia, in Rio Grande do Sul, within a radius of 3 meters from the patches of *H. brasiliensis*. After that, the samples were taken to the Laboratory of Plant Genetics at the Federal University of Santa Maria, where total DNA extraction was performed using the CTAB method, followed by genomic DNA dosage, dilutions and PCR reactions with plastid markers (*trnL-trnF*) and nuclear (ITS). Among the identified botanical families, the most common were Poaceae, Lauraceae, Meliaceae, Piperaceae and Sapindaceae. However, it was not possible to identify at the molecular level the species that *Helosis brasiliensis* was actually parasitizing. On the other hand, it was possible to identify species with a greater chance of representing the hosts of *H. brasiliensis*. New strategies for amplifying DNA fragments and sequencing the roots of parasitized plants may help to determine the host species.

Keywords: phytoparasitism, host plants, biodiversity.

7.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um país com grande diversidade de flora, sendo confirmada até o momento a ocorrência de 49.987 de espécies de plantas nativas, cultivadas e naturalizadas (FLORA DO BRASIL, 2020). Dentre os mais diversos grupos de plantas, com as mais diferentes características possíveis, pode se considerar uma forma de vida bastante peculiar o parasitismo (SAUCET & SHIRASU, 2016). As plantas parasitas, ao contrário das plantas autotróficas, desenvolveram um estilo de vida heterotrófico único, onde elas necessitam de uma planta hospedeira para sua sobrevivência (YOSHIDA et al., 2016; CLARKE et al., 2019).

As plantas parasitas representam um grande grupo da flora mundial, de aproximadamente 4500 ou mais espécies, incluindo árvores, arbustos e ervas (AOKI & SHIMIZU, 2019). São encontradas em praticamente todos os tipos de habitats, e os indivíduos envolvem a planta hospedeira através de um haustório, a estrutura responsável por retirar água e nutrientes, já que formam conexões diretas com os feixes vasculares da planta alvo (KAIZER et al., 2015). Uma família botânica bastante curiosa nesse aspecto é Balanophoraceae, que muitas vezes passa despercebida, já que as espécies são visíveis apenas no período reprodutivo (MEIRELLES, 2016; MELO & ALBA, 2017).

Segundo Melo & Alba (2017), no Brasil essa família está representada por cerca de seis gêneros e 15 espécies descritas, sendo avistadas em interior de floresta na serapilheira. Os indivíduos dessa família são caracterizados como holoparasitas, em que se desenvolvem sobre as raízes de outras plantas, são suculentas, afilas e aclorofiladas. Inclui-se nessa família a espécie *Helosis brasiliensis*, uma espécie herbácea, com uma inflorescência de cerca de 5 a 10 cm, planta holoparasita de raízes, carnosas, possuindo haustório responsável pelo parasitismo (SAMPAIO et al., 2016). A visualização das populações é possível nos meses mais quentes do ano, onde os indivíduos emergem do solo (GONZALEZ; SATO; MARAZZI, 2019; GONZALEZ; POPOFF; LAURENTI, 2013). *Helosis brasiliensis* é endêmica do Brasil, restrita ao bioma Mata Atlântica e com ocorrência nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste (CARDOSO, 2015), habitando locais úmidos, com pouca incidência de luz, e bastante deposição de matéria orgânica.

Os estudos sobre *H. brasiliensis* ainda são escassos, e não há informações sobre quais são as plantas hospedeiras dessa espécie, embora haja citações de que as espécies da família Balanophoraceae parasitem árvores (OTERO; MOURA; COSTA, 2009; LENH; SALIS; MATTOS, 2015; SAMPAIO et al., 2016; IKEDA; FUKUDA; YOKUYAMA, 2016). Através

de estudos morfológicos é bastante difícil obter essa informação, por se tratar de plantas holoparasitas, visíveis somente no período reprodutivo, e por ser bastante difícil de localizar a conexão com as respectivas plantas hospedeiras sob o solo.

O objetivo desse estudo é identificar quais plantas fotossintetizantes ocorrem nos locais onde *Helosia brasiliensis* habita, as quais poderiam ser indicadas como potenciais plantas hospedeiras de *H. brasiliensis* do Rio Grande do Sul, Brasil.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Procedimentos e materiais de campo

Quarenta e quatro amostras de potenciais hospedeiras de *H. brasiliensis* (Figura 1) foram coletados em quatro municípios do Rio Grande do Sul, Brasil (Silveira Martins, Passa Sete, Candelária e Teutônia), em área de Floresta do tipo estacional (Figura 3). Foram coletados e herborizados ramos das espécies arbóreas/arborescentes e arbustivas num raio de 3 m de cada população de *H. brasiliensis* visitada, para identificação taxonômica das espécies. As exsicatas com ramos férteis foram tombadas no herbário SMDB (Tabela 1), e as exsicatas com ramos estéreis foram armazenadas no Laboratório de Taxonomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria, onde ficarão armazenadas por um período de 2 anos. Também foram coletadas amostras de folha armazenados em sílica gel, correspondendo a cada exsicata para posterior extração de DNA, se necessário, para comparação. Foram coletadas e armazenadas em sílica gel, cerca de 26 raízes de plantas que estavam próximas ou em contato com os indivíduos de *H. brasiliensis*.

Figura 1 – Indivíduos de *Helosis brasiliensis*. À esquerda, indivíduos em flor. À direita, indivíduos com frutos em desenvolvimento. A serapilheira foi removida para expor os rizomas.

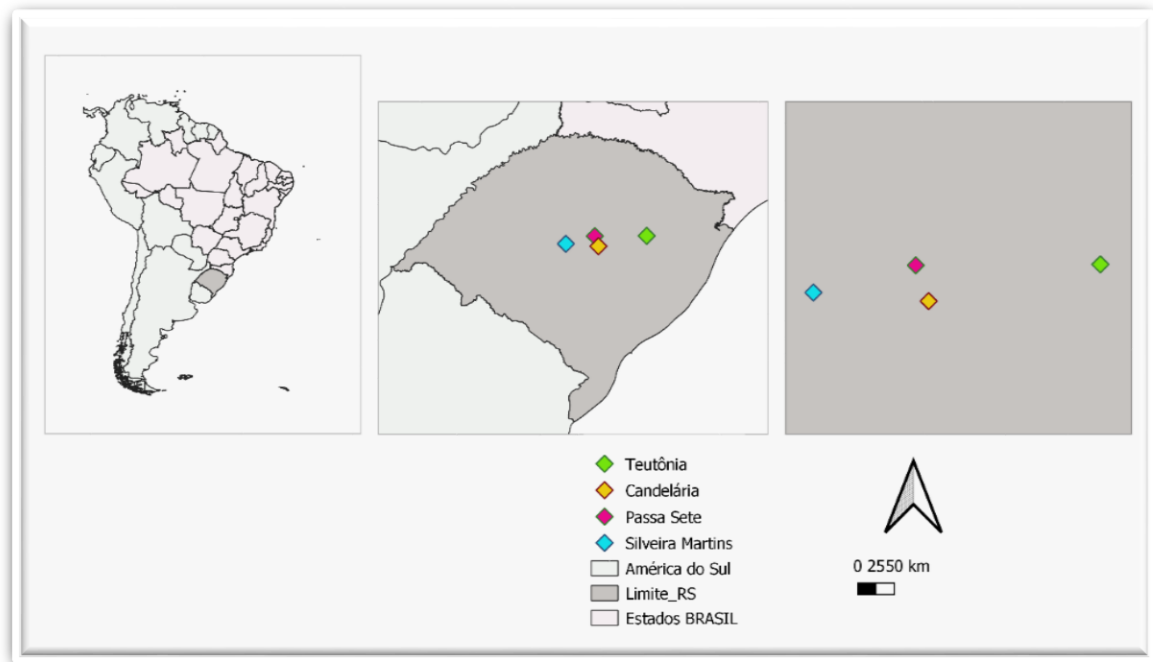


Fonte: LIMA; ESSI; 2021.

Tabela 1 - Número de coletor, coordenadas e voucher (número tombo) correspondente de amostras das potenciais hospedeiras tombadas no herbário SMDB.

N. de coletor	Latitude (N)	Longitude(E)	Município	Voucher
5	29°42'37.9"	052°50'33.7"	Candelária	20750
7	29°28'38.1"	052°55'36.5"	Passa Sete	20752
8	29°28'38.1"	052°55'36.5"	Passa Sete	20753
9	29°28'17.0"	051°43'41.8"	Teutônia	20754
10	29°28'17.0"	051°43'41.8"	Teutônia	20755
11	29°28'17.0"	051°43'41.8"	Teutônia	20756
12	29°42'37.9"	052°50'33.7"	Candelária	20757
14	29°28'38.1"	052°55'36.5"	Passa Sete	20759
16	29°42'37.9"	052°50'33.7"	Candelária	20761

Figura 2 - Mapa das populações amostradas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, para coletas das potenciais plantas hospedeiras de *H. brasiliensis*.



Fonte: LIMA; ESSI, 2021.

Os ensaios de Biologia Molecular foram conduzidos no laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria.

7.2.2 Procedimentos e materiais de laboratório

7.2.2.1 Extração e quantificação do DNA genômico

A extração das potenciais hospedeiras foi feita com cerca de 0,5 mg das folhas secas e das raízes, utilizando o método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987). O DNA total foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, padronizadas com λ DNA, para concentração final de 20 ng/ μ L, e foram armazenadas em freezer -20 °C até o momento do uso.

7.2.2.2 Reação de PCR

As reações de PCR foram realizadas utilizando fragmento nuclear ITS (*Internal Transcribed Spacers*) o espaçador plastidial *trnL-trnF*. Para amplificação das reações de ITS (WHITE et al., 1990) com volumes finais de 25 μ L, contendo 1 μ L de DNA total (20-25 ng),

1,5 µL de MgCl₂ (50mM), 5 µL de tampão (10X), 0,5 µL de iniciador direto (10mM), 0,5 µL de iniciador reverso (10mM), 0,5 µL de mistura dNTPs (40 mM) (cada dNTP 10mM), 0,13 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL), 1µL DMSO e água ultrapura estéril. Para a amplificação das reações *trnF-trnL* (TABERLET et al., 2007), com volumes finais de 25 µL, contendo 1µL de DNA total (20-25 ng), 1,5µL de MgCl₂ (50mM), 5 µL de tampão (10X), 0,5 µL de iniciador direto (10 mM), 0,5 µL de iniciador reverso (10mM), 0,5 µL de mistura dNTPs (40 mM) (cada dNTP 10mM), 0,13 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e água ultrapura estéril.

A amplificação foi realizada em um termociclador Minicycler (Marshall Scientific, New Hampshire, EUA). Para a região do ITS foram realizados 38 ciclos de 5 minuto a 94 °C, 1 minuto a 58 °C, 1 minutos a 72 °C, seguidos de 7 minutos a 72 °C, e completado com uma extensão final de 7 minutos a 72 °C. Para *trnF-trnL* foi realizado 36 ciclos de 5 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minutos a 72 °C, seguidos de 5 minutos a 72 °C, e completado com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos das reações de PCR foram corados com Gel Red e visualizados em gel de agarose 1,2%. Após a eletroforese os fragmentos foram visualizados em luz ultravioleta e comparados com marcadores de 1Kb e 100pb. Após as amostras foram purificadas com solução PEG (polietileno glicol) e enviadas para sequenciamento terceirizado na empresa ACTGene.

7.2.2.3 Procedimento de identificação taxonômica:

Foi realizada uma revisão de exsicatas no herbário SMDB, como também consulta na literatura e identificação por especialistas na área de taxonomia. Amostras de DNA total dos espécimes foram armazenados em freezer para posterior amplificação por PCR de seqüências de DNA, caso fosse necessária a identificação de material não fértil através de sequenciamento de DNA e BLAST no GenBank.

7.3 RESULTADOS

A partir das observações realizadas a campo no momento das coletas podemos registrar diferentes grupos taxonômicos no entorno das populações de *H. brasiliensis*, desde arbustos e árvores, possuindo os mais diferentes tamanhos. Baseado nas coletas realizadas a campo (Tabela 3, figura 4, 5, 6, 7), listamos as famílias mais frequentes, com maior probabilidade de

serem as hospedeiras de *Helosis brasiliensis*, sendo estas: Poaceae, Lauraceae, Meliaceae, Piperaceae e Sapindaceae (Tabela 2).

Tabela 2 - Espécies de plantas que estavam em um raio de 3 metros das manchas de *H. brasiliensis* coletadas no momento da amostragem.

Identificação		Locais de coleta			
Família	Espécie/voucher	SM	PS	CD	TT
Cannabaceae	<i>Trema micrantha</i> (L) Blume/20756				X
Cardiopteridaceae	<i>Citronella paniculata</i> (Mart) R. A.		X		
Dicksoniaceae	<i>Dicksonia sellowiana</i> Hook/20753		X		
Euphorbiaceae	<i>Acalypha gracilis</i> (Spreng.) Mull. Arg./20750-20759 <i>Gymnanthes concolor</i> (Spreng.) Mull. Arg.		X	X	
Poaceae	<i>Merostachys</i> sp./20755 <i>Phyllostachys</i> sp./20761		X	X	X
Lauraceae	<i>Helietta apiculata</i> Benth <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez	X		X	X X
Malvaceae	<i>Pavonia sepium</i> A. St-Hill/20757			X	
Meliaceae	<i>Trichilia clausenii</i> C. D.C <i>Tchilia elegans</i> A. Juss <i>Cabrlea canjerana</i> (Vell) Marth.	X X		X X	
Menispermaceae	<i>Cissampelos parreira</i> L.				X
Monimiaceae	<i>Mollinedia schottiana</i> (Spreng.) Perkins			X	
Moraceae	<i>Sorocea bonplandii</i> (Baill.) W.C. Burger, Lanj. & wess.			X	
Myrtaceae	<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.		X		
Myrcineaceae	<i>Myrsine coriacea</i> (Sw) R. Br.		X		
Piperaceae	<i>Piper arboreum</i> Aubl.	X	X	X	X

Sapindaceae	<i>Cupania vernalis</i> Cambess.	X		X	
	<i>Serjania laruotteana</i> Cambess	X			
Thelypteridaceae	<i>Thelypteris dentata</i> (G. forsts) E. P. St. John	X			
Urticaceae	<i>Boehmeria caudata</i> Sw./20754				X

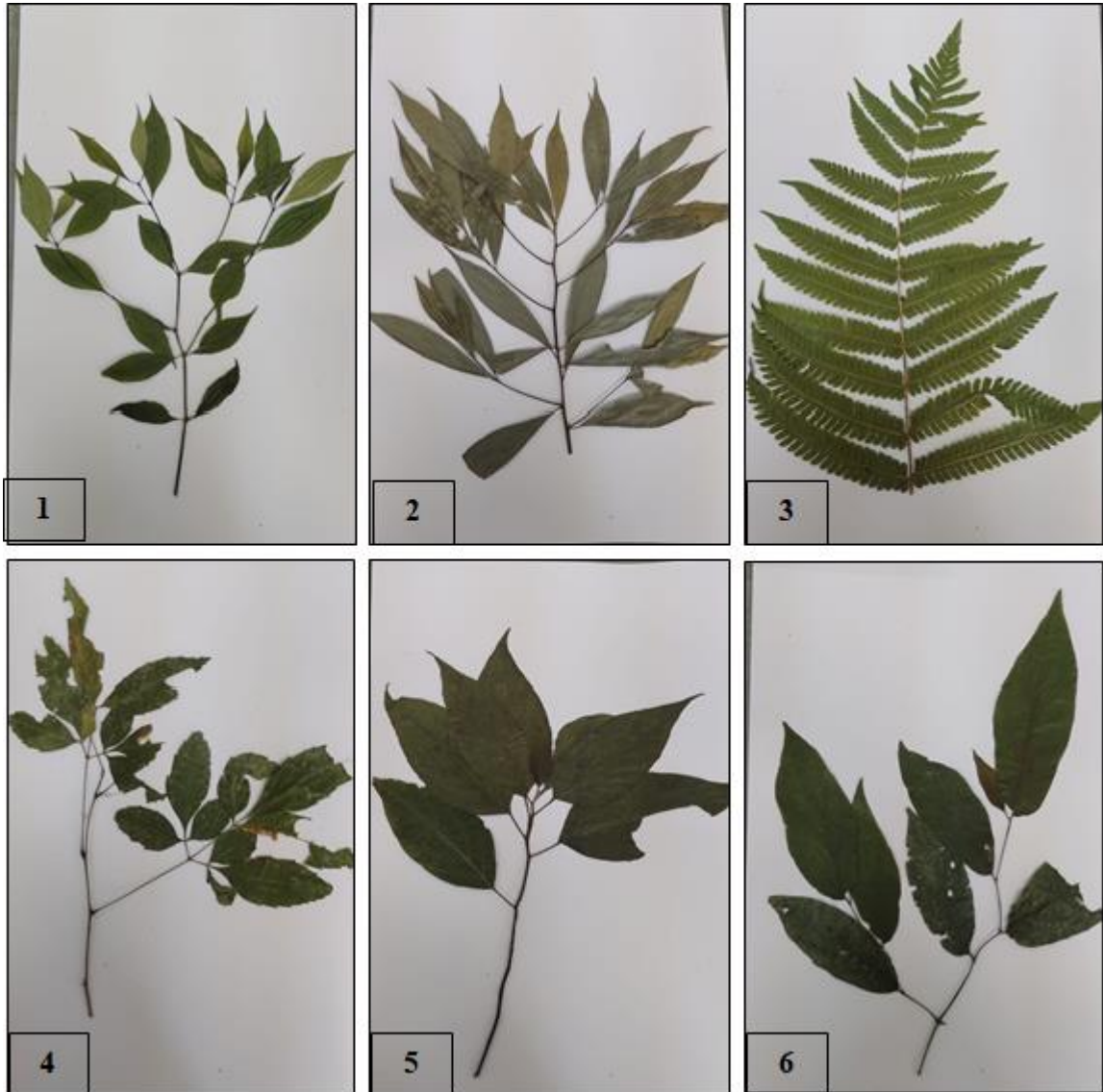
A partir das coletas das raízes que estavam envolvidas pelo haustório de *H. brasiliensis* (Figura 3) foi realizada extração de DNA genômico, como também foi tentado amplificar fragmentos nucleares e plastidiais. Encontramos bastante dificuldade na amplificação, logo não conseguimos obter os fragmentos desejáveis, e nos detemos em identificar através da taxonomia clássica as espécies de vegetais presentes nos locais da amostragem. Para plantas hospedeiras foram amplificados fragmentos em torno de 600 pb para ITS, porém sem sucesso no sequenciamento existindo muitos picos sobrepostos, mas obtivemos amplificação de alguns fungos de solo para esse marcador, que foram identificados a partir de BLAST, sendo eles: *Trichoderma harzianun*, *Cylindrocladiella lanceolata*, *Oidium heveae*, e *Rhizoctonia solani*. Não foi possível amplificar o fragmento plastidial até o momento. Saliento que foram realizadas várias mudanças no protocolo de PCR, como alteração de temperatura, ciclos, e combinações de pares de iniciadores.

Figura 3 - Raízes das espécies hospedeiras sendo envolvida pela espécie holoparasita.



Fonte: LIMA; ESSI, 2021.

Figura 4 - Imagens de potenciais hospedeiras de *Helosis brasiliensis*, coletadas e herborizadas a campo no município de Silveira Martins. 1: Rubiaceae- *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlttdl; 2: Lauraceae- *Helietta apiculata* Benth; 3: Thelypteridaceae- *Thelyptris denadata* (G. Forst.) E.P.St. John; 4: Sapindaceae- *Serjania laruooteana* Cambess; 5: Piperaceae- *Piper arboretum* Aubl.; 6: Piperaceae- *Piper arboretum* Aubl.



Fonte: LIM; ESSI; 2021.

Figura 5 - Imagens de potenciais hospedeiras de *Helosis brasiliensis*, coletadas e herborizadas a campo no município de Passa Sete. 1; 1.1; 1.2;1.3; 1.4: Dicksoniaceae- *Dicksonia sellowiana* Hook; 2; 2.1: Graminae- *Merostachys* sp.; 3: Euphobiaceae-*Acalypha gracilis* (Spreng.) Mull. Arg.; 4: Piperaceae- *Piper arboreum* Aubl; 5: Cardiopteridaceae- *Citronella paniculata* (Mart.) Howard; 6: *Myrsine coriácea* (Sw) R. Br; 7: *Campomanesia xanthocarpa* Berg.

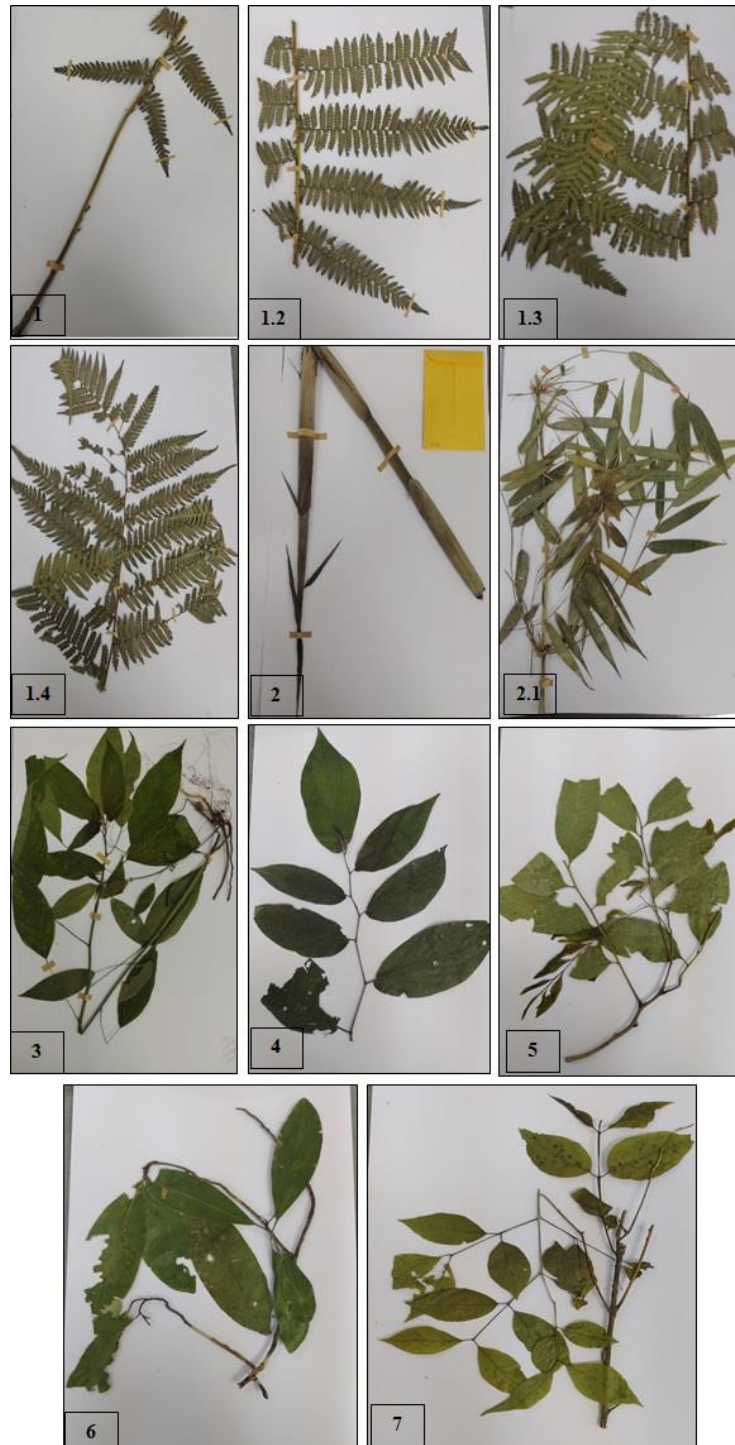
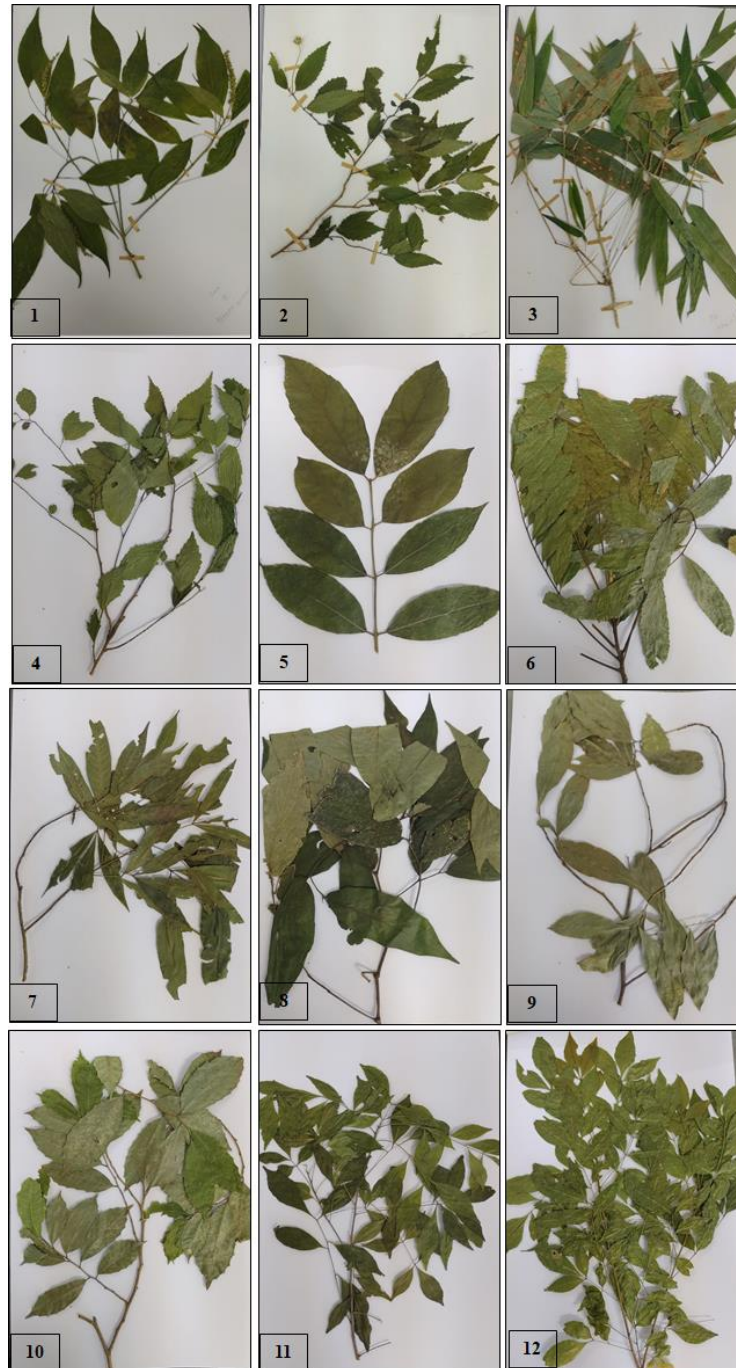
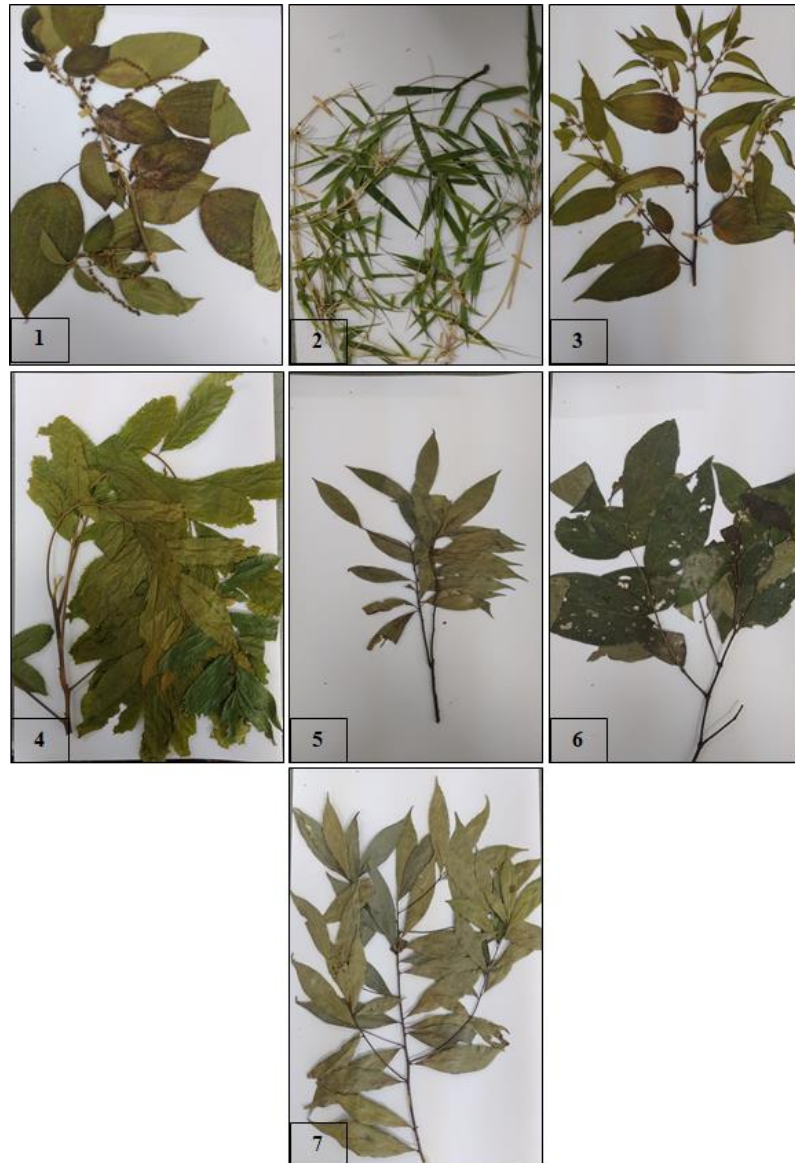


Figura 6 - Imagens de potenciais hospedeiras de *Helosis brasiliensis*, coletadas e herborizadas a campo no município de Candelária. 1: Euphorbiaceae- *Acalypha gracilis* Spreng; 2; Malvaceae- *Pavonia sepium* A.St.-Hil; 3: Graminae- *Phyllostachys* sp.; 4: Malvaceae- *Pavonia sepium* A.St.-Hil; 5: Monimeaceae- *Mollinedia achottiana* (Spreng.) Perkins; 6: Sapindaceae- *Cupania vernalis* Cambess; 7: Meliaceae- *Trichilia clausenii* C.DC.; 8: Piperaceae- *Piper arboreum* Aubl.; 9: Euphorbiaceae- *Gymnanthes concolor* Spreng; 10: Moraceae- *Sorocea bonplandii* (Baill.) W.C. Burger, Lanjouw & Boer; 11: Meliaceae- *Trichilia elegans* A. Juss; 12: Meliaceae- *Trichilia elegans* A. Juss.



Fonte: LIMA; ESSI, 2021.

Figura 7 - Imagens de potenciais hospedeiras de *Helosis brasiliensis*, coletadas e herborizadas a campo no município de Teutônia. 1:Urticaceae- *Boehmeria caudata* Sw.; 2; Graminae- *Merostachys* sp.; 3: Canabaceae- *Trema micrantha* (L) Blume.; 4: Sapindaceae- *Cupania vernalis* Cambess; 5: Lauraceae- *Nectandra megapotamica*; 6:Piperaceae- *Piper arboreum* Aubl; 7: Lauraceae- *Nectandra megapotamica*.(Spreng) Mez.



Fonte: LIMA; ESSI, 2021.

7.4 DISCUSSÃO

As plantas parasitas possuem um papel fundamental na manutenção da biodiversidade, e evoluíram de forma independente nos mais diferentes grupos vegetais. Embora já se tenha estudos sobre a influência da planta parasita a planta hospedeiras, alguns tópicos ainda aparecem inexplorados (KIM et al., 2019; LÓPEZ; BONASORA, 2019; MURSIDAWATI; WICAKSONO; SILVA, 2019). Sendo o caso de quais espécies de plantas são as hospedeiras das holoparasitas, estudos reportaram através de Cardoso e Braga (2015) que as *H. brasiliensis* formam estruturas semelhantes a rizomas, que emergem dos tubérculos e crescem de forma paralela ao solo, constituindo uma espécie de rede, sendo de difícil acesso a conexão da holoparasita a hospedeira no solo.

As plantas holoparasitas desenvolvem uma estrutura especializada para o evento de parasitismo (Fig. 3). Estudos sugerem que as plantas hospedeiras são encontradas pelas plantas parasitas através de sinais químicos no solo, que então realizam a conexão do haustório com as respectivas plantas hospedeira. Esse tipo de conexão foi observado nas demais espécies de Balanophoraceae (CAMPOS et al., 2020; SANTOS et al., 2017).

Estudos sobre a identificação das plantas hospedeira são fundamentais para conservação das espécies parasitas, como também para verificar os efeitos que a parasita causa sobre a hospedeira, já que elas são consideradas componentes da flora com grandes redes de interação (BELLOT; RENNER, 2013; LENH; SALIS; MATTOS et al., 2015; FREITAS et al., 2017). Pesquisas apontam que a floração e a frutificação dessas espécies ocorrem nos meses de seca servindo como forma alternativa de alimento para a fauna em período de carência (CAMPOS et al., 2020; FREITAS et al., 2017). Além disso, algumas espécies de Balanophoraceae são importantes na interação entre microrganismos e plantas hospedeiras, promovendo uma pressão de seleção para a evolução das bactérias promotora de crescimentos (FELESTRINO et al., 2017).

Pesquisas afirmam que as plantas parasitas em geral raramente possuem hospedeiras preferenciais, mas parasitam vários táxons diferentes (GUERRA et al., 2018), o que também observamos neste estudo. Até o momento não obtivemos sucesso em amplificar as regiões do DNA selecionadas neste estudo para as potenciais plantas hospedeiras de *H. brasiliensis*. Isto pode ser causado por algum contaminante do solo, visto que algumas espécies de fungo foram detectadas nas amostras através do uso da região do DNA ribossomal (ITS). Mas estudos sobre

esse caso tão importante devem ser realizados, para informar caracteres molecular e de ecologia sobre essa espécie.

7.5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e analisados nesse estudo, concluímos que as identificações taxonômicas foram de extrema importância para o conhecimento das potenciais espécies hospedeiras de *Helosis brasiliensis* nos locais amostrados. Neste sentido, espécies de Poaceae, Lauraceae, Meliaceae, Piperaceae e Sapindaceae foram identificadas em mais de uma amostragem. São necessários estudos mais aprofundados além da taxonomia e morfologia externa para a identificação de espécies de vegetais que são hospedeiras de *H. brasiliensis*.

7. 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOKI, K.; SHIMIZU, K. Development of parasitic organs of a stem holoparasitic plant in genus *Cuscuta*. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, e. 1435, 2019.

BELLOT, S.; RENNER, S. S. Pollination and mating systems of Apodanthaceae and the distribution of reproductive traits In parasitic angiosperms. **American Journal of Botany**, v. 100, e. 6, p. 1083–1094, 2013.

CAMPOS, B. M. et al. Root parasitism by *Scybalium fungiforme* Schott & Endl. is not random among host species in seasonal tropical forest. **Acta Botanica Brasilica**, v. 34, e. 1, p. 149-154, 2020.

CARDOSO, L. J. T.; BRAGA, J. M. A. A New Caribbean Species of *Helosis* (Balanophoraceae) with a Revised Key to the Genus. **Systematic Botany**, v. 40, e. 2, 2015.

CLARKE, C. R. et al. Molecular dialog between parasitic plants and their hosts. **Annual Review Phytopathology**, v. 57, e. 13, p. 1–13.21, 2019.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. CTAB DNA extraction in plants. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

FELESTRINO, E. B. et al. Plant Growth Promoting Bacteria Associated with *Langsdorffia hypogaea*-Rhizosphere-Host Biological Interface: A Neglected Model of Bacterial Prospection. **Frontiers Microbiology**, v. 8, e. 172, 2017.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em 15 de mar de 2020.

FREITAS, L. S. et al. Reproductive phenology and floral visitors of a *Langsdorffia hypogaea* (Balanophoraceae) population in Brazil. **Flora**, v. 233, p. 51-57, 2017.

GONZALES, A. M.; SATO, H. A.; MARAZZI, B. Embryology in *Helosis cayennensis* (Balanophoraceae): Structure of Female Flowers, Fruit, Endosperm and Embryo. **Plants**, v. 8, e. 74, 2019.

GONZALES, A. M.; POPOFF, O. F.; LAURENTI, C. S.; Structure of staminate flowers, microsporogenesis, and microgametogenesis in *Helosis cayennensis* var. *cayennensis* (Balanophoraceae). **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 70, e. 2, p. 113-121, 2013.

GUERRA, T. J. PIZO, M. A. SILVA, W. R. Host specificity and aggregation for a widespread mistletoe in Campo Rupestre vegetation. **Flora**, v. 238, p. 148-154, 2018.

IKEDA, H.; FUKUDA, T.; YOKOYAMA, J. Endophytic Fungi Associated with a Holoparasitic Plant, *Balanophora japonica* (Balanophoraceae). **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, p. 152-158, 2016.

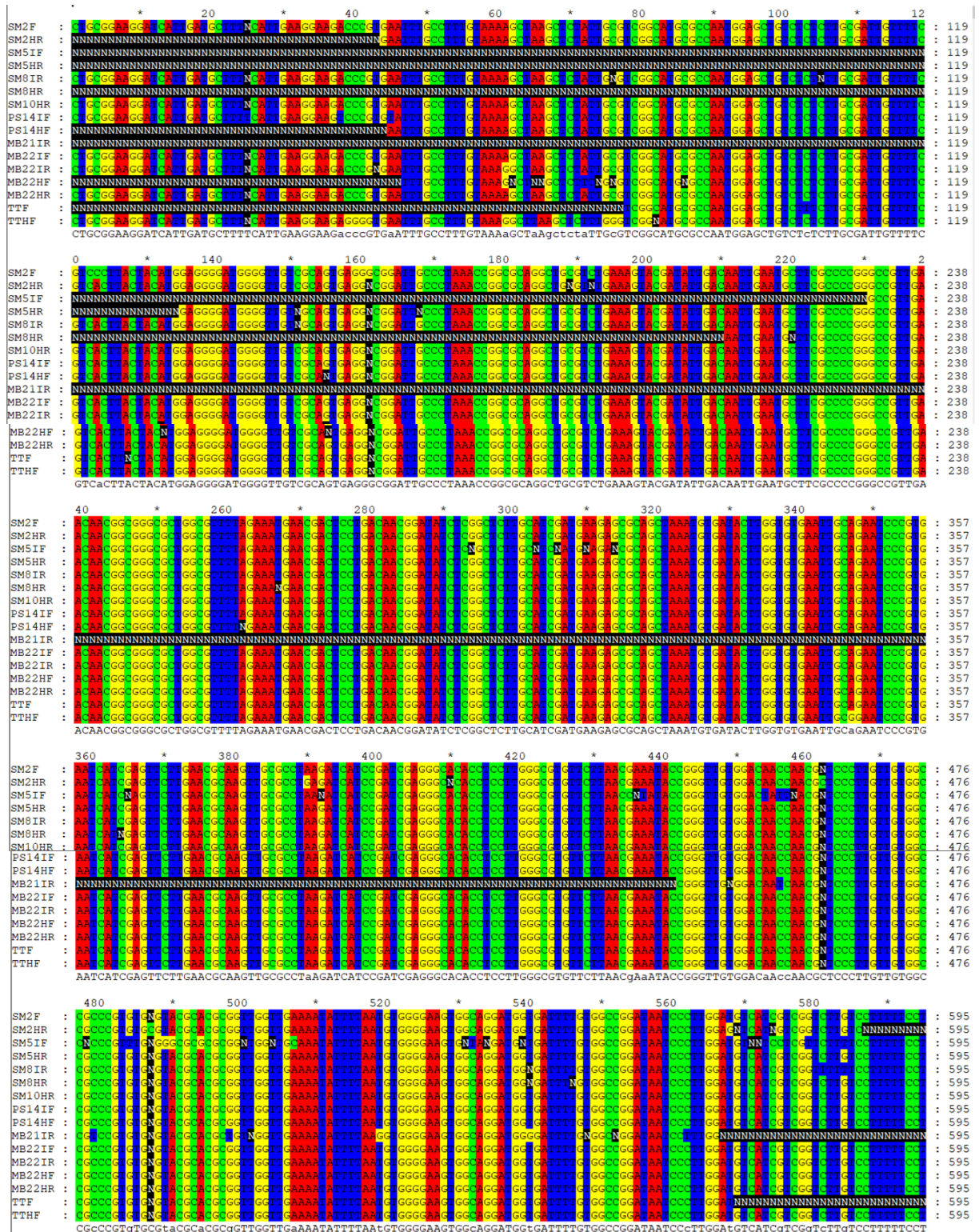
- KAISER, B. et al. Parasitic plants of the genus *Cuscuta* and their interaction with susceptible and resistant host plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, e. 45, 2015.
- KIM, C. Proximate and mineral components of *Viscum album* var. *coloratum* grown on eight different host tree species. **Jornal of Forestry Research**, v. 30, e. 4, p. 1245–1253, 2019.
- LEHN, C. R.; SALIS, S. M.; MATTOS, P. P. Ecological aspects of *Langsdorffia hypogaea* (Balanophoraceae) parasitism in the Pantanal wetlands. **Acta Botanica Brasilica**, v. 29, e. 4, p. 608-612, 2015.
- LÓPEZ, A.; BONASORA, M. G. Phylogeography, genetic diversity and population structure in a Patagonian endemic plant. **AoB PLANTS**, v. 9, 2019.
- MEIRELLES, J. Flora of the cangas of the Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Balanophoraceae. **Rodriguésia** v. 65, n. 5, p. 1243-1245, 2016.
- MELO, J. B.; ALBA, T. M. Ocorrência de *Lophophytum leandri* Eichler (Balophoraceae) no município de cerro largo – RS. Anais do SEPE-Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFFS, v. 7, 2017.
- MURSIDAWATI, S. A.; WICAKSONO, A. B.; SILVA, J. A. T. Development of the endophytic parasite, *Rafflesia patma* Blume, among host plant (*Tetrastigma leucostaphylum* (Dennst.) Alston) vascular cambium tissue. **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 382–386, 2019.
- OTERO, J. T.; MORA, M.; COSTA, J. F. First host record for the root parasite *Corynaea crassa* (BALANOPHORACEAE). **Acta Biológica Colombiana**, v. 14, n. 3, p. 199-204, 2009.
- SANTOS, J.C. Distribution, host plants and floral biology of the root oloparasite *Langsdorffia hypogaea* in the Brazilian savanna. **Flora**, v. 226, p. 65-71, 2017.
- SAMPAIO, A. F. et al. Balanophoraceae of Ecological Cuniã Station, Porto Velho, RO, Brazil. **Acta Biológica Catarinense**, v. 3, p. 73-79, 2016.
- SAUCET, S. B.; SHIRASU, K. Molecular Parasitic Plant-Host Interactions. **PLoS Pathog**, v. 12, e. 12, 2016.
- TABERLET P. et al. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 3, 2007.
- YOSHIDA, S. et al. The Haustorium, a Specialized Invasive Organ in Parasitic Plants. **Annual Review Plant Biology**, v. 67, p. 643-667, 2016.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, pudemos acessar com sucesso a diversidade genética e a estrutura populacional das populações de *Helosis brasiliensis* amostradas no Rio Grande do Sul, revelando índices moderados de diversidade genética e polimorfismo alto para a espécie. A variação molecular maior dentro das populações do que entre as populações, existindo uma correlação entre a distância genética e a distância geográfica. Ambos os marcadores moleculares, ISSR, e ITS foram eficientes para acessar a diversidade genética e a similaridade entre os indivíduos amostrados.

Além disso, com os resultados obtidos nesse trabalho, foi possível identificar e relatar, através de um levantamento arbóreo, quais espécies de plantas são potenciais hospedeiras para *H. brasiliensis* no Rio Grande do Sul. Contudo, ainda são necessários estudos mais aprofundados sobre diversidade de espécies de plantas que são parasitadas por *H. brasiliensis*, compreendendo todos os locais de sua ocorrência. Esses dados podem contribuir para a conservação das espécies hospedeiras e da holoparasita destacada nessa pesquisa, além de auxiliar na caracterização da biodiversidade, tanto de flora quanto de fauna.

APÊNDICE I – Alinhamento das sequências de nucleotídeos do fragmento ITS (Internal Transcribed Spacer), incluindo os trechos ITS 1, 5,8S e ITS2.



```

        600          *          620          *          640          *
SM2F   : GTTATTTGCATGGTGAATGTGCCCTGGCTCATAAATGTTACCCCAGGTGAGGTGAGATTACCGNN : 658
SM2HR  : NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN : 658
SM5IF  : GTTNTTGNCAI NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN : 658
SM5HR  : GTTATTTGCATGGTGAATGTGCCCTGGCTCATAAATGTTACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN : 658
SM8IR  : GTTATTTGCATGGTGAATGTGCCCTGGCTCATAAATGTTAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN : 658
SM8HR  : GTTATTTGCATGGTGAATGTGCCCTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN : 658
SM10HR : GTTATTTGCATGGTGAATGTGCCCTGGCTCATAAATGTTACCCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN : 658
PS14IF : GTTATTTGCATGGTGAATGTGCCCTGGCTCATAAATGTTACCCCAGGTGAGGTGAGATTACCGG : 658
PS14HF : GTTATTTGCATGGTGAATGTGCCCTGGCTCATAAATGTTACCCCAGGTGAGGTGAGATTACCGG : 658
MB21IR : NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN : 658
MB22IF : GTTATTTGCATGGTGAATGTGCCCTGGCTCATAAATGTTACCCCAGGTGAGGTGAGATTACCGG : 658
MB22IR : GTTATTTGCATGGTGAATGTGCCCTGGCTCATAAATGTTACCCCAGGTGAGGTGAGATTACCGG : 658
MB22HF : GTTATTTGCATGGTGAATGTGCCCTGGCTCATAAATGTTACCCCAGGTGAGGTGAGATTNNNNN : 658
MB22HR : GTTATTTGCATGGTGAATGTGCCCTGGCTCATAAATGTTACCCCAGGTGAGGTGAGATTNNNNN : 658
TTF    : NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN : 658
TTHF   : GTTATTTGCATGGTGAATGTGCCCTGGCTCATAAATGTTACCCCAGGTGAGGTGAGATTACCGG : 658
      GTTATTTGCATGGTGAATGTGCCCTGGCTCATAAATGTTACCCCAGGTGAGGTGAGATTACCGG

```