



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA (Produção Vegetal)**



CICERO GERALDO GUALTER DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ESPÉCIES DE ERVA-DE-PASSARINHO PRESENTES NO ESTADO DE ALAGOAS**

Rio Largo - AL
2016

CICERO GERALDO GUALTER DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ESPÉCIES DE ERVA-DE-PASSARINHO PRESENTES NO ESTADO DE ALAGOAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

Orientador: Prof. Dr. Renan Cantalice de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

S237i Santos, Cicero Geraldo Gualter dos.
Identificação botânica e caracterização molecular de espécies de Erva-de-passarinho presentes no estado de Alagoas / Cicero Geraldo Gualter dos Santos.– 2016.
69 f. : il.

Orientador: Renan Cantalice de Souza.
Coorientador: Gildemberg Amorim Leal Junior.
Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Loranthaceae. 2. Viscaceae. 3. Pinha. 4. Struthanthus. 5. Passovia.
6. Phoradendron. 7. Planta parasita. I. Título.

CDU: 632.5

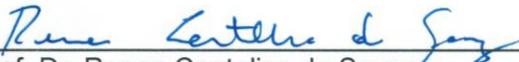
TERMO DE APROVAÇÃO

CICERO GERALDO GUALTER DOS SANTOS

(Matrícula 14130228)

**IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE
ERVA-DE-PASSARINHO PRESENTES NO ESTADO DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada e avaliada pela banca examinadora em quinze de fevereiro de 2016, como parte dos requisitos para obtenção de Mestre em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal do Programa de Pós-Graduação em Agronomia "Produção Vegetal" da Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias da UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS.



Prof. Dr. Renan Cantalice de Souza
Presidente



Prof. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos
Membro



Prof. Dr. Roberto Ramos Sobrinho
Membro

RIO LARGO – AL
fevereiro/2016

A meu pai que, mesmo falecendo cedo me tornou o homem que sou hoje e tenho certeza que está aí do lado do Senhor Jesus olhando esse momento tão especial pra mim, minha mãe, irmão, sobrinhos e noiva que sempre estão do meu lado apoiando, dando força e aconselhando! EU AMO VOCÊS.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo, por sempre me guiar em todos os momentos da minha vida e por dar-me força para enfrentar todos os desafios e obstáculos;

Ao meu irmão José Cicero (Juninho) que sempre esteve do meu lado em todos os momentos;

A minha mãe Maria Luciene por ser esse exemplo de mulher e sempre estar acreditando na minha capacidade;

A minha noiva Roseline Ramos que sempre esteve do meu lado me apoiando;

Aos meus sogros Marlene e Ramos, cunhadas Roselane e Ronilene por terem me abraçado na sua família e fazerem com que eu me sinta parte dela;

A todos familiares e amigos que contribuíram para meu crescimento;

Aos professores Drs. Renan Cantalice de Souza e Gildemberg Amorim Leal Junior pela oportunidade, confiança, orientação, ensinamentos que foram fundamentais para minha formação. Sou muito grato aos senhores;

Aos professores Drs. Iraildes Pereira Assunção e Gaus Silvestre de Andrade pela oportunidade e confiança em ceder o Laboratório de Fitopatologia Molecular para realização de etapas fundamentais para minha dissertação;

A todos do Laboratório de Fitopatologia Molecular pela amizade, ajuda mútua e ensinamentos durante todo esse período, em especial ao Dr. Roberto pelo auxílio com as análises filogenéticas;

A todos do Laboratório de Microscopia, Genética e Microbiologia pela amizade, ajuda mútua e ensinamentos durante todo esse período;

Ao Prof. Dr. Claudenir Caires da UESB pela confirmação botânica das espécies estudadas;

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal) e Proteção de Plantas CECA-UFAL pelos conhecimentos passados, que contribuíram para a minha formação;

A todos os meus colegas do Programa de Pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal) e Proteção de Plantas CECA-UFAL, em especial a Manoel e Eduardo pela ajuda e contribuição para realização dessa pesquisa;

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida e ao CNPq pelo apoio financeiro, o que me permitiu adquirir inúmeros conhecimentos incluindo os fundamentais para a realização desse trabalho;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado!

RESUMO GERAL

As famílias botânicas Loranthaceae e Viscaceae são constituídas por arbustos clorofilados, em geral, hemiparasitas de árvores e arbustos, retirando dos seus hospedeiros água e sais minerais através de suas raízes modificadas chamadas de haustórios. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo identificar espécies de plantas parasitas em pomares de citrus e pinha. Inicialmente foram visitadas áreas de produção de citrus e pinha com histórico de parasitismo. Foram coletados três ramos (fértil e não fértil) de cada hemiparasita, sendo o material vegetal etiquetado, georeferenciado e herborizados para identificação botânica. O DNA total foi extraído a partir de amostras foliares e usado em reações de PCR com os iniciadores ITS 1 e 4. Amplicons foram enviados para sequenciamento na Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul). As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank, para determinar as espécies hemiparasitas com as quais elas compartilham maior identidade de sequência. As quais foram utilizadas para inferências das árvores filogenéticas. Foram encontrados quatro gêneros de erva-de-passarinho, *Passovia*, *Struthanthus*, *Phoradendron* e *Psittacanthus*, pertencentes a duas famílias botânicas (Loranthaceae e Viscaceae), totalizando oito espécies diferentes, parasitando diversos hospedeiros. Análises BLASTn e filogenética mostraram que apenas uma das espécies retida aqui tinha sequências de nucleotídeos depositadas no banco de dados GenBank. Além disso, estes são os primeiros relatos de *Passovia pyrifolia* (Kunth) Tiegh. e *Struthanthus marginatus* (Desr.) G. infectando pomares de *Citrus sinensis* no estado de Alagoas e *Phoradendron mucronatum* (D.C.) Krug. & Urb. e *Phoradendron quadrangulare* (Kunth) Griseb. parasitando *Annona squamosa* L. no Brasil.

Palavras-chave: Loranthaceae. Viscaceae. Pinha. Struthanthus. Passovia. Phoradendron.

GENERAL ABSTRACT

The botanical families Loranthaceae and Viscaceae consist of chlorophyll shrubs generally mistletoes trees and shrubs, removing their hosts water and minerals through their roots modified haustoria calls. Given the above, this study aimed to identify species of parasitic plants in citrus orchards and pine cone. Initially we were visited citrus-producing areas and pine cone with parasitism history. They collected three branches (fertile and infertile) of each mistletoe, being labeled plant material, georeferenced and herborized for botanical identification. Total DNA was extracted from leaf samples and used in PCR with primers 1 and 4. ITS amplicons were sent for sequencing in Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). The sequences obtained were initially analyzed using the BLAST n algorithm and the non-redundant nucleotide database GenBank mistletoes to determine the species with which they share greater sequence identity. Which were used for inference of phylogenetic trees. They were found four kinds of herb-of-finch, *Passovia*, *Struthanthus*, *Phoradendron* and *Psittacanthus* belonging to two botanical families (Loranthaceae and Viscaceae), totaling eight different species, parasitizing different hosts. BLAST n and phylogenetic analysis showed that only one of the species retained here had nucleotide sequences deposited in GenBank database. Moreover, these are the first reports of *Passovia pyrifolia* (Kunth) Tiegh. and *Struthanthus marginatus* (DESR.) G. infecting orchards of *Citrus sinensis* in the state of Alagoas and *Phoradendron mucronatum* (DC) Krug. & Urb. And *Phoradendron quadrangulare* (Kunth) Griseb. parasitizing *Annona squamosa* L. in Brazil.

Keywords: Loranthaceae. Viscaceae. Pinecone. Struthanthus. Passovia. Phoradendron.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa com localização dos pontos de coletas das espécies estudadas, a 8,6 km de distância da sede do Município de Murici – AL.....27
- Figura 2 - Espécie *Passovia pyrifolia* (Kunth) Tiegh. parasitando *Citrus sinensis* (A) e sua respectiva exsicata (B).....30
- Figura 3 - Espécie *Struthanthus marginatus* (Desr.) G. parasitando pomares de *Citrus sinensis* (A) e sua respectiva exsicata (B).....32
- Figura 4 - Mapa com localização dos pontos de coletas das espécies estudadas, a 6,43 km da sede do Município de Palmeira dos Índios.....42
- Figura 5 - Gênero *Phoradendron* parasitando *Annona squamosa* L., em Palmeira dos Índios, Alagoas. Espécie *Phoradendron mucronatum* (D.C.) Krug. & Urb. (A) e *Phoradendron quadrangulare* (B), com suas respectivas exsicatas (C, D).....45
- Figura 6 - Coleta do material vegetal com auxílio do podão (A). Identificação do material (B). Georeferenciado utilizando o GPS (Global Positioning System) (C).....54
- Figura 7 - Fixação e prensagem do material coletado (A, B). Montagem da exsicata (C). Exsicata de erva-de-passarinho *P. pyrifolia* (D). Armazenamento do material coletado em tubos tipo *falcon* de 50mL com etanol 96% (E, F).....55
- Figura 8 - DNA genômico das oito espécies coletas submetido a duas horas de eletroforese $3V \cdot cm^{-1}$ em gel de agarose 0,8%.....56
- Figura 9 - Produto de PCR visualizado após duas horas de eletroforese $3V \cdot cm^{-1}$ em gel de agarose 1,5%. Utilizou-se a combinação de iniciadores ITS 1 e 4 para as espécies de hemiparasitas das famílias Loranthaceae e Viscaceae.....57
- Figura 10 - Árvore filogenética de Inferência Bayseana com espécies da família Loranthaceae, usando sequências nucleotídicas da região ITS. A árvore mostra as relações filogenéticas de espécies das espécies coletadas (vermelho) com as espécies de Loranthaceae encontrada no banco de dados do GenBank, utilizando a espécie *Dendromyza reinwardtiana* como grupo externo.....62

Figura 11 - Árvore filogenética de Inferência Bayseana com espécies da família Viscaceae, usando sequências nucleotídicas da região ITS. A árvore mostra as relações filogenéticas de espécies das espécies coletadas (em vermelho) com as espécies de Viscaceae encontrada no banco de dados do GenBank, utilizando a espécie *Dendromyza reinwardtiana* como grupo externo.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies utilizadas para reconstrução filogenética obtidas a partir do GenBank.....	58
Tabela 2 - Espécies identificadas a partir das amostras coletas e seus respectivos hospedeiros, nos municípios de Murici e Palmeiras dos Índios, Alagoas.....	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Parasitismo e aspectos botânicos das famílias Loranthaceae e Viscaceae	14
2.2	Importância econômica e efeitos da erva-de-passarinho aos seus hospedeiros	15
2.3	Filogenia no auxílio a taxonomia	16
	REFERÊNCIAS	18
3	PRIMEIRO RELATO DAS ESPÉCIES <i>Passovia pyrifolia</i> (Kunth) Tiegh. E <i>Struthanthus marginatus</i> (Desr.) G. PARASITANDO POMARES DE <i>Citrus sinensis</i> NO ESTADO DE ALAGOAS	23
3.1	INTRODUÇÃO	25
3.2	MATERIAS E MÉTODOS	27
3.2.1	Coleta do material vegetal e identificação das espécies	27
3.2.2	Extração e qualidade do DNA genômico	28
3.2.3	Amplificação e sequenciamento do DNA	28
3.2.4	Análises de sequências	29
3.3	RESULTADO E DISCUSSÃO	30
3.4	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35
4.	PRIMEIRO RELATO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Phoradendron</i> PARASITANDO POMARES DE <i>Annona squamosa</i> L. NO BRASIL	39

4.1	INTRODUÇÃO.....	41
4.2	MATERIAS E MÉTODOS.....	42
4.2.1	Coleta do material vegetal e identificação das espécies.....	42
4.2.2	Extração e qualidade do DNA genômico.....	43
4.2.3	Amplificação e sequenciamento do DNA.....	43
4.2.4	Análises de sequências.....	44
4.3	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	45
4.4	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
5	ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES HEMIPARASITAS DE RAMOS PRESENTES NO ESTADO DE ALAGOAS.....	50
5.1	INTRODUÇÃO.....	52
5.2	MATERIAS E MÉTODOS.....	54
5.2.1	Coleta do material vegetal e identificação das espécies.....	54
5.2.2	Extração e qualidade do DNA genômico.....	57
5.2.3	Amplificação e sequenciamento do DNA.....	56
5.2.4	Análises filogenéticas.....	57
5.3	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	59
5.4	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO GERAL

As famílias Loranthaceae e Viscaceae são constituídas por espécies de vegetais denominados de hemiparasitas, pois apresentam clorofila mas necessitam de um hospedeiro para a manutenção do aparato fotossintético, retirando água e sais minerais dos hospedeiros. Mesmo diante da sua importância ecológica, medicinal e parasito-agronômica, esse grupo de planta é pouco investigado (ARRUDA et al 2012). Os principais gêneros presentes no Brasil são *Passovia*, *Struthanthus*, *Phoradendron* e *Psittacanthus*, apresentando plantas perenes, com folhas sempre verdes (CALVIN; WILSON, 2006).

Devido à disseminação de suas sementes serem feitas pelos pássaros, estas plantas são popularmente conhecidas como “erva-de-passarinho” e é através dessas aves que a maioria das infestações acontece. Ao se alimentarem dos frutos, os pássaros liberam as sementes nos ramos das plantas hospedeiras, seja por meio das fezes ou regurgitação. Essas sementes ao aderirem nos ramos podem germinar e emitir imediatamente uma radícula, as quais se transformarão em raízes especiais chamadas de haustórios. A penetrarem no caule, os haustórios desenvolverem uma união complexa com o tecido vascular da planta hospedeira, possibilitando a erva-de-passarinho retirar água e sais minerais para manutenção do aparato fotossintético. Esta relação leva a modificações no crescimento de árvores ornamentais ou pomares, gerando perdas na produção agrícola de algumas frutíferas e ornamentais, sendo consideradas em muitos casos como plantas daninhas (AMICO et al., 2009; LEAL et al., 2006).

Identificar a taxonomia e diversidade de uma comunidade de plantas daninhas é de fundamental importância para a escolha do melhor método de manejo (ERASMO et al. 2004). A sequência de DNA como fonte de variação é muito utilizada na resolução de questões taxonômicas e filogenéticas (MORITZ; HILLIS, 1990; NEI, 1987). Neste sentido, estudos comparativos de sequências do gene do RNA ribossomal permitem verificar relações filogenéticas de diferentes níveis taxonômicos e determinar a estrutura genética de populações (KING; SCHALL, 1989).

Atualmente, as análises de dados morfológicos e moleculares têm auxiliado no entendimento de relações filogenéticas entre plantas. Sequências nucleares e extranucleares podem ser utilizadas para tais finalidades. No intuito de solucionar algumas questões taxonômicas e filogenéticas, sequências de DNA têm sido utilizadas como fontes de variação (TOKUOKA, 2008).

A escolha do tipo de sequência depende do objetivo do estudo e do grau de parentesco entre as espécies. As regiões ITS1 e ITS2, por exemplo, podem ser utilizadas entre espécies próximas e também no plano intraespecífico (MAYER; SOLTIS, 1999). No entanto, para estabelecer relações filogenéticas entre espécies distantemente relacionadas, são utilizadas sequências mais conservadas, como as sequências que codificam a subunidade 18S ribossomal (rDNA 18S). Por ser uma região bem conservada, o rDNA 18S tem sido amplamente empregado em estudos filogenéticos em plantas (HAO et al., 2008; TOKUOKA, 2008).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a identificação e caracterização molecular de plantas hemiparasitas, pertencentes às famílias Loranthaceae e Viscaceae, infestando pomares e áreas próximas no estado de Alagoas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Parasitismo e aspectos botânicos das famílias Loranthaceae e Viscaceae

O hábito do parasitismo evoluiu várias vezes entre plantas e entre as angiospermas heterotróficas, sendo consideradas plantas parasitas aquelas que obtêm recursos diretamente de suas hospedeiras (NICKRENT, 2002; NICKRENT; MUSSELMAN, 2004). Existem aproximadamente 4100 espécies de plantas parasitas distribuídas em 19 famílias (NICKRENT; MUSSELMAN, 2004). Esse grupo de plantas abrange ampla variedade morfológica, estratégias de vida e formas de crescimento, e podem ser encontradas em todo o mundo, habitando desde florestas tropicais úmidas a tundras subárticas (BELL; ADAMS, 2011).

Algumas espécies deste grupo são generalistas, podendo parasitar uma ampla variedade de hospedeiros, enquanto que outras apresentam uma limitação na gama de hospedeiros que parasitam, sendo que algumas poucas espécies são conhecidas por parasitarem apenas uma única espécie de planta (CAZETTA; GALETTI, 2003) e são chamadas também de especialistas.

A família Loranthaceae é um grupo de plantas hemiparasitas constituído por cerca 990 espécies, distribuídas em 75 gêneros, sendo facilmente encontradas no Brasil (NICKRENT 2010). Maior família da ordem Santalales, a ocorre no Brasil juntamente com as famílias Santalaceae e Viscaceae, representada por 12 gêneros e 131 espécies distribuídas por todos os domínios fitogeográficos (ARRUDA et al 2012). O gênero *Struthanthus* é o mais diverso, dentro desta família possuindo cerca de 45 espécies (KUIJT 2011).

Viscaceae ou família do visco possui sete gêneros, todos hemiparasitas de caules. O gênero *Phoradendron* é o mais numeroso com 234 espécies e distribuição predominantemente americana, ocorrendo principalmente em regiões tropicais (KUIJT, 2003). Supostamente, a família Viscaceae teria se originado na Ásia oriental, irradiando através da Laurásia no início do período Terciário e posteriormente dispersou-se para os continentes sulinos (WIENS; BARLOW, 1971). No Brasil, são estimadas cerca de 62 espécies (REIF, 2004) ocupando variados ecossistemas (SOUZA; LORENZI, 2005).

A maioria destes vegetais possui em suas sementes uma substância chamada de visco que as permitem fixar-se na planta hospedeira, após serem ingeridas e depositadas por

pássaros, com exceção das sementes dos gêneros *Nuytsia* e *Misodendrum* que são dispersas pelo vento. Devido ao fato dos pássaros serem os agentes dispersores das sementes das duas principais famílias, Loranthaceae e Viscaceae, estas plantas recebem o nome popular de ervas-de-passarinho (NICKRENT, 2010).

2.2 Importância econômica e efeitos da erva-de-passarinho aos seus hospedeiros

A sobrecarga atribuída aos hospedeiros, seja nutricional ou hídrica, aliada ao sombreamento são os principais efeitos causados por esses parasitas. Ao serem infestadas as plantas têm seu crescimento retardado ou não florescem. Nos locais parasitados (ramos), ocorrem a formação de galhas, bem como a presença de diversos agentes infecciosos que penetram nos tecidos próximos aos haustórios (HUL; LEONARD, 1964; STEWART; PRESS, 1990).

Os hospedeiros de importância econômica, como as espécies florestais, são os mais estudados, com relatos sobre as espécies parasitas, seus ciclo de vida, disseminação e erradicação (MATHIASSEN et al., 2008). Diversos estudos tem falado no do parasitismo sobre coníferas na América do Norte e, uma vez que os haustórios causam irregularidades nas estruturas lenhosas do hospedeiro, causam grandes prejuízos em árvores produtoras de madeira (MATHIASSEN et al. 2008).

Em geral, esses vegetais são observados parasitando espécies de gimnospermas, magnolídeas e eudicotiledôneas, aparecendo em menor frequência sobre monocotiledôneas, como Poaceae (RIZZINI 1951; YONG; HEW 1995, NORTON; CARPENTER 1998).

Downey (1998; 2004), ao realizar estudos em regiões da Austrália mencionou 880 espécies de hospedeiros para cerca de 90 espécies de ervas-de-passarinho (Loranthaceae e Viscaceae), com uma gama de hospedeiro variando de um a 125 espécies, dependendo da especificidade do parasita. Destacando o acréscimo de novas combinações parasita-hospedeiro, como provável resultado de novas pressões seletivas em ambientes australianos, com distúrbios antrópicos (ações causadas pelo homem), e o grande número de hospedeiros representados por espécies exóticas e que certamente têm influência sobre a distribuição das espécies hemiparasitas.

Embora ocorram diversos estudos sobre a interação parasita-hospedeiro em território brasileiro (ARRUDA; CARVALHO 2004; ARRUDA et al. 2006; CAZZETA; GALETTI 2007; FADINI 2011; FADINI et al. 2009; FADINI; LIMA 2012; MOURÃO et al. 2006;

2009; TEODORO et al. 2010), em vários ecossistemas estas relações ainda não estão completamente esclarecidas, e não há um panorama em escalas espaciais maiores, em parte, devido à ausência de informações básicas sobre quem são os hospedeiros.

Autores como Marvier e Smith (1997) e Downey (1998) comentaram a falta de hábito dos coletores de plantas parasitas em também coletar ou discriminar os hospedeiros destas, de forma que a maioria das coleções deixa de apresentar estas informações.

Existem alguns relatos de hemiparasitas infestando frutíferas em todo mundo, sendo constatada a presença desses parasitas em mangueira, laranjeiras, umbuzeiros e cajueiros. Os danos causando podem variar em função do hemiparasita, de sua longevidade e da intensidade da infestação. Alguns dos efeitos causados por esses hemiparasitas nas frutíferas hospedeiras são: redução do vigor e da produção de frutos e sementes, mau funcionamento dos tecidos lenhosos, produção de galhas, folhagem esparsa, morte do ápice, predisposição ao ataque de insetos e doenças e, até mesmo, morte prematura (CAZZETA; GALLETI, 2003; HARRIS, 1992; LEAL et al., 2006)

2.3 Filogenia no auxílio a taxonomia

A identificação de uma espécie somente com base morfológica é um tanto difícil devido à variabilidade na expressão dos caracteres adotados, exigindo, portanto, a aplicação conjunta de outros métodos que possibilitem uma diferenciação correta entre espécies (MENEZES, 2006).

Existem vários relatos sobre espécies hemiparasitas ocorrendo em diferentes regiões geográficas do mundo, mas não considerando as características moleculares das populações (LEAL et al., 2006). Estas características podem servir de base para avaliação da diversidade genética desse grupo de plantas, permitindo assim, tentar relacionar a intensidade do parasitismo e a especificidade aos hospedeiros (WHITE et al., 2011).

A sequência de DNA como fonte de variação tem sido bastante utilizada na resolução de questões taxonômicas e filogenéticas (MORITZ; HILLIS, 1990; NEI, 1987). Os estudos comparativos de sequências do gene do RNA ribossomal permitem verificar relações filogenéticas de diferentes níveis taxonômicos e determinar a estrutura genética de populações (KING; SCHALL, 1989). O gene do ribossomo (rDNA) codifica o RNA ribossomal e está presente no genoma vegetal representado por cerca de 1000 cópias arranjadas em repetidas

séries no mesmo locus (JORGENSEN; CLUSTER, 1988). O gene é transcrito como um único precursor com três regiões codificantes (18S, 5.8S, 25S) separadas por duas regiões transcritas (ITS1 e ITS2) e que não são processadas. As regiões ITS apresentam um taxa intermediária de variação, o que torna essas sequências apropriadas para o uso a nível de gênero e/ou de espécie (MORITZ et al., 1990).

Em vários estudos relacionados à sistemática molecular e filogenia de hemiparasitas, o cistron que codifica o DNA ribossomal (rDNA) tem sido utilizado com sucesso. A região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) e os espaços intergênicos de unidades repetidas do rDNA nuclear variam entre espécies do mesmo gênero, ou entre populações. Além disso, as reações de *Polimerase Chain Reaction* (PCR) e o sequenciamento direto dessas regiões ribossomais oferecem muitas vantagens como rapidez, sequências com baixo número de erros, requer pequenas quantidades de DNA, sendo um método compatível com sequenciadores automáticos (WHITE et al., 1990, FUNGARO, 2000). Segundo esses autores os primers ITS1 e ITS4 possibilitam a amplificação de uma região que engloba o ITS 1, 5.8S rDNA e o ITS2 do rDNA nuclear. Wilson e Calvin (2006) utilizaram a região ITS para identificação da origem do parasitismo de ramos aéreos na família Loranthaceae. Também utilizando a região ITS, Zanjanchi e Mehrvarz (2015) conseguiram posicionar filogeneticamente espécies de hemiparasitas no Iran.

Outra região que tem ajudado na resolução de questões taxonômicas é a região plastidiais, pois tem sido gerada uma grande quantidade de informações e solucionados questões taxonômicas não resolvidas anteriormente (AMICO; NICKRENT, 2009). Regiões cloroplastidiais como a região trnL-trnF provaram ser de grande utilidade para estudos filogenéticos, devido as suas rápidas taxas de evolução de sequências e sítios de flaqueamento dos *primers* bem conservados (SHAW et al., 2005). Tais locus tem mostrado capacidade de detectar variação inter e intraespecífica em diversas espécies parasitas (TSAI et al., 2006). A combinação de dados de regiões plastidiais (trnL) e regiões nucleares (ITS) são de eventual importância para se obter dendrogramas que mostrem verdadeira história evolutiva a níveis infragenéricos (YUAN; OLMSTEAD, 2008).

REFERÊNCIAS

- AMICO, G. C., E D. L. NICKRENT. Population structure and phylogeography of the mistletoe *Tristerix corymbosus* and *T. aphyllus* (Loranthaceae) using chloroplast DNA sequence variation. **American Journal of Botany**, v. 96: 1571-1580, 2009.
- ARRUDA, R.; CARVALHO, L. N. Especificidade de hospedeiros por *Struthanthus polyanthus* (Loranthaceae) em uma área de Cerrado do Parque Estadual da Serra de Caldas Novas, GO, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 20, p: 211-214, 2004.
- ARRUDA, R.; CARVALHO, L.N.; DEL-CLARO, K. Host specificity of a Brazilian mistletoe, *Struthanthus* aff. *polyanthus* (Loranthaceae), in cerrado tropical savanna. **Flora**, v. 201, p: 127-134, 2006.
- ARRUDA, R.; FADINI, R.F.; CARVALHO, L.N.; DEL-CLARO, K.; MOURÃO, F.A.; JACOBI, C.M.; TEODORO, G.S.; VAN DEN BERG, E.; CAIRES, C.S. & DETTKE, G.A. Ecology of Neotropical mistletoes: an important canopy-dwelling component of Brazilian ecosystems. **Acta Botanica Brasílica**, v. 26, p. 264-274, 2012.
- BELL T.L.; ADAMS M.A. Attack on all fronts: functional relationships between aerial and root parasitic plants and their woody hosts and consequences for ecosystems. **Tree Physiology**, v. 31: p. 3–15, 2011.
- CAZETTA, E.; GALETTI, M. Ecologia das ervas-de-passarinho. **Ciência Hoje**, São Paulo, v.3, n. 94, p.72 - 74, 2003.
- CAZZETA, E.; GALETTI, M. Frugivoria e especificidade por hospedeiros na erva de passarinho *Phoradendron rubrum* (L.) Griseb. (Viscaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, p: 345-351, 2007.
- DOWNEY, P.O. An inventory of host species for each aerial mistletoe species (Loranthaceae and Viscaceae) in Australia. **Cunninghamia**, v. 5, p: 685-720, 1998.
- DOWNEY, P.O. A regional examination of the mistletoe host species inventory. **Cunninghamia**, v. 8, p: 354-361, 2004.

ERASMO, E.A.L.; PINHEIRO, L.L.A.; COSTA, N.V. Levantamento fitossociológico das comunidades de plantas daninhas infestantes em áreas de produção de arroz irrigado cultivado sob diferentes sistemas de manejo. **Planta Daninha, Viçosa**, v.22, n.2, p.195-201, 2004.

FADINI, R. F.; LIMA, A. P. Fire and host abundance as determinants of the distribution of three congener and sympatric mistletoes in an Amazonian savanna. **Biotropica**, v. 44, p: 27-34, 2012.

FADINI, R. F. Non-overlap of hosts used by three congeneric and sympatric loranthaceous mistletoe species in an Amazonian savanna: host generalization to extreme specialization. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, p: 337-345, 2011.

FADINI, R.F.; GONÇALVES, D.C.M.; REIS, R.P.F. Consistency in seed-deposition patterns and the distribution of mistletoes among its host trees in an Amazonian savanna. **Australian Journal of Botany**, v. 57, p: 640-646, 2009.

FUNGARO, M.H.P. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.14, p. 12-16, 2000.

HARRIS, R. W. Arboriculture: integrated management of landscape trees, shrubs and vines. **New Jersey: Prentice-Hall**, 674p, 1992.

LEAL, L; BUJOKAS, W.M; BIONDI, D. Análise da infestação de erva-de-passarinho na arborização de ruas de Curitiba, PR. **Floresta**, v. 36, n. 3, 2006.

KING, L.M.; SCHAAL B.A. Ribosomal DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. **Evolution**, v.43, p.1117-1119, 1989.

KUIJT, J. Pulling the skeleton out of the closet: resurrection of *Phthirusa* sensu Martius and consequent revival of *Passovia* (Loranthaceae). **Plant Diversity and Evolution**, v. 129, p. 159-211, 2011.

HAO, D.C.; HUANG, B.; YANG, L. Phylogenetic relationships of the genus *Taxus* inferred from chloroplast intergenic spacer and nuclear coding DNA. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, 260-265, 2008.

HULL, R. J.; LEONARD, O. A. Physiological aspects of parasitism in mistletoes (*Arceuthobium* and *Phoradendron*) I. The carbohydrate nutrition of mistletoes. **Plant Physiol**, v. 40, p. 996-1007, 1964.

JORGENSEN, R.A.; CLUSTER, P.D. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: New characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. **Ann. Missouri Bot. Gard**, v.75, p.1238-1247, 1988.

MATHIASSEN, R. L.; NICKRENT, D. L.; SHAW, D. C.; WATSON, D. M. Mistletoes: pathology, systematics, ecology and management. **Plant Disease**, v. 92, p. 120-126, 2008.

MAYER, M.S.; SOLTIS, P.S. Intraspecific phylogeny analysis using ITS sequences: insights from studies of the *Streptanthus glandulosus* complex (Cruciferae). **Systematic Botanical**, v.24, p.47-61, 1999.

MENEZES, M. **Aspectos Biológicos e Taxonômicos de Espécies do Gênero *Colletotrichum***. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, v.3, p.170-179, 2006.

MORITZ, C.; HILLIS, D. M. **Molecular systematics: context and controversies**. In: Molecular Systematics. Eds. D.M. Hillis e C. Moritz. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Mass. EUA, 1990.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York. 1987.

NICKRENT D. L.; MUSSELMAN L. J. **Introduction to parasitic flowering plants**. Plant Health Instructor. doi:10.1094/PHI-I-2004- 0330-01, 2004.

NICKRENT D. L. **Parasitic Plants of the World**. In: Lopez-Saez JA, Catalan P, Saez L, eds. Parasitic Plants of the Iberian Peninsula and Balearic Islands. Madrid: Mundi- Prensa Libros S.A., p. 7–27, 2002.

NICKRENT D. L.; MALÉCOT V.; VIDAL-RUSSELL R.; DER J. P. A revised classification of Santalales. **Taxon**, v. 59, p. 538–558, 2010.

NORTON, D.A. & CARPENTER, M.A. Mistletoes as parasites: host specificity and speciation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 13, p: 101-105, 1998.

REIF, C. **Contribuição à taxonomia das famílias Eremopidaceae, Loranthaceae e Viscaceae no Estado do Rio de Janeiro**. 112f. Tese (Dissertação de Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

RIZZINI, C.T. O parasitismo de “Loranthaceae” sobre monocotiledôneos. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 11, p. 289-302, 1951.

SHAW, J., LICKEY, E.B., BECK, J.T. , FARMER, S.B., LIU, W., MILLER, J., SIRIPUN, K. C., WINDER, C.T., SCHILLING, E.E. , SMALL, R.L. The Tortoise and the hare II: Relative Utility of 21 Noncoding Chloroplast DNA Sequences for Phylogenetic Analysis. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 1, p. 142-166, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Botânica Sistemática, Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, Nova Odessa. 640p., 2005.

STEWART, G. R.; PRESS, M. C. **The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms**. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v. 41, p. 127-151, 1990.

TSAILL.C., YU, Y.C., HSIEH, H.M., WANG, J.C., LINACRE, A., LEE, J.C.I. Species identification using sequences of the trnL intron and the trnL-trnF IGS of chloroplast genome among popular plants in Taiwan. **Forensic Science Int.**, v. 164, p. 193–200, 2006.

TOKUOKA, T. Molecular phylogenetic analysis of Violaceae (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. **Journal of Plant Research**, v.121, p.253-260, 2008.

WESTWOOD, J.H. et al. The evolution of parasitism in plants. **Trends in Plant Science**, v.15, p. 227-235, 2010.

WHITE, B. L. A. et al. Análise da ocorrência de erva-de-passarinho na arborização da Universidade Federal de Sergipe, Campus São Cristóvão. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 41, p. 1-8, 2011.

WIENS, D.; BARLOW, B. A. The Cytogeography and Relationships of the Viscaceous and Eremolepidaceous Mistletoes. **Taxon**, v. 20, p. 313-332, 1971.

WILSON C. A.; CALVIN C. L. An origin of aerial branch parasitism in the mistletoe family, Loranthaceae. **American Journal of Botany**, v. 93, p. 787-796, 2006.

YUAN, Y., OLMSTEAD, R.G. Evolution and phylogenetic utility of the *PHOT* gene duplicates in the *Verbena Complex* (VERBENACEAE): Dramatic intron size variation and footprint of ancestral recombination. **American Journal of Botany**, v. 95, n. 9, p. 1166–1176, 2008.

YONG, J.cW.cH.; HEW, C.cS. A report of mistletoes on pigeon orchids in Singapore. **Lindleyana**, v. 10, p: 131-132, 1995.

ZANJANCHI, P.; MAHRVARZ, S. S. **The generic position of *Loranthus grewingkii* of Loranthaceae (Loranthaceae) inferred from the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) and chloroplast trnL-F sequences: A case study on *Loranthus* in Iran.** *Journal of Plant Taxonomy and Geography*, <http://dx.doi.org/10.1080/00837792.2015.1064585>, 2015.

3. PRIMEIRO RELATO DAS ESPÉCIES *Passovia pyrifolia* (Kunth) Tiegh. E *Struthanthus marginatus* (Desr.) G. PARASITANDO POMARES DE *Citrus sinensis* NO ESTADO DE ALAGOAS

RESUMO

As plantas hemiparasitas são popularmente conhecidas como erva-de-passarinho, pois seus frutos são umas das principais fontes de alimentos de algumas espécies de passarinho. Essas aves ao se alimentarem das polpas dos frutos, regurgitam ou defecam as sementes nos troncos das plantas hospedeiras. A erva-de-passarinho é uma planta trepadeira e na sua maioria hemiparasita, suas raízes modificadas (haustório) fixam nos galhos ou troncos das árvores, retirando do hospedeiro água e sais minerais para que a mesma realize a fotossíntese. Os hospedeiros dessas plantas podem ter sua copa totalmente coberta, diminuindo a iluminação na copa e conseqüentemente diminuindo a eficiência do aparato fotossintético. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi relatar o parasitismo de espécies de erva-de-passarinho mediante identificação morfológica e molecular. Foram coletadas duas espécies de hemiparasitas em pomares de *Citrus sinensis* (laranja lima) no Município de Murici, Alagoas. A identificação das espécies parasitas foi confirmada com base na morfologia e análise de sequências de DNA do segmento das regiões ITS 1 e 4 do rDNA. O rDNA foi amplificado por PCR e diretamente sequenciado. As sequências obtidas foram comparadas com sequências de espécies de Loranthaceae disponíveis no GenBank através da ferramenta BLASTn. Através da morfologia foi possível identificar duas espécies distintas *Passovia pyrifolia* (Kunth) Tiegh. e *Struthanthus marginatus* (Desr.) G. A análise molecular confirmou a identificação da espécie *P. pyrifolia*, porém em relação a *S. marginatus*, não existem dados de sequências disponíveis para GenBank, fazendo-se necessário o depósito dos dados obtidos nesse experimento. Existem relatos da ocorrência dessas espécies em alguns estados brasileiros, porém infestando diferentes hospedeiros. Portanto, este é o primeiro relato dessas espécies parasitas no estado de Alagoas, e o primeiro relato de *P. pyrifolia* e *S. marginatus* infestando laranja lima no Brasil.

Palavras-chaves: Loranthaceae. Hemiparasitas. ITS.

ABSTRACT

The mistletoes plants are popularly known as wort-bird, because its fruits are a major source of food for some bird species. These birds while feeding the fruit pulp, regurgitate or defecate the seeds in the trunks of host plants. The mistletoes is a vine and mostly mistletoe, its modified roots (haustoria) secure the branches or trunks of trees, removing the host water and minerals for it to perform photosynthesis. The hosts of these plants may have a completely covered canopy, reduced lighting in the canopy and consequently decreasing the efficiency of the photosynthetic apparatus. Given the above, the objective of this study was to report the parasitic species of herb-of-finch by morphological and molecular identification. two species of mistletoes were collected in orchards of *Citrus sinensis* (orange file) in the municipality of Murici, Alagoas. The identification of parasite species was confirmed based on morphology and analysis of DNA sequences of the ITS regions of segment 1 and 4 rDNA. The rDNA was amplified by PCR and directly sequenced. The obtained sequences were compared with Loranthaceae species sequences available in GenBank using the BLAST n tool. By morphology it was possible to identify two distinct species *Passovia pyrifolia* (Kunth) Tiegh. and *Struthanthus marginatus* (DESR.) G. Molecular analysis confirmed the identification of the species *P. pyrifolia*, but in relation to *S. marginatus*, there are no data streams available to GenBank, making it necessary to deposit the data obtained in this experiment. There are reports of occurrence of these species in some Brazilian states, but infesting different hosts. So this is the first report of these parasitic species in the state of Alagoas, and the first report of *P. pyrifolia* and *S. marginatus* infesting orange lime in Brazil.

Keywords: Loranthaceae. Mistletoes. ITS.

3.1 INTRODUÇÃO

A família Loranthaceae apresenta espécies de plantas escandentes (trepadeiras) que recebem o nome de ervas-de-passarinho. Esses vegetais estão associados ao hábito alimentar de diversas aves, que os disseminam ao consumirem seus frutos e regurgitar ou defecar as sementes nos galhos e troncos de algumas plantas. São plantas que causam grandes danos em ruas, praças, jardins e em alguns pomares. As ervas-de-passarinho em sua maioria são hemiparasitas, ou seja, retiram da planta hospedeira água e sais minerais através de suas raízes modificadas (haustórios) e por apresentarem folhas com a presença de clorofila e estômatos, realizam fotossíntese (ROTTA, 2004; ARRUDA et al. 2012).

As ervas-de-passarinho são plantas perenes, com caule apresentando nós e entrenós bem definidos, com ramos cilíndricos, comprimidos ou angulosos, e na sua maioria disposto dicotomicamente, opostamente ou verticalmente. Suas folhas são sempre verdes e apresentam uma diversidade muito grande quanto a forma. A inflorescência também é variada e apresenta flores hermafroditas ou unissexuais, pediceladas ou sésseis, seus frutos são bagas ou drupas (GOMES DE ANDRADE, 2002; KUIJT 2011).

Uma característica interessante nesse grupo de plantas parasitas é a presença de haustórios, que são um dos tipos mais comuns de raízes epicorticais (WILSON; CALVIN, 2005; CALVIN; WILSON, 2006). Essa raiz modificada pode ser estimulada ou inibida dependendo da interação fisiológica com o hospedeiro, podendo facilitar ou dificultar o grau de fixação e germinação das sementes (ROXBURGH; NICOLSON, 2005, KUIJT 2012). O formato do galho ou tronco da planta hospedeira representa uma condição básica para uma possível ocorrência desse hemiparásita. Quando essas estruturas apresentam rugosidade, ocasionando maior resistência das sementes a ações causadas por condições ambientais, como vento e chuva, facilitam fixação do parasita no hospedeiro (ARRUDA et al., 2006, KUIJT 2013). Outras características anatômicas como o aumento da espessura do caule e da concentração de polifenóis nas células das plantas hospedeiras, influenciam de forma negativa o sucesso do parasitismo (HARIRI et al., 1992).

Aliado à influência dessas características das plantas hospedeiras, no sucesso do estabelecimento da planta parasita, está a fauna local, especificamente os pássaros que desempenham um papel fundamental no ciclo de vida dessas plantas, pois são a principal forma de dispersão de suas sementes. As plantas hospedeiras além de exercerem influência

direta no sucesso do parasitismo, também atuam de forma indireta, afetando o comportamento das aves (OVERTON, 1993; AUKEMA; MARTINEZ DEL RIO, 2002).

As ervas-de-passarinho causam inúmeros danos econômicos, seja causando prejuízos em pomares ou na urbanização (CAZETTA; GALLETTI, 2003). Ao parasitar a planta hospedeira, podem causar redução do vigor e produção de frutos e sementes, deformação do caule, pois ocasionam o mau funcionamento dos tecidos lenhosos, produção de galhas e morte do ápice, podendo causar até a morte da planta hospedeira (HARRIS, 1992). Em alguns casos, dependendo do grau de infestação por esses hemiparasitas, a planta hospedeira pode ficar mais propícia ao ataque de insetos e doenças, além de se tornar mais susceptível a alguns tipos de estresse como a seca, pois ao sofrerem a infestação por erva-de-passarinho o vigor dessas plantas diminui. Essa diminuição no vigor da planta hospedeira é principalmente, devido a competição do a competição por radiação solar (CAZETTA; GALLETTI, 2003).

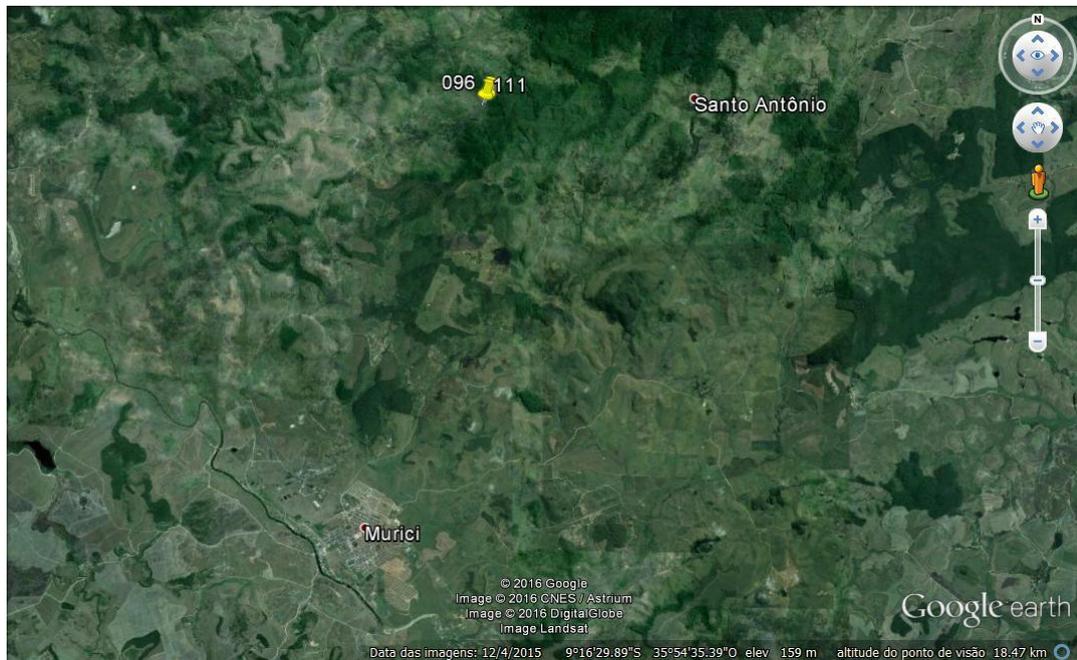
Em outros continentes como África, Ásia e América Central, a presença desses parasitas também causa danos em vários tipos de plantações, como abacate até café e manga ((FERREIRA, 1986; LEAL et al. 2006). Com relação ao território brasileiro, a infestação de erva-de-passarinho é muito comum na arborização de ruas, praças e parques, além de causarem danos em alguns pomares (WHITE et al., 2010). Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi identificar as espécies de hemiparasitas presentes em pomares de *Citrus sinensis* (laranja lima) no estado de Alagoas, através das características morfológicas e moleculares.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Coleta do material vegetal e identificação das espécies

As amostras de Loranthaceae (erva-de-passarinho) utilizadas para realização deste trabalho foram coletas em áreas de pomares de *Citrus sinensis* (laranja lima) no estado de Alagoas, município de Murici, nas coordenadas 9°14'1.95"S e 35°55'13.93"W, 9°14'3.58"S e 5°55'15.67"W, para os respectivamente pontos 96 e 111 (Figura 1). Foi realizada identificação visual e coleta das espécies hemiparasitas, juntamente com os seus respectivos hospedeiros, para posterior identificação botânica. O material foi coletado com auxílio de tesoura de poda e podão, sendo retirados no mínimo três ramos (fértil e não fértil) de cada hemiparasita. O material vegetal foi etiquetado e georeferenciado utilizando GPS (Garmin eTrex 20). O processo de identificação teve início no campo, no entanto, por se contar de espécies pouco estudadas e ainda desconhecidas, as amostras tiveram que ser enviados para o Herbário MAC, do Instituto do Meio Ambiente (IMA) do estado de Alagoas e a Universidade Estadual da do Sudoeste da Bahia (UESB), para confirmação da identificação botânica pelo Dr. Claudenir Simões Caires, especialista em famílias de hemiparasitas.

Figura 1 - Mapa com localização dos pontos de coletas das espécies estudadas, a 8,6 km de distância da sede do Município de Murici – AL.



Fonte: Google Earth.

As exsiccatas permanentes foram confeccionadas através da limpeza do material botânico, retirando estruturas danificadas e excesso de folhas e ramos secundários, além da

catalogação, prensagem em prensa de madeira, secagem e fixação em cartolina. Para posterior identificação molecular, foi realizado armazenamento de cinco folhas de cada espécie de erva-de-passarinho, em tubos tipo *falcon* de 50mL com etanol 96% e incubado em freezer a -20°C (BRESSAN, 2011).

3.2.2 Extração e qualidade do DNA genômico

Extração do DNA total foi realizada de acordo com Moog e Bond (2003). Foi utilizado cerca de 50mg do material foliar, macerado em 600 µL de tampão de extração e PVP (polivinilpirrolidona), em cadinhos de porcelanas. O tampão de extração foi composto por 100mM de Tris pH 8,0; 50mM de EDTA 0,5M pH 8,0; 500mM de NaCl 5M; 0,7% de SDS 7%; 50µg/mL de Proteinase K (10mg/mL) e 50µg/mL de RNase (10mg/mL). Após maceração, o material foi colocado em tubos de 1,5mL e incubado em estufa a uma temperatura de 37°C por cerca de 12 horas. Em seguida, os tubos foram retirados da estufa, foi adicionado 320µL de NaCl 5M e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm. Para precipitação do DNA adicionou-se 800µL de isopropanol ao sobrenadante e mantidos -20°C por 3 horas, seguido de centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C. O pellet foi lavado com 500µL de etanol 70% e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, sendo esse procedimento foi realizado por duas vezes. Utilizando 500µL de etanol 100%, efetuou-se a última lavagem. O pellet formado foi ressuspensionado em 200µL de TE (1mM de Tris e 0,1mM EDTA) e armazenados em freezer -20°C. Alíquotas desses produtos da extração foram corados com *Sybr green* e após eletroforese de 3V*cm⁻¹ por cerca de duas horas em gel de agarose 0,8%, foram visualizados por transluminação em luz ultravioleta.

3.2.3 Amplificação e sequenciamento do DNA

Aproximadamente 25ng de DNA foram usados na reação de PCR (*polimerase chain reaction*), além dos pares de iniciadores ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') de acordo com White et al. (1990). As reações de PCR foram realizadas com tampão 10X de *Taq* com KCl [100 mM Tris-HCl (ph 8,8); 500 mM KCl; 08% Nonidet P40], 100 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada iniciador (ITS1 e ITS4), 1 U de *Taq polymerase* e 2µL de DNA diluído (1:20). O volume final das reações foi ajustado para 25µL com água Milli-Q autoclavada.

A reação de PCR foi realizada em termociclador Axygen Maxygene, com o seguinte ciclo termal: 95°C por 2min., seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s., anelamento a 52,5°C por 30s e alongamento a 72°C por 30s, com uma etapa final de extensão

a 72°C por 4min. Parte dos produtos da PCR (5µL) foram corados com *Sybr green* e após eletroforese de 3V*cm⁻¹ por aproximadamente duas horas em gel de agarose 1,5%, foram visualizados por transluminação em luz ultravioleta (Figura 9). O restante do produto do PCR (20µL) foi enviado para sequenciamento na Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul).

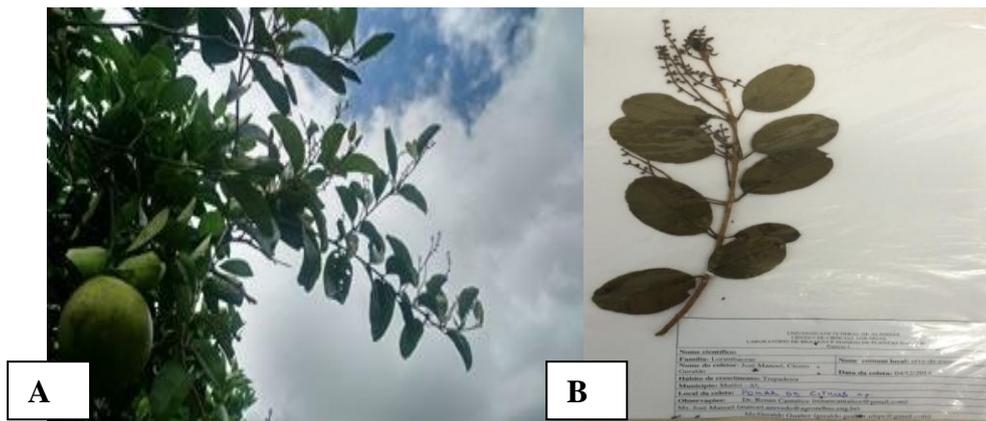
3.2.4 Análises de sequências

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software *CodonCode Aligner* (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA). O arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso. As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLAST n (ALTSCHUL et al., 1990) e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies de Loranthaceae com as quais elas compartilham maior identidade de sequência.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se, através das análises morfológicas e moleculares que uma das espécies encontrada pertence à *Passovia pyrifolia* (Kunth) Tiegh. (Figura 2). Análise BLASTn mostrou que a amostra de hemiparasita foi identificada como pertencentes à espécie *P. pyrifolia*, com porcentagem de identidade de nucleotídeos 99%, com espécie *Phthirusa pyrifolia* presente no GenBank (número de acesso DQ333857). Recentemente o gênero *Phthirusa* Mart. foi revisado por Kuijt (2011) que indicou o ressurgimento do gênero *Passovia*, o que implica que espécies de *Phthirusa* passam a pertencer a *Passovia*. Entretanto essa combinação ainda é considerada “não resolvida” nos bancos de dados internacionais (“Missouri Botanical Garden” e “The plant list”), e o gênero *Passovia* está em revisão (ARRUDA et al., 2012).

Figura 2 - Espécie *Passovia pyrifolia* (Kunth) Tiegh. parasitando *Citrus sinensis* (A) e sua respectiva exsicata (B).



Fonte: Autor, 2016.

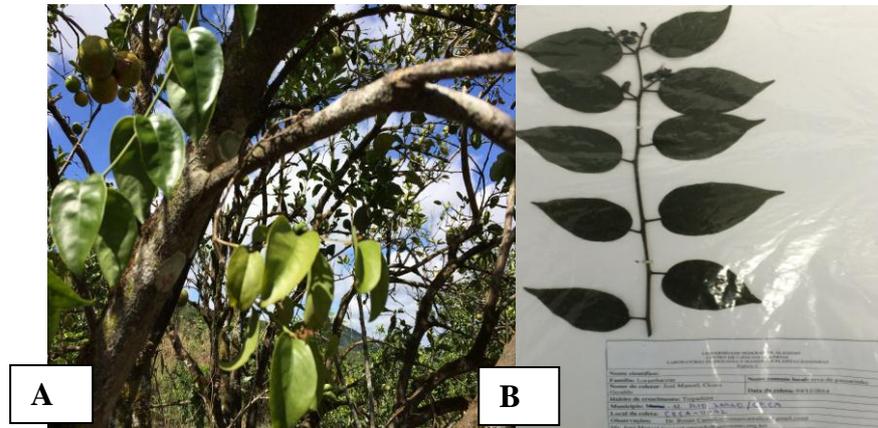
O gênero *Passovia*, juntamente com *Psittacanthus* e *Struthanthus*, são os gêneros mais diversificados de hemiparasitas na flora brasileira (CAIRES et al., 2009; ARRUDA et al., 2012). Mesmo tendo a diversificação de hospedeiras sendo consideradas comuns (NICKRENT, 2002; GLATZEL; GEILS, 2009), podem mostrar preferência por algumas espécies hospedeiras (PRESS; PHOENIX, 2005; ARRUDA et al., 2012). Mourão et al. (2009) relatou a infestação de hemiparasitas do gênero *Passovia* em *Mimosa calodendron* Mart., no estado de Mina Gerais. Sulevis e Boindi (2014) ao avaliar a presença de erva-de-passarinho na arborização de ruas em Curitiba-PR constatou que 25,8% do total de 1926 árvores avaliadas apresentavam infestação por erva-de-passarinho, espécies como *Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze, *Acer negundo* L., *Ligustrum lucidum* W.T. Aiton, *Lagerstroemia*

indica L., *Handroanthus albus* (Cham.) Mattos e *Cassia leptophylla* Vog. foram identificadas com a presença de hemiparasitas.

A espécie *P. pyrifolia* é caracterizado por ser um hemiparasita decumbente, pouco ramificado e bastante folhoso, possuindo raízes epicorticais presentes apenas na base. O caule do parasita é marrom-acinzentados, não lenticelados, cilíndricos a angulosos, tendo os entrenós variando de 3,5cm-4,5cm a 0,2cm-0,3cm. Suas folhas são pecioladas, pecíolo de 0,5cm a 1 cm, opostas, verde escuras, glabras, lustrosas, lâmina ovada, base rotunda, ápice agudo, venação eucamptódroma perfeita. Tendo sua inflorescência em racemo de tríades, com 12 a 16 tríades por inflorescência, ramos cilíndricos. As Flores são as principais características morfológicas para identificação de tais parasitas. As plantas pertencentes a esta espécie apresentam flores sésses, bissexuais, botões cilíndricos; cálculo íntegro na forma de bainha, verde; corola com 6 pétalas, vermelhoescuro, estames 6 epipétalos, dimórficos, 3 maiores, 3 menores, alternos, basifixos, inclusos, filetes com depressões que acomodam as anteras; ovário ínfero e frutos ovoides (VASCONCELOS, 2011). No Brasil é relatada nos Estados de Roraima, Amapá, Pará, Amazonas, Acre, Rondônia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Mato Grosso (CAIRES; DETTKE, 2010).

A outra espécie de hemiparasita encontrada foi a *Struthanthus marginatus* (Desr.) G (Figura 3). Análise BLASTn mostrou que a espécie *S. marginatus* apresentou porcentagem de identidade de nucleotídeos 89%, com espécie *Struthanthus orbicularis* presente no GenBank (número de acesso DQ333856). Notou-se também que não há nenhum depósito no banco de dados GenBank, relacionado a espécie, fazendo-se necessário o seu depósito para auxiliar em estudos futuros. Dentre os 75 gêneros de ervas-de-passarinho descritos na família Loranthaceae, o gênero *Struthanthus* possui cerca de 60 espécies nativas da América tropical, a grande maioria localizando-se na América do Sul e, em particular, no Brasil, representado por 40 espécies (CAIRES, 2012, RIZZINI, 1968).

Figura 3 - Espécie *Struthanthus marginatus* (Desr.) G. parasitando pomares de *Citrus sinensis* (A) e sua respectiva exsicata (B).



Fonte: Autor, 2016.

De acordo com Vasconcelos (2011) as plantas parasitas pertencentes à espécie *S. marginatus* apresentam hemiparasitas decumbentes, bastante ramificadas, pouco folhosas. Suas raízes epicorticais são encontradas desde a base da planta até os entrenós. O caule verde quando jovem e acinzentado quando adulto, lenticelado e cilíndrico. Suas folhas semicoriáceas, pecioladas, subopostas, verde brilhante, glabras, base obtusa a cuneada, ápice acuminado e nervura central proeminente na face abaxial. Em relação a inflorescência, são em racemos de tríades, 1 a 2 por axila, de 3 a 4 pares de tríades, pedúnculo com comprimento de 0,3cm e ramos da inflorescência angulosos. Suas flores são sésseis sobre brácteas ovadas, 6 pétalas, com pistilo rudimentar na flor masculina e fruto tipo baga elíptica, avermelhado e glabro. Já foram relatadas nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (CAIRES; DETTKE, 2010).

O gênero neotropical *Struthanthus*, compreendendo espécies como *S. cansjerifolius*, *S. costaricensis*, *S. orbicularis*, *S. marginatus*, entre outras, é bastante encontrado no Brasil, nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Bahia, principalmente a espécie *S. vulgaris*, planta nativa das regiões de mata pluvial, apreciadora de temperaturas mais amenas, muito comum no sul e nas serras do leste (RIZZINI, 1968). Mourão et al. (2006) estudando o parasitismo da espécie *Struthanthus flexicaulis* observou este parasita em um total de 44 espécies de 19 famílias botânicas, demonstrando a ampla gama de hospedeiro.

No Brasil, uma das espécies mais comuns parasitando árvores ornamentais e pomares é a espécie *S. vulgaris* (VASCONCELOS, 2011). Algumas das espécies desse gênero originárias do Brasil e América Tropical são conhecidas por terem atividades medicinais (VIEIRA, et al., 2005).

Murilho (2005), observou a presença de *Struthanthus orbicularis* e *Phthirusa pyrifolia* infestando pomares de *Citrus* spp na Costa Rica, confirmando que os gêneros *Passovia* (sinônimo de *Phthirusa*) e *Struthanthus* são presentes e causam grandes danos em pomares de laranja. Um fato que pode explicar o primeiro relato das duas espécies de Loranthaceae parasitando pomares de *Citrus sinensis*, pode se dar por esses dois gêneros *Passovia* e *Struthanthus* apresentarem ampla distribuição geográfica no Brasil, sendo encontrados desde áreas de Floresta Atlântica e Amazônia, até mesmo em Cerrado e Caatinga, e serem consideradas generalistas, ou seja, parasitando vários hospedeiros (CAIRES, 2012).

3.4 CONCLUSÕES

- Foi identificado duas espécie de Loranthaceae, a *Passovia pyrifolia* (Kunth) Tiegh. e *Struthanthus marginatus* (Desr.) G.;
- O *Citrus sinensis* (laranja lima) apresentou-se como hospedeiro em comum com as duas espécies identificadas;
- Este é o primeiro registro oficial do parasitismo de tais espécies em pomares de laranja lima para o estado de Alagoas;

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL S.F., et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ARRUDA, R.; CARVALHO, L.N.; DEL-CLARO, K. Host specificity of a Brazilian mistletoe, *Struthanthus* aff. *Polyanthus* (Loranthaceae), in cerrado tropical savanna. **Flora**, v. 201, p. 127–134, 2006.
- ARRUDA, R.; FADINI, R.F.; CARVALHO, L.N.; DEL-CLARO, K.; MOURÃO, F.A.; JACOBI, C.M.; TEODORO, G.S.; VAN DEN BERG, E.; CAIRES, C.S. & DETTKE, G.A. Ecology of Neotropical mistletoes: an important canopy-dwelling component of Brazilian ecosystems. **Acta Botanica Brasílica** v. 26, 264-274, 2012.
- AUKEMA, J. E.; DEL RIO, C. M. Where does a fruit-eating bird deposit mistletoe seeds? Seed deposition patterns and an experiment. **Ecology**, v. 83, p. 3489-3496, 2002.
- BRESSAM, E. A. **Variabilidade genética e estimativa da taxa de cruzamento do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) empregando marcadores moleculares**. 208f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2011.
- CAIRES, C.S., DETTKE, G.A. Loranthaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000152>), 2010.
- CAIRES, C. S. **Estudos Taxanômicos aprofundados de *Oryctanthus* (GRISEB.) EICHLER, *Oryctina* TIECH. E *Pusillanthus* KUIJT (LORANTHACEAE)**. 332f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2012.
- CAIRES, C.S.; UCHÔA-FERNANDES, M. A.; NICÁCIO, J.; STRIKIS, P. C. Frugivoria de larvas de *Neosilba* McAlpine (Diptera, Lonchaeidae) sobre *Psittacanthus plagiophyllus* Eichler (Santalales, Loranthaceae) no sudoeste de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev bras Entomol**, v. 53, p. 272–277, 2009.
- CALVIN, C. L.; WILSON, C. A. Comparative morphology of epicortical roots in Old and New World Loranthaceae with reference to root types, origin, patterns of longitudinal extension and potential for clonal growth. **Flora**, v. 201, p. 345-353, 2006.

- CAZETTA, E.; GALETTI, M. Ecologia das ervas-de-passarinho. **Ciência Hoje**, São Paulo, v.3, n. 94, p.72 - 74, 2003.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792-1797, 2004.
- FERREIRA, F. A. **Patologia Florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, MG: Sociedade de Investigações Florestais, 570p, 1986.
- GLATZEL, G.; GEILS, B. W. Mistletoe ecophysiology: host-parasite interactions. **NRC Research Press Botany**, v. 87, p. 10–15, 2009.
- GOMES DE ANDRADE, M. J. **Números cromossômicos de Loranthaceae e Viscaceae ocorrentes no nordeste brasileiro**. 80f. Tese (Mestrado em Biologia Vegetal) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2002.
- HARIRI, E. B.; JEUNE, B.; BAUDINO, S. Elaboration d'un coefficient de resistance au guichez le chene. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 1239-1246, 1992.
- LEAL, L; BUJOKAS, W.M; BIONDI, D. Análise da infestação de erva-de-passarinho na arborização de ruas de Curitiba, PR. **Floresta**, v. 36, n. 3, 2006.
- KUIJT, J. A brief taxonomic history of neotropical mistletoe genera, with a key to the genera. **Blumea**, v. 58, p. 263-266, 2013.
- KUIJT, J. Pulling the skeleton out of the closet: resurrection of *Phthirusa sensu* Martius and consequent revival of *Passovia* (Loranthaceae). **Plant Diversity and Evolution**, v. 129, p.159–211, 2011.
- KUIJT, J. Reinstatement and expansion of the genus *Peristethium* (Loranthaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 98: p. 542-577, 2012.
- MOOG, R. J.; BOND, J. M. A cheap, reliable and rapid method of extracting high quality DNA from plants. **Molecular Ecology Notes**, Dordrecht, v. 3, n. 4, p. 666-668, 2003.
- MOURÃO, F. A.; CARMO, F. F.; RATTON, P.; JACOBI, C. M. Hospedeiras de *Struthanthus flexicaulis* (Loranthaceae) em campos rupestres ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais. **Lundiana**, Minas Gerais, v. 7, p. 103-109, 2006.

MURILHO, F. H. Principales Loranthaceas que afectan las plantaciones de naranja en Costa Rica. **Revista de Agricultura Tropical**, v. 35, p. 27-38, 2005.

MOURÃO, F.A.; JACOBI, C.M.; FIGUEIRA, J. E. C.; BATISTA, E. K. L. Effects of the parasitism of *Struthanthus flexicaulis* (Mart.) Mart. (Loranthaceae) on the fitness of *Mimosa calodendron* Mart. (Fabaceae), an endemic shrub from rupestrian fields over ironstone outcrops, Minas Gerais State, Brazil. **Acta botanica brasílica**, v. 23, p. 820–825, 2009.

NICKRENT, D. L. **Parasitic plants of the world**. In Lopez-Saez JA, P Catalan, L Saez, eds. Parasitic Plants of the Iberian Peninsula and Balearic Islands. Mundi-Prensa Libros, S.A., Madrid, p 7-27, 2002

OVERTON, J. M. Dispersal in mistletoes and models. **Ecography**, v. 25, p. 139-144, 1993.

RIZZINI, C., T., **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, Santa Catarina, 1968.

ROTTA, E. **Autotrofia em *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.) Theigh. (erva-de-passarinho) – um registro**. Comunicado Técnico 115, Embrapa Florestas, Colombo – PR, 2004.

ROXBURGH, L.; NICOLSON, S.W. Patterns of host use in two African mistletoes: the importance of mistletoe-host compatibility and avian disperser behaviour. **Functional Ecology**, v. 19, p. 865-873, 2005.

SULEVIS, C.; BIONDI, D. Análise morfológica de espécies da arborização de ruas de Curitiba-PR e a infestação por erva-de-passarinho. **REVSBAU**, Piracicaba, São Paulo, v. 9, n. 2, p 1-17, 2014.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

VASCONCELOS, G. C. L. **As famílias Loranthaceae Juss. E Viscaceae Batsch no estado da Paraíba**. 66f. Tese (Trabalho de conclusão de curso em ciências biológicas), Universidade Estadual da Paraíba, 2011.

VIEIRA, O. A. C. ; SANTOS, M. H.; SILVA, G. A.; SIQUEIRA, A. M. Atividade antimicrobiana de *Struthanthus vulgaris* (erva-de-passarinho). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, p. 149-154, 2005.

WHITE, T.J. et al. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. Eds. INNIS, M.A.; GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J.,. Academic Press,1990.

WHITE, B. L. A.; RIBEIRO, A. S.; WHITE, L. A. S.; JUNIOR NASCIMENTO, J. E. Análise da ocorrência de erva-de-passarinho na arborização da Universidade Federal de Sergipe, Campus São Cristóvão. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2011.

WILSON, C. A.; CALVIN, C. L. Character divergences and convergences in canopy-dwelling Loranthaceae. **Botanical Journal of Linnean Society**, v. 150, p. 101-113, 2005.

4. PRIMEIRO RELATO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Phoradendron* PARASITANDO POMARES DE *Annona squamosa* L.

RESUMO

As plantas hemiparasitas constituem um importante grupo vegetal, pois podem modificar a estrutura e dinâmica da comunidade onde estão presentes, reduzindo a biomassa e alterando a alocação de recursos das espécies hospedeiras. Esses vegetais recebem o nome vulgar de ervas-de-passarinho e parasitam uma ampla variedade de hospedeiros. Objetivou-se nesse trabalho relatar o parasitismo de espécies de erva-de-passarinho, mediante identificação morfológica e molecular, infestando pinha (*Annona squamosa*) no estado de Alagoas. Foram coletadas duas espécies de hemiparasitas em pomares de *Annona squamosa* L. no Município de Palmeiras dos Índios, Alagoas. A identificação das espécies foi confirmada com base na morfologia e análise de sequências de DNA do segmento das regiões ITS 1 e 4 do rDNA. O segmento de rDNA foi amplificado por PCR e então sequenciado comercialmente. As sequências obtidas foram comparadas com sequências de espécies de Viscaceae disponíveis no GenBank através de análise BLASTn. Com as análises morfológicas, foi possível identificar as duas amostras como pertencentes ao gênero *Phoradendron*, espécie *Phoradendron mucronatum* (D.C.) Krug. & Urb. e *Phoradendron quadrangulare* (Kunth) Griseb. Até o momento, não se tem relato dessas espécies parasitando a cultura da pinha, além de não existir disponível nenhum dado sobre sequências de nucleotídeos para essas espécies de plantas parasitas. O depósito dos dados obtidos nesse experimento no banco de dados GenBank é importante para auxiliar estudos futuros.

Palavras-chave: Viscaceae. Hemiparasita. ITS.

ABSTRACT

The mistletoes is an important vegetable plants group, they may modify the structure and dynamics of the community where they are present, thus reducing biomass and changing the allocation of resources of the host species. These vegetables are given the common name mistletoes herbs and a wide variety of hosts. This work aimed to report the parasitic species of mistletoes by morphological and molecular identification, infesting sugar apple (*Annona squamosa*) in the state of Alagoas. two species of mistletoes were collected in *Annona squamosa* L. groves in Palmeiras municipality of Indians, Alagoas. Species identification was confirmed based on morphology and analysis of DNA sequences of the ITS regions of segment 1 and 4 rDNA. The segment rDNA was amplified by PCR and then sequenced commercially. The obtained sequences were compared with sequences Viscaceae species available in GenBank using BLASTn analysis. With the morphological analysis, it was possible to identify the two samples as belonging to the genus *Phoradendron*, species *Phoradendron mucronatum* (D.C.) Krug. & Urb. And *Phoradendron quadrangulare* (Kunth) Griseb. So far, there is no account of these species parasitizing the culture of the cone, and there is no data available on nucleotide sequences for these species of parasitic plants. The deposit of the data obtained in this experiment in the GenBank database is important to help future studies.

Keywords: Viscaceae. Mistletoe. ITS.

4.1 INTRODUÇÃO

A família Viscaceae é composta por sete gêneros, todos hemiparasitas de ramos. O gênero *Phoradendron* é o mais numeroso, com 234 espécies distribuídas em todo território americano, ocorrendo desde os Estados Unidos ao sudeste da América do Sul, e predominando em áreas tropicais. No Brasil, existem cerca de 62 espécies que se distribuem por todo território nacional e estando presente em quase todos os ecossistemas (KUIJT, 2003; REIF, 2004; SOUZA; LORENZI, 2005)

De acordo com Rigon e Cervi (2013), poucas plantas parasitas causam doenças importantes em florestas ou áreas cultivadas. *Phoradendron* está entre os gêneros mais comuns e mais prejudiciais, podendo parasitar espécies economicamente importantes incluindo frutíferas e espécies utilizadas na indústria madeireira (REIF; ANDREATA, 2006; SAUERBORN et al., 2007).

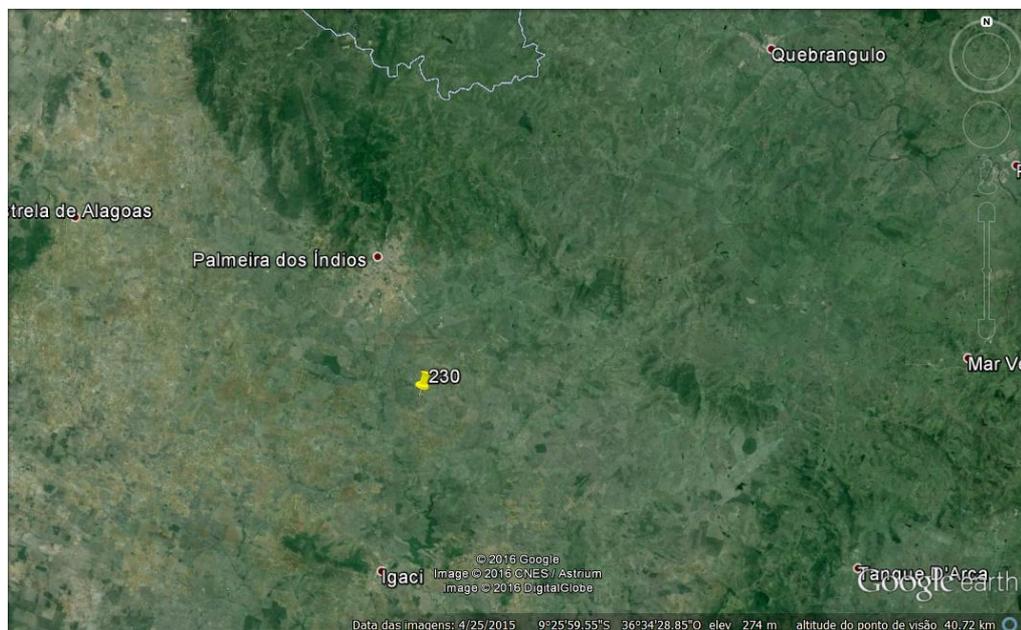
Existe uma vasta literatura sobre as hemiparasitas, porém estudos abordando estas plantas no Brasil são escassos (REIF, 2004). Apesar de constarem em herbários e inventários florísticos, coletas botânicas são pouco frequentes, além de serem sub-representadas devido à dificuldade de visualização, coleta, herborização e identificação (BARBOSA, 2000). O gênero *Phoradendron* apresenta grande plasticidade fenotípica e poucos caracteres diagnósticos fixos aplicáveis na diferenciação das espécies, (ASHWORTH, 2000; KUIJT, 2003). Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi identificar as espécies de hemiparasitas presentes em pomares de pinha no estado de Alagoas, através das características morfológicas e moleculares.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Coleta do material vegetal e identificação das espécies

As amostras de Viscaceae (erva-de-passarinho) utilizadas para realização deste trabalho foram coletas em áreas pomares de *Annona squamosa* L. (pinha) no estado de Alagoas, município de Palmeira dos Índios, nas coordenadas 9°27'49.59"S e 36°36'58.32"W, para o ponto 230 (Figura 4). Foi realizada identificação visual e coleta das espécies hemiparasitas, juntamente com os seus respectivos hospedeiros, para posterior identificação botânica. O material foi coletado com auxílio de tesoura de poda e podão, sendo retirados no mínimo três ramos (fértil e não fértil) de cada hemiparasita. O material vegetal foi etiquetado e georeferenciado utilizando GPS (Garmin eTrex 20) (Figura 6). O processo de identificação teve início no campo, no entanto, por se contar de espécies pouco estudadas e ainda desconhecidas, as amostras tiveram que ser enviados para o Herbário MAC, do Instituto do Meio Ambiente (IMA) do estado de Alagoas e a Universidade Estadual da do Sudoeste da Bahia (UESB), para confirmação da identificação botânica pelo Dr. Claudenir Simões Caires, especialista em famílias de hemiparasitas.

Figura 4 - Mapa com localização dos pontos de coletas das espécies estudadas, a 6,43 km da sede do Município de Palmeira dos Índios.



Fonte: Google Earth.

As exsiccatas permanentes foram confeccionadas através da limpeza do material botânico, retirando estruturas danificadas e excesso de folhas e ramos secundários, além da

catalogação, prensagem em prensa de madeira, secagem e fixação em cartolina. Para posterior identificação molecular, foi realizado armazenamento de cinco folhas de cada espécie de erva-de-passarinho, em tubos tipo *falcon* de 50mL com etanol 96% e incubado em freezer a -20°C (BRESSAN, 2011).

4.2.2 Extração e qualidade do DNA genômico

Extração do DNA total foi realizada de acordo com Moog e Bond (2003). Foi utilizado cerca de 50mg do material foliar, macerado em 600 µL de tampão de extração e PVP (polivinilpirrolidona), em cadinhos de porcelanas. O tampão de extração foi composto por 100mM de Tris pH 8,0; 50mM de EDTA 0,5M pH 8,0; 500mM de NaCl 5M; 0,7% de SDS 7%; 50µg/mL de Proteinase K (10mg/mL) e 50µg/mL de RNase (10mg/mL). Após maceração, o material foi colocado em tubos de 1,5mL e incubado em estufa a uma temperatura de 37°C por cerca de 12 horas. Em seguida, os tubos foram retirados da estufa, foi adicionado 320µL de NaCl 5M e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm. Para precipitação do DNA adicionou-se 800µL de isopropanol ao sobrenadante e mantidos -20°C por 3 horas, seguido de centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C. O pellet foi lavado com 500µL de etanol 70% e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, sendo esse procedimento foi realizado por duas vezes. Utilizando 500µL de etanol 100%, efetuou-se a última lavagem. O pellet formado foi ressuscitado em 200µL de TE (1mM de Tris e 0,1mM EDTA) e armazenados em freezer -20°C. Alíquotas desses produtos da extração foram corados com *Sybr green* e após eletroforese de 3V*cm⁻¹ por cerca de duas horas em gel de agarose 0,8%, foram visualizados por transluminação em luz ultravioleta.

4.2.3 Amplificação e sequenciamento do DNA

Aproximadamente 25ng de DNA foram usados na reação de PCR (*polimerase chain reaction*), além dos pares de iniciadores ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') de acordo com White et al. (1990). As reações de PCR foram realizadas com tampão 10X de *Taq* com KCl [100 mM Tris-HCl (pH 8,8); 500 mM KCl; 08% Nonidet P40], 100 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada iniciador (ITS1 e ITS4), 1 U de *Taq polymerase* e 2µL de DNA diluído (1:20). O volume final das reações foi ajustado para 25µL com água Milli-Q autoclavada.

A reação de PCR foi realizada em termociclador Axygen Maxygene, com o seguinte ciclo termal: 95°C por 2min., seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s., anelamento a 52,5°C por 30s e alongamento a 72°C por 30s, com uma etapa final de extensão

a 72°C por 4min. Parte dos produtos da PCR (5µL) foram corados com *Sybr green* e após eletroforese de 3V*cm⁻¹ por aproximadamente duas horas em gel de agarose 1,5%, foram visualizados por transluminação em luz ultravioleta (Figura 9). O restante do produto do PCR (20µL) foi enviado para sequenciamento na Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul).

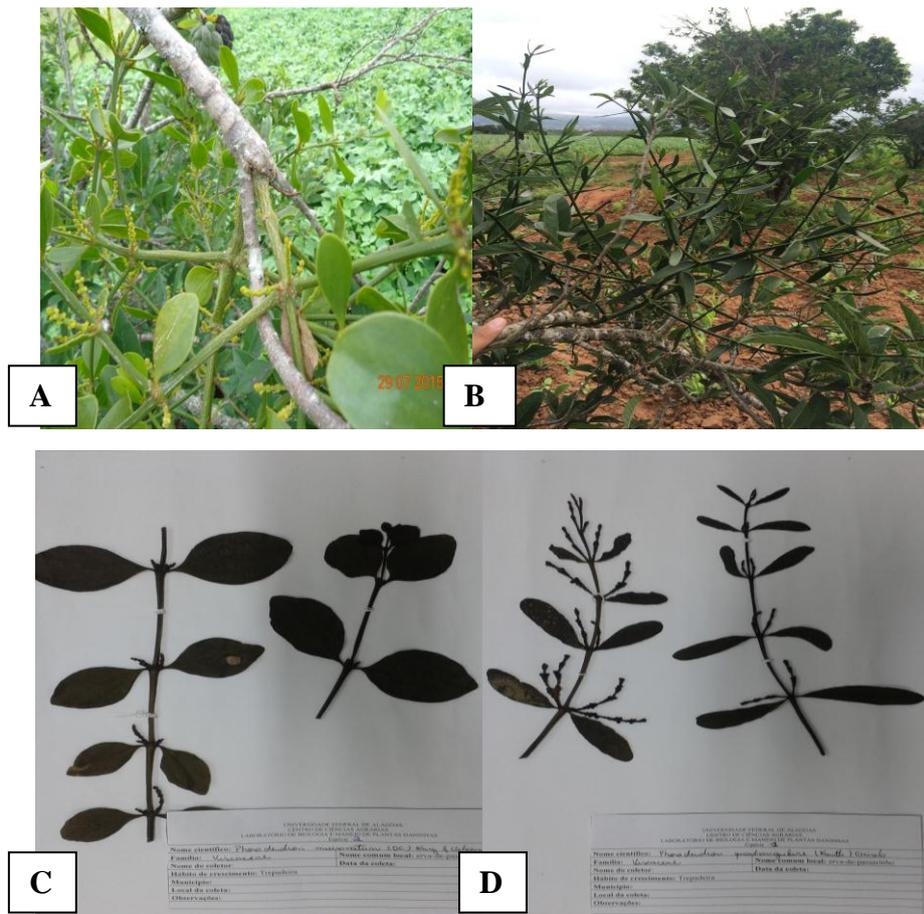
4.2.4 Análises de sequências

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software *CodonCode Aligner* (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA). O arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso. As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLAST n (ALTSCHUL et al., 1990) e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies de Viscaceae com as quais elas compartilham maior identidade de sequência.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontradas duas espécies pertencentes ao gênero *Phoradendron*, parasitando pomares na região de Palmeira dos Índios (Alagoas); *Phoradendron mucronatum* (D.C.) Krug. & Urb. e *Phoradendron quadrangulare* (Kunth) Griseb. (Figura 5). Análise BLASTn mostrou que as espécies *P. mucronatum* e *P.* apresentaram porcentagem de identidade de nucleotídeos 96%, com espécie *Phoradendron tamaulipense* presente no GenBank (número de acesso AF178730). São conhecidas cerca de 230 espécies dentro desse gênero, o qual é predominantemente neotropical, mas podem ser encontrados exemplares desde os Estados Unidos até a Argentina e o Uruguai, tendo o Equador como o país com o maior número de espécies (KUIJT, 2003).

Figura 5 - Gênero *Phoradendron* parasitando *Annona squamosa* L., em Palmeira dos Índios, Alagoas. *Phoradendron mucronatum* (D.C.) Krug. & Urb. (A) e *Phoradendron quadrangulare* (B), com suas respectivas exsicatas (C, D).



Fonte: Autor, 2016.

O gênero *Phoradendron* apresenta plantas hemiparasitas herbáceas, eretas, 1-2-3 pares de catafilos no ramo principal ou em todos os entrenós, caule quadrangular quando jovem. Com folhas carnosas ou crassas, pecíoladas, nervação eucamptódroma a acródroma. Inflorescências em espigas 1-2 por axila, articuladas. Suas flores em sulcos ao longo da espiga. Frutos bagas elipsóides a ovóides, perianto persistente, aberto ou fechado, liso ou rugoso, mesocarpo viscoso (KUIJT, 2007). A principal característica que separa as espécies do gênero *Phoradendron* é a flor, para a *P. mucronatum* estão presentes três flor por bráctea, já a espécie *P. quadrangulare* seis por bráctea (VASCONCELOS, 2010).

Em território brasileiro, o gênero *Phoradendron* é constituído por uma grande diversidade de espécies (cerca de 60 espécies), presentes em todas as regiões e parasitando diversos hospedeiros, desde árvores até arbustos, pois são classificadas como generalistas (parasitam vários hospedeiros) (CAIRES; DETTKE, 2010; ARRUDA et al., 2012). Tais dados podem explicar o fator dessas espécies estarem presente em pomares de pinha. Estudos anteriores relataram o gênero *Phoradendron* parasitando inúmeros vegetais (KUIJT, 2003; RIGON; CERVI, 2013; RIZZINI, 1968), porém este o primeiro relato das espécies *P. mucronatum* e *P. quadrangulare* parasitando *Annona squamosa* L. no Brasil.

4.4 CONCLUSÕES

- Foi identificado duas espécies de Viscaceae, a *Phoradendron mucronatum* (D.C.) Krug. & Urb. e *Phoradendron quadrangulare* (Kunth) Griseb.;
- A *Annona squamosa* L. (pinha) foi identificada como hospedeiro em comum para ambas as espécies parasitas;
- Este é o primeiro registro oficial da infestação por tais parasitas para a cultura da pinha no Brasil;

REFERÊNCIAS

ARRUDA, R.; FADINI, R.F.; CARVALHO, L.N.; DEL-CLARO, K.; MOURÃO, F.A.; JACOBI, C.M.; TEODORO, G.S.; VAN DEN BERG, E.; CAIRES, C.S. & DETTKE, G.A. Ecology of Neotropical mistletoes: an important canopy-dwelling component of Brazilian ecosystems. **Acta Botanica Brasilica** v. 26, 264-274, 2012.

ASHWORTH, V.E.T. M. Phylogenetic Relationship in Phoradendrea (Viscaceae) Inferred from Three Regions of Nuclear Ribosomal Cistron. I. Major Lineages and Paraphyly of *Phoradendron*. **Systematic Botany**, v. 25, p. 349-370, 2000.

BARBOSA, M.A. **Loranthaceae and Viscaceae no bioma cerrado**. 115p. Tese (Mestrado em Botânica), Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2000.

BRESSAM, E. A. **Variabilidade genética e estimativa da taxa de cruzamento do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) empregando marcadores moleculares**. 208f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2011.

CAIRES, C.S., DETTKE, G.A. Loranthaceae. *In: Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000152>), 2010.

CAIRES, C. S. **Estudos Taxanômicos aprofundados de *Oryctanthus* (GRISEB.) EICHLER, *Oryctina* TIECH. E *Pusillanthus* KUIJT (LORANTHACEAE)**. 332f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2012.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792-1797, 2004.

KUIJT, J. Monograph of *Phoradendron*. **Systematic Botany Monographs**, v. 66, p. 1-643, 2003.

KUIJT, J. Eremolepidaceae, Loranthaceae & Viscaceae. *In: JANSEN-JACOBS, M. J. (Ed.)*. Flora of the Guianas. **Richmond**, Royal Botanic Gardens, p. 1-149, 2007.

MOOG, R. J.; BOND, J. M. A cheap, reliable and rapid method of extracting high quality DNA from plants. **Molecular Ecology Notes**, Dordrecht, v. 3, n. 4, p. 666-668, 2003.

REIF, C. **Contribuição à taxonomia das famílias Eremopidaceae, Loranthaceae e Viscaceae no Estado do Rio de Janeiro.** Tese (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Rio de Janeiro. 112p, 2004.

REIF, C.; ANDREATA, R. H. P. **Sinopse de “Ervas-de-passarinho” do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.** Pesquisa, Botânica. Instituto Anchieta de Pesquisas, São Leopoldo, v. 52, p. 255-274, 2006.

RIGON, J.; CERVI, A. C. **O gênero *Phoradendron* Nutt. (Viscaceae) no estado do Paraná, Brasil.** Pesquisa, Botânica. Instituto Anchieta de Pesquisas, São Leopoldo, v. 64, p. 15-38, 2013.

RIZZINI, C., T., **Flora Ilustrada Catarinense.** Itajaí, Santa Catarina, 1968.

SAUERBORN, J.; MÜLLER-STÖVER, D.; HERSHENHORN, J. The role of biological control in managing parasitic weeds. **Crop Protection**, v. 26, p. 246-254, 2007.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, Botânica Sistemática, 640p, 2005.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

WHITE, T.J. et al. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. Eds. INNIS, M.A.; GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J.,. Academic Press, 1990.

5. ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES HEMIPARASITAS DE RAMOS PRESENTES NO ESTADO DE ALAGOAS

RESUMO

As famílias Loranthaceae e Viscaceae compreendem plantas hemiparasitas que realizam fotossíntese, mas retiram das plantas parasitadas água e sais minerais. Mesmo sabendo dos grandes danos causados por esses parasitas, pouco se sabe a respeito das espécies que compõem esse grupo de plantas, principalmente, em relação a características moleculares e morfofisiológicas das populações existentes. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi realizar estudo filogenético de espécies de erva-de-passarinho presentes no Estado de Alagoas. Foram realizadas coletas nos municípios de Murici e Palmeira dos Índios, no estado de Alagoas, em áreas de pomares e mata com relatos de infestação por hemiparasitas. O material vegetal foi etiquetado, herborizado e georeferenciado. Também foram feitas três exsiccatas permanentes para cada amostra e encaminhadas a Universidade Federal de Alagoas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Herbário MAC, do Instituto do Meio Ambiente, para análises morfológicas. Para análise molecular, foram coletadas cinco folhas de cada amostra e acondicionadas em tubos tipo *falcon* de 50mL contendo etanol 96%. Foi realizada a extração de DNA total de cada uma das amostras e parte desse DNA foi usado em reações de PCR com os iniciadores ITS 1 e 4. Os amplicons foram enviados para sequenciamento na Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul). As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLAST n e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank para determinar as espécies hemiparasitas com as quais elas compartilham maior identidade de sequência. Foram preparados alinhamentos múltiplos para os conjuntos de dados de sequências nucleotídicas da região ITS, e inferidas árvores filogenéticas por análise bayesiana. Foram encontrados quatro gêneros de erva-de-passarinho, *Passovia*, *Struthanthus*, *Phoradendron* e *Psittacanthus*, pertencentes a duas famílias botânicas (Loranthaceae e Viscaceae), totalizando oito espécies parasitando diversos hospedeiros. Análise da região ITS mostrou que as espécies de Loranthaceae tiveram maior variabilidade interespecífica, já as espécies de Viscaceae apresentaram menor variação interespecífica.

Palavras-chave: Loranthaceae. Viscaceae. ITS. Hemiparasitas.

ABSTRACT

The family Loranthaceae and Viscaceae mistletoes comprise plants that perform photosynthesis, but derive from plants infested water and mineral salts. Even though the extensive damage caused by these parasites, little is known about the species that make up this group of plants, especially in relation to molecular characteristics and morphophysiological of existing populations. In this context, the aim of this study was to perform phylogenetic study of species of mistletoes present in the state of Alagoas. Collections were held in cities and Murici and Palmeira dos Indios, in the state of Alagoas, in areas of orchards and woods with infestation reports by mistletoes. The plant material was labeled, herbarium and georeferenced. They were also made three permanent herbarium specimens for each sample and sent the Federal University of Alagoas State University of Southwest Bahia and Herbarium MAC, the Instituted of Environment, for morphological analysis. For molecular analysis were collected five leaves from each sample and placed in 50 ml falcon type tubes containing 96% ethanol. extracting total DNA from each sample and part of the DNA was performed was used in PCR reactions with the primers ITS 1 and 4. The amplicons were sent in for sequencing Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). The obtained sequences were initially analyzed with BLAST n algorithm and the nucleotide database, non-redundant GenBank to determine the mistletoes species with which they share greater sequence identity. Multiple alignments were prepared for the data sets of nucleotide sequences of the ITS region and phylogenetic trees inferred by Bayesian analysis. They were found four wort-finch genres, *Passovia*, *Struthanthus*, *Phoradendron* and *Psittacanthus* belonging to two botanical families (Loranthaceae and Viscaceae), totaling eight species parasitizing different hosts. Analysis of the ITS region showed that the species had higher Loranthaceae interspecific variability, since the species Viscaceae showed less variation interspecific.

Keywords: Loranthaceae. Viscaceae. ITS. Mistletoes.

5.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, na classificação das Angiospermas (APGIII 2009), as plantas parasitas estão distribuídas em 12 ordens, representadas por aproximadamente 4.350 espécies. A ordem Santalales apresenta grande destaque, pois cerca de metade das espécies de plantas parasitas estão incluídas nessa ordem, sendo distribuídas em 18 famílias e 160 gêneros. As famílias Misodendraceae, Loranthaceae, Santalaceae, Amphorogynaceae e Viscaceae pertencentes a ordem Santalales, são as cinco famílias compostas predominantemente por ervas hemiparasitas e holoparasitas de ramos de angiospermas ou gimnospermas (NICKRENT et al. 2010).

As famílias Loranthaceae e Viscaceae são formadas por arbustos eretos ou escandentes, clorofilados, hemiparasitas de ramos, possuem raízes modificadas em órgãos especiais que recebem o nome de haustórios a partir do qual retiram água e sais minerais dos seus hospedeiros, em geral, não requerem um hospedeiro específico, crescendo tanto em plantas cultivadas quanto em selvagens. No Brasil, são vulgarmente conhecidas por diversos nomes, como: enxerto, esterco-de-jurema, visgo, enxerto-de-passarinho e ervas-de-passarinho (ARRUDA et al., 2012).

Algumas hemiparasitas são generalistas, podendo parasitar uma ampla variedade de hospedeiros, enquanto outras apresentam uma limitação na quantidade de hospedeiros que parasitam, sendo algumas poucas espécies conhecidas por parasitarem apenas uma única espécie de planta e são chamadas também de especialistas (CAZETTA; GALETTI, 2003).

Cuidados constantes devem ser tomados com a infestação por erva-de-passarinho, pois, se em desequilíbrio, compromete todo um programa de arborização e manejo de culturas (ROTTA, 2001). Pode se destacar entre os principais efeitos sobre os hospedeiros, a redução do vigor e da produção de frutos e sementes, mau funcionamento dos tecidos lenhosos, produção de galhas, folhagem esparsa, morte do ápice, predisposição ao ataque de insetos e doenças e, até mesmo, morte prematura (HARRIS, 1992; SULEVIS; BIONDI, 2014).

Um instrumento eficiente para a identificação da variabilidade genética entre indivíduos de uma mesma população ou entre indivíduos de populações diferentes é o sequenciamento de regiões gênicas variáveis. Entre essas regiões, destaca-se o sequenciamento das regiões genômicas denominadas ITS ("Internal Transcribed Spacers"), e que fazem parte do gene que codifica as subunidades 18S, 5,8S e 28S do RNA ribossômico.

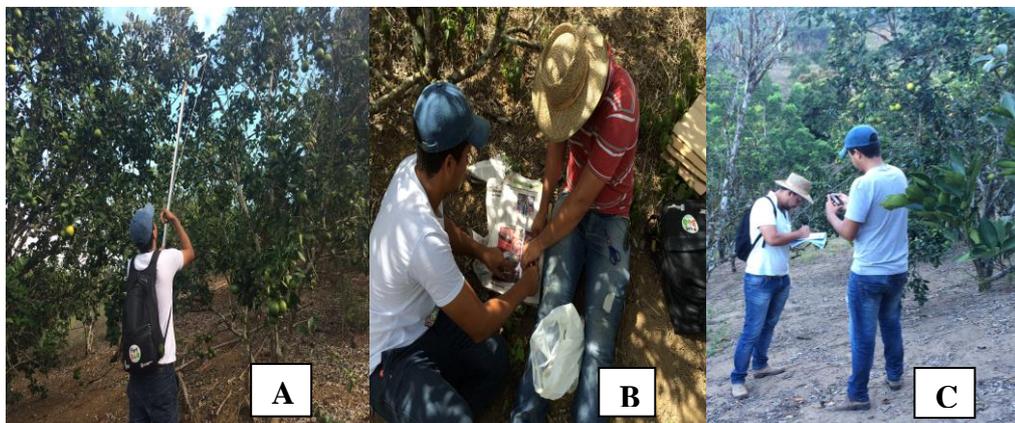
Devido à sua alta taxa de substituição nucleotídica, esses espaçadores têm sido empregados como ferramentas para estudar tanto a diversidade genética como para desenvolver estudos filogenéticos entre plantas (SCHMICKL et al., 2010). Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho realizar uma análise filogenética das espécies de erva-de-passarinho presentes no em duas regiões do estado de Alagoas.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Coleta do material vegetal e identificação das espécies

As amostras de Loranthaceae e Viscaceae (erva-de-passarinho) utilizadas para realização deste trabalho foram coletas em áreas de mata ciliar, pomares de *Citrus sinensis* (laranja lima) e de *Annona squamosa* L. (pinha) no estado de Alagoas. Foi realizada identificação visual e coleta das espécies hemiparasitas, juntamente com os seus respectivos hospedeiros, para posterior identificação botânica. O material foi coletado com auxílio de tesoura de poda e podão, sendo retirados no mínimo três ramos (fértil e não fértil) de cada hemiparásita. O material vegetal foi etiquetado e georeferenciado utilizando GPS (Garmin eTrex 20) (Figura 6). O processo de identificação teve início no campo, no entanto, por se tratar de espécies pouco estudadas e ainda desconhecidas, as amostras tiveram que ser enviados para o Herbário MAC, do Instituto do Meio Ambiente (IMA) do estado de Alagoas e a Universidade Estadual da do Sudoeste da Bahia (UESB), para confirmação da identificação botânica pelo Dr. Claudenir Simões Caires, especialista em famílias de hemiparasitas.

Figura 6 - Coleta do material vegetal com auxílio do podão (A); identificação do material (B) e georeferenciado utilizando GPS (Global Positioning System) (C).



Fonte: Autor, 2016.

As exsiccatas permanentes foram confeccionadas através da limpeza do material botânico, retirando estruturas danificadas e excesso de folhas e ramos secundários, além da catalogação, prensagem em prensa de madeira, secagem e fixação em cartolina. Para posterior identificação molecular, foi realizado armazenamento de cinco folhas de cada espécie de erva-de-passarinho, em tubos tipo *falcon* de 50mL com etanol 96% e incubado em freezer a -20°C (BRESSAN, 2011) (Figura 7).

Figura 7 - Fixação e prensagem do material coletado (A, B); montagem da exsicata (C). Exsicata de erva-de-passarinho *P. pyrifolia* (D) e armazenamento do material coletado em tubos tipo falcon de 50mL com etanol 96% (E, F).

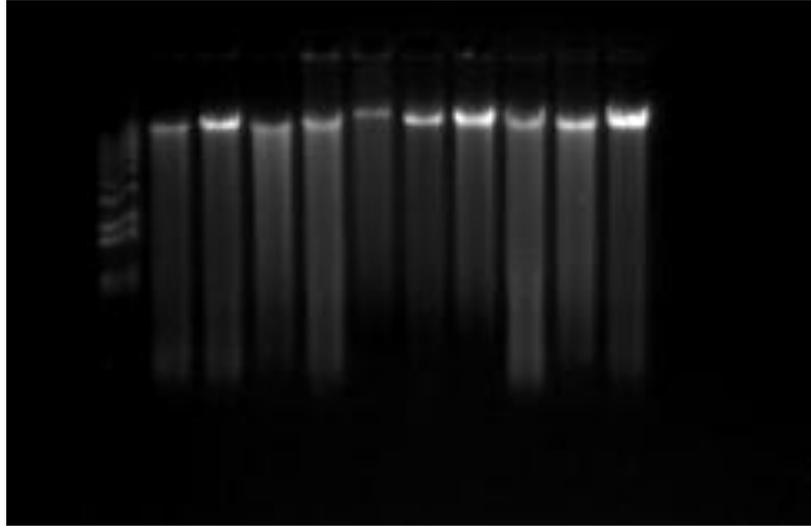


Fonte: Autor, 2016.

5.2.2 Extração e qualidade do DNA genômico

Extração do DNA total foi realizada de acordo com Moog e Bond (2003). Foi utilizado cerca de 50mg do material foliar, macerado em 600 μL de tampão de extração e PVP (polivinilpirrolidona), em cadinhos de porcelanas. O tampão de extração foi composto por 100mM de Tris pH 8,0; 50mM de EDTA 0,5M pH 8,0; 500mM de NaCl 5M; 0,7% de SDS 7%; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Proteinase K (10mg/mL) e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase (10mg/mL). Após maceração, o material foi colocado em tubos de 1,5mL e incubado em estufa a uma temperatura de 37°C por cerca de 12 horas. Em seguida, os tubos foram retirados da estufa, foi adicionado 320 μL de NaCl 5M e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm. Para precipitação do DNA adicionou-se 800 μL de isopropanol ao sobrenadante e mantidos -20°C por 3 horas, seguido de centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C. O pellet foi lavado com 500 μL de etanol 70% e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, sendo esse procedimento foi realizado por duas vezes. Utilizando 500 μL de etanol 100%, efetuou-se a última lavagem. O pellet formado foi ressuspensionado em 200 μL de TE (1mM de Tris e 0,1mM EDTA) e armazenados em freezer -20°C. Alíquotas desses produtos da extração foram corados com *Sybr green* e após eletroforese de 3V*cm⁻¹ por cerca de duas horas em gel de agarose 0,8%, foram visualizados por transluminação em luz ultravioleta (Figura 8).

Figura 8 - DNA genômico das oito espécies coletadas submetido a duas horas de eletroforese $3V*cm^{-1}$ em gel de agarose 0,8%.



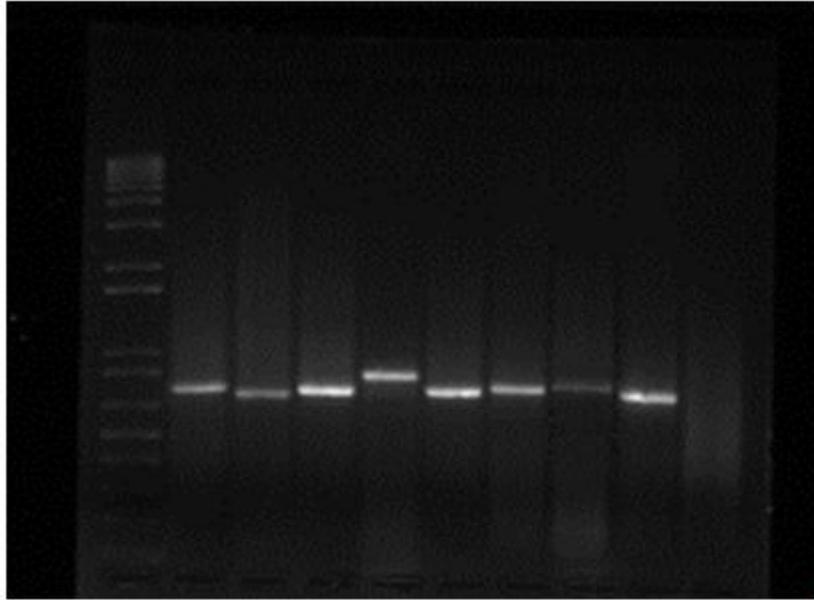
Fonte: Autor, 2016.

5.2.3 Amplificação e sequenciamento do DNA

Aproximadamente 25ng de DNA foram usados na reação de PCR (*polimerase chain reaction*), além dos pares de iniciadores ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') de acordo com White et al. (1990). As reações de PCR foram realizadas com tampão 10X de *Taq* com KCl [100 mM Tris-HCl (ph 8,8); 500 mM KCl; 08% Nonidet P40], 100 μ M de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 μ M de cada iniciador (ITS1 e ITS4), 1 U de *Taq polymerase* e 2 μ L de DNA diluído (1:20). O volume final das reações foi ajustado para 25 μ L com água Milli-Q autoclavada.

A reação de PCR foi realizada em termociclador Axygen Maxygene, com o seguinte ciclo termal: 95°C por 2min., seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s., anelamento a 52,5°C por 30s e alongamento a 72°C por 30s, com uma etapa final de extensão a 72°C por 4min. Parte dos produtos da PCR (5 μ L) foram corados com *Sybr green* e após eletroforese de $3V*cm^{-1}$ por aproximadamente duas horas em gel de agarose 1,5%, foram visualizados por transluminação em luz ultravioleta (Figura 9). O restante do produto do PCR (20 μ L) foi enviado para sequenciamento na Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul).

Figura 9 - Produto de PCR visualizado após duas horas de eletroforese $3V \cdot cm^{-1}$ em gel de agrose 1,5%. Utilizou-se a combinação de iniciadores ITS 1 e 4 para as espécies de hemiparasitas das famílias Loranthaceae e Viscaceae.



Fonte: Autor, 2016.

5.2.4 Análises Filogenéticas

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software *CodonCode Aligner* (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA). O arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso. Foram preparados alinhamentos múltiplo para os conjuntos de dados Loranthaceae e Viscaceae utilizando o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004), disponível no pacote computacional MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA et al., 2011). As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) e no banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies hemiparasitas com as quais elas compartilham maior identidade de sequência (Tabela 1).

Tabela 1 - Espécies utilizadas para reconstrução filogenética obtidas a partir do GenBank.

ESPÉCIES	ACESSO
<i>Tripodanthus acutifolius</i>	HM010410
<i>Tripodanthus acutifolius</i>	HM010411
<i>Struthanthus orbicularis</i>	DQ333856
<i>Phthirusa pyrifolia</i>	DQ333857
<i>Psittacanthus schiedeanus</i>	DQ333859
<i>Cladocolea mcvaughii</i>	DQ333860
<i>Oryctanthus occidentalis</i>	DQ333862
<i>Phoradendron tamaulipense</i>	AF178730
<i>Phoradendron trinervium</i>	AF178731
<i>Phoradendron carneum</i>	AF178732
<i>Phoradendron heydeanum</i>	AF178729
<i>Phoradendron cf. tonduzii</i>	AF178736
<i>Phoradendron robustissimum</i>	AF178733
<i>Dendrophthora squamigera</i>	AF178745
<i>Dendrophthora clavata</i>	AF178742
<i>Dendrophthora domingensis</i>	AF178741
<i>Dendrophthora opuntioides</i>	AF178740
<i>Dendromyza reinwardtiana</i>	DQ333870

Fonte: GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

A inferência Bayesiana, para o região ITS foi realizada no *web portal* CIPRES (MILLER et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al., 2012). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado para cada conjunto de dados usando MrModeltest 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004) de acordo com o *Akaike Information Criterion* (AIC). O modelo evolutivo GTR+I foi utilizado para o conjunto de dado da região ITS. Análises foram rodadas para cada conjunto de dados por 10 milhões de gerações usando quatro cadeias e amostrando a cada 1.000 gerações, para um total de 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas como uma fase de *burn-in*. Probabilidades posteriores (RANNALA; YANG, 1996) foram determinadas a partir de uma árvore consenso *majority-rule* gerada com as 7.500 árvores remanescentes. As árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas nos programas FigTree v. 1.4 (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) e Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>). A espécie *Dendromyza reinwardtiana* foi selecionado como grupo externo para os dois conjuntos de dados analisados (Loranthaceae e Viscaceae).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as características morfológicas das amostras foram identificados quatro gêneros de hemiparasitas, *Passovia*, *Struthanthus*, *Phoradendron* e *Psittacanthus*, pertencentes a duas famílias botânicas (Loranthaceae e Viscaceae), totalizando oito espécies diferentes (Tabela 2).

Tabela 2 - Espécies identificadas a partir das amostras coletas e seus respectivos hospedeiros, nos municípios de Murici e Palmeiras dos Índios, Alagoas.

ESPÉCIE	FAMÍLIA	LOCAL DE COLETA	HOSPEDEIRO
<i>Passovia pyrifolia</i> (Kunth) Tiegh.	Loranthaceae	Murici - AL	<i>Syzygium jambolanum</i> (Lam.) DC <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> <i>Citrus sinensis</i>
<i>Struthanthus marginatus</i> (Desr.) G.	Loranthaceae	Murici - AL	<i>Citrus sinensis</i> <i>Myrcia</i> sp.
<i>Psittacanthus dichroos</i> Mart.	Loranthaceae	Murici - AL	<i>Eschweilera ovata</i>
<i>Phoradendron pteroneuron</i> Eichler	Viscaceae	Murici - AL	<i>Byrsonima crassifolia</i>
<i>Struthanthus syringifolius</i> Mart.	Loranthaceae	Palmeira dos Índios - AL	<i>Annona squamosa</i> L. <i>Azadirachta indica</i>
<i>Phoradendron mucronatum</i> (D.C.) Krug. & Urb.	Viscaceae	Palmeira dos Índios - AL	<i>Annona squamosa</i> L.
<i>Phoradendron quadrangulare</i> (Kunth) Griseb.	Viscaceae	Palmeira dos Índios - AL	<i>Annona squamosa</i> L.
<i>Struthanthus podopterus</i> (Cham. & Schltdl.) G. Don.	Loranthaceae	Palmeira dos Índios - AL	<i>Annona squamosa</i> L.

Fonte: Autor, 2016.

Ao avaliar espécies da família Loranthaceae, Dzerefos et al., (2003) sugere que representantes desta família sejam generalistas, utilizando com sucesso uma grande variedade de espécies hospedeiras graças a suas raízes altamente especializadas do tipo haustório. Este padrão foi confirmado em Loranthaceae brasileiras (MOURÃO et al., 2006; ARRUDA et al., 2006).

Estudos realizados na Austrália (DOWNEY 1998, 2004) relatam 90 espécies, pertencentes as famílias Loranthaceae e Viscaceae, parasitando cerca de 880 hospedeiros diferentes, demonstrando assim a ampla gama de hospedeiros que podem ser parasitados por esses hemiparasitas. Um fato importante para o estabelecimento das plantas parasitas nos diversos ecossistemas é o sucesso da dispersão de suas sementes pela fauna local (AUKEMA, 2003; MEDEL et al., 2004). Onde a presença de dispersores pode ser um fator limitante para o sucesso da infestação por plantas parasitas (CAZZETA; GALLETI, 2007). Os locais de coleta avaliados aqui, por se tratarem na sua maioria de pomares de frutíferas e apresentarem uma grande quantidade de alimentos, fator que pode predominar no aparecimento de pássaros no local, pode ter facilitado a infestação por erva-de-passarinho, devido ao aparecimento de pássaros no local.

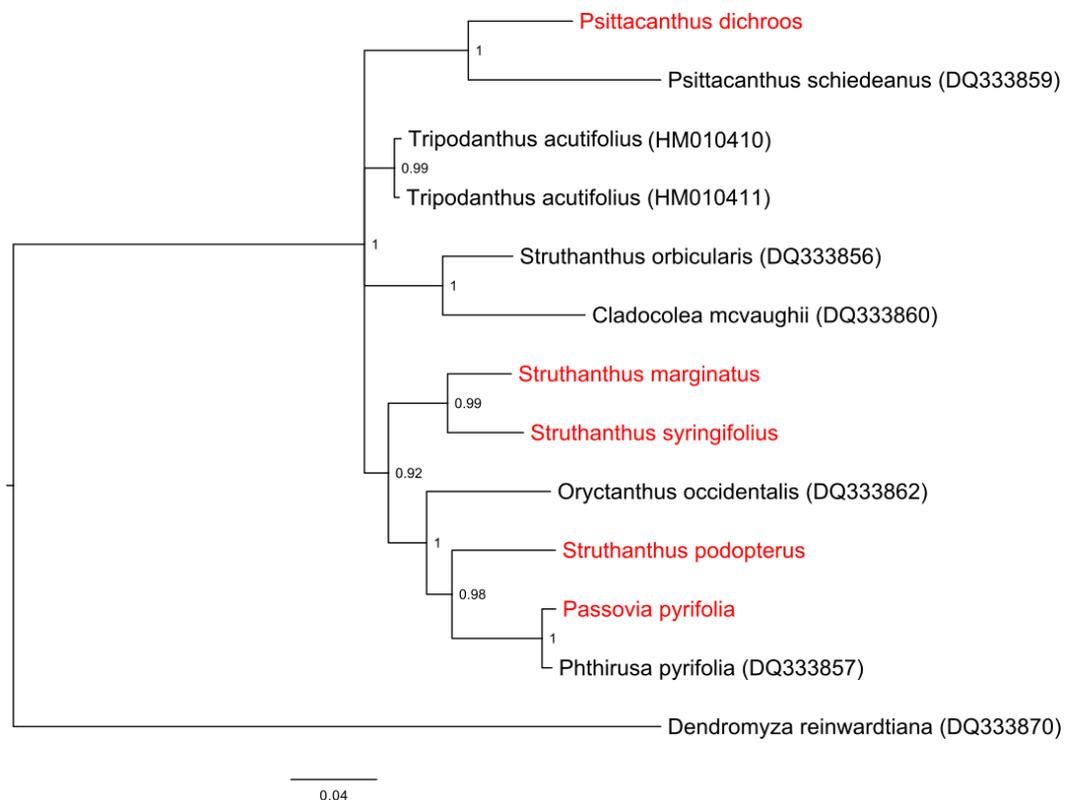
No Brasil, diversos estudos relatam a infestação de hemiparasitas em árvores de áreas urbanas (WHITE et al., 2011; MATOS et al., 2010; RUSCHEL; LEITE, 2002). Já com relação a árvores nativas, destacam-se os estudos de Arruda et al. (2004, 2006, 2012).

Análise BLASTn mostrou que a *S. podopterus*, *S. marginatus* e *S. syringifolius* apresentaram porcentagem de identidade de nucleotídeos de 88 e 89%, com a espécie *Struthanthus orbiculares* presente no GenBank (número de acesso DQ333856), respectivamente. A *P. pyrifolia* apresentou identidade de nucleotídeos de 99% com a *Phthirusa pyrifolia* (número de acesso DQ333857). A *P. dichroos* apresentou identidade de nucleotídeos de 84% com a *Psittacanthus schiedeanus* (número de acesso DQ333859). Em relação às espécies do gênero *Phoradendron*, a *P. mucronatum* e *P. quadrangulare* apresentaram identidade de nucleotídeos de 89% com a espécie *Phoradendron tamaulipense* (número de acesso AF178730), já a *P. pteroneuron* apresentou identidade de nucleotídeos de 89% com a *Dendrophthora domingensis* (número de acesso AF178741).

As cinco espécies pertencente à família Loranthaceae [*Passovia pyrifolia* (Kunth) Tiegh., *Struthanthus marginatus* (Desr.) G., *Psittacanthus dichroos* Mart., *Struthanthus*

syringifolius Mart. e *Struthanthus podopterus* (Cham. & Schltl.) G. Don.] agruparam com outras espécies da mesma família presentes no banco de dados do GenBank, sendo observado que apenas a espécie *Passovia pyrifolia* tem sua sequência de nucleotídeos armazenada no banco de dados. Em relação às espécies *Struthanthus podopterus*, *Struthanthus marginatus* e *Struthanthus syringifolius*, foi observado que as mesmas ficaram muito distantes da espécie *Struthanthus orbicularis*, única do gênero presente no GenBank (Figura 10).

Figura 10. Árvore filogenética de Inferência Bayseana com espécies da família Loranthaceae usando sequências nucleotídicas da região ITS. A árvore mostra as relações filogenéticas das espécies coletadas (em vermelho) com as espécies de Loranthaceae encontrada no banco de dados do GenBank, utilizando a espécie *Dendromyza reinwardtiana* foi utilizada como grupo externo.

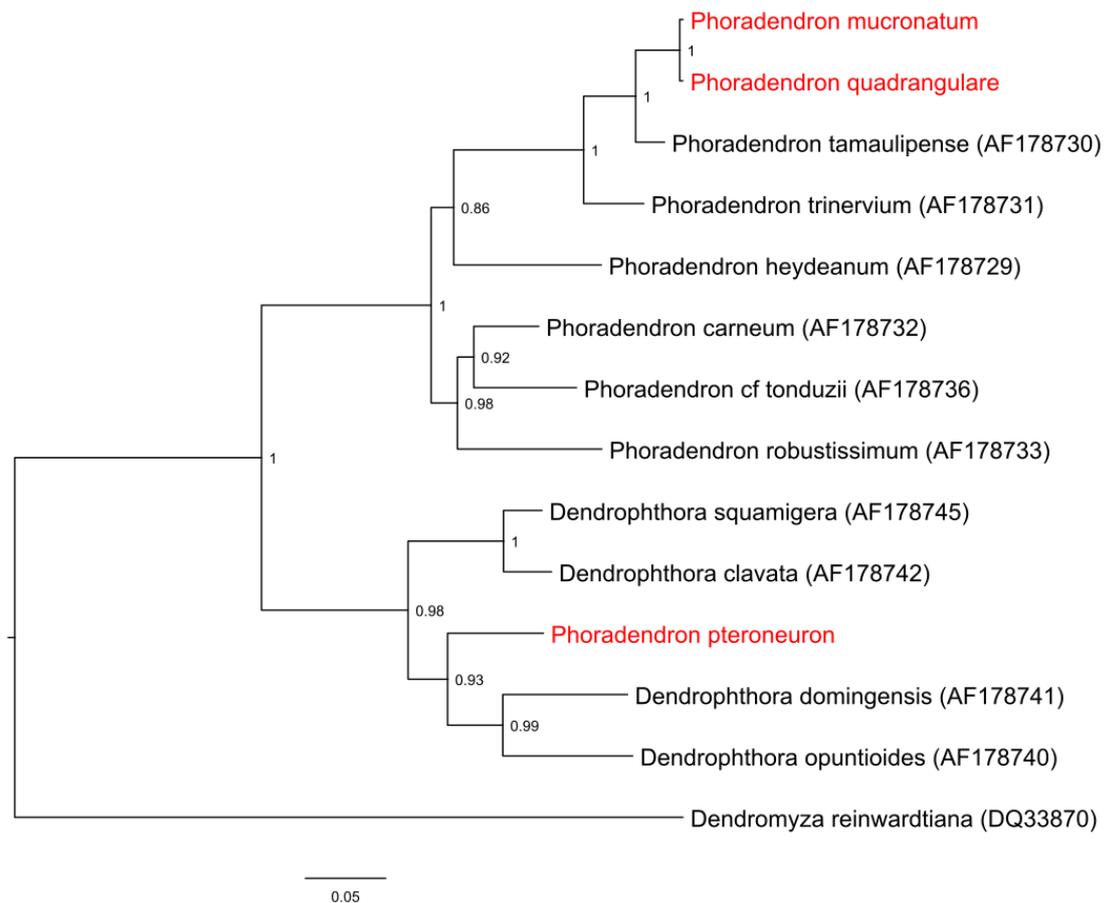


Fonte: Autor, 2016.

Os resultados obtidos neste estudo são, em geral, congruentes com análises moleculares recentemente publicadas (AMICO; NICKRENT, 2009; AMICO et al., 2007a, 2007b, 2012), porém não há suporte para as relações de alguns gêneros com outros clados. Portanto, mais investigações são necessárias a fim de esclarecer o relacionamento filogenético dentro da família Loranthaceae.

Em relação à família Viscaceae, as três espécies [*Phoradendron pteroneuron* Eichler, *Phoradendron mucronatum* (D.C.) Krug. & Urb. e *Phoradendron quadrangulare* (Kunth) Griseb], embora pertençam a um dos gêneros mais estudados em relação aos demais, nenhuma das espécies identificadas tinham dados depositados no GenBank. A espécie *Phoradendron pteroneuron* agrupou com espécies do gênero *Dendrophthora* (Figura 11). Tais dados comprovam pesquisas anteriores (NICKRENT et al. 2010; VIDAL-RUSSELL; NICKRENT, 2008, WILSON; CALVIN, 2006), que relatam que estes gêneros são muito próximos.

Figura 11. Árvore filogenética de Inferência Bayseana com espécies da família Viscaceae usando sequências nucleotídicas da região ITS. A árvore mostra as relações filogenéticas das espécies coletadas (em vermelho) com as espécies de Loranthaceae encontrada no banco de dados do GenBank, utilizando a espécie *Dendromyza reinwardtiana* foi utilizada como grupo externo.



Fonte: Autor, 2016.

Os dados moleculares indicaram que a região ITS sozinha pode não ser suficiente para determinar a filogenia exata dentro dos gêneros (*Phoradendron* e *Struthanthus*), fazendo-se necessário uso de outras regiões, como a cloroplastidial (*trnL*) em estudos futuros. Para Yuan

e Olmstead (2008) a combinação das regiões plastidiais (trnL) e regiões nucleares (ITS) são de eventual importância para se obter dendrogramas que mostrem a verdadeira história evolutiva a níveis infragenéricos.

5.4 CONCLUSÕES

- As plantas parasitas apresentaram grande diversidade de espécies;
- Foi identificado duas famílias (Loranthaceae e Viscaceae), representadas por gêneros distintos (*Passovia*, *Struthanthus*, *Phoradendron* e *Psittacanthus*);
- Foram identificadas as espécies *Passovia pyrifolia*, *Struthanthus marginatus*, *Psittacanthus dichroos*, *Phoradendron pteroneuron*, *Struthanthus syringifolius*, *Phoradendron mucronatum*, *Phoradendron quadrangulare* e *Struthanthus podopterus*;
- Os hospedeiros identificados foram *Syzygium jambolanum*, *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Eschweilera ovata*, *Byrsonima crassifolia*, *Azadirachta indica*, *Annona squamosa* e *Citrus sinensis*;
- Apenas a espécie *P. pyrifolia* tem sua sequência de nucleotídeos depositada no banco de dados GenBank;

REFERÊNCIAS

- AMICO, G. C., E D. L. NICKRENT. Population structure and phylogeography of the mistletoe *Tristerix corymbosus* and *T. aphyllus* (Loranthaceae) using chloroplast DNA sequence variation. **American Journal of Botany**, v. 96: 1571-1580, 2009.
- AMICO, G. C., R. VIDAL-RUSSELL, E D.L. NICKRENT. A molecular phylogeny of the mistletoe genus *Tripodanthus* (Loranthaceae). **Darwiniana**, v. 45: 61-63, 2007a.
- AMICO, G. C., R. VITAL-RUSSELL, E D. L. NICKRENT. Phylogenetic relationships and ecological speciation in the mistletoe *Tristerix* (Loranthaceae): the influence of pollinators, dispersers, and hosts. **American Journal of Botany**, v. 94: 558-567, 2007b.
- AMICO, G. C., R. VIDAL-RUSSELL, M.A. GARCIA, E D.L. NICKRENT. Evolutionary history of the South American mistletoe *Tripodanthus* (Loranthaceae) using nuclear and plastid markers. **Systematic Botany**, v. 37: 1-8, 2012.
- ARRUDA, R. S. **Especificidade de hospedeiros por *Struthanthus* aff. *Polyanthus* (Loranthaceae) em uma área de cerrado, Uberlândia, Minas Gerais**. 34 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2004.
- ARRUDA, R.; CARVALHO, L. N.; DEL-CLARO, K. Host specificity of a Brazilian mistletoe, *Struthanthus* aff. *Polyanthus* (Loranthaceae), in cerrado tropical savanna. **Flora**, v. 201, p. 127-134, 2006.
- ARRUDA, R.; FADINI, R.F.; CARVALHO, L.N.; DEL-CLARO, K.; MOURÃO, F.A.; JACOBI, C.M.; TEODORO, G.S.; VAN DEN BERG, E.; CAIRES, C.S. & DETTKE, G.A. Ecology of Neotropical mistletoes: an important canopy-dwelling component of Brazilian ecosystems. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, p. 264-274, 2012.
- BRESSAM, E. A. **Variabilidade genética e estimativa da taxa de cruzamento do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) empregando marcadores moleculares**. 208f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2011.

- CAZETTA, E.; GALETTI, M. **Ecologia das ervas-de-passarinho**. *Ciência Hoje*, São Paulo, v.3, n. 94, p.72 - 74, 2003.
- CAZZETA, E.; GALETTI, M. Frugivoria e especificidade por hospedeiros na erva-de-passarinho *Phoradendron rubum* (L.) Griseb. (Viscaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, p. 345-351, 2007.
- DOWNEY, P. O. An inventory of host species for each aerial mistletoe species (Loranthaceae and Viscaceae) in Australia. **Cunninghamia**, v. 5, p. 685-720, 1998.
- DOWNEY, P. O. A regional examination of the mistletoe host species inventory. **Cunninghamia**, v. 8, p. 354-361, 2004.
- DZEREFOS, C. M.; WITKOWSKI, E. T. F.; SHACKLETON, C. M. Host-preference and density of woodrose-forming mistletoes (Loranthaceae) on savanna vegetation, South Africa. **Plant Ecology**, v. 167, p. 163-177, 2003.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792-1797, 2004.
- HARRIS, R. W. *Arboriculture: integrated management of landscape trees, shrubs and vines*. New Jersey: **Prentice-Hall**, 674p, 1992.
- MATOS, E. C DO A.; NASCIMENTO JÚNIOR, J. E.; MARIANO, D. L. DA S; MARIANO, OLIVEIRA. A. L. DE; *Arborização do Bairro Centro da Cidade de Aracaju, Sergipe, e seus Organismos Associados*. **REVSBAU**, Piracicaba , São Paulo, v.5, p.22-39, 2010.
- MILLER, M. A. et al. The CIPRES Portals. **Cipres**. 2010. Website http://www.phylo.org/sub_sections/portal [acesso em 10 outubro de 2015].
- MOURÃO, F. A.; CARMO, F. F.; RATTON, P.; JACOBI, C. M. **Hospedeiras de *Struthanthus flexicaulis* (Loranthaceae) em campos rupestres ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais**. *Lundiana, Minas Gerais*, v. 7, p. 103-109, 2006.
- MOOG, R. J.; BOND, J. M. A cheap, reliable and rapid method of extracting high quality DNA from plants. **Molecular Ecology Notes**, Dordrecht, v. 3, n. 4, p. 666-668, 2003.

NICKRENT, D. L.; MALÉCOT, V.; VIDAL-RUSSELL, R.; DER, J. P. A revised classification of Santalales. **Taxon**, v. 59, p. 538–558, 2010.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. **Systematic Biology**, v. 53, p. 793–808, 2004.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**, v. 43, p. 304–311, 1996.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. **Systematic Biology Advance Access**, v. 61, p. 539–42, 2012.

ROTTA, E. **Erva-de-passarinho (Loranthaceae) na arborização urbana: Passeio Público de Curitiba, um estudo de caso**. 135f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

RUSCHEL, D.; LEITE, S. L. C. **Arborização urbana em uma área da cidade de Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil**. Caderno de Pesquisa Série Biologia, Santa Cruz do Sul, v. 14, p. 7–24, 2002.

SCHMICKL, R.; JORGENSEN, M.H.; BRYSTING, A.K.; KOCH, M.A. The evolutionary history of the *Arabidopsis lyrata* complex: a hybrid in the amphi-Beringian área closes a large distribution gap and builds up a genetic barrier. **BMC Evolutionary Biology**, v.10, p.2–18, 2010.

SUELEVIS, C.; BIONDI, D. Análise morfológica de espécies da arborização de ruas de Curitiba-pr e a infestação por erva-de-passarinho. **REVSBAU**, Piracicaba, São Paulo, v. 9, p 1–17, 2014.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725–2729, 2013.

VIDAL-RUSSELL, R.; NICKRENT, D. C. L. The first mistletoes: Origins of aerial parasitism in Santalales. **Molec. Phylogen. Evol.**, v. 47, p. 523–527, 2008.

WESTWOOD, J.H. et al. The evolution of parasitism in plants. **Trends in Plant Science**, v.15, n.4, p.227-235, 2010.

WHITE, B. L. A.; RIBEIRO, A. DE S.; WHITE, L. A. S.; NASCIMENTO JÚNIOR, J. E. DO; Análise da Ocorrência de Erva-De-Passarinho na Arborização da Universidade Federal de Sergipe, Campus São Cristóvão. **FLORESTA**, Curitiba, PR, v. 41, n. 1, p. 1-8, jan./mar. 2011.

WHITE, T.J. et al. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. Eds. INNIS, M.A.; GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J.,. Academic Press,1990.

WILSON C. A.; CALVIN C. L. An origin of aerial branch parasitism in the mistletoe family, Loranthaceae. **American Journal of Botany**, v. 93, p. 787-796, 2006.

YUAN, Y., OLMSTEAD, R.G. Evolution and phylogenetic utility of the *PHOT* gene duplicates in the *Verbena Complex* (VERBENACEAE): Dramatic intron size variation and footprint of ancestral recombination. **American Journal of Botany**, v. 95, n. 9, p. 1166–1176, 2008.