

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Piptadenia gonoacantha* (Mart.)
Macbr. POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD**

Evandro Vagner Tamarussi

Pós-graduando em Genética, ESALQ/USP.

Edson Seizo Mori

Prof. Adjunto do Dep. de Produção Vegetal, FCA/UNESP. esmori@fca.unesp.br

Léo Zimback

Pesquisador do Instituto Florestal-SP. lzimback@terra.com.br

Neide Tomita Mori

Pós-graduanda em Ciência Florestal, FCA/UNESP. nkimie@hotmail.com

Cleber da Silva Pinto

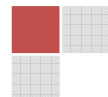
Pós-graduando em Ciência Florestal, FCA/UNESP. cspinto2007@gmail.com

Kairo Henrique Pereira Fernandes

Pós-graduando em Ciência Florestal, FCA/UNESP. khpfernandes@yahoo.com.br

RESUMO

A importância do conhecimento da diversidade genética entre e dentro de populações está em dar suporte à conservação dos recursos genéticos. Os marcadores moleculares foram recentemente incorporados aos programas de melhoramento e conservação genética. No entanto, já são consideradas ferramentas poderosas com diversas aplicações, entre elas, para o monitoramento da variabilidade genética de populações naturais. Este trabalho teve como objetivo estimar a variabilidade genética em nove populações de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.). As populações utilizadas encontram-se em remanescentes de Floresta Atlântica dos municípios de Botucatu e Bofete-SP. A variabilidade genética dessas populações foi estimada por meio de 44 locos RAPD pertencentes a oito primers polimórficos, selecionados de um conjunto de 48 primers testados. As quantidades de heterozigose esperadas foram, 0,3508; 0,3303; 0,2810; 0,2372; 0,3139; 0,2693; 0,2413; 0,2955 e 0,3096 para as



populações 1,2,3,4,5,6,7,8 e 9, respectivamente. A menor distância genética de Roger's ocorreu entre as populações 2 e 5 ($D= 0,2890$) e a maior distância foi entre as populações 7 e 8 ($D= 0,4269$).

Palavras-chave: Pau-jacaré, RAPD, variabilidade genética, primers.

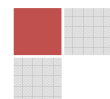
GENETIC STRUCTURE OF *Piptadenia Gonoacantha* (Mart.) Macbr. POPULATIONS THROUGH MOLECULAR MARKERS RAPD

ABSTRACT

The importance of the genetic diversity knowledge populations, is to present support for conservation of genetic resources. The molecular markers were recently well used in to the tree improvement and the germplasm conservation programs. However, they already are considered as a powerful tools with several applications, like as, the monitoring of genetic diversity in natural populations. This research had as objective to estimate the genetic diversity of nine *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) populations. The populations were in Atlantic Forest fragments of Botucatu and Bofete cities, SP, Brazil. The genetic diversities of populations were estimated 44 RAPD loci by of eight polymorphic primers RAPD, out of 48 primers. The expected heterozigosityes were, , 0,3508; 0,3303; 0,2810; 0,2372; 0,3139; 0,2693; 0,2413; 0,2955 and 0,3096 respectively for populations 1,2,3,4,5,6,7,8 and 9. The shortest Roger's genetic distance occurred between the populations 2 and 5 ($D = 0,2890$) and the largest distance was between the populations 7 e 8 ($D = 0,4269$).

Key-words: pau-jacaré, RAPD, genetic diversity, primers.

INTRODUÇÃO



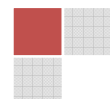
O pau-jacaré *Piptadenia gonoacantha* (MART.) MACBR é uma planta nativa que ocorre principalmente na floresta pluvial da encosta atlântica, pertence à família Leguminosae-Mimosoidae e é também conhecido como jacaré, angico-branco, monjoleiro, monjolo, icarapé ou casco de jacaré. Distribui-se pelos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, até Santa Catarina. No Estado de São Paulo ocorre em regiões com altitudes entre 500 e 700 m, vegetando em solos desde férteis a pobres. Cresce de 10 até 20 metros de altura quando bem desenvolvido e apresenta tronco de 30 a 40 cm de madeira moderadamente pesada, com densidade aproximada de 0,75 g/cm³ (LORENZI, 1992).

O pau-jacaré apresenta inúmeras utilidades, como por exemplo, para celulose e papel, acabamentos internos, armação de móveis, miolos de portas, painéis, confecção de brinquedos e embalagens, sendo uma das melhores madeiras para fabricação de carvão. Espécie de rápido crescimento é recomendável para reflorestamentos destinados a recomposição de áreas degradadas de preservação permanente. Suas flores são intensamente visitadas por abelhas, característica esta que a faz atrativa para utilização como planta melífera. (LORENZI, 1992; CARVALHO, 1994).

A intensa atividade humana em ecossistemas florestais, seja para o extrativismo, seja para a abertura de novas áreas agriculturáveis ou mesmo na construção civil, vem de forma predatória contribuindo para a perda de muitas espécies vegetais, principalmente arbóreas.

Através de estudos e pesquisas evidenciamos a importância do conhecimento da distribuição espacial do genótipo dentro de populações, sabendo que isto é de fundamental importância à exploração racional, à recuperação e à conservação dos recursos florestais. (SEBBENN et al., 1998; MORAES et al., 1999; KAWAGUICI e KAGEYAMA, 2001).

Para o conhecimento específico de cada organismo dentro de uma população, existem hoje diversas técnicas que utilizam os marcadores moleculares. Segundo Pigato e Lopes (2001) os marcadores moleculares têm auxiliado grandemente o estudo de populações florestais. Essas técnicas apresentam a variabilidade genética ao nível molecular facilitando sua compreensão (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).



A técnica RAPD proposta por Welsh e McClelland (1990) e Willians et al.(1990), baseiam-se na amplificação de segmentos específicos de DNA do genoma através do uso de primers (iniciadores) com seqüência arbitrária, embora a amplificação, tecnicamente, não ocorra ao acaso e sim em sítios específicos do genoma.

O RAPD é um marcador que se baseia na amplificação termocíclica de DNA, apresentado como principais vantagens à rapidez, a simplicidade, o baixo custo e ainda garante uma análise genética mais detalhada para um maior número de marcadores (WILLIANS et al., 1990; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O marcador RAPD tem sido amplamente utilizado para medir a diversidade genética de populações, estudar estratégias de conservação e de melhoramento genético (KEIL e GRIFFIN, 1994; ROSSETTO, 1995; WACHIRA et al., 1995; CHALMERS et al.,1994; HAMRICK, 1983).

Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo estimar a variabilidade genética em nove populações de pau-jacaré em fragmentos de floresta atlântica, por meio de marcadores genéticos RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Genético

Foram utilizadas para estudo nove populações, totalizando 115 árvores (Tabela 1) de *Piptadenia gonoacantha* de fragmentos de floresta atlântica dos Municípios de Botucatu-SP e Bofete-SP.

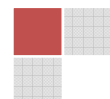
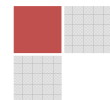


Tabela 1. Locais de coleta e quantidade de indivíduos estudados por população.**Table 1.** Collection places and amount of studied individuals for population.

Fragmentos Florestais Coletados		
Nº correspondente à população	População	Nº de Indivíduos
1	Fazenda São José	22
2	Fazenda Santana	9
3	Fazenda Comura	6
4	Fazenda Lageado/Piscicultura	5
5	Fazenda Padovan	10
6	Fazenda Lageado/Trilha	12
7	Serra Bocaina	5
8	Fazenda Edgardia	13
9	Fazenda Lageado/Campus	33
TOTAL		115

Extração de DNA

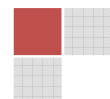
A extração de DNA dos 115 indivíduos estudados foi realizada com base no protocolo de Doyle e Doyle (1987) e modificado por Grattapaglia e Sederoff (1994), o qual foram aplicadas algumas modificações. Caracterizou-se por utilizar detergente catiônico



CTAB (Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide). A extração foi iniciada triturando-se em moinho elétrico 150mg de folhas jovens de indivíduos adultos, adicionando-se até 1200 μ L de tampão 2XCTAB e recolhendo-se o macerado em tubo eppendorf de 2 mL. Em seguida na capela foi adicionado a cada tubo 2 μ L de 2-mercaptanol, e após agitação no vortex, os mesmos foram colocados em banho-maria a 65°C, por 30 minutos, e agitados a cada 10 minutos. Depois de resfriados a temperatura ambiente, na capela foi adicionado 600 μ L de CIA (clorofórmio, álcool-isoamílico 24:1) a cada tubo, em seguida eles foram agitados por inversão, no mínimo 20 vezes. Então foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante (aproximadamente 600 μ L) transferido para um novo tubo de 1.5mL. A seguir, foi adicionado 300 μ L de isopropanol frio (-16°C) e os tubos agitados por inversão; em seguida colocados no freezer por 30 minutos. E após isso, centrifugados a 7500 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o pellet lavado duas vezes com etanol 70% a 10 minutos e uma vez com etanol 95% a 3 minutos, então os pellets foram secos mantendo-se os tubos invertidos sobre papel toalha durante duas horas. Finalmente, os pellets foram ressuspensos no vortex com 80 μ L de tampão 0.1X TE com RNase A 100 μ g/mL (10 μ L de solução 10mg /ml de RNase A) e os tubos colocados em banho-maria a 37°C por 30 minutos).

Quantificação do DNA

Todas as amostras de DNA extraídas foram quantificadas em minigel de agarose a 0.8% (1,6g de agarose em 200mL de tampão TEA 1X). Nas quantificações realizadas, as amostras foram comparadas visualmente as de concentrações 20 e 200 ng/ μ L. Após a quantificação do DNA extraído foi realizado a diluição das amostras com tampão 0,1XTE e tartrazina, até a concentração de 5ng/ μ L, a aferição das comparações das amostras diluídas também foram realizadas através da comparação de minigel de agarose.



Condições da reação

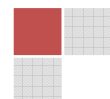
As reações de amplificação realizadas com o uso de iniciadores (primers) de RAPD foram feitas em um volume final de 20,88 μ L, contendo 8,4 μ L de água d-ionizada, 2 μ L de DNA (5ng/ μ L), 1 μ L de primer, 4,3 μ L de solução de dNTP (0,5mM), 0,18 μ L de Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies), 1,8 μ L de tampão (PCR buffer 10X) e 1,4 μ L do reagente MgCl₂. As reações foram realizadas em termociclador Programmable thermal controller - 100(MJ Research Inc.) com ciclos termicos programados de 2 min a 94°C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 35°C e 1,3 min a 72°C, seguidos de 6 min a 72°C.

Eletroforese

Para separação dos produtos de amplificação, vistos PCR, foram utilizados géis de agarose Metaphor (FMC Bioproducts) na concentração de 3% (6 g de agarose em 200 ml de tampão TAE 1X). Os fragmentos de interesse foram localizados no gel através da utilização de DNA ladder de 100 pares de bases (Invitrogen Life Technologies) utilizados nas extremidades do gel. As corridas foram realizadas a temperatura ambiente, a voltagem constante de 80V por 3 horas, a coloração foi realizad por imersão do gel durante 1 hora em solução de brometo de etidíó (75mg/L). Os géis foram fotografados em sistema de foto documentação Biodoc-it (UVP) sobre luz ultravioleta.

Análise dos dados

A avaliação foi realizada com base na presença (1), ausência (2) e falha (0) de fragmentos de DNA obtendo-se uma matriz de dados binários. As distâncias genéticas de Roger's (1972), e a elaboração do dendrograma de distâncias foram obtidas pelo método de UPGMA (Média aritmética não ponderada de agrupamentos pares). O software utilizado foi o TFPGA (Tools for Population Genetic Analyses).



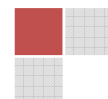
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do DNA extraído de seis indivíduos, selecionados ao acaso, das populações em estudo, foram analisados 48 *primers*, sendo escolhidos para estudo oito *primers* polimórficos (Tabela 2), em função do número e clareza dos locos amplificados, com objetivo de evitar resultados ambíguos. Os *primers* selecionados revelaram 35 locos RAPD polimórficos. Freire et al. (2007) analisando 75 indivíduos de 5 populações de *Shizolobium parahyba* encontraram 32 locos polimórficos utilizando cinco *primers*, esse resultado estão próximos ao encontrado nesse estudo. Zimback *et al.* (2004) analisando a diversidade genética em *Trichilia pallida*, uma Meliaceae clímax, encontraram 72 locos polimórficos. O *primer* que produziu o maior número de locos polimórficos foi o AD11 (6 locos RAPD) e o que gerou o menor número de locos polimórficos foi o AE13 (3 locos RAPD).

Tabela 2. Seqüência dos *primers* Operon selecionados para estudo da *Piptadenia gonoacantha* e o número de locos polimórficos obtidos.

Table 2. Sequence of Operon primers selected to study *Piptadenia gonoacantha* and the number of polymorphic loci.

Primers	Seqüências	Locos RAPD Polimórficos
AD02	5'-CTGAACCGCT-3'	05
AD04	5'-GTAGGCCTCA-3'	04
AD11	5'-CAATCGGGTC-3'	06
AD14	5'-GAACGAGGGT-3'	05
AD16	5'-AACGGGCGTC-3'	04
AE01	5'-TGAGGGCCGT-3'	04
AE12	5'-CCGAGCAATC-3'	04
AE13	5'-TGTGGACTGG-3'	03
TOTAL		35

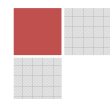


A Tabela 3 apresenta a porcentagem de locos polimórficos e a heterozigosidade esperada (H_e), para cada população. A menor porcentagem de locos polimórficos foi observada na população 7 (61,36%) e a maior porcentagem na população 1 (88,64%). Avaliando a heterozigosidade esperada por população foi constatado que os valores variaram de 0,351, para a população com maior diversidade genética (população 1), a 0,237, para a população com menor diversidade (população 4), com uma média de 0,292.

Tabela 3. Hererozigosidade esperada e % de locos polimórficos para as nove populações de *Piptadenia gonoacantha*.

Table 3. Expected heterozygosity and % of polymorphic loci for nine populations of *Piptadenia gonoacantha*.

Populações	Heterozigosidade esperada	% Locos Polimórficos
1	0,351	88,64
2	0,330	81,82
3	0,281	70,45
4	0,237	63,63
5	0,314	84,09
6	0,269	70,45
7	0,241	61,36
8	0,295	75,00
9	0,309	77,27
Média	0,2921	74,74



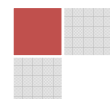
Os valores médios da porcentagem de locos polimórficos ($P=74,74\%$) e heterozigidade esperada ($H_e=0,292$) encontrados em *Piptadenia gonoacantha* foram superiores ao das espécies *Aspidosperma polyneuron* ($P=50\%$; $H_e=0,243$; MALTEZ, 1997), *Genipa americana* ($H_e=0,182$; $P=50\%$; SEBBENN, 1997), e inferior ao das espécies *Euterpe edulis* ($H_e=0,463$; $P=100\%$; REIS, 1996), *Trema micrantha* ($H_e=0,381$; $P=100\%$; RIBAS, 2003) e *Cecropia pachystachia* ($H_e=0,345$; $P=100\%$; RIBAS, 2003), mostrando uma diversidade mediana em relação a diferentes espécies nativas encontradas na literatura.

A tabela 4 mostra a distância genética de Roger's entre as populações estudadas. A menor distância genética ocorreu entre as populações 2 e 5 ($D= 0,2890$) e a maior distância foi entre as populações 7 e 8 ($D= 0,4269$).

Tabela 4. Distância genética de Roger's entre nove populações de *Piptadenia gonoacantha*, com base em marcadores RAPD.

Table 4. Roger's genetic distance between nine populations of *Piptadenia gonoacantha*, by RAPD markers.

Populações	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	*****								
2	0,2963	*****							
3	0,3510	0,3507	*****						
4	0,2973	0,3011	0,3171	*****					
5	0,3260	0,2890	0,3175	0,3081	*****				
6	0,3278	0,3610	0,3599	0,4103	0,3147	*****			
7	0,3856	0,3556	0,3261	0,3923	0,4099	0,4255	*****		
8	0,3403	0,3268	0,3816	0,3700	0,3135	0,3941	0,4269	*****	
9	0,3167	0,3035	0,3443	0,4183	0,3114	0,3707	0,3128	0,3531	*****
Média									0,3543



As populações, de maneira geral, não apresentaram uma distância muito significativa, estando apenas a população 6 mais distante das demais (Figura 1). No entanto, o valor médio encontrado (0,3543, Tabela 4) foi superior ao encontrado por Zimback et al. (2004), onde os autores encontraram valor médio de 0,0800, para distância genética, estudando 3 populações de *Trichilia pallida*, indicando baixa diversidade genética entre as populações. Freire et al. (2007) encontraram valor médio de 0,0658 para 5 populações de *Shizolobium parahyba*, este valor é ainda mais inferior ao encontrado neste estudo. Esses resultados mostram haver boa diversidade genética entre as populações *Piptadenia gonoacantha*.

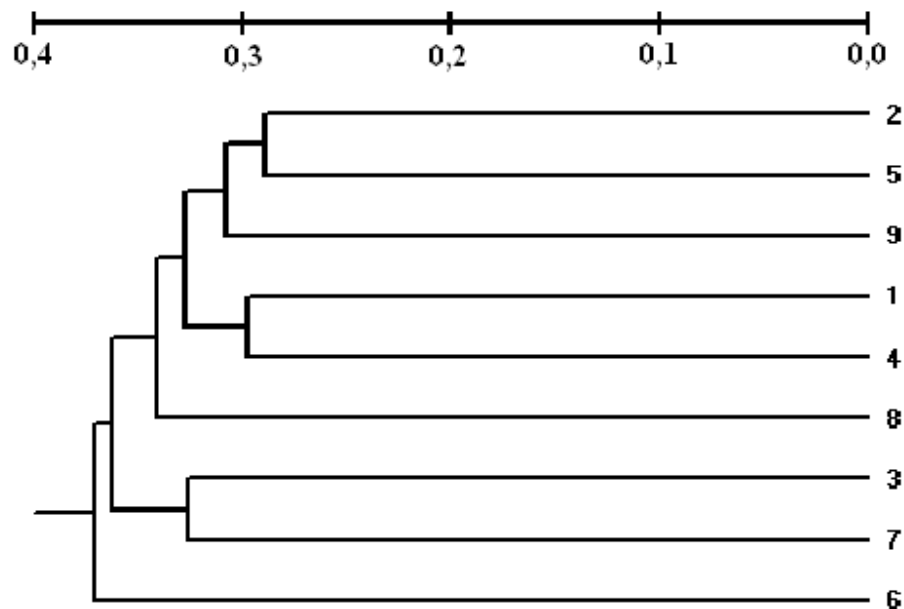
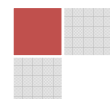


Figura 1. Dendrograma de distância genética de Roger obtido entre nove populações de *Piptadenia gonoacantha*, usando agrupamento UPGMA.

Figure 1. Dendrogram of Roger's genetic distance of *Piptadenia gonoacantha* populations, using UPGMA.

CONCLUSÕES



As nove populações de *Piptadenia gonoacantha* apresentaram um alto nível de polimorfismo e de heterozigosidade esperada, sugerindo que as populações têm potencial para compor programas de conservação genética.

As populações apresentaram distâncias genéticas média de 0,3510, mostrando existir diversidade genética entre populações, apontando possibilidades de se realizar colheitas de diferentes materiais genéticos nas diferentes populações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

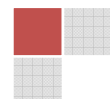
CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da Madeira**, Brasília: EMBRAPA, 1994, p.407.

CHALMERS, K. J.; NEWTON, A. C.; WAUGH, R.; WILSON, J.; W. POWELL. Evaluation of the extent of genetic variation in mahoganies (Meliaceae) using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, n.89, p.504-508, 1994.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v.19, p11-15, 1987.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**, Brasília: EMBRAPACENARGEM, 3.ed, 1998.

FREIRE, J.M.; PIÑA-RODRIGUES F.C.M.; LIMA, E.R.; SODRÉ S.R.C.; CORRÊA R.X. Estrutura genética de populações de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (guapuruvu) por meio de marcadores RAPD . **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.77, p27-35, jun. 2007.



GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v.137, p.1121-37, 1994.

HAMRICK, J. L. **The distribution of genetic variation within and among natural plant population.** In: C.M.SCHONE-WALD-COX, S.H. CHAMBERS, B. MacBYDE & L. THOMAS. *Genetics and Conservation*. Benjamin Cummings Publishing Co., Menlo Park, CA, p.335-348, 1983.

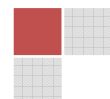
KAWAGUICI, C. B., KAGEYAMA, P. Y. Diversidade genética de três grupos de indivíduos (adultos, jovens e plântulas) de *Calophyllum brasiliense* em uma população de mata de galeria. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n.59, p.131-143, 2001.

KEIL, M.; GRIFFIN, A. R. Use of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. **Theoretical and Applied Genetics**, n.89, p.442-450, 1994.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas e nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992, p.184.

MALTEZ, H.M. **Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. - Apocynaceae (peroba rosa) em uma floresta estacional semidecídua no estado de São Paulo.** 1997. 132p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R.; VENCOVSKY, R. Conservação genética de população de *Cryptocarya moschata* Ness (Lauraceae) na mata atlântica do estado de São Paulo. **Revista brasil bot**, São Paulo, v.22, n.2, p. 237-248, 1999.



PIGATO, S.M.P.C.; LOPES, C.R. Avaliação da variabilidade genética em quatro gerações de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake por meio do marcador molecular RAPD. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.60, p.119- 133, 2001.

REIS, M.S. **Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmiteiro (*Euterpe edulis* M.)**. 1996. 210p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

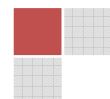
RIBAS, L.A. **Diversidade genética e sistema de cruzamento em populações naturais de duas espécies pioneiras arbóreas**. 2003. 103p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

ROGERS, J.S. 1972. Mesasures of genetic similirity and genetic distance. P-145-154 in “Studies in Genetic VII”. University of Texas Publication no 7213, Austin.

ROSSETTO, M.; WEAVER, P. K.; DIXON, K. W. Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). **Molecular Ecology**, n.4, p.321-329, 1995.

SEBBENN, A.M. **Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) a partir de isoenzimas**. 1997. 107p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. VENCOVSKY, R. Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética especial em *Genipa americana* L. através de marcadores de isoenzimáticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.53, p.15-30, 1998.



WACHIRA, F. N.; WAUGH, R.; HACKETT, C.A.; POWELL, W. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. **Genome**, n.38, p.201-210, 1995.

WELSH, J. ; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res**, n.18, p.7213-7218, 1990.

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

ZIMBACK, L.; MORI, E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; VEIGA, R.F.A.; MELLO JÚNIOR, J.R.S. Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) por marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.65, p.114-119, 2004.

