
CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES NATURAIS DE *Vochysia bifalcata* WARM NO PARQUE NACIONAL DO CAPARAÓ/ES

VIANNA, Larissa Souza¹

Recebido em: 2014.06.29

Aprovado em: 2015.01.23

ISSUE DOI: 10.3738/1982.2278.1159

RESUMO: A Mata Atlântica é uma região de grande importância global, constituída por um conjunto de formações florestais que, atualmente, encontra-se bastante fragmentada. A família Vochysiaceae é uma espécie deste bioma e está incluída na subclasse Rosidae, ordem Myrtales. A espécie *Vochysia bifalcata* Warm., conhecida popularmente como guaricica, possui grande importância ecológica e econômica, sendo muito utilizada em programas de recuperação de áreas degradadas. A espécie apresenta diferenciações genéticas que se devem à fragmentação de habitats, o que levou alguns cientistas a questionarem a fragilidade genética de populações, além de estratégias envolvidas na sua conservação. Com o objetivo de estudar padrões de diversidade genética, foram utilizados marcadores microssatélites para avaliar populações naturais de *V. bifalcata* no Parque Nacional do Caparaó com o intuito de verificar a importância do Parque para fins de conservação da espécie em estudo. Os resultados de amplificação heteróloga de *Vochysia ferruginea* para *V. bifalcata* foram satisfatórios. O valor médio de heterozigosidade observada para a população I foi 0,4341 e para população II foi 0,4331, ambos distintos do esperado para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O índice de fixação médio para as populações foi 0,3326, indicando presença de endogamia. O maior valor de dissimilaridade das duas populações foi 0,832 e o menor valor 0,151. A maior diversidade genética foi encontrada dentro das populações. Os estudos utilizando marcadores moleculares microssatélites têm se mostrado vantajosos ao fornecer subsídios para programas de conservação e manejo. E os resultados geram informações importantes acerca da variabilidade genética existente, comprovando a importância do Parque para fins de conservação da espécie.

Palavras chave: Microssatélites. Variabilidade genética. Conservação.

SUMMARY: The Atlantic Forest is a region of great global importance, consists of a set of forest formations that today is very fragmented. The Vochysiaceae family is a species of this biome and is included in the subclass Rosidae, order Myrtales. The species *Vochysia bifalcata* Warm., Popularly known as guaricica, has great ecological and economic importance, being widely used in reclamation programs. The species has genetic differences that are due to habitat fragmentation, which led some scientists to question the fragility of genetic populations and strategies involved in its conservation. With the aim of studying patterns of genetic diversity, microsatellite markers were used to evaluate natural populations of *V. bifalcata* in Caparaó National Park in order to verify the importance of the park for conservation of this species. The results of heterologous amplification *Vochysia* for *V. ferruginea bifalcata* were satisfactory. The average observed heterozygosity for the population I was 0.4341 and 0.4331 for population II was both different than expected for the Hardy-Weinberg equilibrium. The average rate for fixing populations was 0.3326, indicating the presence of inbreeding. The highest dissimilarity of the two populations was 0.832 and the lowest 0.151. The highest genetic diversity was found within populations. Studies using microsatellite markers have proved advantageous to provide grants for conservation and management programs. And generate important results about the genetic variability information, proving the importance of the park for conservation of the species.

Keywords : Microsatellite. Genetic variability. Conservation.

¹ Instituto Federal do espírito Santo. Nome em citações bibliográficas VIANNA, L.S.

INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica é um bioma de importância global, constituída por um conjunto de formações florestais e outros tipos de vegetação. A situação de isolamento dos fragmentos bem conservados e o processo de degradação são críticos e colocam em risco a sustentabilidade de longo prazo da sua biodiversidade, implicando em graves consequências à capacidade de prover serviços ambientais para a sociedade (CUNHA, et al., 2012).

Distribuída ao longo de todo o domínio da Floresta Atlântica, a família Vochysiaceae abriga várias espécies de importância ecológica e econômica. De acordo com o Angiosperm Phylogeny Group (APG III, 2009), Vochysiaceae está incluída na subclasse Rosidae, ordem Myrtales. Compreende oito gêneros e cerca de 250 espécies, destas mais da metade pertencem ao gênero *Vochysia*, sendo bem distribuído nos ecossistemas de florestas pluviais: Floresta Amazônica, Planalto Central e Floresta Atlântica (VIANNA, 2006).

A espécie alvo deste estudo, *Vochysia bifalcata* Warm., é conhecida popularmente como guaricica ou murici vermelho e possui grande importância econômica e ambiental, sendo muito utilizada para programas de recuperação de áreas degradadas, apresenta crescimento rápido, frutose retilíneo e madeira com características desejáveis (LORENZI, 1998).

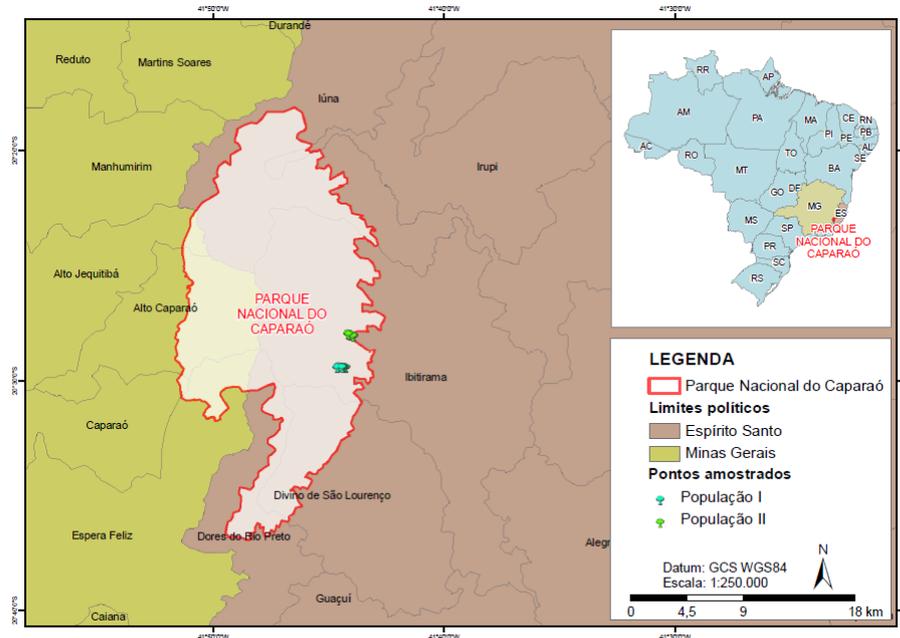
Para este fim, marcadores microssatélites (Single Sequence Repeats - SSR) podem ser utilizados como ferramentas úteis e eficientes. Marcadores microssatélites são baseados na amplificação de fragmentos distribuídos no genoma e podem ser analisados via PCR (Reação de Cadeia Polimerase), entre regiões repetitivas do DNA das quais permitem acessar elevados níveis de polimorfismo genético. Por ser espécie-específico, desenvolver estes marcadores é um processo custoso e lento. Por outro lado a proximidade evolutiva entre duas espécies permite que os pares de iniciadores SSR sejam utilizados com sucesso em espécies pertencentes ao mesmo gênero ou gêneros relacionados (amplificação heteróloga ou cruzada) (COSTA, 2010).

Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade genética de duas populações naturais de *Vochysia bifalcata* no Parque Nacional do Caparaó/ES utilizando marcadores microssatélites e simultaneamente verificar a importância do Parque Nacional do Caparaó/ES para fins de conservação da espécie em estudo.

MATERIAL E MÉTODO

A pesquisa foi realizada no Parque Nacional do Caparaó localiza-se na divisa dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo (Figura 1) entre os paralelos 20°19's e 20°37's e os meridianos 41°43'w e 41°53'w (IBDF, 1981). O Parque encobre os municípios mineiros de Alto Caparaó, Caparaó, Espera Feliz e Alto Jequitibá, além dos municípios capixabas de Divino de São Lourenço, Dolores do Rio Preto, Ibitirama, Iúna e Irupi (IBAMA, 1996).

Figura 1 - Localização do Parque Nacional do Caparaó (a). Localização das populações dentro do Parque.



Ao todo foram coletadas amostras foliares de 28 indivíduos adultos no município de Ibitirama/ES, sendo 15 no Vale do Córrego Santa Marta (População I) e 13 no Vale do Córrego Calçado (População II). Os indivíduos foram identificados por meio do método de busca exaustiva e suas coordenadas geográficas e altitudes foram demarcados utilizando sistema de GPS.

Para a caracterização métrica dos indivíduos, foi utilizada uma fita diamétrica para medir o diâmetro a altura do peito (DAP) e visão a olho nu para estimar a altura aproximada. A escolha destes indivíduos foi baseada na aparência fenotípica, observando os aspectos de vigor e sanidade.

O DNA genômico total foi isolado e purificado usando o método de extração de DNA total de plantas Doyle & Doyle (1990) modificado, após esta etapa, todas as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm. A partir da extração, foi realizada a quantificação de DNA por eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando como padrão de DNA, marcadores de concentração conhecidos para a comparação.

Amostras de DNA de cinco indivíduos de *V. bifalcata* foram utilizadas nas PCRs com dez marcadores microssatélites previamente desenvolvidos para *V. ferruginea* (LOWE et al. 2002).

Os marcadores foram então utilizados para os estudos de diversidade e estruturação genética com todos os indivíduos amostrados, as amplificações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems, modelo Veriti).

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 80 Volts por aproximadamente três horas. Após a corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta e em seguida analisados quanto ao número e tamanho de fragmentos amplificados e à detecção de polimorfismos.

O registro de dados moleculares foi feito a partir das bandas monomórficas e polimórficas detectadas entre os indivíduos nas populações estudadas. Analisando os loci polimórficos, foi gerada uma matriz de valores binários, onde a codificação (1, 2, 3, ..., n) foi de acordo com o número de

alelos para cada loco. Os homozigotos são representados por 11, 22, 33, ..., nn, e os heterozigotos por 12, 13, 23, ... n, sendo o valor 0 destinado a falta de informação (dado perdido) sobre o indivíduo.

Para cada loco foram calculados número, riqueza e frequência de alelos, frequências e distribuições genotípicas, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Também foi estimado o índice de fixação (F), conforme Weir (1996). A estrutura genética populacional e o fluxo gênico entre os indivíduos amostrados foram avaliados segundo estatística F_{ST} clássica de Nei (1973). Os valores de similaridade genética entre indivíduos na população foram estimados através do complemento do índice ponderado a partir dos dados moleculares. Esse estudo foi realizado com o propósito de identificar a estruturação genética da espécie visando conhecer seu potencial para a conservação genética *in situ*.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram avaliados e demarcados 28 indivíduos adultos de *V. bifalcata*, sendo do 1 ao 15 indivíduos da população I e do 16 ao 28 da população II. Todos os indivíduos encontravam-se em estado vegetativo, se localizavam em áreas de Mata Ciliar, no interior da floresta, em solo bem drenado e aparentando-se de forma sadia. A altura média dos indivíduos foi 23,03 m e DAP médio 64,22 cm.

De acordo com Oliveira (2011) a região do entorno do Parque Nacional do Caparaó apresenta grande diversidade ambiental, apresentando condições de calor e umidade com verões brandos e chuvosos, além de possuir grandes variações no seu relevo.

A razão para a conservação das populações remanescentes no Parque é a vasta existência de maciços de grande altitude e, também, a importância ecológica da área que concentra em pequeno espaço variado e distintas formações vegetais. São encontradas amostras importantes dos chamados “campos rupestres” ou “campos de altitude”, sendo a única ocorrência desse ecossistema no Estado (ICMBio, 2010).

A distância geográfica de aproximadamente 2,614 Km e a interropção de um pico de 1.900 metros de altitude entre as duas populações podem influenciar nos parâmetros dendrológicos avaliados, uma vez que, em ambientes heterogênicos as plantas tendem a apresentar uma maior plasticidade fenotípica em resposta às adversidades ambientais (PEREIRA et al., 2004).

Futuyma (1992) afirma que quanto mais distâncias estão as populações mais diferentes elas são em frequências alélicas e nas características fenotípicas de base genética embora não haja frequentemente, uma correlação estrita.

No que se refere à eficiência dos marcadores microssatélites utilizados, dos dez pares de iniciadores de *V. ferruginea*, sete (70%) geraram produtos de amplificação satisfatórios, este resultado pode ser atribuído ao fato de *V. bifalcata* pertencer ao mesmo gênero da espécie para a qual os *primers* foram desenvolvidos. Assim, é de se esperar que ambos os genomas apresentem similaridade de sequência nas regiões flangeadoras de microssatélites, comprovando que a proximidade evolutiva entre táxons está diretamente relacionada ao sucesso da transferibilidade de marcadores SSR (BARBARÁ et al. 2007). Os marcadores microssatélites são considerados ideais para estimar parâmetros genéticos de populações e para a compreensão de padrão de fluxo gênico e parentesco (ZUCCHI, 2002).

O número de alelos por loco variou entre quatro e seis, com média de 4,85 alelos/loco. O menor fragmento detectado apresentava 98 pb e o maior fragmento apresentava 212 pb. Esses resultados foram semelhantes a observado no estudo de Lowe et al. (2002) com *V. ferruginea*, demonstrando alta confiabilidade dos dados obtidos por meio de tais marcadores.

Com relação à distribuição genotípica (Tabela 6), os valores de heterozigosidade observada e esperada dos loci para a população I variaram de 0,0714 a 0,9 e de 0,5179 a 0,7645 respectivamente, com média de 0,4341 para heterozigosidade observada e 0,6696 para heterozigosidade esperada (diversidade gênica de Nei – H). Na população II, a heterozigosidade observada variou de 0,1743 a 0,6667, com média de 0,4331 e H_e variou de 0,56 a 0,7653, com média de 0,6309. Esses resultados demonstram que o percentual de heterozigose observado nas duas populações foi diferente do esperado para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando excesso de homozigotos em detrimento dos heterozigotos, isso pode ser explicado devido à ocorrência de excesso de autofecundação e endogamia populacional (Wright, 1965). Ritter (2012) em estudos com *Q. grandiflora* também encontrou um excesso de homozigotos na população. Os autores sugerem que essa perda de diversidade genética seria mais provável por causa do efeito fundador na origem das populações por posteriores, ou recentes, pontos de estrangulamento.

Os valores do Índice de Fixação (F) para a maior parte dos locos foi positiva, indicando excesso de homozigotos, com exceção para os locos A1-20 (-0,1921) e A1-39 (-0,0213) que se mostraram negativos, indicando excesso de heterozigotos (WRIGHT, 1965).

A média dos locos para a população I foi 0,35 e para a população II foi 0,3136. Ritter (2012) para *Q. grandiflora* encontrou média de 0,388, indicando a presença de endogamia na população.

Os valores de “ H ”, estimado por meio da heterozigosidade esperada com base na frequência dos alelos, foi similar para as duas populações sendo 0,669 para a população I e 0,63 para a população II. O valor médio do PIC foi de 0,608 para a população I e 0,566 para a população II o qual indica uma boa informatividade dos marcadores usados, onde marcadores com valores acima de 0,5 são considerados muito informativos (BOTSTEIN et al. 1980).

A análise de estruturação populacional obtida por meio da estatística F, como descrito por Nei (1973), revelou que a diversidade genética total nas populações foi 0,7098, dentro das populações 0,6566 e entre as populações 0,0532. O valor de G_{ST} (%) como estimador do grau de subdivisão das populações foi 7,4885. Este valor, segundo Wrigth (1978) indica uma diferenciação genética moderada entre as populações.

Estimado com base na estatística F, foi obtido o fluxo gênico médio de 2,885 (valor com base no número de migrantes por geração). Govindajaru (1989) distinguiu três níveis de fluxo gênico: alto (acima de um), intermediário (entre 0,25 e 0,99) e baixo (abaixo de 0,25). O valor obtido foi considerado alto o suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética.

O reconhecimento da existência de um certo nível de estruturação genética nas populações da espécie, auxilia no estabelecimento de medidas de conservação genética. Estes valores de diversidade genética demonstram que as subpopulações apresentam um grande potencial para a conservação genética *in situ* e pode ser utilizada como fonte de material genético (sementes) para a conservação *ex situ* (TARAZI, 2009).

CONCLUSÃO

Dos 10 *primers* de locos microssatélites desenvolvidos para *V. ferruginea*, 7 foram transferidos com sucesso para *V. bifalcata*.

A diversidade genética foi considerada moderada para as populações naturais de *V. bifalcata*. Essa variação genética das espécies é essencial para sobrevivência de populações ao longo das gerações. Os estudos utilizando marcadores moleculares microssatélites tem se mostrado vantajosos, atingindo seus propósitos de fornecer subsídios para programas de conservação e manejo, permitindo o uso sustentável de recursos.

Estes resultados geram informações importantes a cerca da variabilidade genética existente, comprovando a importância do Parque Nacional Do Caparaó/ES de alguma forma está contribuindo para a conservação dessa diversidade; e provavelmente, o tempo de perturbação antrópica nas áreas fragmentadas não foi suficiente para alterar a diversidade genética.

REFERÊNCIAS

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Bot. J. Linn. Soc.** n.161, p. 105–121. 2009.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 32, p. 314-331, 1980.

COSTA, F. C. et al. Amplificação cruzada de iniciadores em regiões microssatélites do genoma de *Eugenia klotzchiana* (BERG.) C. Ciências Biológicas - 8. Genética - 4. Genética Molecular. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 62. 2010. **Anais...** Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/2816.htm>>. Acesso em: 14 maio 2013.

CUNHA, A. A. et al. **Pagamentos por serviços ambientais na Mata Atlântica: lições aprendidas e desafios**. 2. ed., p.272. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. v.12, p. 13-15, 1990.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992. 646p.

GOVINDAJARU, J. Variation in gene flow levels among predominately selfpollinated plants. **Journal of Evolutionary Biology**, Malden, v. 2, p. 173-181, 1989.

IBAMA- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. **Plano de manejo Parque Nacional de Caparaó**. Brasília, 1996.

IBDF - INSTITUTO BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO FLORESTAL. **Plano de manejo do Parque Nacional do Caparaó**. Brasília: IBDF-FBCN, 1981.

ICMBio- INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE - **Parque Nacional do Caparaó**. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www4.icmbio.gov.br/parna_caparao/>. Acesso em: 18 mar. 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 2, 352 p. 1998.

-
- LOWE, A. J. et al. A set of polymorphic microsatellites for *Vochysia ferruginea*, a promising tree for land reclamation in the Neotropics. **Molecular Ecology Notes**, v2, n.3, p.209-210, 2002.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. In: NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE OF THE USA, 70. **Proceedings...**, p.3321-3323, 1973.
- OLIVEIRA, L.T. **Caracterização da fragmentação florestal para produção de sementes no entorno capixaba do Parque Nacional do Caparaó**. 2011. Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Espírito Santo. Jerônimo Monteiro/ES.
- PEREIRA, M. F. et al. Estrutura de genética de populações de espécies arbóreas nativas do cerrado encontradas em terrenos serpentínicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, n.34, n.2, p. 75-82, 2004.
- RITTER, L. M. O. et al. Development of microsatellite markers for *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae), a typical species of the Brazilian cerrado. **American Journal of Botany**, v 99, n.3, p. 97-98, 2012.
- TARAZI, R. Diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico em uma população de *Copaifera langsdorffii* Desf. no cerrado. 2009. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. Piracicaba.
- VIANNA, M. C. Vochysiaceae na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia** v.57, n.3, p. 659-666, 2006.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. **Evolution** v.19, p.395-42, 1965.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Vol. 4: Variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press, 1978.
- ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

