

# Comunicado 171

## Técnico

ISSN 9192-0099  
Dezembro, 2007  
Brasília, DF



### ESTIMATIVA DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE CEDRO (MELIACEAE), UMA ESPÉCIE AMEAÇADA

Sujii, P. S.<sup>1</sup>

Azevedo, V.C.R.<sup>2</sup>

Ciampi, A. Y.<sup>2</sup>

O cedro, *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae), é utilizado para marcenaria, construção e reflorestamento heterogêneo de áreas degradadas. É classificado como espécie ameaçada, com alto risco de extinção pela *IUCN (Red List of Threatened Species)* devido ao alto nível de exploração e à degradação das áreas de ocorrência (florestas semidecídua e pluvial Atlântica). Estudos genéticos de populações ameaçadas são importantes para o planejamento de estratégias de conservação que proporcionem maior viabilidade da espécie. Marcadores *SSR (Simple Sequence Repeats)* são vantajosos para esse fim, pois possuem elevado conteúdo de

<sup>1</sup> Ciências Biológicas, Graduanda, Bolsista, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

<sup>2</sup> Bióloga, Doutora, Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

informações de polimorfismo, apresentam expressão co-dominante e multialélica, além de serem muito freqüentes e distribuídos ao acaso em genomas eucariotos. O presente estudo teve como objetivo gerar informações de diversidade genética a fim de fornecer subsídios para a conservação e a reintrodução de *C. fissilis*. Fragmentos de DNA de oito famílias (um adulto e 11 indivíduos da progênie de meio-irmãos) de polimórficos por loco (Ap) e índice de fixação (f). Os três iniciadores utilizados permitiram a amplificação de quatro locos, com Ap variando entre quatro e 10;  $He = 0,67$ ;  $Ho = 0,68$ ;  $f = -0,02$ . Esses resultados evidenciam a potência dos marcadores nas investigações de estimativa de fluxo gênico, paternidade e diversidade

## Introdução

A destruição de habitats é a principal causa da extinção de populações naturais, pois populações pequenas encontradas em paisagens fragmentadas podem ficar expostas a eventos estocásticos (genéticos, demográficos, ambientais e catástrofes). Eventos como esses podem afetar a distribuição e a abundância dos organismos, diminuindo a probabilidade de sua persistência em longo prazo. (Lowe *et al*, 2005)

*Cedrela fissilis* Vell. (cedro) é uma espécie arbórea, monóica, alógama, com flores unissexuais que amadurecem em tempos diferentes. Sua madeira é utilizada para marcenaria, construção e reflorestamento heterogêneo de áreas degradadas. É classificada como espécie ameaçada, com

uma população foram amplificados via *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando três iniciadores microssatélites desenvolvidos para a espécie. A genotipagem dos fragmentos foi feita utilizando seqüenciador automático e os programas GeneScan e Genotyper. A partir dos dados gerados, foram calculados: Heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho), número de alelos genética. Estudos com outros dois iniciadores estão sendo desenvolvidos visando obter pelo menos cinco locos para avaliar quatro populações, estabelecer sua estrutura populacional e diversidade genética para subsidiar estratégias de conservação e recuperação áreas degradadas.

alto risco de extinção pela IUCN (*Red List of Threatened Species*) devido ao alto nível de exploração e à degradação das áreas de ocorrência (florestas semidecíduas e pluvial Atlântica) (Carvalho, 1994).



Figura 1. *Cedrela fissilis*. Fonte: [www.cienciahoje.uol.com.br](http://www.cienciahoje.uol.com.br)

Estudos genéticos de populações ameaçadas são importantes para o planejamento de estratégias de conservação que proporcionem maior viabilidade da espécie. Marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*) são vantajosos para esse tipo de estudo, pois possuem elevado conteúdo de informações de polimorfismo, apresentam expressão co-dominante e multialélica, além de serem muito freqüentes e distribuídos ao acaso em genomas eucariotos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Este trabalho teve como objetivo gerar informações de diversidade genética a fim de fornecer subsídios para a conservação e a reintrodução de *C. fissilis*.

## Material e Métodos

### Amostragem

Foram coletados folhas de 40 indivíduos adultos e 30 sementes de cada matriz, de quatro populações de *Cedrela fissilis* da Bacia do Rio Paranã, com uma distância de até 190km entre as árvores.

### Amplificação dos fragmentos de DNA

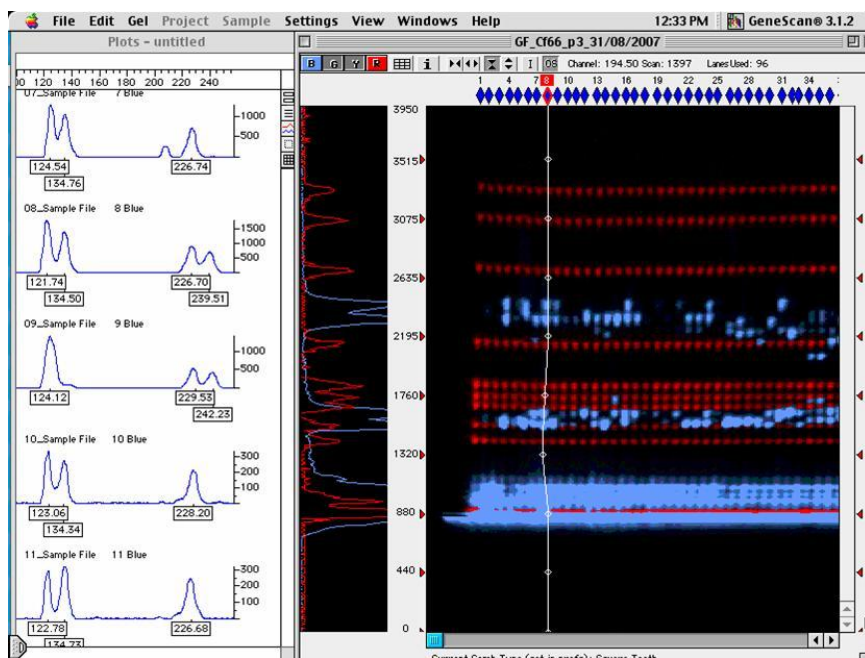
Utilizando três iniciadores microssatélites marcados com fluorescência, desenvolvidos para a espécie, foram amplificados via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) fragmentos de DNA de oito famílias (um adulto e 11 indivíduos da progênie de meio-irmãos) de uma população. Também foram obtidos resultados de amplificação com **um** iniciador em três populações (totalizando 32 famílias de 11 descendentes cada).

A solução para PCR teve volume final de 13  $\mu$ l e é composta por 3ng de DNA,

tampão para reação 1x (KCl a 50mM; Tris-HCl a 10mM; pH 8,3; MgCl<sub>2</sub> a 1,5mM, Triton X-100 1%), dNTP a uma concentração de 0,25mM, 0,25 ng de albumina de soro bovino (BSA), 1,3 U de Taq polimerase e 0,3  $\mu$  M de *primers forward* e *reverse*. O programa utilizado segue a seguinte ordem: um ciclo a 94°C por 5min, 30 ciclos de 1min a 94°C, 1min a temperatura de anelamento específica do *primer* e 1min a 72°C e um ciclo a 72°C por 7min.

### Genotipagem

A separação dos fragmentos foi feita utilizando analisador automático de fragmentos ABI 377 (Applied Biosystems) (Figura 1) e marcador interno ROX desenvolvido por Brondani e Grattapaglia (2001). A genotipagem foi feita utilizando os programas GeneScan e Genotyper.



**Figura 1.** À esquerda, genotipagem dos fragmentos amplificados com iniciadores fluorescentes em seqüenciador automático, e à direita, imagem do gel com as bandas dos fragmentos amplificados marcados com fluorescência 6-FAM(azul) e com o marcador interno ROX (vermelho).

### Análises estatísticas

A partir dos dados gerados, foram calculadas, utilizando o programa GDA (Lewis & Zaykin, 2001), as seguintes estimativas: Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ); Heterozigosidade observada ( $H_o$ ); Número médio de alelos polimórficos por loco ( $A_p$ ); Índice de fixação ( $f$ ). A consistência da estimativa  $f$  foi calculada por reamostragens bootstrap utilizando 10.000 permutações.

### Resultados e Discussão

Todos os locos apresentaram polimorfismo para todas as populações estudadas. Dois dos iniciadores permitiram a amplificação de um loco cada (Cf 26 e Cf 78) e um iniciador permitiu a amplificação de dois locos (Cf

66a e Cf 66b). A Figura 1 ilustra a genotipagem dos fragmentos obtidos pela análise com o iniciador Cf 66.

A partir dos dados gerados, foram realizadas duas análises. A primeira foi baseada nas amplificações de DNA de oito famílias de 12 indivíduos de uma mesma população com os quatro locos. As estimativas obtidas estão representadas na Tabela 1. Os locos apresentam grande quantidade de alelos, de três a dez, considerando-se a amostragem utilizada, oito famílias de uma mesma população, totalizando 96 indivíduos. Para o total de indivíduos analisados (adultos e progênie) o valor de  $f$  encontrado não é consistente, pois apresenta um intervalo de confiança (IC) que varia de +0,155 (excesso de homozigotos) a -0,227 (excesso de heterozigotos).

**Tabela 1.** Parâmetros estimados em uma população de *C. fissilis*.

	<i>n</i>	<i>Ap</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>f</i>
Cf 26	87,00	10,00	0,78	0,76	-0,026
Cf 66 a	82,00	3,00	0,59	0,62	0,053
Cf 66 b	73,00	4,00	0,49	0,64	0,226
Cf 78	88,00	7,00	0,86	0,66	-0,315
Média	82,50	6,00	0,68	0,67	-0,019

Número de indivíduos analisados (*n*), média do número de alelos polimórficos por loco (*Ap*), Heterozigiosidade observada (*Ho*) e esperada (*He*) e estimativa de índice de fixação (*f*).

A segunda análise foi realizada com base nos dados de adultos e progênie de três populações analisadas com os dois locos SSR amplificados com o iniciador Cf 66 (Tabela 2). É possível observar valor de *f* positivo e consistente na progênie (IC entre 0,0003 e 0,0364) e negativo e consistente em adultos (IC entre -0,0510 e -0,0235), indicando possível seleção contra homozigotos. Esses resultados não

corroboram os dados de Póvoa (2002) cujo estudo foi baseado em marcadores isoenzimáticos, em que o *f* encontrado para adultos foi em geral maior que o para a progênie, o que indicou presença de endogamia na população adulta.

**Tabela 2.** Parâmetros estimados em três populações de *C. fissilis* com base no iniciador Cf 66.

Populações	<i>n</i>	<i>Ap</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>f</i>
Pop 1	9,0 / 80,5	3,0 / 4,0	0,61 / 0,58	0,65 / 0,63	0,063 / 0,069
Pop 2	13,0 / 154,0	3,5 / 4,5	0,69 / 0,64	0,65 / 0,60	-0,075 / -0,053
Pop 3	9,0 / 93,0	4,5 / 9,0	0,78 / 0,67	0,73 / 0,73	-0,077 / 0,084
Médias	10,3 / 109,2	3,67 / 5,83	0,69 / 0,63	0,67 / 0,65	-0,031 / 0,037

Número de indivíduos analisados (*n*), proporção de locos polimórficos (*P*) e média do número de alelos polimórficos por loco (*Ap*) para cada população, para dois locos analisados. Valores para: Adultos/Progênie.

## Conclusão

O presente trabalho apresenta resultados de um estudo que evidencia a eficiência dos marcadores SSR nas investigações de

estimativa genéticas relevantes para definição de estratégias de conservação e manejo bem como para a detecção do impacto da exploração em populações naturais.

Os resultados de índice de fixação obtidos para as três populações indicam existir uma tendência de, na natureza, ocorrer seleção contra indivíduos homozigotos, o que pode ser visualizado pela diferença entre os valores de índice de fixação dos adultos e da progênie. Esse padrão é encontrado comumente em populações naturais de arbóreas e pode estar relacionado ao fato de, possivelmente, esses genes em homozigose serem deletérios, desvantajosos.

### Referências Bibliográficas

BRONDANI R.P.V., GATTRAPAGLIA D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. Biotechniques, 2001. 4(31):2-5.

CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo – PR: EMBRAPA– CNPF, 1994. 640p.

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed., Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220p.

KAGEYAMA, P. & GANDARA, F.B. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. Série Técnica IPEF, 1998. 12(32): 65-70.

LEWIS, P. O., ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the

analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>, 2001.

LOWE A.J., BOSHIER D., WARD M., BACLES C.E., NAVARRO C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. Heredity, 2005. 95: 255 – 273.

PÓVOA, J. S. R. Distribuição de variação genética de *Cedrela fissilis* Vell., em fragmentos florestais, no sul de Minas Gerais, por meio de isoenzimas. 2002. 95p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Ciências Florestais. Universidade Federal de Lavras.

**Comunicado  
Técnico, 171**

**Ministério da  
Agricultura,  
Pecuária  
e  
Abastecimento**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372  
PABX: (61) 3448-4673 Fax: (61) 3340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição  
1ª impressão (2007):

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



**Comitê de  
Publicações**

**Presidente:** Sergio Mauro Folle  
**Secretário-Executivo:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Membros:** Arthur da Silva Mariante  
Maria da Graça S. P. Negrão  
Maria de Fátima Batista  
Maurício Machain Franco  
Regina Maria Dechechi Carneiro  
Sueli Correa Marques de Mello  
Vera Tavares de Campos Carneiro

**Supervisor editorial:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

**Editoração eletrônica:** *Daniele Alves Loiola*

**Expediente**