

FOL 05454
2001
FL-05454

**abilidade genética em
populações de copaíba (*Copaifera
langsdorffii* Desf. – Caesalpiniaceae)
estimada com polimorfismos de
AFLP, microssatélites e
seqüenciamento de cpDNA**

República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Marcus Vinicius Pratini de Moraes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast
José Honório Accarini
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Dante Daniel Giacomelli Scolari
Bonifacio Hideyuki Nakasu
José Roberto Rodrigues Peres
Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Luiz Antonio Barreto de Castro
Chefe-Geral

Arthur da Silva Mariante
Chefe-Adjunto de Administração

Clara Oliveira Goedert
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

José Manuel Cabral Sousa Dias
Chefe-Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio

FL 22309

Embrapa

ISSN 1676 - 1340

Dezembro, 2001

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 12

**Variabilidade genética em
populações de copaíba
(*Copaifera langsdorffii* Desf. –
Caesalpiniaceae) estimada com
polimorfismos de AFLP,
microssatélites e
seqüenciamento de cpDNA**

Ana Yamaguishi Ciampi
Dário Grattapaglia

EMBRAPA
GENARGEN

Brasília, DF
2001

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF
CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600
Fax: (61) 340-3624
http://www.cenargen.embrapa.br
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual
Membros: Antônio Costa Allem
Marcos Rodrigues de Faria
Marta Aguiar Sabo Mendes
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares Campos Carneiro
Suplentes: Edson Junqueira Leite
José Roberto de Alencar Moreira
Supervisor editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual
Revisor de texto: Miraci de Arruda Camara Pontual
Normalização bibliográfica: Sérgio Souza Santos
Tratamento de ilustrações: Alysson Messias da Silva
Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva

1ª edição

1ª impressão (2001): tiragem 150 exemplares.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIAMPI, A. Y.; GRATTAPAGLIA, D. **Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 33p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 12).

ISSN 1676-1340

1. Variabilidade genética. 2. *Copaifera langsdorffii*. 3. AFLP.
4. Microssatélites. I. Grattapaglia, D. II. Título. III. Série.

CDD 581.15

© Embrapa 2001

Embrapa
Unidade Cenargen
Valor aquisição: _____
Data aquisição: _____
N.º N. Fiscal/Fatura: _____
Fornecedor: _____
N.º OCS: _____
Origem: _____
N.º Registro: F015454

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	11
Áreas de Estudo	11
Material Vegetal e Extração de DNA	11
Análise de Marcadores AFLP	13
Seqüenciamento de Região de cpDNA	13
Análise de Locos Microssatélites	14
Análise de Dados	14
Resultados	16
Marcadores Moleculares	16
Análise de Variância Molecular (AMOVA)	19
Discussão	23
Conclusão	27
Referências Bibliográficas	27

EMBRAPA

CENARGEN

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. –Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

Ana Yamaguishi Ciampi ¹

Dário Grattapaglia ²

Resumo

Informações de genética de populações, com base em dados de alta resolução na análise genômica obtidas com AFLP, SSR e cpDNA, foram utilizadas para a recomendação da conservação *in situ* das populações de copaíba, em matas de galeria do Cerrado. O ensaio AFLP, otimizado para esta espécie, permitiu obter alto polimorfismo, com 138 marcadores avaliados em 96 adultos das quatro populações estudadas, com duas combinações de "primers", verificados em dois géis de poliacrilamida. A porcentagem de variação genética dentro das populações foi maior que entre as populações. A análise comparativa das técnicas de marcadores moleculares dominantes AFLP e co-dominantes SSR para o genoma nuclear mostrou que ambas as técnicas são altamente eficientes para estimar de forma robusta as proporções de variabilidade genética entre e dentro de populações de copaíba. Um resultado importante obtido foi a forte congruência nas estimativas da decomposição da variabilidade genética entre e dentro das populações e da significância destas estimativas com os dois tipos de marcadores. Considerando este resultado e o fato de que a técnica de AFLP não depende de um desenvolvimento tecnicamente complexo e caro, esta técnica é a melhor opção para uma quantificação de variabilidade genética de forma rápida e a baixo custo. A análise dos haplótipos obtidos pelo seqüenciamento da região não codificante do cpDNA, permitiu quantificar a variabilidade entre e dentro das

¹ Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, E-mail: aciampi@cenargen.embrapa.br

² Eng. Florestal, PhD, Universidade Católica de Brasília, E-mail: dario@pos.ucb.br

populações e estimar um fluxo gênico pequeno (0,2 semente/geração). Os dados de oito locos SSR marcados com fluorescência, além de estimar a variabilidade genética entre e dentro das populações, permitiram avaliar sua estrutura genética. A análise das frequências gênicas, resultaram em: número de alelos/loco ($A = 13$); diversidade genética ($\hat{H}_e = 0,88$); diferenciação entre populações ($F_{ST} = 0,0503$) significativo (IC 95%); taxa aparente de cruzamento igual a 1 ($t = 100\%$ alogamia); fluxo gênico (pólen e sementes) elevado $Nm = 5$ migrações/geração e aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg na maioria das populações. A existência de fluxo gênico entre as populações permitiu considera-las como sendo uma metapopulação. A utilização de marcador co-dominante neutro, tipo SSR, foi imprescindível na estimativa de tamanho efetivo populacional, para a recomendação de conservação *in situ* de 40 populações, entre as 190 populações existentes no Distrito Federal, assegurando a perda de menor número de alelos raros de copaíba. A obtenção e análise de dados genotípicos discretos, a partir de marcadores moleculares essencialmente neutros (fragmentos de DNA), é a única forma viável de investigar a variabilidade genética e a estrutura genética das populações a curto prazo, gerando informações para um grande número de indivíduos, populações e espécies, bem como na determinação precisa de parentesco entre regenerantes e adultos, o que permitirá entender a dinâmica da manutenção da variabilidade entre gerações, e possivelmente resultar em recomendações futuras sobre o manejo da regeneração.

Palavras Chaves: Variabilidade genética, *Copaifera langsdorffii*, AFLP, cpDNA, SSR, microssatélites, Tamanho efetivo de população.

Genetic variability in populations of copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. Caesalpiniaceae) estimated with AFLP, microsatellite and cpDNA sequencing polymorphisms

Abstract

The population genetic structure of *Copaifera langsdorffii* Desf. (copaíba) - Leguminosae-Caesalpinioideae was studied based on DNA polymorphisms generated with different class of molecular markers sampling different portions of the nuclear and chloroplast genomes. Genetic parameters of diversity, differentiation, parentage and gene flow were estimated from discrete data of nuclear co-dominant microsatellite and dominant AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers, as well as from sequencing data of specific chloroplast (cpDNA) regions. The study was carried out with four populations located in gallery forests in Distrito Federal with the objective of supplying subsidies to the conservation programs of this species in the area.

A wide genome coverage with different classes of molecular markers was used to understand the distribution of genetic variability within and among natural populations of "copaíba". Besides the analysis with co-dominant microsatellite markers, protocols for the resolution of dominant AFLP markers were optimized. Estimates of genetic variation within and among populations were obtained based on 138 AFLP markers. Sequencing data of an intron of a specific gene in the chloroplast genome (cpDNA) was used to estimate the gene flow through seed and the haplotypic variability within and among populations for this molecule that has uniparental inheritance and low evolution rate. An indel of 21 base pairs allowed inferences on the dispersion of seeds among populations.

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

The partitioning of molecular variation obtained based on AFLP data was perfectly congruent with the one obtained from microsatellite data. Both markers indicated that most of the genetic variability in "copaíba", of the order of 90%, is contained within populations and about 10% among populations. The variability among populations although small is significant ($P < 0,0001$). In contrast, an AMOVA based on cpDNA sequencing data indicated that most of the variability (83%) for chloroplast DNA is found among populations. This confirms the expectations of high differentiation among populations for cpDNA as a result of limited gene flow via seed.

Population genetic parameters were estimated from microsatellite data for the adult individuals of the four populations. The expected heterozygosity, 0,88, was smaller than observed heterozygosity, 0,89. The coefficient of inbreeding, -0,0157 was not significantly different from zero (Confidence Interval at 95%) and the differentiation among populations \hat{F}_{ST} was 0,0503 and significant. The apparent outcrossing rate was equal to 1, i.e. the populations are predominantly or actually exclusively outcrossed. Finally, high gene flow was verified of the order of 5 migrants/generation and goodness of fit to Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) for all the loci in most of the populations. The existence of intense gene flow among the populations suggests that they are in fact a metapopulation. For this metapopulation the effective population size was estimated from the variance of the allele frequencies at the microsatellite loci. The estimated effective population size for the metapopulation was 40, that in the situation under study corresponds to a census number of 96 individuals. This estimate led to the recommendation of conserving in situ a total of 40 populations of the 190 that currently exist in Distrito Federal, assuring an effective population size of 500 individuals and the conservation of all the alleles detected in this sampling, including the rare ones. The obtaining and analysis of discrete genotypic data using essentially neutral molecular markers (DNA fragments) is the only viable form of investigating the genetic variability and genetics structures of the short term populations, generating information for a great number of individuals, populations and species, as well as to the determination of relationships between seedling and sapling and adults to will allow to understand the dynamics of the maintenance of the variability among generations and possibly to result in future recommendations on the handling of the regeneration.

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

Introdução

Copaifera langsdorffii Desf (Caesalpiniaceae), conhecida popularmente como copaíba ou pau d'óleo, é uma espécie florestal de importância sócio-econômica, que ocorre em diferentes biomas brasileiros. Das espécies do gênero, *Copaifera langsdorffii* apresenta a mais ampla distribuição natural no Brasil, embora esteja incluída entre as espécies da flora nativa em perigo de extinção (FAO, 1986; Carvalho, 1994). Isto deve-se à sua exploração sem controle, tanto para usos madeireiros (construção civil, carpintaria etc) quanto medicinais.

Informações sobre a variabilidade genética existente entre e dentro de populações são fundamentais para fazer inferências e previsões sobre diversos processos de manutenção de diversidade, tais como endogamia, deriva genética, fluxo gênico e seleção natural (Wright, 1978; Slatkin & Barton, 1989). A obtenção e análise de dados discretos, a partir de marcadores moleculares baseados em polimorfismos de DNA, tem se tornado uma forma eficiente de gerar informações para um grande número de indivíduos, populações e espécies, em um curto espaço de tempo. Várias técnicas de análise genômica estão disponíveis hoje e têm sido utilizadas nos últimos anos para estudos de genética de populações. Marcadores AFLP têm sido utilizados para análise genética em várias culturas anuais como *Glycine* sp. (Powell et al., 1996; Maughan et al., 1996), *Solanum* sp. (Milbourne et al., 1997), *Pisum* sp. (Lu et al., 1996), *Manihot* sp. (Roa et al., 1997), *Oryza sativa* (Zhu et al., 1998), *Zea mays* (Ajmone Marsan et al., 1998) e em algumas espécies arbóreas, como *Eucalyptus urophylla* (Gaiotto, 1997) e *Populus* sp. (Cervera et al., 1996). Marcadores AFLP têm natureza dominante, e portanto, baixa informação por loco individual não permitindo a estimativa de heterozigosidade, ou seja, diversidade dentro de indivíduo. Entretanto, são marcadores tecnicamente robustos, apresentando um elevado índice multiplex e ampla cobertura genômica, tendo em vista o grande número de polimorfismos gerados em uma única pista de um gel.

Marcadores baseados em seqüências simples repetitivas (SRR) constituem os marcadores ideais para estudos de populações. Eles são co-dominantes, tipicamente multialélicos e altamente polimórficos, permitindo uma elevada resolução na investigação de relações de parentesco e estudos de genética de populações. Entretanto, tendo em vista o número tipicamente reduzido de locos analisados, a cobertura genômica é limitada. Marcadores microssatélites têm sido desenvolvidos de forma crescente para espécies arbóreas para as mais diversas

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

aplicações, desde mapeamento em *Pinus radiata* (Smith & Devey, 1994), *Eucalyptus* sp. (Brondani et al., 1998) até estudos de genética de populações em *Quercus macrocarpa* (Dow et al., 1995; Dow & Ashley, 1996), *Pithecellobium elegans* (Chase et al., 1996), *Swietenia humilis* (White & Powell, 1997), *Symphonia globulifera* (Aldrich et al., 1998) e *Caryocar brasiliense* (Collevatti et al., 1999).

Tendo em vista a baixa taxa de evolução do genoma de cloroplasto (cpDNA), polimorfismos de fragmentos de restrição e seqüenciamento de regiões intergênicas têm sido tradicionalmente utilizados para investigações filogenéticas interespecíficas (Palmer & Zamir, 1982; Palmer, 1985; Soltis et al., 1989; Dumolin-Lapègue et al., 1997; Buso, 1998; Maguire et al., 1997). Nos últimos anos, com o acesso mais fácil a um grande número de enzimas de restrição e seqüenciamento de DNA, polimorfismos de seqüência têm sido utilizados de forma crescente para análises da variação e diferenciação intra-específica em *Quercus robur* (Petit et al., 1994), *Phacelia* (Levy et al., 1996), *Eucalyptus nitens* (Byrne & Moran, 1994) e *Silene alba* (McCauley, 1994; McCauley et al., 1995).

Análises comparativas das diferentes classes de marcadores moleculares são escassas. Powell et al. (1996) e Lu et al. (1996) compararam marcadores AFLP, RAPD e microssatélites para a análise de distância genética em espécies autógamas como soja e ervilha, Isabel et al. (1995) compararam marcadores isoenzimáticos e RAPD para a análise de estrutura genética de populações de *Pinus*. Tendo em vista a ampla variedade de técnicas de DNA disponíveis hoje para estudos de variabilidade genética em populações, tornam-se necessários estudos comparativos. Neste trabalho são apresentadas as estimativas da variabilidade genética em populações de *Copaifera langsdorffii* pela análise dos dados genotípicos dominantes AFLP, co-dominantes microssatélites e seqüenciamento de cpDNA. Os objetivos deste estudo foram: (1) otimizar as condições de ensaio de marcadores AFLP para copaíba; (2) quantificar a variabilidade genética entre e dentro de populações em quatro matas de galeria do cerrado no Distrito Federal; (3) comparar os resultados obtidos com as três técnicas; (4) sugerir recomendações para ações de conservação *in situ* de copaíba.

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

Material e Métodos

Áreas de Estudo

Foram amostradas populações de copaíba em quatro matas de galeria, situadas no Distrito Federal (Fig. 1): (1) Mata do córrego da Onça localizada na Fazenda Água Limpa (FAL), de propriedade da Universidade de Brasília (UnB). A FAL está situada a 15°56'14" S e 47°56'08" W, a uma altitude média de 1.100m. Com área de 51ha, possui vegetação do tipo mata de galeria nativa, remanescente da bacia hidrográfica do ribeirão do Gama (Pereira et al., 1988); (2) Mata do córrego Tamanduá constituída por vegetação remanescente da bacia hidrográfica do Tamanduá, cortada pelo córrego Capoeira Grande, afluente do rio Descoberto. A mata abrange uma área de 21ha e está situada na região administrativa da cidade satélite do Gama - DF, Km 9 da BR-060 (Brasília - Anápolis), entre as coordenadas geográficas 15°56'00" S e 48°08'00" W, a uma altitude de 997m (Martins Netto, 1992); (3) Mata do córrego da Cabeça do Veado no Jardim Botânico de Brasília, distante 16 km de Brasília. Com área de 96ha, está situada a 15°55'00" S e 47°51'00" W, a uma altitude média de 1.100m. Possui vegetação tipo mata de galeria nativa, remanescente da bacia hidrográfica do córrego Cabeça de Veado (Azevedo et al., 1990); (4) Mata do córrego Açudinho na fazenda experimental Sucupira de propriedade da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, distante 22 Km de Brasília. Com área aproximada de 1.116 ha está situada a 15°54'50" S e 48°02'00" W, a uma altitude de 1.100m. A vegetação é remanescente da bacia hidrográfica do córrego Riacho Fundo.

Material Vegetal e Extração de DNA

De cada mata de galeria, foram utilizados 24 indivíduos adultos, perfazendo um total de 96 indivíduos. Foram considerados indivíduos adultos aqueles que apresentaram diâmetro à altura de peito (DAP) maior que 5 cm (Walter et al., 1997). A coleta das folhas foi realizada com a ajuda de equipamentos de escalada e podão. Todos os indivíduos foram marcados e sua localização obtida a partir de uma linha perpendicular do centro do curso do córrego, de onde se pôde medir a distância até a planta utilizada. Folhas adultas foram utilizadas para extração de DNA genômico total, de acordo com o protocolo de Doyle & Doyle (1987). O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose 1%, mediante comparações visuais com concentrações conhecidas de DNA de fago λ , corado com brometo de etídio.

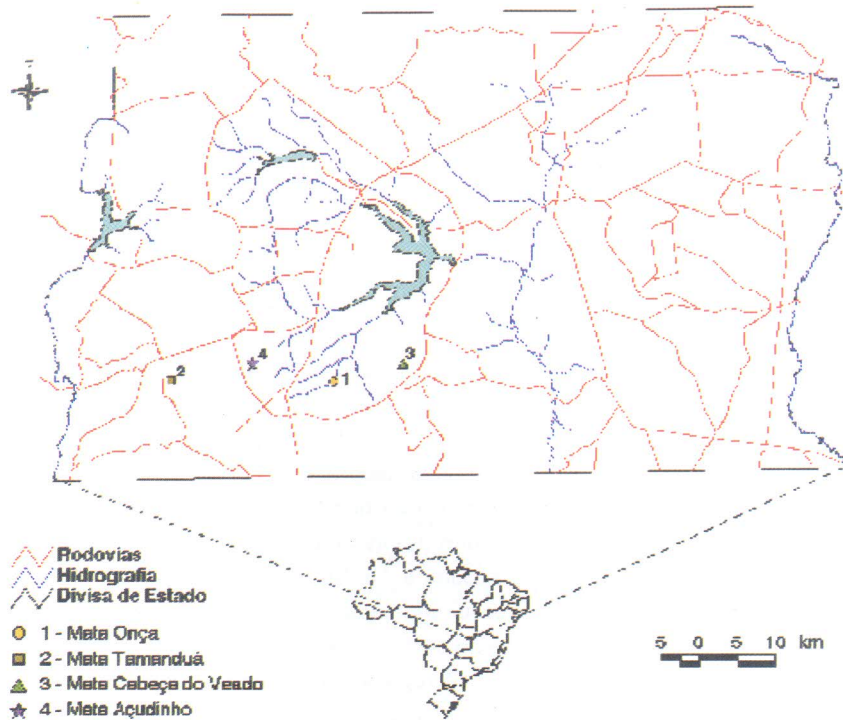


Fig. 1. Mapa do Distrito Federal com a localização das áreas de estudo: Pop1-Mata Onça, Pop2-Mata Tamanduá, Pop3-Mata Cabeça do Veado e Pop4-Mata Açudinho, distantes em linha reta a 9,4 Km entre Pop1 e 3, a 10,7 Km entre Pop 1 e 4, a 10,9 Km entre Pop 2 e 4, a 19,6 Km entre Pop 3 e 4, a 21,1 Km entre Pop 1 e 2, e a 30,4 Km entre Pop 2 e 3.

Análise de Marcadores AFLP

A técnica AFLP foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Vos et al., 1995, utilizando enzimas de corte freqüente e raro, EcoRI e MseI, respectivamente. Na otimização para o genoma de *Copaifera langsdorffii* foram feitas algumas modificações, principalmente na etapa de pré-amplificação, resultando em uma alta reproducibilidade no passo de amplificação final. Essa modificação consistiu na manutenção da temperatura de anelamento à 60 °C durante todo o programa de PCR. No programa original (Vos et al., 1995) a temperatura de anelamento tinha início à 65 °C e um decréscimo de 0,7°C no primeiro ciclo, e sucessivamente até o ciclo 23, chegando à 56 °C. A comparação do produto da pré-amplificação, em gel de agarose, mostrou claramente, que no ciclo modificado a banda com "smear" foi mais consistente que no ciclo original. Na amplificação seletiva final foram testadas as combinações de "primers" contendo dois ou três nucleotídeos seletivos no terminal 3'. Desta forma, os "primers", testados foram aqueles com dois nucleotídeos no terminal EcoRI, e três nucleotídeos seletivos no terminal MseI (+2/+3) e três nucleotídeos seletivos para ambos os terminais (+3/+3). Após a triagem com "primers" (+3/+3), foram selecionadas duas combinações de "primers" (+3/+3) de MseI (M48 e M52 com os nucleotídeos CAC e CCC, respectivamente) combinados com EcoRI (E 37 com nucleotídeos ACG), o quais mostraram-se mais polimórficos. Os dados de presença e ausência de fragmentos de todos os indivíduos foram avaliados para estas duas combinações de "primers", a partir dos filmes de autoradiografias, onde foram detectados os marcadores AFLP por resolução com ³³P radioativo.

Seqüenciamento de Região de cpDNA

Foi analisada a região do intron do gene trnL(UAA) do genoma de cloroplasto, amplificada usando-se os "primers" universais C e D com seqüências 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' e 5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3', respectivamente (Taberlet et al., 1991). A reação de amplificação de 50µl foi realizada, utilizando-se 10 ng de DNA genômico, 0,25 mM de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl pH8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 37,5 ng de cada "primer", 15 mg/ml de BSA, 2 unidades de Taq DNA Polimerase e água MiliQ estéril, até completar o volume total da reação. A PCR foi conduzida com uma desnaturação inicial de 4 min a 94°C, seguida de 30 ciclos de 45'' a 92°C, 45'' a 56°C e 45'' a 72°C e uma elongação final de 3' a 72°C. Uma alíquota de 2µl do produto da reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1 % contendo 0.1mg/ml de brometo de etídio em tampão 1x TBE pH 8,3 (89mM tris-borato , 2mM

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

EDTA), para verificar a amplificação de único fragmento de 500pb. O restante da reação foi purificada com acetato de sódio e etanol para posterior seqüenciamento via dideoxi-terminator, realizado em um equipamento ABI 377 (Perkin Elmer). As seqüências contendo aproximadamente 500 nucleotídeos foram alinhadas manualmente e segmentos com 100 bases de cada indivíduo foram analisados.

Análise de Locos Microssatélites

Os 96 indivíduos foram genotipados para 8 locos previamente desenvolvidos e caracterizados (Ciampi et al., 2000). A genotipagem foi realizada semi-automaticamente via detecção fluorescente multicolorida em sequenciador automático e filtragem de eletroferogramas nos softwares Genescan e Genotyper (Perkin Elmer).

Análise de Dados

Os dados de AFLP (binários - presença/ausência de bandas), de cpDNA (seqüências com 100 nucleotídeos) e SSR (freqüências alélicas dos oito locos) foram submetidos a uma série de análises, visando estimar e decompor a variabilidade nos componentes entre e dentro das populações. Com base nos dados de cada marcador foram construídas matrizes do quadrado da distância Euclidiana. A partir destas matrizes foram estimadas as magnitudes da variabilidade genética entre e dentro das populações via uma análise de variância molecular (Excoffier et al., 1992), implementada com o software Arlequin (Schneider et al., 1997).

A partir de dados genotípicos de microssatélites foram estimados parâmetros descritivos das populações tais como o número de alelos polimórficos/loco(A), a heterozigosidade esperada (\hat{H}_e), heterozigosidade observada (\hat{H}_o) e as estatísticas de Wright. Intervalos de confiança a 95% para \hat{F}_{IS} e \hat{F}_{ST} foram construídos via reamostragem numérica. Aderência dos dados genotípicos às proporções esperadas sob equilíbrio de Hardy Weinberg foi testada para os oito locos via um teste exato de Fisher. Estas análises foram realizadas utilizando o programa GDA "Genetic Data Analysis" (Lewis & Zaykin, 1997).

A estimativa de tamanho efetivo populacional foi obtida pela fórmula

$$N_e = \frac{S}{2\hat{F}_{ST}} \quad (\text{Vencovsky, 1999}).$$

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

Nesta expressão proposta para várias populações de uma metapopulação, considera-se que a metapopulação é subdivida em populações locais, não havendo níveis mais elevados de hierarquia (Ex.: subdivisões locais de uma população).

A estimativa de tamanho efetivo populacional foi utilizada para estimar S , que corresponde ao número de populações a serem conservadas em um programa de conservação *in situ* de Copaíba no Distrito Federal. Para isso foi utilizada a seguinte expressão sugerida por Vencovsky & Crossa (1999) onde:

$$N_e = \frac{1}{2D_1}$$

e

$$D_1 = F_{ST} \left[\frac{1+C^2}{S} \left(\frac{S^*}{S^*-1} \right) - \frac{1}{S^*-1} - \frac{1}{n} \right] + \frac{1+F_{IT}}{2n}$$

onde:

N_e - número ou tamanho efetivo;

n - número de indivíduos tomados ou amostrados, na geração seguinte, cujo N_e se deseja conhecer; pode referir-se a sementes;

S - número de populações amostradas de uma metapopulação;

S^* - número real de populações constituintes na metapopulação; no caso, foram relativas às matas de galerias encontradas na região do Distrito Federal de acordo com os córregos encontrados no Mapa Ambiental do DF - 1994-CODEPLAN, onde a copaíba ocorre com grande freqüência (Walter et al., 1999*);

F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} - estatísticas F de Wright; no caso de uma só população $F_{IS} = f$. Em populações em equilíbrio admitem-se constantes ao longo das gerações;

C - coeficiente de variação do número de indivíduos amostrados; $C^2 = \frac{\sigma^2}{n^2}$.

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

Na situação em análise, foi considerada a existência de cerca de $S^* = 190$ populações no DF (Walter et al., 1997), com um número infinito de indivíduos por população ($n = \infty$), de acordo com o modelo de Vencovsky & Crossa (1999) e foi objetivado um tamanho efetivo para conservação de N_e de 500 indivíduos.

Resultados

Marcadores Moleculares

A partir de duas combinações de primers com 3 bases seletivas cada (+3/+3) foram detectados 138 marcadores AFLP polimórficos, facilmente interpretáveis e altamente robustos (Fig. 2). Esse alto nível de polimorfismo e nível de multiplex (69 bandas/combinção de "primers") foram alcançados após alguns passos de otimização da técnica AFLP para o genoma de copaíba. Os principais passos otimizados foram a utilização de uma temperatura de anelamento mais seletiva, 60 °C durante a pré-amplificação, o uso de combinação de "primers" com um total de 6 bases seletivas, sendo três em cada "primer" na amplificação final e finalmente a utilização de combinações de bases seletivas que mostraram maior número de bandas polimórficas, após a triagem com diferentes "primers" seletivos. A triagem de "primers" seletivos com diferentes números e tipos de bases seletivas torna-se um passo essencial para a otimização desta técnica para uma espécie previamente não estudada.

Todos os locos microssatélites analisados foram altamente polimórficos em todas as quatro populações, confirmando o alto conteúdo de informação genética destes marcadores para estudos de diversidade genética. A detecção fluorescente permitiu ainda uma estimativa precisa dos tamanhos dos alelos em pares de bases (Fig. 3), o que foi fundamental para a consolidação de dados genotípicos obtidos de diferentes corridas eletroforéticas.

Os "primers" universais utilizados permitiram a amplificação precisa, no genoma de cloroplasto, de um fragmento de aproximadamente 500 pb. Este fragmento foi sequenciado e alinhado. Uma sub-região de 100 bases, contendo um polimorfismo de inserção/deleção de 21 bases, foi detectada (Fig. 4).

A deleção foi observada em todos os indivíduos da população 2 e em apenas quatro indivíduos da população 4. Numa análise global dos diferentes haplótipos encontrados, foi detectado monomorfismo na população 2 com apenas um único haplótipo, seis haplótipos diferentes nas populações 1 e 3 e oito haplótipos na população 4.

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

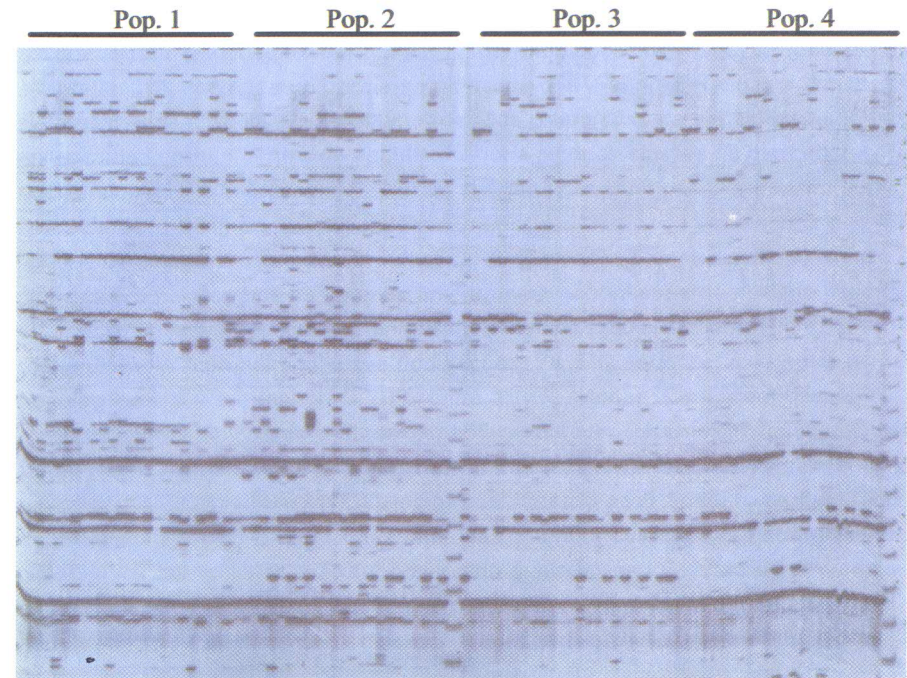


Fig. 2. Padrões de marcadores AFLP. Auto-radiograma dos marcadores AFLP das quatro populações contendo 24 indivíduos cada, com fragmentos gerados pela combinação de "primers" +3/+3 (E37/M48) com nucleotídeos seletivos "ACT" e "CAC", respectivamente.

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

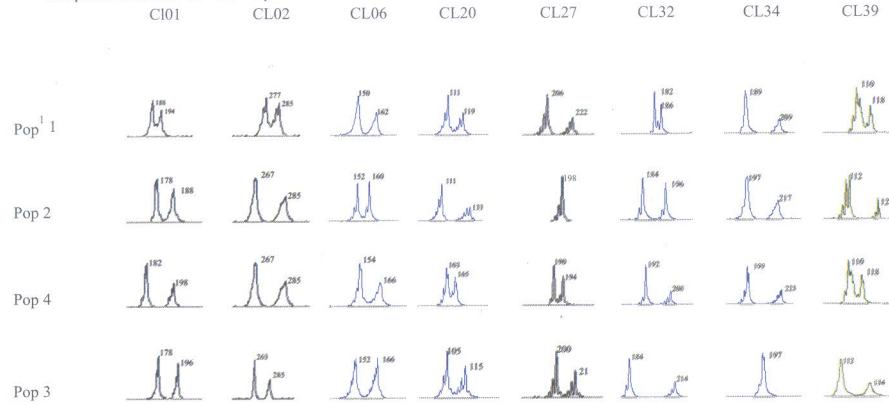


Fig. 3. Eletoferograma dos oito locos SSRs de *Copaifera langsdorffii*. Padrões genotípicos representados pelos respectivos alelos em pares de bases nas quatro populações estudadas. ¹ Pop1-Mata Onça, Pop2-Mata Tamanduá, Pop3-Mata Cabeça do Veado e Pop4-Mata Açudinho.

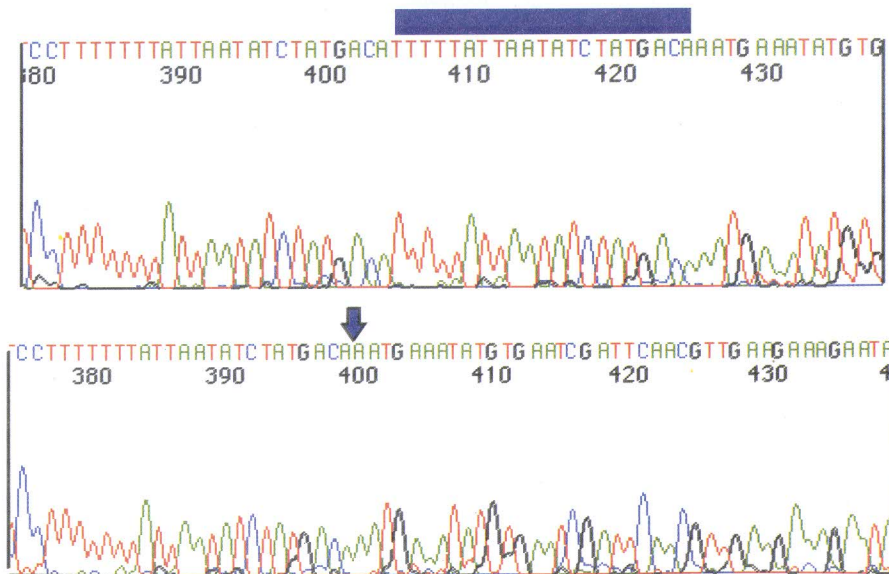


Fig. 4. Eletoferograma obtido a partir do seqüenciamento de uma região intron do cpDNA amplificada, mostrando a inserção de 21 bases.

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

Análise de Variância Molecular (AMOVA)

A variabilidade genética existente nas quatro populações de matas de galeria analisadas, foi estimada utilizando-se os dados de AFLP, cpDNA e microssatélites (Tabela 1). As estimativas das proporções da variabilidade encontradas entre e dentro de populações para as duas classes de marcadores nucleares, AFLP e microssatélites foram em geral congruentes. De maneira geral, cerca de 85 a 95% da variabilidade estão contidas dentro de populações e apenas de cinco a 15% entre populações. A diferenciação entre populações foi significativa para ambos os tipos de amostragem genômica, embora uma maior diferenciação entre populações tenha sido estimada com marcadores AFLP. A maior diferenciação nominal entre populações, 24,5%, foi observada entre as populações 2 e 4 e a menor, 3,79% entre as populações 3 e 4, com base em marcadores AFLP e microssatélites respectivamente. Entretanto, com exceção do fato que em todas as AMOVAs realizadas foi detectada diferenciação significativa entre populações ($P < 0,0001$), nada pôde ser afirmado sobre a magnitude comparativa destas diferenciações, uma vez que não foi realizado teste formal de significância. Além disso, não foi observado qualquer padrão claro de diferenciação entre populações e localização geográfica. Por exemplo, não foi encontrada correlação significativa entre a distância genética (Nei, 1972) entre populações estimadas com base em marcadores microssatélites e a distância geográfica.

Em claro contraste à distribuição de variabilidade encontrada entre e dentro das populações para o genoma nuclear, cerca de 80% da variabilidade para a região de cpDNA estudada está contida entre populações. Além disso, foi observada uma variação significativa na diferenciação entre as quatro populações para o genoma de cpDNA indo de apenas 12,02% entre as populações 3 e 4 até 98,98% entre as populações 1 e 2. Esta variação é um reflexo direto da ocorrência de polimorfismos de inserção/deleção e consequentemente, dos haplótipos diferenciados nas diferentes populações.

Na análise dos 8 locos microssatélites, o número de alelos/loco variou de 10,87 a 14,37, a heterozigidade observada (\hat{H}_o) variou de 0,85 a 0,91 e a heterozigidade esperada (\hat{H}_e), de 0,85 a 0,90 (Tabela 2).

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

Tabela 1. Distribuição de variabilidade entre e dentro de populações, em quatro populações de *Copaifera langsdorffii*, obtida por análise da variância molecular de dados de AFLP, microssatélites e cpDNA. Todos as estimativas de variabilidade entre populações foram significativos ($P < 0,0001$).

Fonte de Variação	% de Variabilidade		
	AFLP	Microssatélites	cpDNA
Dentro de cada Pop	84,82	94,97	16,59
Entre 4 Populações ¹	15,18	5,03	83,41
Entre Pop 1 x 2	10,16	4,41	98,98
Entre Pop 1 x 3	12,34	5,30	27,09
Entre Pop 1 x 4	16,95	6,27	12,70
Entre Pop 2 x 3	18,18	4,64	98,34
Entre Pop 2 x 4	24,52	5,55	81,67
Entre Pop 3 x 4	6,26	3,79	12,02

⁽¹⁾ Pop1-Mata Onça, Pop2-Mata Tamanduá, Pop3-Mata Cabeça do Veado e Pop4-Mata Açudinho.

Tabela 2. Diversidade para quatro populações naturais de *Copaifera langsdorffii* (copaíba) de matas de galeria do DF, obtida a partir da análise de oito locos SSRs em 96 adultos. Estimativas de diversidade gênica (H_e), heterozigidade observada (H_o).

População ¹	Tamanho da Amostra	Nº. Alelos/Loco	Médio de % de Polimórficos	Heterozigidade Média		Índice de Fixação (\hat{F}_{IS})
				\hat{H}_e	\hat{H}_o	
Pop1	24	10,87	100	0,85	0,91	-0,0752
Pop2	24	13,37	100	0,87	0,88	-0,0133
Pop3	24	13,75	100	0,89	0,85	0,0311
Pop4	24	14,37	100	0,90	0,91	-0,0081
Média	24	13,09	100	0,88	0,89	-0,0157

⁽¹⁾ Pop1-Mata Onça, Pop2-Mata Tamanduá, Pop3-Mata Cabeça do Veado e Pop4-Mata Açudinho.

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

A heterozigidade esperada média para todo o conjunto de dados foi de 88%, numa diversidade média máxima possível de 92%, obtida por:

$$H_{e(max)} = A - 1/A,$$

onde A representa o número médio de alelos. O índice de fixação estimado conjuntamente para as quatro populações (\hat{F}_{IS}) foi de -0,015, o qual não diferiu significativamente de zero (IC 95% - 0,0819 a 0,0428). O valor de \hat{F}_{IT} foi de 0,0354, o qual tampouco diferiu significativamente de zero (IC 95% - 0,0257 a 0,0902). O \hat{F}_{ST} de 0,0503 diferiu significativamente de zero (IC 95% 0,0433 a 0,0574).

A existência de alelos privados de cada população foi detectada em todas as populações variando, desde nove até 21, no somatório de todos os oito locos (Tabela 3). Os locos CL34 e CL39 não apresentaram alelos exclusivos nas populações 1 e 4 e os locos CL1, CL2, CL24 e CL27 apresentaram alelos exclusivos em todas as populações, reforçando a existência de divergência entre as populações.

Com exceção da população 1, em todas as demais populações as proporções genotípicas encontradas aderiram às proporções esperadas sob equilíbrio, verificadas pelo exato teste de Fisher de não aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, para cada loco e em todos os locos conjuntamente. Na análise por loco, observou-se que CL1 e CL39; CL2 e CL39; CL34 não aderiram às proporções nas populações 1, 3 e 4, respectivamente (Tabela 4).

O fluxo gênico (Nm) entre as populações com base em dados de microssatélites variou de 3,74 a 6,35, indicando uma alta taxa de migração geral (pólen e semente) equivalente à migração de 5 indivíduos por geração. O fluxo gênico estimado a partir do genoma de cloroplasto variou de 0,005 a 3,65, mostrando pouca migração de sementes (0,2 semente por geração).

Com base na estimativa de F_{ST} foi estimado um tamanho efetivo populacional de $N_e = 40$ indivíduos. A partir da estimativa de $N_e = 40$ e visando um $N_e = 500$, para conservação *in situ*, foi estimado que o número de populações a serem conservadas no DF seria igual a $S = 39,74$ ou seja cerca de 40 populações.

Tabela 3. Número de alelos exclusivos por loco, em cada população de *Copaifera langsdorffii*.

Locos SSRs	Alelos			
	Pop ¹	Pop2	Pop3	Pop4
CL01	2	1	2	1
CL02	3	2	4	5
CL06	1	1	-	4
CL24	1	1	4	1
CL27	1	1	2	-
CL32	1	1	1	2
CL34	-	5	3	-
CL39	-	2	3	-
Total	9	14	21	13

⁽¹⁾ Pop1-Mata Onça, Pop2-Mata Tamanduá, Pop3-Mata Cabeça do Veado e Pop4-Mata Açudinho

Tabela 4. Resultados do teste exato de Fisher de não aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco e todos os oito locos SSR.

Locos SSRs	Alelos			
	Pop ¹	Pop2	Pop3	Pop4
CL01	0,01219	0,35031	0,13875	0,54375
CL02	0,94031	0,24781	0,00062	0,55281
CL06	0,13937	0,84812	0,45750	0,54750
CL20	0,40750	0,69125	0,68125	0,17687
CL27	0,12281	0,08562	0,21969	0,44781
CL32	0,16719	0,47875	0,30156	0,33656
CL34	0,08594	0,22125	0,22844	0,01156
CL39	0,00031	0,29375	0,01594	0,87844
Todos	0,00406	0,35719	0,78349	0,35469

⁽¹⁾ Pop1-Mata Onça, Pop2-Mata Tamanduá, Pop3-Mata Cabeça do Veado e Pop4-Mata Açudinho

Discussão

Este é o primeiro estudo que avaliou a distribuição de variabilidade genética entre e dentro de populações naturais de copaíba, utilizando uma ampla cobertura genômica com diferentes classes de marcadores moleculares. A análise comparativa das técnicas de marcadores moleculares dominantes AFLP e co-dominantes SSR para o genoma nuclear mostrou que ambas as técnicas são altamente eficientes para estimar de forma robusta as proporções de variabilidade genética entre e dentro de populações de *Copaifera langsdorffii* (copaíba). Um resultado importante foi a forte congruência nas estimativas da decomposição da variabilidade genética entre e dentro das populações e da significância destas estimativas com os dois tipos de marcadores. Considerando este resultado e o fato de que a técnica de AFLP não depende de um desenvolvimento tecnicamente complexo e caro, esta técnica é a melhor opção para uma quantificação de variabilidade genética de forma rápida e a baixo custo. Além disso, os resultados de diferenciação entre e dentro de populações obtidos com AFLP e SSR foram semelhantes àqueles obtidos com isoenzimas para um grande número de espécies arbóreas tropicais (compiladas por Reis, 1996), o que valida a utilização de análise de DNA para estudos populacionais. Entretanto, vale ressaltar as diferenças na magnitude em estimativas dos parâmetros de variabilidade genética o que se deve provavelmente, às diferenças na base genética do polimorfismo de cada marcador e nas diferenças de amostragem do genoma.

Um aspecto importante a ser considerado na análise comparativa de técnicas de análise molecular é o sistema preferencial de cruzamento da espécie. No caso de espécies autógamas, por exemplo, pode-se assumir que todos os indivíduos que apresentam um determinado marcador dominante são na verdade homocigotos e que heterocigotos serão extremamente raros. Com isso, torna-se possível estimar exatamente a frequência alélica de marcadores dominantes e assim, comparar diretamente com estimativas de diversidade genética obtidas com marcadores co-dominantes. Buso (1998) verificaram uma forte congruência nas estimativas dos coeficientes de endogamia, em arroz, uma planta autógama, obtida com marcadores dominantes RAPD e isoenzimas. Marcadores AFLP e SSR foram comparados para a eficiência na avaliação da diversidade genética de culturas como *Glycine* sp. (Powell et al., 1996) e *Pisum* sp. (Lu et al., 1996), mostrando que uma maior diversidade genética é obtida quando utiliza-se marcadores multialélicos baseados em SSR. Isso seria esperado tendo em vista que para

AFLP somente podem ser detectados dois alelos por loco, sendo um a presença de uma banda e o outro a ausência. Já para SSR podem ser detectados diversos alelos em um loco e a seqüência simples repetitiva é naturalmente mais sujeita a mutações. Já, para copaíba, sendo esta uma espécie preferencialmente alógama, não é possível realizar esse tipo de comparação direta. A comparação torna-se possível somente para a congruência da decomposição da variância molecular. Os resultados deste trabalho indicam, portanto, que ambas as tecnologias são úteis para investigar os padrões de distribuição de variabilidade entre e dentro de populações para espécies autógamas, mas que somente marcadores co-dominantes e multialélicos vão permitir a estimativa de endogamia (F_{IS} e F_{IT}) e análises mais refinadas de parentesco.

A análise de polimorfismos de seqüência do cpDNA gerou um resultado diametralmente oposto àquele observado para o genoma nuclear. Conforme esperado para este genoma de herança uniparental e baixa taxa de mutação, a maior parte da variabilidade genética foi encontrada entre populações. O polimorfismo das seqüências amplificadas na região do intron do gene trnL(UAA) foi baseado principalmente na ocorrência da inserção/deleção contida em uma seqüência de 100 nucleotídeos. Embora a variabilidade de seqüência entre os haplótipos possa ter sido gerada por erros na adição de nucleotídeos na PCR que antecedeu a etapa do seqüenciamento, a diferença em nucleotídeos dos haplótipos de cada população variou entre zero a 10%.

Na análise de seqüenciamento da região do intron do gene trnL(UAA) do genoma de cloroplasto foi encontrada uma inserção/deleção de 21 nucleotídeos em todos os haplótipos da população 2 - Mata Tamanduá, a qual foi a principal responsável pela alta porcentagem da variabilidade encontrada entre todas as populações e entre as populações duas a duas (Tabela 1). Esta região foi citada por Taberlet et al., (1991), como sendo a região menos polimórfica entre as regiões não codificantes do cpDNA, porém indicada para estudos de população da mesma espécie. Segundo Palmer (1987), a ocorrência de mutações de comprimento pela inserção/deleção de novas seqüências, é muito freqüente, gerando seqüências pequenas de 10pb nas regiões não codificantes. McCauley (1994) obteve valores similares de diferenciação entre populações de *Silene alba* àqueles encontrados neste estudo com copaíba analisando cpDNA em região não codificante (intron). Outros trabalhos citados na revisão de McCauley et al. (1995), também encontraram níveis altos de diferenciação entre populações em até 100% na análise destas regiões (intron e espaçadores intergênicos).

Finalmente, a comparação dos valores de diferenciação entre populações estimados por cpDNA são dramaticamente maiores que os valores estimados por AFLP e SSR, mostrando claramente que o fluxo gênico via pólen é significativamente maior que o fluxo por dispersão de semente.

Os oito locos SSR utilizados na análise das populações detectaram níveis altos de diversidade alélica (número médio de 13 alelos/loco), e corroboraram para a aplicabilidade no entendimento da estrutura genética de populações. A diversidade genética, estimada pela heterozigosidade média esperada H_e foi de 88% (Tabela 2), indicando uma alta diversidade em *C. langsdorffii*, uma vez que a diversidade máxima possível com este número de alelos é de 92%. Esse valor de diversidade encontrado pela análise de oito locos SSR foi de quatro a 12 vezes superior aos dados obtidos com isoenzimas em diferentes espécies arbóreas relatados por Sheely & Meagher (1996) e Loveless et al. (1998). Comparações entre estimativas de diversidade obtidas com isoenzimas e com microssatélites tornam-se, entretanto, de difícil avaliação, tendo em vista a diferença fundamental na natureza da seqüência amostrada ao nível de DNA. Enquanto, isoenzimas são seqüências codificantes, microssatélites são regiões geralmente não codificantes e sujeitas a altas taxas de mutação, pela sua estrutura.

A estimativa da diversidade genética entre populações obtida pela estatística F de Wright, mostrou existir uma estruturação significativa entre as populações de *C. langsdorffii*. Observando o índice de fixação de Wright (\hat{F}_{IS}) de cada população e a aderência às proporções esperadas segundo HW na maioria das populações de copaíba, considerou-se que nas quatro populações estudadas, existe uma forte tendência à panmixia, portanto, $F_{IS} \cong 0$. Desta forma, foi estimada a taxa de cruzamento aparente da *Copaifera langsdorffii*, resultando em 100% de alogamia. A ocorrência dos alelos privativos a determinadas populações estudadas, reforçam a existência de diferenciação entre as populações (\hat{F}_{ST}), a possibilidade de estudos detalhados de parentesco e principalmente a necessidade em estimar adequadamente o tamanho efetivo da população visando sua conservação *in situ*.

A diferenciação (\hat{F}_{ST} de 0,0503) reduzida mas significativa obtida no estudo, demonstra a ocorrência de uma alta taxa de fluxo gênico entre as populações com média de 5 indivíduos/geração. Já o fluxo gênico via sementes (determinado pela análise do cpDNA), mostrou um baixo índice de migração por geração (0,2 migrante/geração), coerente com a característica de dispersão

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

barocórica das sementes de copaíba, que não se afastam muito da planta mãe. Estes resultados sugerem portanto, que o fluxo gênico entre estas quatro populações se dá principalmente via pólen. De acordo com Machado et al. (1992), os prováveis polinizadores de copaíba são abelhas (*Apis mellifera*). Embora Hamrick & Murawski (1990), relataram que a polinização indireta por abelha, pode alcançar a distância de 750 m em espécies arbóreas. Existem citações de que *Apis mellifera* pode voar aproximadamente 21-24 km em busca de néctar (Crane, 1985) e podem percorrer um raio de 10 km ao encontro de uma rainha (Wiese, 1985). Estas distâncias são compatíveis para que as polinizações tenham ocorrido ou estejam ocorrendo entre as populações distantes 9 - 30 km. Além disso, é perfeitamente possível que existam indivíduos adultos não amostrados entre as quatro populações que atuariam como veículos de fluxo gênico, mesmo que as abelhas não tenham longa autonomia de voo.

Em situações de baixa diferenciação e grande fluxo gênico entre populações amostradas, estas podem ser consideradas como única população, ou seja, uma metapopulação (Levin, 1970). Esta abordagem foi utilizada por McCauley et al. (1995) ao verificar uma baixa diferenciação entre populações, utilizando isoenzimas e cpDNA para a espécie herbácea *Silene alba* nos EUA. Neste estudo, os resultados suportam a hipótese da existência de uma metapopulação de copaíba no DF. Para esta metapopulação foi estimado o tamanho efetivo N_e , a partir da variância das frequências gênicas, obtidas por marcadores genéticos neutros e co-dominantes. O tamanho efetivo estimado para a metapopulação foi de 40, que na situação em análise corresponde a um número de censo de 96 indivíduos. Com um N_e igual a 40 indivíduos (tamanho genético), de acordo com Vencovsky & Crossa (1999), é possível afirmar que as estimativas dos coeficientes de endogamia de Wright são robustos para as populações do Distrito Federal e que não foram afetados por erros de amostragem.

Finalmente, com base no tamanho efetivo estimado neste estudo e considerando que em praticamente todas as 190 matas de galeria do DF podem ser encontrados indivíduos de copaíba, o número de populações a serem conservadas no DF para assegurar um $N_e = 500$ é igual a $S = 39,74$ ou seja cerca de 40 populações. O modelo utilizado nesta estimativa assume um número infinito de indivíduos por população. Do ponto de vista prático, entretanto, a conservação *in situ* poderia visar 40 populações, onde somados os indivíduos adultos e regenerantes fossem levantados cerca de 500 indivíduos. Isto seria

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

plenamente possível, uma vez que em estudos fitossociológicos de copaíba foi determinada a densidade de cerca de 50 indivíduos por hectare (Walter, 1997).

Conclusão

Este estudo permitiu determinar o tamanho efetivo em populações naturais de copaíba com base em dados genotípicos de marcadores neutros e co-dominantes. A recomendação que surge deste estudo é de se conservar cerca de 40 populações das 190 existentes no Distrito Federal para evitar a perda de variabilidade existente. Estudos da estrutura genética nos estratos de regenerantes (plântulas e juvenis) das mesmas populações, bem como a determinação precisa de parentesco entre regenerantes e adultos permitirá entender a dinâmica da manutenção da variabilidade entre gerações e possivelmente resultar em recomendações futuras sobre o manejo da regeneração.

Referências Bibliográficas

- AJMONÉ MARSAN, P.; CASTIGLIONI, P.; FUSARI, F.; KUIPER, M.; MOTTO, M. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. **Theoretical Applied Genetics**, v.96, p.219-227, 1998.
- ALDRICH, P.; HAMRICK, J. L.; CHAVARRIAGA, P.; KOCHERT, G. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragments population of tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology**, v.7, p.933-944, 1998.
- AZEVEDO, L. G. de; RIBEIRO, J. F.; SCHIAVINI, I.; OLIVEIRA, P. E. A. M. de. **Levantamento da vegetação do jardim botânico de Brasília**: Distrito Federal. Brasília: Fundação Zoobotânica do Distrito Federal, 1990. 92p.
- BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandes* and *E. urophylla*. **Theoretical Applied Genetics**, v.97, p.816-827, 1998.

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

BUSO, G. S. C. **Análise de espécies silvestres de arroz (*Oryza spp* nativas do Brasil): estrutura de populações, diversidade genética e relações filogenéticas utilizando marcadores moleculares.** 1998. 324f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

BYRNE, M.; MORAN, G. F. Population divergence in the chloroplast genome of *Eucalyptus nitens*. **Heredity**, v.73, p.87-92, 1994.

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

CERVERA, M. T.; GUSMÃO J.; STEENACKERS, M.; PELEMAN, J.; STORME, V.; VANDEN, B. A.; VAN MONTANGU, M.; BOERJAN, W. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici* - populina in *Populus*. **Theoretical Applied Genetics**, v.93, p.733-737, 1996.

CHASE, M. R.; KESSELI, R.; BAWA, K. S. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, v.83, p.51-57, 1996.

CIAMPI, A. Y.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. **Otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco e desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera langsdorffii* Desf. (Copaíba) Leguminosae - Caesalpinoideae.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 40p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa, 16).

COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v.83, p.748-756, 1999.

CRANE, E. O. **Livro do mel.** São Paulo: Nobel, 1985. 226p.

DOW, B. D.; ASHLEY, M. V.; HOWE, H. F. Characterization of highly variable (AG/CT)_n microsatellite in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. **Theoretical Applied Genetics**, v.91, p.137-141, 1995.

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

DOW, B. D.; ASHLEY, M. V. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. **Molecular Ecology**, v.5, p.615-627, 1996.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1987.

DUMOLIN-LAPÈGUE, S.; DEMESURE, B.; FINESCHI, S.; LE CORRE, V.; PETIT, R. J. Phylogeographic structure of White Oaks Throughout The European continent. **Genetics**, v.146, p.1475-1487, 1997.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p.479-91, 1992.

FAO. **Databook on endangered tree and shrub species and provenances.** Rome, 1986. 524p. (Forestry Paper, 77).

GAIOTTO, F. A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.842-849, 1997.

HAMRICK, J. L.; MURAWSKI, D. A. The breeding structure of tropical tree populations. **Plant Species Biology**, v.5, p.157-165, 1990.

ISABEL, N.; BEAULIEU J.; BOUSQUET J. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA in black spruce. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.92, p.6369-6373, 1995.

LEVIN, R. Extinction. In: GERSTENHABER, M., (Ed.). **Some mathematical problems in biology.** Providence, Rhode Island: American Mathematical Society, 1970. p.77-107.

LEVY, F.; ANTONOVICS, J.; BOYNTON, J. E.; GILLHAM, N. W. A population genetic analysis of chloroplast DNA in *Phacelia*. **Heredity**, v.76, p.143-155, 1996.

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0. [S.l.: s.n.], 1997.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L.; FOSTER, R. B. Population structure and mating system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. **Heredity**, v.81, p.134-143, 1998.

LU, J.; KNOX, M. R.; AMBROSE, M. J.; BROWN, J. K. M. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP and PCR-based methods. **Theoretical Applied Genetics**, v.93, p.1103-1111, 1996.

MACHADO, J. W. B.; ALENCAR, F. O. C. C. de; RODRIGUES, M. das G. R. **Árvores de Brasília**. Brasília: Governo do Distrito Federal, 1992. 100p.

MAGUIRE, T. L.; CORAN, J. G.; COLLINS, G. G.; SEDGLEY, M. Molecular analysis of interspecific and intergeneric relationships of *Banksia* using RAPDs and non-coding chloroplast DNA sequences. **Theoretical Applied Genetics**, v.95, p.253-260, 1997.

MARTINS NETTO, D. A. **Aspectos demográficos de quatro espécies florestais na mata de galeria da Reserva Genética do Tamanduá - Distrito Federal**. 1992. 95p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Departamento de Ecologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

MAUGHAN, P. J.; SAGHAIMAROOF, M. A.; BUSS, G. R.; HUESTIS, G. M. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. **Theoretical Applied Genetics**, v.93, p.392-401, 1996.

MCCAULEY, D. E. Contrasting the distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphism among local population of *Silene alba*: Implications for studies of gene flow in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.91, p.8127-8131, 1994.

MCCAULEY, D. E.; RAVEILL, J.; ANTONOVICS, J. Local founding events as determinants of genetic structure in plant metapopulation. **Heredity**, v.75, p.630-636, 1995.

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

MILBOURNE, D.; MEYER, R.; BRADSHAW, J. E.; BAIRD, E.; PROVAN, J.; POWELL, W. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. **Molecular Breeding**, v.3, p.127-136, 1997.

NEI, M. Genetic distance between populations. **The American Naturalist**, v.106, n.949, p.283-92, 1972.

PALMER, J. D. Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae. In: MACINTYRE, R., (Ed.). **Monographs in evolutionary biology: molecular evolutionary genetics**. New York: Plenum, 1985. p.131-240.

PALMER, J. D. Chloroplast DNA evolution and Biosystematic uses of chloroplast DNA variation. **The American Naturalist**, v.130, p.S6-S29, 1987.

PALMER, J. D.; ZAMIR, D. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.79, p.5006-5010, 1982.

PEREIRA, J. E. S.; BRASILEIRO, A. C. M.; FELFILI, J. M.; SILVA, J. A. da. Elaboração de uma tabela de volume comercial para a mata ciliar do Gama - DF com uso do tele-relascópio de Bitterlich. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 6, Nova Prata, RS. **Anais...** Nova Prata: Prefeitura Municipal, 1988. v.2. p.771-791.

PETIT, R. J.; KREMER, A.; WAGNER, D. B. Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. **Theoretical Applied Genetics**, v.93, p.392-401, 1994.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGE, S.; RAFALSKI, A. The comparison of AFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v.2, p.225-238, 1996.

REIS, M. S. **Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmiteiro (*Euterpe edulis* Martius)**. 1996. 210f. Tese (Doutorado) - Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

ROA, A. C.; MAYA, M. M.; DUQUE, M. C.; TOHNE, J.; ALLEN, A. C.; BORNIERBALE, M. W. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. **Theoretical Applied Genetics**, v.95, p.741-750, 1997.

SCHNEIDER, S.; KUEFFER, J.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **A software for population genetic data analysis**. [S.l.: s.n.], 1997.

SHEELY, D. L.; MEAGHER, T. Genetic diversity in Micronesian island populations of the tropical tree *Camposperma brevipetiolata* (Anacardiaceae) **American Journal of Botany**, v.83, n.12, p.1571-1579, 1996.

SLATKIN, M.; BARTON, H. E. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, v.43, p.1349-1368, 1989.

SMITH, D. N.; DEVEY, M. E. Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. **Genome**, v.37, p.977-983, 1994.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, O. S.; RANKER, T. A.; NESS, B. D. Chloroplast DNA Variation in a Wild Plant. *Tolmiea menziesii*. **Genetics**, v.121, p.819-826, 1989.

TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G.; BOUVET, J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, v.17, p.1105-1109, 1991.

VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. **Medidas de representatividade**. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 1999. Biowork.

VENCOVSKY, R. Biometrical approaches for molecular markers: estimation of effective population size. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY. **Abstracts...** [S.l.]: ESALQ/USP, 1997.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M. E.; LEE, T. V.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, p.4407-14, 1995.

Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA

WALTER, B. M. T.; PINHO, G. S. C.; SAMPAIO, A. B.; CIAMPI, A. Y. **Estrutura populacional de copaifera langsdorffii na Mata do Açudinho, Fazenda Sucupira, Brasília, DF**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1997. 8p. (EMBRAPA-CENARGEN. Comunicado Técnico, 22).

WHITE, G.; POWELL, W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology**, v.6, p.851-860, 1997.

WIESE, H. **Nova apicultura**. Porto Alegre: Agropecuária, 1985. 493p.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of population: variability within and among natural population**. Chicago: University of Chicago Press, 1978. v.4.

ZHU, J.; GALE, M. D.; QUARRIE, S.; JACKSON, M. T.; BRYAN, G. J. AFLP markers for the study of rice biodiversity. **Theoretical Applied Genetics**, v.96, p.602-611, 1998.

EMBRAPA
CENARGEN



*Recursos Genéticos
e Biotecnologia*

Variabilidade genética em ...

2001

FL-05454



CENARGEN- 22309-1