

**ANÁLISE GENÉTICA POPULACIONAL
DE *Tabebuia impetiginosa*
UTILIZANDO MARCADORES
MOLECULARES RAPD**



República Federativa do Brasil*Luiz Inácio Lula da Silva*

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*Roberto Rodrigues*

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**Conselho de Administração***José Amauri Dimázio*

Presidente

Clayton Campanhola

Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires**Dietrich Gerhard Quast**Sérgio Fausto**Urbano Campos Ribeiral*

Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa*Clayton Campanhola*

Diretor-Presidente

*Gustavo Kauark Chianca**Herbert Cavalcante de Lima**Mariza Marilena T. Luz Barbosa*

Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*Luiz Antonio Barreto de Castro*

Chefe -Geral

Clra de Oliveira Goedert

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

José Manuel Cabral de Sousa Dias

Chefe-adjunto de Comunicação e Negócios

Arthur da Silva Mariante

Chefe-Adjunto de Administração

**Boletim de Pesquisa
e Desenvolvimento 55**

**ANÁLISE GENÉTICA POPULACIONAL DE
Tabebuia impetiginosa UTILIZANDO
MARCADORES MOLECULARES RAPD**

**Ana Yamaguishi Ciampi¹
Vânia Cristina Rennó Azevedo²
Valci Pereira da Silva²**

**Brasília, DF
2003**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão

¹ Bióloga, PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Estudante de graduação UnB, estagiária Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Estudante de ensino médio, estagiário Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

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: Maria José de Oliveira Duarte

Membros: Maurício Machaim Franco

Regina Maria Dechechi G. Carneiro

Maria Alice Bianchi

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Arthur da Silva Mariante

Maria Fátima Batista

Supervisor Editorial: Maria José de Oliveira Duarte

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Tratamento de Ilustrações: Altevir de Carvalho Freitas

Editoração Eletrônica: Altevir de Carvalho Freitas

1ª edição

1ª impressão (2003): tiragem 150

Todos os direitos reservados.

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

C 565 Ciampi, Ana Yamaguishi

Análise genética populacional de *Tabebuia impetiginosa* utilizando marcadores moleculares RAPD / Ana Yamaguishi Ciampi, Vânia Cristina Rennó Azevedo, Valci Pereira da Silva. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.

18 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676-1340; 55)

1. *Tabebuia impetiginosa* 2. RAPD 3. Conservação I. Azevedo, Vânia Cristina Rennó. II. Silva, Valci Pereira da. III. Título IV. Série

CDD 634.9

SUMÁRIO

RESUMO	3
INTRODUÇÃO	4
MATERIAS E MÉTODOS	6
RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

RESUMO

Estudos de análise genômica têm sido feitos para espécies arbóreas nativas como o Ipê, com a finalidade de avaliar a variabilidade genética entre e dentro das populações naturais, com vistas a fornecer subsídios aos programas de conservação. *Tabebuia impetiginosa* – Bignoniaceae (Ipê-roxo) ocorre desde estados do Nordeste como o Piauí e Ceará, até o Sudeste e o Sul, tanto na mata pluvial atlântica como na floresta semidecídua e, ocasionalmente, no cerrado e na caatinga. Essa espécie é de grande importância econômica, podendo ser usada na construção e no paisagismo em geral. Sua importância ecológica está ligada principalmente ao fato de ser usada para compor reflorestamento. Um dos métodos de análise genética muito utilizado consiste na utilização de marcadores moleculares RAPD de amplificação ao acaso, dominantes, que utiliza primers curtos e de seqüência arbitrária. O polimorfismo se apresenta de forma binária, ou seja, pela presença ou ausência da banda. Baseado nisso, nossos estudos consistem numa análise genética de 6 (seis) populações de Ipê-roxo, das Florestas Estacionais Decíduas da Região do Vale do Paranã, GO, totalizando 164 indivíduos. Da seleção de 116 primers, foram escolhidos 32 primers com maior número de bandas polimórficas. Estes geraram 152 marcadores RAPD polimórficos, os quais foram analisados pelo programa NTSYS, utilizando o coeficiente DICE pelo método de agrupamento UPGMA. Nessa análise verificou-se uma similaridade de 60% e não foi evidenciado nenhum agrupamento consistente separando as populações mais perturbadas. As análises utilizando o Amova indicou que 93% da variabilidade genética está dentro das populações e somente 6% está entre as seis populações de Ipê. Esse resultado indica que a perturbação que vem sendo gerada nas populações de Ipê, ainda não causou alterações na estrutura genética da espécie.

Palavras-chave: *Tabebuia impetiginosa*, RAPD, conservação.

INTRODUÇÃO

O manejo florestal sustentado é a exploração ordenada das florestas naturais e plantadas, visando à produção contínua da madeira (Sebbenn, et al, 2000). Por isso, estudos de análise genômica têm sido feitos para espécies arbóreas nativas como a *Tabebuia impetiginosa* (Ipê-roxo) com a finalidade de avaliar a variabilidade genética entre e dentro das populações naturais, com vistas a fornecer subsídios aos programas de conservação e manejo sustentado, pois o componente genético é o fator responsável pelas diferenças em produtividade, adaptação e reprodução (Sebbenn, et al, 2000). *Tabebuia impetiginosa* - Bignoniaceae, possui alguns nomes populares, como: ipê-roxo, pau-d'arco-roxo, ipê-roxo-de-bola, ipê-una, ipê-preto, pau-cachorro (figura 1B). Possui entre 8 a 12 m de altura podendo atingir de 20 a 30 m no interior da floresta, com tronco de 60 a 90 cm de diâmetro. No Brasil ocorre desde a região Nordeste em estados como o Piauí e Ceará, até o Centro Oeste (Goiás) e Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) tanto na mata pluvial atlântica como na floresta semidecídua, e ocasionalmente no cerrado e na caatinga. Apesar dessa ampla distribuição, essa espécie se encontra ameaçada de extinção principalmente devido ao uso indiscriminado como planta medicinal. Sua madeira (figura 1D) é muito pesada (densidade 0,96 g/cm³), dura ao corte, de textura fina a média e resistente ao ataque de organismos xilófagos (Lorenzi,1992). *Tabebuia impetiginosa* é uma planta decídua durante o inverno, heliófita, característica da floresta semidecídua e pluvial. Apresenta ampla dispersão, porém descontínua em toda a sua área de distribuição. Ocorre tanto no interior da floresta primária densa, como nas formações abertas e secundárias. Floresce durante os meses de maio a agosto com a árvore totalmente despida de folhagem. Os frutos amadurecem a partir de meados de setembro até outubro (Lorenzi, 1992).

Essa espécie é apropriada para construções externas, como dormentes, cruzetas, postes, para esquadrias e lambris, para trabalhos de torno, confecção de artigos esportivos, como bolas de bocha e boliche, acabamentos internos, como

tacos e tábuas para assoalhos, degraus de escada e para carrocerias e instrumentos musicais.

A árvore é extremamente ornamental quando em floração (figuras 1A e 1B), prestando-se admiravelmente bem para o paisagismo em geral. É uma das espécies de ipê-roxo mais cultivadas para arborização urbana nas cidades do centro oeste do país. É também ótima para compor reflorestamentos destinados à recomposição vegetal de áreas degradadas de preservação permanente (Lorenzi,1992).

Um dos métodos de análise genética muito utilizado em estudos populacionais consiste na utilização de marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams *et al.* 1990). Esta tecnologia é muito utilizada na obtenção de informações na análise genômica. Utiliza um único *primer* ao invés de um par, e esse *primer* único tem seqüência arbitrária de modo que a seqüência alvo é desconhecida e irrelevante. Os marcadores RAPD se baseiam na amplificação de fragmentos de DNA e é vantajosa pela simplicidade e rapidez a baixos custos. Assim, grande quantidade de polimorfismo e segmentos de DNA são obtidos em curto espaço de tempo. Para que haja a amplificação de um fragmento RAPD duas seqüências de DNA complementares ao *primer* devem estar adjacentes (<4000 pares de base) e em orientação oposta, para permitir a amplificação pela DNA polimerase. A característica importante, e desvantajosa, deste tipo de marcador é o seu comportamento como marcador genético dominante (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A dominância neste caso não se refere à interação genética entre alelos de um mesmo loco e sim à interpretação relativa entre fenótipo e genótipo.

Baseado nisso, nossos estudos consistiram em uma análise genética de 6 (seis) populações de Ipê-roxo das Florestas Estacionais Deciduais da Região do Vale do Paranã, GO, com diferentes áreas de perturbação. O objetivo desse estudo é avaliar e quantificar a variabilidade genética existente entre os e dentro dos fragmentos de *Tabebuia impetiginosa* na região do Vale do Paranã (GO), com vistas à conservação.

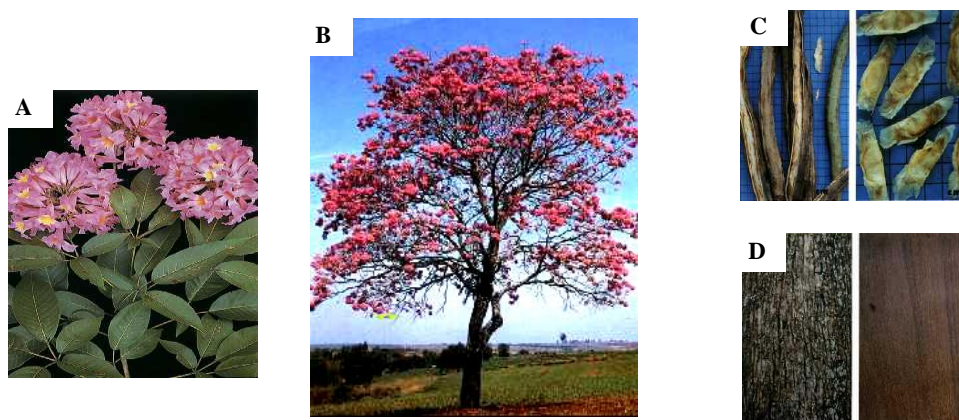


Figura 1: *Tabebuia impetiginosa*, 1A. Flor de *Tabebuia impetiginosa*, 1B. Árvore em floração, 1C. sementes e 1D. madeira. Fonte: Lorenzi, 1992.

MATERIAS E MÉTODOS

Áreas de Estudo

Após a prospecção na região do Vale do Paranã (GO) foram amostradas seis áreas de diferentes níveis de perturbação:

Fazenda Flor do Ermo Perturbada (FEP): 30 indivíduos

Fazenda São Domingos Perturbada (SDP): 29 indivíduos

Fazenda Olhos D'água (FOA): 30 indivíduos

Fazenda São Domingos (SD): 30 indivíduos

Fazenda Traçadal Intacta (TLI): 30 indivíduos

Fazenda Manguinha (FM): 15 indivíduos

Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de câmbios coletados de árvores adultas, e tratados com o protocolo de acordo com Machado, 2002:

- Discos de caules contendo câmbios foram coletados com o auxílio de um instrumento metálico cilíndrico com aproximadamente 1cm de diâmetro.
- Os discos foram armazenados em tubos eppendorfs de 2ml contendo 1ml de tampão de transporte (CTAB, etanol e ácido ascórbico) e foram

transportados em gelo. Ao chegarem ao laboratório, os tubos foram armazenados em um freezer a -20°C , para posterior extração de DNA

O protocolo com CTAB 2% (Ferreira & Grattapaglia, 1998) foi adaptado com o auxílio da máquina Fastprep – BIO 101 SAVANT, que realiza a trituração das amostras, como segue:

- 1) Discos de caule foram cortados em tamanho adequado (cerca de 200 mg), e colocados em eppendorf de 2 ml, nos quais já haviam sido colocados “beads” pequenos. Acima do material vegetal foram colocados “beads” maiores. A cada tubo foram adicionados 700 μl de tampão de extração CTAB 2% adicionado de β -mercaptoetanol (2 $\mu\text{l}/\text{ml}$).
- 2) Os discos de caule foram então triturados com o auxílio da máquina Fastprep – BIO 101 SAVANT por 20 segundos, e foram colocados em banho-maria à temperatura de 65°C durante o período entre quarenta e cinco minutos e uma hora. Durante a incubação os tubos foram agitados de dez em dez minutos com o fim de homogeneizar a suspensão.
- 3) Após o banho-maria os tubos foram esfriados à temperatura ambiente por alguns minutos e a cada tubo foram adicionados 600 μl de um solvente orgânico CIA (clorofórmico-alcool isoamílico - 24:1). Em seguida foram agitados para formar uma emulsão homogênea.
- 4) Os tubos foram centrifugados em uma microcentrífuga com a velocidade máxima de 12000 rpm durante dez minutos. Foram retirados da centrífuga de modo que as duas fases formadas não fossem novamente misturadas.
- 5) A fase superior foi pipetada para um novo tubo onde foram adicionados 400 μl de 2-isopropanol (-20°C), os tubos foram gentilmente agitados e incubados à temperatura de -20°C durante 30 minutos para precipitação dos ácidos nucleicos. Foram agitados cuidadosamente quando perfizeram 15 minutos de incubação.
- 6) Os tubos foram novamente centrifugados a 12000 rpm em uma microcentrífuga durante 15 minutos para que o DNA fosse precipitado, formando o *pellet*.
- 7) O passo seguinte foi a lavagem dos *pellets*, onde foi retirado cuidadosamente o 2-propanol e em seguida foram adicionados 500 μl de etanol 70%. Seguiu-se uma centrifugação de 5 min a 12000 rpm, e retirou-se cuidadosamente o álcool. Repetiu-se o procedimento mais uma vez. Para finalizar o processo de

purificação do DNA foram adicionados 500 μ l de etanol absoluto (100%), e uma última centrifugação de 5 min a 12000 rpm foi realizada. Retirou-se todo o etanol e os pellets foram colocados para secar durante a noite (*over night*).

- 8) Aos *pellets* secos foram adicionados de 20 μ l a 100 μ l de tampão TE contendo 10 μ g/ml de RNase, de acordo com o volume do *pellet*.

Quantificação do DNA

O DNA extraído foi quantificado em mini-gel de agarose 1%, visualizado em luz ultravioleta (Figura 2), comparando-se com λ DNA padrão nas concentrações conhecidas de 20, 50, 100 e 200ng/ μ l.

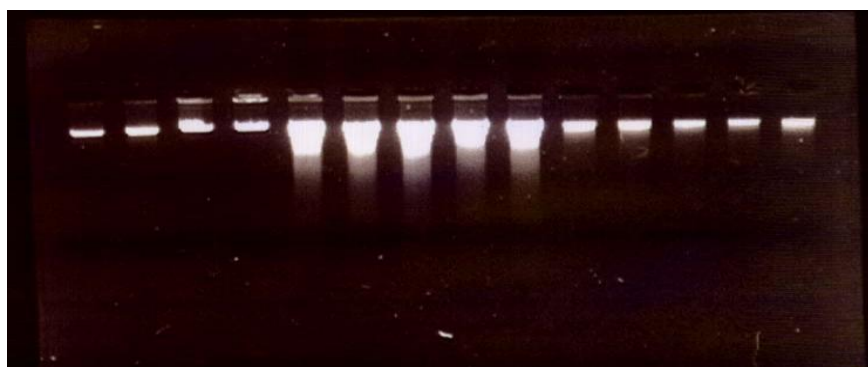


Figura 2: Quantificação de DNA em mini gel de agarose 1%. λ DNA em concentração de 20ng, 50ng, 100ng, 200ng nas primeira, segunda, terceira e quarta colunas, respectivamente. A partir da quinta coluna estão 2 μ l do DNA extraído de amostras de caule de *Tabebuia impetiginosa*.

Foram feitas diluições das amostras em água Milli Q estéril para uma concentração final de 1,0 ng/ μ l.

Seleção de PRIMERS

Inicialmente foi feita uma triagem (*screening*) para verificar a presença de fragmentos polimórficos robustos entre e dentro das populações (figura 3). Foram utilizados 2 indivíduos de cada população, totalizando 12 indivíduos por primer, em 116 primers distintos. Dessa seleção foram escolhidos 32 primers com maior número de bandas polimórficas. São eles: AA9, AI4, AI8, AI12, AI18, AX6, C2, C5,

C10, G5, M14, N11, O8, O14, O19, P1, P2, P11, P14, T8, T15, V12, W8, X1, X4, X6, X7, X14, Y14, Y16, Y19, Z15.

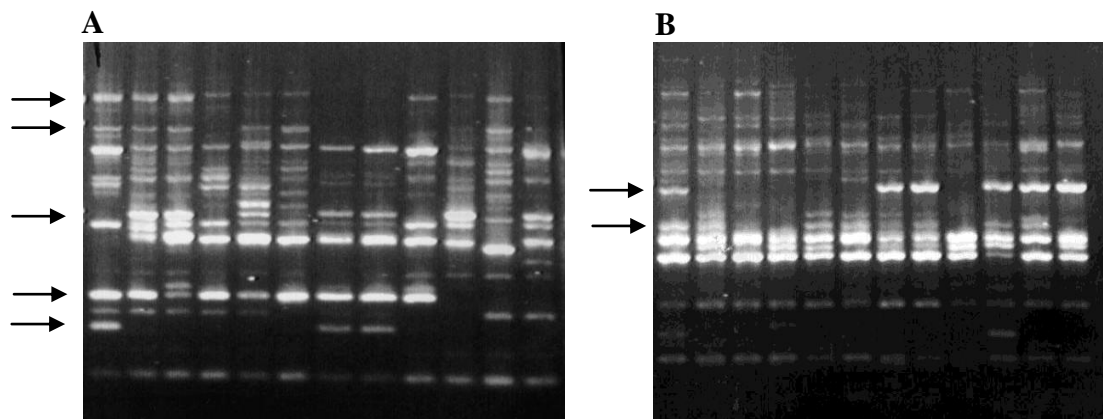


Figura 3: Triagem de primers em gel de agarose 1,5%. A) amplificação com o primer A112 e B) amplificação com o primer C2. Os indivíduos de cada fragmento utilizados para a triagem são, na seguinte ordem: FOA 6, FOA 22, TLI 1, TLI 30, FEP 8, FEP 22, FM 5, FM 9, SD 16, SD 19, SDP 29, SDP 30. As setas laterais indicam marcadores polimórficos selecionados.

Reação RAPD

A amplificação do DNA foi feita por RAPD uma técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que utiliza um único primer de cerca de 10 pb. Foram utilizados 3 μ l de DNA a 1 ng/ μ l e 10 μ l de um coquetel de reagentes (1,3 μ l Tampão 10x + 15 mM MgCl₂; 1,04 μ l dNTP 2,5 mM; 1,04 μ l BSA 2,5 mg/ml; 3,0 μ l Primer 10 ng/ μ l; 0,2 μ l Taq DNA polimerase 5 U/ μ l e 3,42 μ l de H₂O Milli Q estéril) e sobre a reação foram adicionados 50 μ l de óleo mineral puro, que impede que a reação evapore quando exposta a altas temperaturas no termociclador. O programa utilizado para essa PCR, descrito por Williams *et al* (1990), consiste de 41 ciclos (Desnaturação a 92°C por 1 min, anelamento a 35°C por 1min e extensão a 72°C por 2 min e um passo final de extensão de 5 min a 72°C).

As reações foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, onde os produtos da amplificação foram separados sob uma voltagem constante de 120 Volts durante 4 horas e 30 minutos. O DNA padrão, com fragmentos de tamanhos conhecidos utilizado foi Ladder 1kb.

A visualização das amplificações de fragmentos de DNA foi realizada com detecção em luz ultravioleta e os resultados foram fotografados por uma câmera acoplada a um sistema computadorizado denominado de Eagle Eye II – Stratagene.

Análise dos Dados

A análise dos marcadores RAPD polimórficos, foi feita em planilha no programa *Microsoft Excel* utilizando a relação indivíduo e *primers* com seus respectivos pesos moleculares com o intuito de gerar dados para uma matriz de similaridade a qual fornece as informações necessárias para os resultados finais. Os valores da planilha foram dados de acordo com a presença ou ausência de bandas. Quando um marcador está presente em um indivíduo, é fornecido ao mesmo, na planilha, o número 1 (um), caso contrário, ou seja, na ausência da banda, é fornecido o número 0 (zero) e no caso de dúvidas em relação ao fragmento fornecemos o número 9 (nove).

Feito isso, a matriz foi gerada utilizando o programa NTSYS versão 2.02pc (Rohlf, 1993), usando o coeficiente DICE pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted PairGroup Method, Arithmetic*) que considerou a média dos valores da matriz de similaridade.

A Amova (análise da variância molecular) foi realizada utilizando o programa Arlequin versão 2000.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso do câmbio para Extração

Observou-se pouca oxidação do material coletado, desde a coleta até a chegada ao laboratório, se comparado ao que ocorre com o transporte de folhas. Isso, conseqüentemente, permitiu a extração de DNA com pouca degradação e com menor quantidade de compostos secundários, logo de melhor qualidade, e em grande quantidade.

Isso pôde ser verificado não somente durante as extrações, cujas quantificações geraram bandas sem rastro, indicando que não houve degradação

do material causada por compostos secundários da oxidação e outras impurezas, mas também por meio de reações RAPD, para as quais não houve necessidade de purificar o DNA obtido. Ficaram evidenciadas a facilidade e a praticidade na coleta de material biológico, caule, em se tratando de arbóreas de grande porte, como o Ipê.

Ensaio RAPD

Os 32 primers selecionados apresentavam no mínimo três bandas polimórficas (figura 4), indicando alta diversidade genética entre e dentro das populações de Ipê. Estes primers com maior número de polimorfismo geraram um total de 152 marcadores RAPD.

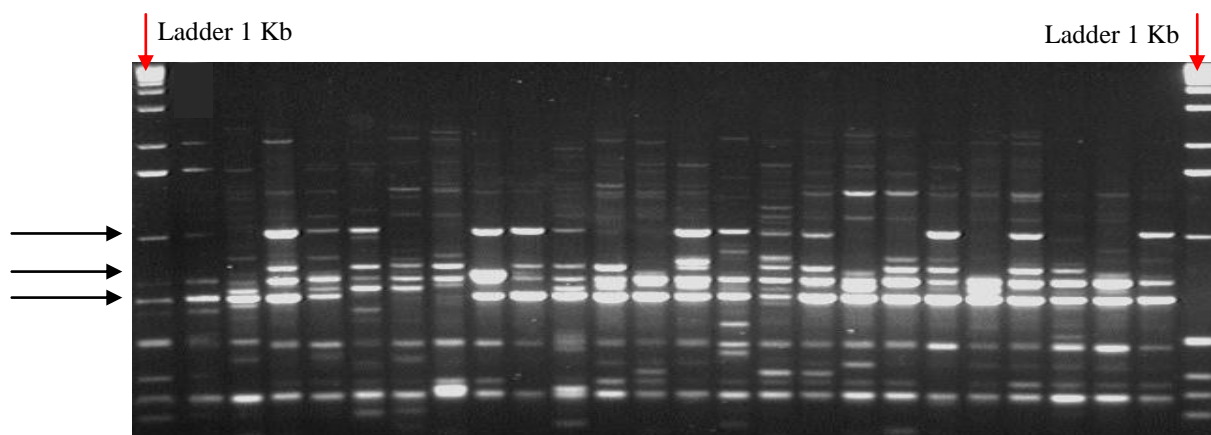


Figura 4: Reação RAPD em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio 1 mg/ml. Primer C10. As setas laterais pretas indicam bandas polimórficas, as setas superiores indicam o marcador Ladder 1 Kb.

Análise de Similaridade

Na análise pelo programa NTSYS verificou-se uma similaridade de 60% e não foi evidenciado nenhum agrupamento consistente separando as populações mais perturbadas da Região do Vale do Paranã, GO, com diferentes áreas de perturbação (figura 5). Isso indica que a variabilidade genética dessa espécie dentro de um mesmo fragmento é muita elevada, e que os riscos de extinção são pequenos, a não ser por uma ação devastadora que poderia ser causada por uma exploração desordenada e contínua.

Variabilidade Molecular

A AMOVA baseada nos marcadores RAPD quantificou as proporções de variabilidade molecular encontrada entre e dentro de fragmentos das Florestas Estacionais Decíduas da Região do Vale do Paranã (GO). A análise da variância molecular baseada nos marcadores RAPD, considerando os seis fragmentos de diferentes níveis de perturbação, mostra que a maior parte (93%) da variabilidade está dentro dos fragmentos, embora exista diferenciação entre as populações de 6%, $P < 0,001$. (Tabela 1). Este padrão de estrutura genética está de acordo com o que diz a literatura, que mostra que espécies arbóreas tropicais que têm dispersão de sementes e pólen a longas distâncias mantêm maior proporção de sua variabilidade genética dentro das populações (Sebbenn, 2000).

Tabela 1: Amova baseada nos Marcadores RAPD, indicando variabilidade genética entre e dentro das seis populações de *Tabebuia impetiginosa* estudadas.

Fonte de Variação	GL	Soma dos quadrados	Componente da Variação	% Total	P
Entre os Fragmentos	5	337,75	1,6274 Va	6,49	<0.001
Dentro dos Fragmentos	158	3702,41	23,4330Vb	93,51	
Total	163	4040,16	25,06		

Conservação de Ipê-roxo - *Tabebuia impetiginosa*

A magnitude dos resultados obtidos mostra que a variabilidade dentro das populações é muito maior quando comparada aos resultados obtidos entre as populações. Isso sugere que o risco de extinção não é elevado, já que dentro de um mesmo fragmento, independente do nível de perturbação, a variabilidade genética observada por meio destes marcadores é muito grande. A pequena variabilidade (6%) entre as seis populações, incluindo as perturbadas e não perturbadas indica que a intervenção causada nas regiões perturbadas, até este momento, não causou grandes mudanças na estrutura genética das populações.



Figura 5: Dendrograma montado em NTSYS dos 164 indivíduos das 6 populações de *Tabebuia impetiginosa*

A ocorrência de uma diferenciação entre as populações mesmo que pequena, sugere uma estratégia de conservação que inclua o máximo de fragmentos. No entanto para o desenvolvimento de estratégias nesse nível, talvez seja necessária a realização de estudos utilizando outras técnicas de análise molecular, que possam analisar tal variabilidade, considerando outras seqüências de DNA que não essas aleatórias utilizadas por RAPD, como é o que ocorre com marcadores moleculares microssatélites, por exemplo. Essas análises permitiriam estimar a variabilidade genética, analisando fluxo gênico, heterozigosidade, freqüências alélicas e taxas de endogamia, o que forneceria outros resultados para o desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo sustentável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA –CENARGEN, 1998.

Lorenzi, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP. Editora Plantarum, 1992.

Machado, F.R.; Vinson, C.C.; Silva, V.P., Ciampi, A.Y. **Extração de DNA genômico de câmbios de espécies madeireiras tropicais**. 53^o Congresso de Botânica, 22 a 26 de Julho de 2002, Recife, PE.

Rohlf, F. J. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate System. Version 2.9**. New York: Applied Biostatistics, 1993.

Sebbenn, A.M.; Seoane, C.E.S.; Kageyama, P.Y.; Vencovsky, R. **Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*)**. Scientia Florestalis, 2000 58:127-143.

Schneider S.; Roessli D. & Excoffier L. **Arlequin ver. 2.000: A software for population data analysis**. (software). Geneva: University of Geneva, Genetic and Biometry Laboratory, Switzerland, 2000.

Williams, J.G.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers**. Nucl. Acids. Res. 1990 18: 6531-6535.