

ISSN 1980-041X

Dezembro, 2008

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Florestas
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 40

Diversidade Genética em Populações Naturais de Vassourão-Branco (*Piptocarpha angustifolia*) por Marcador RAPD

João Antonio Pereira Fowler

Chirlei Glienke

Embrapa Florestas

Colombo, PR

2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, Km 111, Guaraituba,

83411 000 - Colombo, PR - Brasil

Caixa Postal: 319

Fone/Fax: (41) 3675 5600

Home page: www.cnpf.embrapa.br

E-mail: sac@cnpf.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Patrícia Póvoa de Mattos

Secretária-Executiva: Elisabete Marques Oaida

Membros: Álvaro Figueredo dos Santos, Dalva Luiz de Queiroz

Santana, Edilson Batista de Oliveira, Elenice Fritzsos, Jorge

Ribaski, José Alfredo Sturion, Maria Augusta Doetzer Rosot,

Sérgio Ahrens

Supervisão editorial: Patrícia Póvoa de Mattos

Revisão de texto: Mauro Marcelo Berté

Normalização bibliográfica: Elizabeth Denise Câmara Trevisan

Editoração eletrônica: Mauro Marcelo Berté

1ª edição

1ª impressão (2008): sob demanda

Todos os direitos reservados

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Florestas

Fowler, João Antonio Pereira.

Diversidade genética em populações naturais de vassourão-branco (*Piptocarpha angustifolia*) por marcador RAPD [recurso eletrônico] / João Antonio Pereira Fowler, Chirlei Glienke. - Dados eletrônicos. - Colombo : Embrapa Florestas, 2008.

1 CD-ROM. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Florestas, ISSN 1980-041X; 40)

1. *Piptocarpha angustifolia*. 2. Espécie nativa – Brasil. 3. Variabilidade genética. 4. Marcador molecular. I. Glienke, Chirlei. II. Título. III. Série.

CDD 634.973 (21. ed.)

© Embrapa 2008

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	12
Resultados e Discussão	16
Conclusões	28
Referências	28

Diversidade Genética em Populações Naturais de Vassourão-Branco (*Piptocarpha angustifolia*) por Marcador RAPD

João Antonio Pereira Fowler¹

Chirlei Glienke²

Resumo

Os projetos com espécies nativas dependem da disponibilidade de sementes e mudas nas quantidades requeridas e com a qualidade apropriada. O mercado, contudo, não oferece sementes de inúmeras espécies, e para a maioria inexistem estudos visando conhecer a distribuição espacial dos genótipos nas populações naturais, informação indispensável para formação de lotes de sementes com qualidade genética, entre as quais o vassourão-branco (*Piptocarpha angustifolia* Dúsen ex Malme). O vassourão-branco é comum nas clareiras, capoeirões e no estrato secundário da Floresta com Araucária. Além das aptidões madeireiras e para recuperação ambiental, apresenta potencial para compor sistemas silvipastoris. O objetivo deste trabalho foi quantificar a diversidade genética intra e inter-populacional. As árvores amostradas de vassourão-branco, das quais foram coletadas folhas para extração do DNA genômico, estão localizadas em fragmentos florestais em Curitiba e São José dos Pinhais, PR, e Rio Negrinho, SC. Para extração do DNA genômico, foram utilizadas duas folhas com tecido jovem, pesando aproximadamente dois gramas, que foram maceradas em almofariz após adição de nitrogênio líquido. A extração do DNA genômico das folhas do vassourão-branco foi eficiente com qualidade e nas

¹ Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*. fowler@cnpf.embrapa.br

² Bióloga, Doutora, Professora da Universidade Federal do Paraná. cglienke@ufpr.br

quantidades requeridas para execução da metodologia da PCR-RAPD. As diversidades genéticas entre as populações de Rio Negrinho, e Curitiba e entre São José dos Pinhais, e Rio Negrinho, foi moderada, contudo, entre Curitiba e São José dos Pinhais foi grande. A correlação entre a distância geográfica e dissimilaridade genética entre as populações foi baixa. Não houve correlação entre a distância física e a similaridade genética entre as árvores amostradas nas três populações. A maior parte da diversidade genética encontra-se dentro das populações.

Termos de indexação: Variabilidade genética, espécie nativa, marcador molecular.

Genetic Diversity on Natural Populations of *Piptocarpha angustifolia* by RAPD Marker

João Antonio Pereira Fowler
Chirlei Glienke

Abstract

Projects of forestation and reforestation with native species depend on the availability of seeds and seedlings in large quantities and of good quality. But in most cases there are no seeds readily available or studies that show the spacial distribution of genotype in natua populations of *Piptocarpha angustifolia* Dusén ex Malme, what would greatly improve genetic quality of seed lots. The *Piptocarpha angustifolia* is a specie of secondary stratum Araucaria forest, with high potential of use in environmental restauration programs, wood production and agroforestry systems. The objectives of this work were quantify the genetic diversity intra and inter populations. The trees of *Piptocarpha angustifolia* sampled, of which were collected leaves for extraction of DNA, are located in forest fragments in Curitiba and São José dos Pinhais, PR and Rio Negrinho, SC. For extraction of DNA were used two leaves weighing about two grams, which were macerated in mortar after addition of liquid nitrogen. The extraction of genomic DNA from the leaves of *Piptocarpha angustifolia* was efficient with quantity and quality for implementation of PCR-RAPD methodology. The genetic dissimilarity between the populations of Rio Negrinho, SC and Curitiba, PR and between São José dos Pinhais, PR and Rio Negrinho, SC was moderate. The genetic dissimilarity between Curitiba and São José dos Pinhais, PR was high. The correlation between the geographical distance and genetic

dissimilarity between populations was low. There was no correlation from physical distance and genetic similarity between the trees sampled in three populations. The most genetic variability was found within populations of *Piptocarpha angustifolia*.

Index terms: Genetic variability, Brazilian native species, molecular marker.

Introdução

O vassourão-branco é uma espécie perenifólia, secundária inicial, que ocorre preferencialmente na Floresta Ombrófila Mista, com registros de ocorrência na Floresta Ombrófila Densa e em associação com a Floresta Estacional Semidecidual. A espécie é heliófila e apresenta boa regeneração, tronco quase reto, fuste cilíndrico a irregular, podendo atingir 30 m de altura e 60 cm de diâmetro à altura do peito na idade adulta (CARVALHO, 2003). O vassourão-branco é tolerante à solos de baixa fertilidade e possui sistema radicular que atinge mais de 2 m de profundidade, o que o credencia para recuperação de terrenos erodidos, além de apresentar potencial para suplementação alimentar dos animais como forragem, pois suas folhas contêm de 12 % a 15 % de proteína bruta e 4 % de tanino (SEITZ, 1976). A madeira é utilizada para a fabricação de compensados industriais, preferencialmente como miolo, substrato para colagem de chapas finas de espécies decorativas e partes internas de móveis (LELLES, 1977). O vassourão-branco pode compor sistemas silvipastoris, para a proteção contra os excessos climáticos sobre os animais, além de propiciar receita extra pela retirada da madeira do sistema (SILVA, 1998).

Os projetos de florestamento ou reflorestamento com esta espécie dependem da disponibilidade de sementes e mudas nas quantidades requeridas e com a diversidade genética apropriada. O mercado não oferece sementes ou mudas de vassourão-branco e inexistem estudos sobre a estrutura genética das populações naturais da espécie, informação indispensável para o planejamento das coletas e formação de lotes de sementes com diversidade genética adequada.

A análise dos polimorfismos do DNA é um maneira eficiente para conhecer a distribuição da diversidade genética dentro e entre populações de plantas. O baixo custo e relativa facilidade de execução tornaram os marcadores RAPD uma ferramenta intensamente utilizada, especialmente nas espécies arbóreas, pelo longo tempo da experimentação convencional. Além das dificuldades para uso de marcadores microssatélites, os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) são muito aplicados para

investigação da diversidade genética em populações naturais e caracterização de coleções de germoplasma (REIS; GRATTAPAGLIA, 2003).

A técnica de RAPD demonstrou ser indicada para estudos de espécies desconhecidas geneticamente, por utilizar *primers* pequenos e de seqüência arbitrária, por requerer pequena quantidade de DNA para as análises e apresentar grande potencial para detectar polimorfismo genético, permitindo a obtenção rápida de resultados, além de apresentar custo baixo, tornando-se ferramenta acessível a muitos laboratórios (LACERDA et al., 2002).

Os estudos de diferenciação genética entre populações e espécies de *Taraxarum* pelo uso do RAPD foi eficiente, a despeito dos problemas de comparação das bandas devido ao fenômeno de diferenças de amplificação. A análise RAPD, não obstante, foi utilizada com sucesso na determinação de parentesco genético entre espécies de plantas apomíticas (REISCH, 2004).

O marcador RAPD foi utilizado com sucesso para caracterização da diversidade genética entre cultivares de *Olea europaea* L. subsp. *europaea*, pelo uso combinado com o marcador microssatélite, o que possibilitou ampla cobertura dos polimorfismos do genoma desta espécie, uma vez que os marcadores RAPD amplificam locos associados a características de interesse, enquanto que os marcadores microssatélite amplificam regiões hipervariáveis não codificadas do genoma (GEMAS et al., 2004).

A análise RAPD, embora apresente limitações teóricas e práticas em sua aplicação, ainda é amplamente utilizada em laboratórios de genética molecular por ser tecnicamente simples e revelar um grande número de marcadores genéticos moleculares. As limitações são minimizadas pela aplicação cuidadosa da técnica, pelo alto número de polimorfismos detectados e pela adoção de técnicas de análise dos resultados apropriadas (MUCHUGI et al., 2006).

A técnica molecular RAPD provou ser uma ferramenta valiosa na caracterização e avaliação da diversidade genética dentro e entre populações de várias espécies, com as vantagens da simplicidade de uso, baixo custo e pequena quantidade de material vegetal para sua execução (ZOGHLAMI et al., 2007).

A estrutura populacional refere-se à densidade e à distribuição dos indivíduos em cada faixa etária. Os sistemas de cruzamento e a variação genética são partes da estrutura populacional. As populações apresentam comportamento dinâmico em decorrência dos nascimentos e mortes dos indivíduos, sendo estes processos influenciados pelas interações entre os indivíduos e seus ambientes. A distribuição de uma população é sua abrangência geográfica, sendo determinantes habitat adequado, clima, topografia e tipo de solo, competidores, patógenos e barreiras. Os padrões de distribuição dos indivíduos numa população podem ser agrupados, no qual os indivíduos formam pequenos núcleos; homogênea quando estão uniformemente espaçados e; randômica, em que estão distribuídos sem qualquer dependência de proximidade com os demais (RICKLEFS, 2003).

As populações de algumas espécies arbóreas apresentam estruturas familiares, formando sub-populações em forma de manchas onde as freqüências alélicas tendem à homogeneidade e o parentesco interno apresenta-se acima do esperado pelas suposições de cruzamentos aleatórios, decorrente da distribuição das sementes próximas a árvore-matriz. Os estudos com várias espécies florestais relatam que a maioria delas apresentam mancha com raio de até 100 m, geralmente de 20 m a 50 m. O tamanho das manchas decorre da forma de dispersão das sementes (SEBBENN, 2002).

A diversidade genética entre populações de espécies florestais dos diferentes grupos sucessionais concentra-se principalmente dentro das populações. A distribuição da diversidade genética interpopulacional foi observada em várias espécies arbóreas, especialmente nas alógamas que possuem mecanismos eficientes de dispersão de pólen e de sementes. O fluxo gênico entre populações e entre indivíduos reduz as diferenças entre

populações por deriva genética e seleção, diminuindo a diversidade interpopulacional. Nas espécies arbóreas de ciclo de vida longo, e isoladas em fragmentos, o fluxo gênico reflete os acontecimentos passados quando eram unidas, sendo que após a fragmentação ocorre o aumento progressivo da diferença genética por deriva entre estas populações (KAGEYAMA et al., 2003).

Os estudos de diversidade genética em populações de plantas são prioritários pelas informações geradas sobre a capacidade de sobrevivência da espécie e de suas populações, diante das constantes alterações ambientais (PRATHEPHA; BAIMAI, 1999).

As populações com pequena diversidade genética estão em maior risco de extinção do que aquelas com maior diversidade genética (O'BRIEN; EVERMANN, 1988).

Os objetivos deste trabalho foram quantificar a diversidade genética intra e inter populacional de vassourão-branco em fragmentos florestais naturais de Curitiba e São José dos Pinhais, PR, e Rio Negrinho, SC.

Material e Métodos

As árvores onde foram coletadas as folhas de vassourão-branco para extração do DNA genômico estão localizadas em fragmentos florestais em Curitiba e São José dos Pinhais, PR, e Rio Negrinho, SC. A identificação detalhada das origens do material vegetal é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Municípios e locais de coleta das folhas de vassourão-branco para extração do DNA genômico.

Município/Estado	Local	Nº de árvores	Latitude	Longitude	Altitude (m)
Curitiba, PR	Parque Barigüí	30	25° 25' 54'' S	49° 18' 68'' O	934
São José dos Pinhais, PR	BR-376	30	25° 32' 05'' S	49° 12' 23'' O	906
Rio Negrinho, SC	BR-281	30	26° 15' 16'' S	49° 31' 06'' O	790

A coleta das folhas foi feita com o auxílio de podão nas árvores amostradas mais baixas e de estilingue com linha de nylon e corda nas mais altas. Após a coleta, as folhas foram transportadas até o Laboratório de Genética Molecular da *Embrapa Florestas* em Colombo, PR, onde permaneceram armazenadas em *freezer* a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração do DNA genômico.

Extração do DNA e condições de amplificação

O método utilizado para extração do DNA genômico das folhas de vassourão-branco foi uma modificação do protocolo desenvolvido por Cheung et al. (1993). A técnica preconiza o uso de concentração de sal muito alta no tampão de extração, o que elimina vários inibidores da PCR, tornando a ruptura do tecido e a extração do DNA um processo simples, rápido e de baixo custo.

Para extração do DNA genômico, foram utilizadas duas folhas com tecido jovem, pesando aproximadamente dois gramas, que foram maceradas em almofariz após adição de nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para o tubo de microcentrífuga de 2,0 mL, adicionados 900 μL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 35 mM EDTA; 1 M NaCl, 1 % polivinilpirrolidona-PVP) e 40 μL de SDS (*dodecyl sulfate sodium salt*) 10 %, colocado em banho-maria a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Adicionou-se 900 μL da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e centrifugou-se por 8 minutos a 3.200 G. Coletou-se 800 μL do sobrenadante e colocou-se em outro tubo de microcentrífuga de 2,0 mL, adicionou-se 520 μL de acetato de amônio 7,5 M, homogeneizou-se manualmente por inversão do tubo e centrifugou-se por 7 min. Transferiu-se 1 mL do sobrenadante para outro tubo de microcentrífuga de 2,0 mL e adicionou-se 700 μL de isopropanol e homogeneizou-se manualmente por inversão do tubo. Após a homogeneização, o conteúdo do tubo de micro centrífuga foi centrifugado por 12 min, descartado o sobrenadante, deixando ao fundo o pellet de DNA extraído. Adicionou-se ao pellet 1 mL de etanol 70 %, centrifugou-se por 5 min e descartou-se o sobrenadante. O pellet de DNA foi secado por 30 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e foi adicionado 50 μL de água ultra pura autoclavada para ressuspendê-lo.

A quantificação do DNA das amostras de vassourão-branco foi estimada através da comparação visual da intensidade de fluorescência das bandas com as do DNA do fago de concentração conhecidas, 5, 10 e 20 ng. μL^{-1} por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8 % (P/v), em corrida de 90 min a 100 V. A visualização também permitiu verificar a integridade do DNA extraído. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,05 %) diluído em tampão TBE 1X. Após as quantificações, cada amostra de DNA do vassourão-branco foi diluída para 1 ng. μL^{-1} para as reações de RAPD.

As reações de amplificação foram feitas em termociclador modelo Mastercycler Gradient 5331, marca Eppendorff, num volume de reação de 25 μL contendo: 1 ng DNA molde, 0,5 μM de *primer* (*Operon Technologies*), 0,8 μM de dNTP, 2,5 μL de tampão 10X, 1,5 mM de MgCl_2 , 2,5 unidades de TaqDNApolimerase e água ultrapura. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 92 °C por 4 min; 40 ciclos de 1 min a 92 °C, 1 min e 30 s a 40 °C, e 2 min a 72 °C. A extensão final foi de 5 min a 72 °C. Os *primers* utilizados para amplificação dos polimorfismos do vassourão-branco estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Relação dos *primers* utilizados na amplificação do DNA genômico do vassourão-branco.

<i>Primer</i>	Seqüência 5' ? 3'	CG %	Locos obtidos N°	Polimorfismo %
OPC-02	GTGAGGCGTC	70	10	100,0
OPB-04	GGACTGGAGT	60	10	90,0
OPC-05	GATGACCGCC	70	7	100,0
OPX-11	GGAGCCTCAG	70	8	87,5
OPX-05	CCTTCCCTC	60	11	100,0
OPB-01	GTTTCGCTCC	60	10	100,0
OPF-03	CCTGATCACC	60	10	90,0
OPC-06	GAACGGACTC	60	10	90,0
OPC-04	CCGCATCTAC	60	8	75,0
OPA-05	AGGGGTCTTG	60	10	100,0
OPC-15	GACGGATCAG	60	11	100,0
OPB-10	CTGCTGGGAC	70	11	100,0
Total			116	94,8

Os produtos de amplificação, repetidos duas vezes para cada árvore-matriz foram submetidos à eletroforese com corrida (3V/cm) em géis de agarose 1,5 % (P/v) em tampão TBE 1X. O DNA Ladder 1Kb (Invitrogen) foi usado como marcador de peso molecular. A triagem dos *primers* foi feita utilizando-se um indivíduo de cada população, selecionando-se 12 que apresentaram maior número e mais intensas bandas no gel para as análises genéticas.

Análise dos dados

A foto documentação dos géis foi realizada pelo *software* DigiDoc-it acoplado à câmara Olympus digital modelo C-3040200M, 3.3 megapixels no Laboratório do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

A análise dos dados foi feita com base nos polimorfismos gerados pelas bandas mais evidentes do marcador RAPD pela análise das fotos dos géis. Os dados foram interpretados como binários, gerando-se uma matriz, em planilha eletrônica, com a genotipagem dos indivíduos quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas. Os indivíduos foram agrupados com base no coeficiente de similaridade de Jaccard entre as árvores-amostradas de cada população pelo método UPGMA, permitindo a construção de dendrogramas. As matrizes e dendrogramas foram elaborados com o uso do *software* NTSYS 2.0 (ROHLF, 2000). A consistência dos agrupamentos entre indivíduos de cada população foi testada pela execução de 10.000 *Bootstrapp* por meio do *software* BOOD (COELHO, 2001). A análise de variância molecular (AMOVA) dos dados binários foi efetuada pela decomposição dos componentes principais entre e dentro das populações, conforme Excoffier et al. (1992), pelo *software* Arlequim (SCHNEIDER et al., 2000). Os cálculos da dissimilaridade genética foram elaborados conforme Nei e Li (1979). A correlação entre as matrizes de dissimilaridade genética e distância geográfica foi calculada pelo coeficiente de Pearson (r) entre as populações.

Resultados e Discussão

As análises de variância molecular (AMOVA) dos dados binários de 116 locos foram efetuadas pela decomposição de seus componentes entre e dentro das três populações, assim, 87,62 % da variabilidade genética encontram-se dentro das populações estudadas e 12,38 % entre as populações (Tabela 3). A diferenciação genética entre as três populações ($F_{st} = 0,12379$) é moderada conforme Wright (1951).

Tabela 3. Análise de variância molecular entre as três populações de vassourão-branco.

Fonte de Variação	G. L.	S. Q.	Variação %	Φ_{st}
Interpopulações	2	17451,556	12,38	0,1238
Intrapopulações	87	144914,933	87,62	0,8762
Total	89	162366,489	FST: 0,12379	p = 0,001

A AMOVA foi também efetuada comparando as populações duas a duas, para verificação dos índices de variabilidade genética nesta condição (Tabela 4), tendo-se constatado que entre a população de Rio Negrinho, SC, e de Curitiba, PR, os índices variaram pouco, tanto intra como inter populações, comparativamente à análise conjunta das três, indicando diferença moderada ($F_{st} = 0,12981$) segundo Wright (1951).

Tabela 4. Análise de variância molecular entre as populações de vassourão-branco de Curitiba, PR, e Rio Negrinho, SC.

Fonte de Variação	G. L.	S. Q.	Variação %	Φ_{st}
Interpopulações	1	9295,467	12,98	0,1298
Intrapopulações	58	98468,533	87,02	0,8702
Total	59	107764,000	FST : 0,12981	p = 0,001

A AMOVA entre as populações de vassourão-branco de São José dos Pinhais, PR, e Rio Negrinho, SC, revelou que a diversidade genética intra e inter populações foi 92,43 % e 7,57 %, respectivamente (Tabela 5), apresentou valores pouco diferentes daqueles observados nas análises entre as três populações conjuntas e entre as de Curitiba, PR, e Rio Negrinho, SC. O $F_{st} = 0,0757$ indica que a diferença entre as duas populações também é moderada, entretanto, mais próximas geneticamente, uma vez que $F_{st} > 0,05$ revela pouca diferença genética entre populações (WRIGHT, 1951).

Tabela 5. Análise de variância molecular entre as populações de vassourão-branco de São José dos Pinhais, PR, e Rio Negrinho, SC.

Fonte de Variação	G. L.	S. Q.	Variação %	Φ_{st}
Interpopulações	1	47,200	7,57	0,0757
Intrapopulações	58	791,800	92,43	0,9243
Total	59	839,000	FST:0,07571	p=0,001

O procedimento adotado de desmembramento da AMOVA foi eficiente para demonstrar que as populações de vassourão-branco de Rio Negrinho, SC, e São José dos Pinhais, PR, separadas geograficamente por 78,43 km são bastante semelhantes geneticamente. A AMOVA entre as populações de Curitiba e São José dos Pinhais, PR, revelou variabilidade genética intra e inter populacional de 15,84 % e 84,16 %, respectivamente (Tabela 6). O valor de $F_{st} = 0,1584$ indica diferença genética alta entre duas populações segundo Wright (1951), embora estejam próximas geograficamente (28,1 km) (Tabela 6). O valor de F_{st} , segundo Jenczewski et al. (1999), é superestimado ao se utilizarem marcadores RAPD para estimar as frequências alélicas.

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) entre as populações de vassourão-branco de Curitiba e São José dos Pinhais, PR.

Fonte de Variação	G. L.	S. Q.	Variação %	Φ_{st}
Interpopulações	1	11406,667	15,84	0,1584
Intrapopulações	58	99512,533	84,16	0,8416
Total	59	110919,200	FST:0,15844	p=0,001

Os resultados obtidos nas AMOVAS entre as três populações foram confirmados pelo BOOD-P, demonstrando que o maior índice de dissimilaridade genética, conforme Jaccard foi entre as populações de vassourão-branco de Curitiba e São José dos Pinhais, PR, e o menor foi entre São José dos Pinhais, PR, e Rio Negrinho, SC (Tabela 7).

Tabela 7. Matriz de dissimilaridade genética por *bootstrap* entre as três populações de vassourão-branco.

Populações	Coefficiente de Dissimilaridade
Curitiba x São José dos Pinhais	0, 877299
Curitiba x Rio Negrinho	0, 830947
São José dos Pinhais X Rio Negrinho	0, 824449

A Fig. 1 mostra a baixa correlação ($r = 0,2185$) entre distância geográfica e dissimilaridade genética entre as populações. Os resultados são respaldados por Schmidt (2000) ao afirmar que nas espécies existe uma ampla variação em termos de adaptação

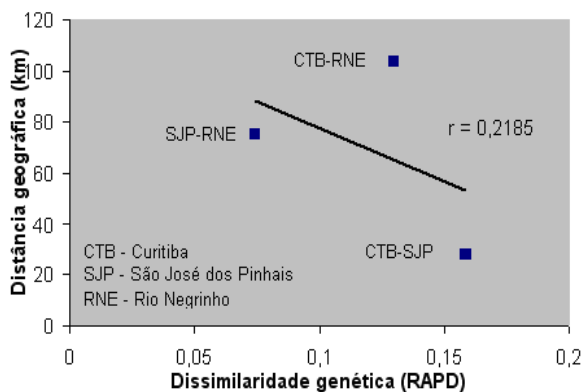


Fig. 1. Correlação entre distância geográfica e a dissimilaridade genética entre as três populações de vassourão-branco.

Na análise da distribuição bidimensional conjunta das três populações, pode-se perceber que a população de Curitiba, PR, apresenta maior dissimilaridade genética em relação às populações de São José dos Pinhais, PR, e Rio Negrinho, SC. Por outro lado, as populações de São José dos Pinhais, PR, e Rio Negrinho, SC, apresentam menor dissimilaridade genética.

A constatação acima mencionada é evidenciada pelo agrupamento dos indivíduos da população de Curitiba, PR, na extrema direita, enquanto que os indivíduos de outras populações estão misturados no meio e na extremidade esquerda (Fig. 2).

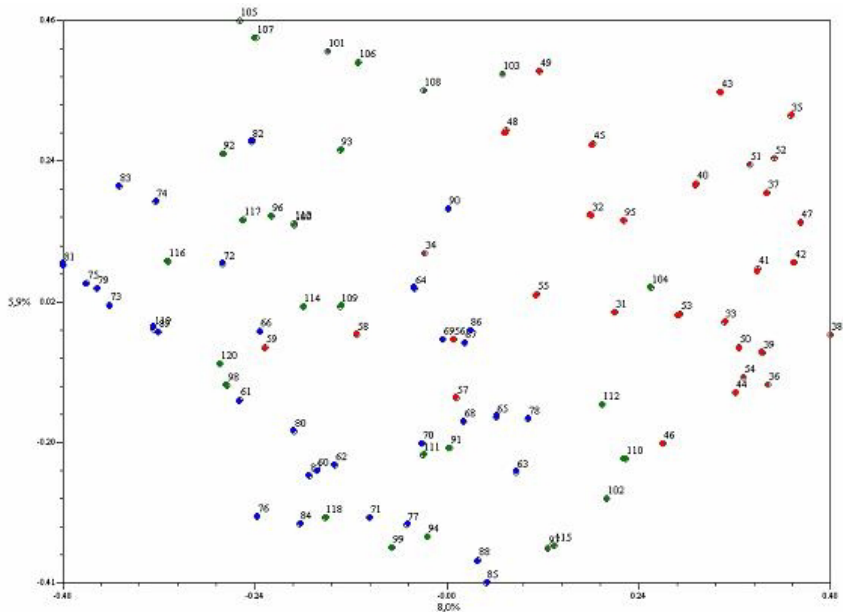


Fig. 2. Análise de componentes principais das árvores amostradas de vassourão-branco, baseada na similaridade genética nas três populações.

A população de Curitiba, PR, provavelmente foi isolada a mais tempo, por isso apresenta dissimilaridade genética maior, quando comparada com São José dos Pinhais, PR, e Rio Negrinho, SC. As três populações constituíam provavelmente uma metapopulação, subdivididas pela ação antrópica.

O trabalho de Neigel (1997) indica que o fluxo gênico atua na homogeneização das frequências alélicas entre as populações pequenas, mesmo que separadas geograficamente, elas comportam-se como uma grande população panmítica. As afirmações desse autor explicam a proximidade genética entre as populações de Rio Negrinho, SC, e São José dos Pinhais, PR, provavelmente sub-divididas pela ação antrópica decorrente da urbanização da sede desses municípios, causando a segmentação destas populações, tornando-as sub-populações em processo de diferenciação genética.

As diferenças genéticas entre as populações estudadas também encontram respaldo nos estudos de Sork et al., (1999), que preconiza o modelo de metapopulação, definida como o conjunto de sub-populações conectadas interagindo através do fluxo gênico e controladas por novas colonizações e extinções.

A diversidade genética inter populacional em espécies florestais é bastante variável, demonstrando que o sistema reprodutivo, a dispersão do pólen e das sementes, além do estágio sucessional, são fatores determinantes da estrutura genética populacional. As diferentes taxas de diversidade genética interpopulacional foram observadas em várias espécies, entre as quais *Myracrodruon urundeuva*, 8,00 % (REIS, 1999) e *Esenbeckia leiocarpa*, 10,06 % (CASTELLEN, 2000).

Os resultados das AMOVAS, caracterizando os níveis de diversidade genética intra e inter populacional, indicam que não houve redução da diversidade genética a despeito da ação antrópica, provavelmente pelo desconhecimento da potencialidades de uso da espécie, evitando com isso a eliminação de árvores de maior porte ou fuste reto, ou qualquer outra característica fenotípica de interesse comercial, assim, não ocorreu a

redução da base genética destas populações a despeito da divisão. Entretanto, a redução do número de indivíduos de uma população causa o aumento nas taxas de endogamia e conseqüentemente a redução da diversidade (SUN; WONG, 2001).

Os níveis de diversidade nas populações estudadas está dentro dos padrões para espécies com o mesmo sistema reprodutivo e pertencente ao mesmo grupo sucessional, de acordo com Kageyama et al. (2003), podendo inferir-se que não apresentam endogamia e conseqüentemente redução da diversidade.

Por outro lado, Amos e Balmford (2001) afirmam que as perdas da diversidade genética em populações florestais de até 25 % são toleráveis e não afetam sua capacidade de adaptação a mudanças ambientais.

A população de Rio Negrinho, SC, apresentou uma distribuição espacial com agrupamentos de indivíduos com diversos graus de parentesco. O coeficiente de correlação entre o dendrograma e os agrupamentos do *Boodstrap* foi ($r = 0,74927$). Os índices de dissimilaridade entre as árvores amostradas no dendrograma foram feitos baseados no coeficiente de similaridade de Jaccard convertido para dissimilaridade pela análise de *Boodstrapp*, comparando todas as árvores amostradas nesta população. A análise revelou que os indivíduos desta população apresentam uma distribuição agrupada com coeficiente de dissimilaridade entre elas variando de 0,38 % a 79,10 %. Esses agrupamentos demonstram claramente uma distribuição agregada das árvores nesta população de vassourão-branco. A existência destes agrupamentos decorre das características demográficas da espécie, como a forma de dispersão, em que grandes quantidades de sementes são depositadas nas vizinhanças das árvores-amostradas, aumentando a possibilidade de cruzamentos entre estas e seus filhos próximos. Os agrupamentos são formados por árvores com grau de parentesco variado, constituindo demes panmíticos (Fig. 3).

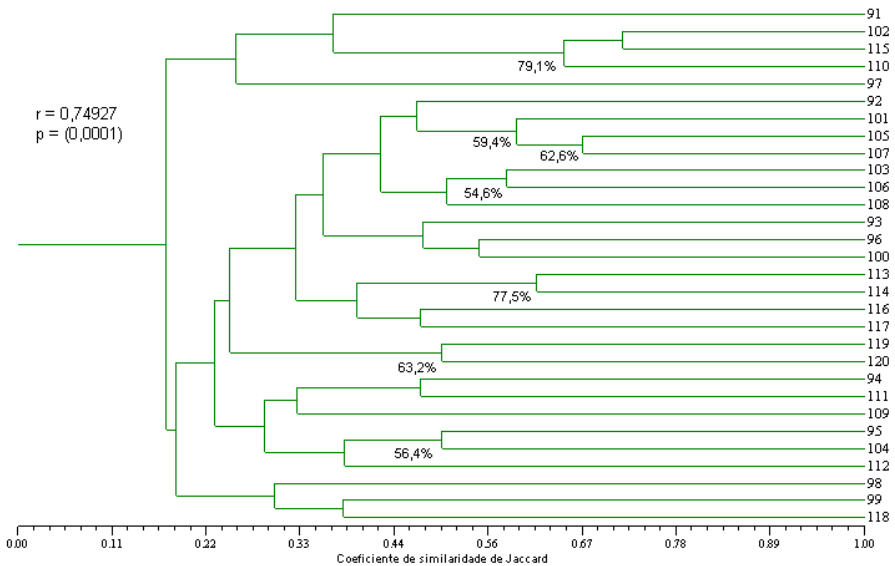


Fig. 3. Dendrograma de similaridades genéticas entre as árvores amostradas de vassourão-branco em Rio Negrinho, SC.

A distribuição espacial das árvores apresenta uma característica comum: árvores fisicamente próximas e geneticamente dissimilares e árvores fisicamente distantes e geneticamente similares, ou seja, caracterizada por indivíduos com variados níveis de parentesco, independentemente da distância física.

O coeficiente de correlação ($r = -0,18865$) entre as matrizes de similaridade genética e distâncias físicas das árvores amostradas confirma a inexistência de qualquer relação entre estas duas variáveis na população de vassourão-branco de Rio Negrinho, SC.

Os resultados obtidos também estão de acordo com as constatações de Hamrick e Godt (1989), de que a diversidade genética em espécies arbóreas concentra-se principalmente dentro das populações.

Assim, quantificar a diversidade genética entre os indivíduos nas populações representa a base para os trabalhos de conservação genética, produção de sementes e utilização comercial das espécies nativas florestais.

O dendrograma da população de vassourão-branco de São José dos Pinhais, PR, (Fig. 4) demonstra a distribuição agregada de indivíduos, semelhante à população de Rio Negrinho, SC. Analisando-se a Fig. 4, percebe-se que existem agrupamentos de árvores mais próximas geneticamente, entretanto, sem nenhuma relação seqüencial numérica, ou proximidade física, a exemplo do que ocorre na população de Rio Negrinho, SC.

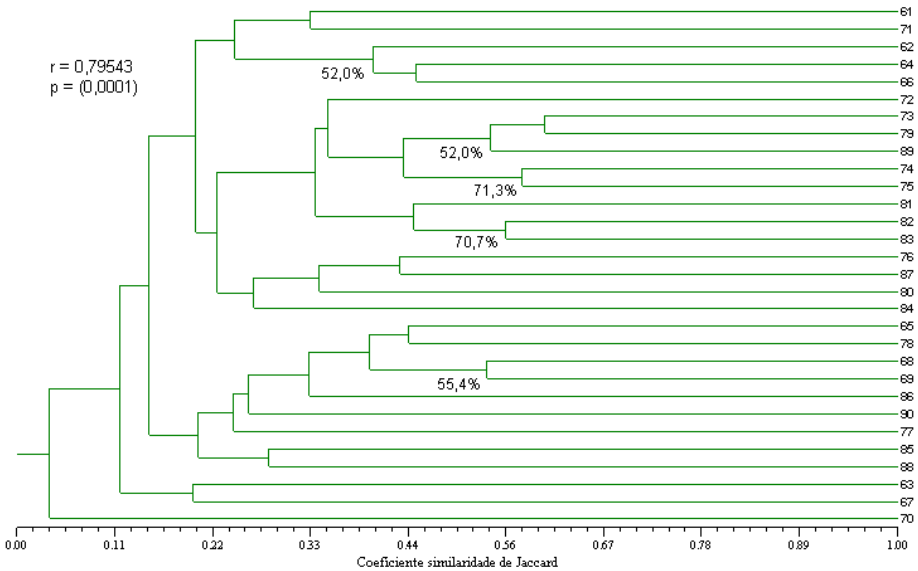


Fig. 4. Dendrograma de similaridades genéticas entre as árvores amostradas de vassourão-branco em São José dos Pinhais, PR.

O coeficiente de correlação ($r = -0,19480$) entre as matrizes de similaridade genética e distâncias físicas das árvores amostradas confirma a inexistência de qualquer relação entre essas duas variáveis, na população de vassourão-branco de São José dos Pinhais, PR.

O mesmo comportamento foi observado em *Cariniana legalis*, espécie com o mesmo sistema reprodutivo e pertencente ao mesmo estágio sucessional, conforme Sebbenn et al. (2001), confirmando as relações existentes entre as características das espécies de cada grupo sucessional sugeridas por Kageyama et al. (2003).

A distribuição espacial observada foi consequência do sistema reprodutivo e da dispersão de pólen e sementes da espécie, com grandes quantidades de sementes depositadas nas vizinhanças das árvores-amostradas, estabelecendo condições para cruzamentos entre indivíduos aparentados.

Os trabalhos de Bawa et al. (1985) indicaram que muitas espécies com flores bissexuais, como é o caso do vassourão-branco, apresentam incompatibilidade de auto-fecundação, no entanto, em outras, a auto incompatibilidade é fraca ou inexistente.

A distribuição agregada dos indivíduos com diversos graus de parentesco nas três populações estudadas de vassourão-branco permitiu inferir que o mecanismo de incompatibilidade à auto-fecundação na espécie é fraco ou inexistente.

A distribuição espacial dos genótipos na população de vassourão-branco de São José dos Pinhais, PR, demonstrou claramente que não existe padrão entre a distância física e dissimilaridade genética.

O dendrograma da população de vassourão-branco de Curitiba, PR, (Fig. 5) demonstra uma distribuição agregada dos indivíduos, semelhante às populações de Rio Negrinho, SC, e São José dos Pinhais, PR.

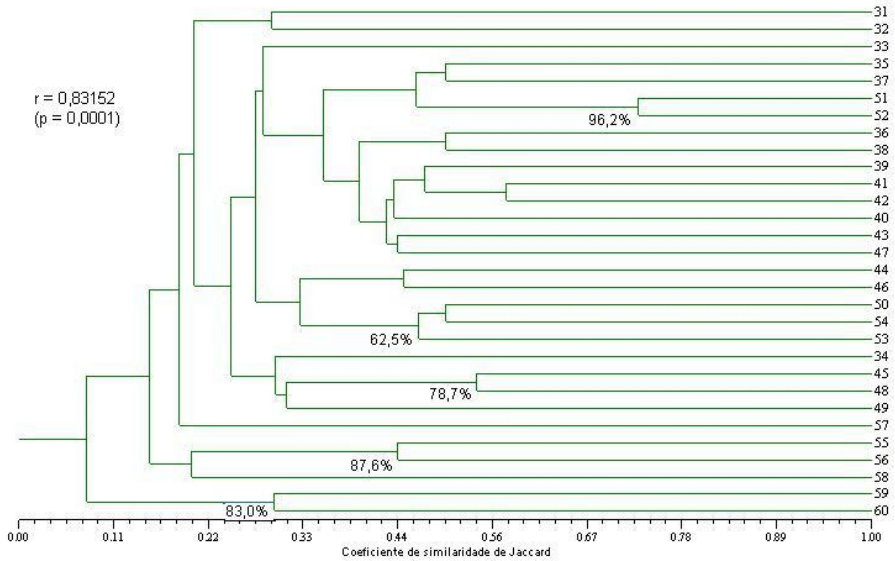


Fig. 5. Dendrograma de similaridades genéticas entre as árvores amostradas de vassourão-branco

O coeficiente de correlação entre o dendrograma e os agrupamentos do *Boodstrap* foi ($r = 0,83152$). Os índices de dissimilaridade entre árvores amostradas no dendrograma foram feitos baseados no coeficiente de similaridade de Jaccard convertido para dissimilaridade pela análise de *Boodstrapp*, comparando todas as árvores amostradas nesta população. A análise revelou que os indivíduos desta população também apresentam uma distribuição agrupada com variados graus de parentesco, com coeficiente de dissimilaridade variando entre 0,34 % e 96,20 %.

Nas três populações, ocorrem indivíduos geneticamente distintos dos demais e que devem ser selecionados para coleta de sementes, pois são importantes para formação de lotes de sementes com maior diversidade genética.

A população de Curitiba, PR, apresentou uma característica que a diferencia das demais, maior estruturação evidenciada pelo agrupamento

dos indivíduos na extrema direita, enquanto que os indivíduos de outras populações menos estruturadas estão misturados no meio e na extremidade esquerda (Fig. 6).

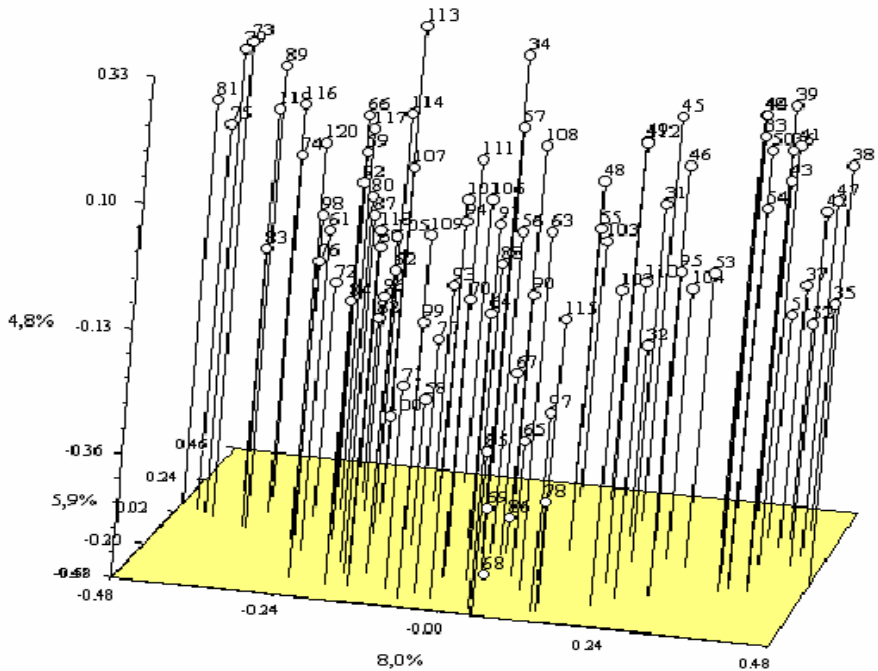


Fig. 6. Análise de componentes principais tridimensional das árvores amostradas de vassourão-branco, baseada na similaridade genética nas três populações.

O coeficiente de correlação ($r = -0,22921$) entre as matrizes de similaridade genética e distâncias físicas das árvores amostradas confirmou a inexistência de qualquer relação entre estas duas variáveis na população de vassourão-branco de Curitiba, PR, a exemplo do que ocorreu com as populações de São José dos Pinhais, PR, e Rio Negrinho, SC.

A característica comum nas três populações foi no número de árvores que compuseram os agrupamentos, confirmando que nas populações naturais de vassourão-branco, cujos principais polinizadores são as abelhas e

pequenos insetos com dispersão anemocórica, as distâncias de polinização e dispersão são pequenas, portanto, propícias à criação de grupos de indivíduos aparentados.

Os indivíduos de algumas espécies arbóreas apresentam uma distribuição espacial em forma de manchas onde o parentesco apresenta-se acima do esperado, decorrente da distribuição das sementes próxima à árvore matriz (SEBBENN, 2002).

Conclusões

As diversidades genéticas entre as populações de Rio Negrinho, SC, e Curitiba, PR, e entre São José dos Pinhais, PR, e Rio Negrinho, SC, foi moderada, contudo, entre Curitiba, PR, e São José dos Pinhais, PR, foi alta;

A correlação entre a distância geográfica e dissimilaridade genética entre as populações foi baixa;

Não houve correlação entre a distância física e similaridade genética entre as árvores amostradas nas três populações;

A maior diversidade genética de vassourão-branco está dentro das populações estudadas.

Referências

AMOS, W.; BALMFORD, A. When does conservation genetics matter? **Heredity**, Oxford, v. 87, n. 3, p. 257-265, 2001.

BAWA, K. S.; PERRY, D. R.; BEACH, J. H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees: 1. sexual systems and incompatibility mechanisms. **American Journal of Botany**, Oklahoma, v. 72, n. 3, p. 331-345, 1985.

CASTELLEN, M. da S. **Uso de marcadores RAPD e isoenzimáticos na quantificação da diversidade genética em populações naturais de *Esenbeckia leiocarpa* Engl.** 2000. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v. 1, 1039 p.

CHEUNG, W. Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B. S. **A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and others PCR analysis: PCR methods and applications.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. v. 3.

COELHO, A. S. G. **Dboot: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores (software).** Goiânia: Universidade Federal de Goiás: Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Vegetal, 2001.

EXCOFFIER, N. C.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analyses of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Baltimore, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

GEMAS, V. J. V.; ALMADANIM, M. C.; TENREIRO, R.; MARTINS, A.; FEVEREIRO, P. Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. **Genetic Resources and Crop Evaluation**, Dordrecht, v. 51, p. 501-511, 2004.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plants species. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources.** Sunderland: Sinauer Associates, 1989. p. 43-63.

JENCZEWSKI, E.; PROSPERI, J. M.; RONFORT, J. Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison to allozymes. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 8, p. 1317-1330, 1999.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENKOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 64, p. 93-107, 2003.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p. 87-92, 2002.

LELLES, J. G. de. **Adaptabilidade das madeiras de quatro espécies ocorrentes no sudoeste do Paraná, pouco conhecidas, na produção de compensados industriais.** 1977. 177 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MUCHUGI, A.; LENGKEEK, A. G.; KADU, C. A. C.; MULUVI, G. M.; NJAGI, E. N. M.; DAWSON, I. K. Genetic variation in the threatened medicinal tree *Prunus africana* in Cameroon and Kenya: implications for current management and evolutionary history. **South African Journal of Botany**, Pretória, v. 72, p. 498-506, 2006.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restrictions endonucleases. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, DC, v. 74, p. 5267-5273, 1979.

NEIGEL, J. E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review Ecology Systematics**, Palo Alto, v. 28, p. 105-128, 1997.

O'BRIEN, S. J.; EVERMANN, J. F. Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 3, p. 254-259, 1988.

PRATHEPHA, P.; BAIMAI, V. Genetic differentiation in Thai population of the rare species *Afgekia sericea* Craib (Leguminosae) revealed by RAPD-PCR assays. **Gene**, Napoli, v. 105, p. 193-202, 1999.

REIS, A. M. M. **Distribuição da diversidade genética em aroeira (*Myracrodruon urudeuva*-Anacardiaceae) por marcadores RAPD e polimorfismo de seqüência de cpDNA**. 1999. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

REIS, A. M. M.; GRATTAPAGLIA, D. RAPD variation in a germoplasm collection of *Myracrodruon urudeuva* (Anacardiaceae), an endangered tropical tree: Recommendatins for conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Witzzenhausen, v. 51, p. 529-538, 2003.

REISCH, C. Molecular differentiation between coexisting specie of *Taraxacum* sect. *Erythrosperma* (Asteraceae) from populations in south-east and west Germany. **Botanical Journal of The Linnean Society**, London, v. 145, p. 109-117, 2004.

RICKLEFS, R. E. Estruturas populacionais. In: _____. **A economia da natureza**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 236-246.

ROHLF, F. J. **NTSYS-P**: ver. 2.1 numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Stony Brook, 2000. 37 p.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **ARLEQUIN ver 2.000**: a software for population data analysis. Geneva: University of Geneva, GeneticS and Biometry Laboratory, 2000.

SCHMIDT, L. **Guide to handling of tropical and subtropical forest seed**. Humlebaek: Danida Forest Seed Centre, 2000. 511 p.

SEBBENN, A. M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamento com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 14, p. 115-132, 2002.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; ZANOTTO, A. C. S. Estrutura genética de jequitibá-rosa (*Cariniana Legalis* (Mart.) O. Ktze) por caracteres quantitativos e isoenzimas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 121-134, jun. 2001.

SEITZ, R. A. **Algumas características ecológicas e silviculturais do vassourão-branco (*Piptocarpha angustifolia* Dúsen)**. 1976. 114 f. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SILVA, V. P. da. **Modificações microclimáticas em sistema silvipastoril com *Grevillea robusta* A. Cunn. ex R. Br. no noroeste do Estado do Paraná**. 1998. 128 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SORK, V. L.; NANSON, J.; CAMPBELL, D.; FERNANDEZ, J. F. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. **Trends Ecology and Evolution**, London, v. 13, n. 5, p. 219-224, 1999.

SUN, M.; WONG, K. C. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, n. 12, p. 2180-2188, Dec. 2001.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGLER, S. P. **Isoenzimas: diversidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 186 p.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v. 15, p. 395-420, 1951.

ZOGLAMI, N.; CHRITA, I.; BOUAMAMA, B.; GARGOURI, M.; ZEMNI, H.; GHORBEL, A.; MLIKI, A. Molecular based assessment of genetic diversity within barbary fig (*Opuntia fucis indica* (L.) Mill.) in Tunisia. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 134-141, 2007.