

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Stryphnodendron adstringens* (Mart.)¹

Eliete Aparecida BRANCO¹; Léo ZIMBACK²; Adriano Balarin LIMA³;
Edson Seizo MORI⁴; Hideyo AOKI²

1 INTRODUÇÃO

A conscientização populacional, juntamente com algumas exigências legais, vem aumentando as iniciativas para a recuperação de áreas degradadas, principalmente nas zonas ciliares. As exigências legais incluem o Código Florestal (Lei nº 4771 – 15/09/65), em que foi instituído a zona ciliar como área de preservação permanente, e a Lei de Política Agrícola (Lei nº 8171 – 17/01/91), que determina a recuperação gradual de áreas de preservação permanente em um período de 30 anos. Dessa forma, houve aumento exponencial de iniciativas governamentais estaduais e municipais e não-governamentais (associações de reposição florestal, consórcios de bacias, empresas privadas e produtores rurais) para recuperação da flora do Estado. Tal iniciativa demonstra a importância de estudos de espécies nativas, como o barbatimão, que propiciarão informações importantes para a preservação da flora brasileira, especialmente do bioma Cerrado. Os remanescentes florestais dessa espécie podem desaparecer devido ao aumento da taxa de desmatamento para exploração de culturas comerciais, como eucalipto, *Citrus*, soja e cana-de-açúcar, e podem desaparecer em 2030 (Machado, 2006).

O barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart. - Leguminosae-Mimosoideae) é um arbusto ou árvore do cerrado, perinifólia com picos de floração, produção e queda das folhas no período entre julho e outubro (Almeida et al., 1998). Suas flores são nectaríferas, servindo na alimentação de pequenos insetos polinizadores, tais como *Apis mellifera*, *Bombus* spp., moscas Tabanidae e especialmente abelhas Meliponinae (Oliveira, 1991). Assim como o néctar, os frutos participam na alimentação de alguns animais (pequenos roedores), resultando na dispersão zoocórica de suas sementes (Oliveira, 1991). Economicamente, o barbatimão possui grande importância na indústria (fabricação de tintas) (Jacobson et al., 2005), na fitoterapia (contra úlceras, gonorréia, escorbuto, como antisséptico e cicatrizante) (Corrêa, 1978; Jacobson et al., 2005), em curtumes (Jacobson et al., 2005) e no setor florestal tem potencial para construção e torno por sua boa densidade e alta durabilidade (Almeida et al., 1998). No Pantanal é uma forrageira importante na dieta bovina local (Almeida et al. 1998).

A fim de gerar informações que auxiliem no estabelecimento de planos de manejo integrados com fins conservacionistas, enfocando o extrativismo de algumas espécies do Cerrado para fins comerciais, foi detectada a necessidade de informações sobre a variabilidade genética do barbatimão.

¹ Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Universidade do Sagrado Coração, Rua Irmã Armanda, 10-50 17011-160, Bauru, SP, Brasil. Bolsista de Iniciação Científica da CNPq. eliete.branco@gmail.com.

² Instituto Florestal, Rua do Horto 931, 02377-000 São Paulo, SP, Brasil. Izimback@terra.com.br.; hiaoki@uol.com.br.

³ Doutorando da Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', Caixa Postal 237, 18603-970, SP, Brasil. nativas@fca.unesp.br.

⁴ Prof. Dr. da Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' Caixa Postal 237, 18603-970, SP, Brasil. esmori@fca.unesp.br.

2 MÉTODO

2.1 Coleta das Amostras

Folhas jovens de até 30 indivíduos por população de *S. adstringens* foram coletadas em populações naturais de barbatimão estudadas em cinco locais diferentes: Floresta Estadual de Botucatu, Bairro 24 de Maio em Botucatu, Distrito de Rubião Júnior em Botucatu, área de tiro do Exército no município de Itu e Horto Florestal Andrade e Silva em Avaré.

2.2 Extração de DNA

Cerca de 100 mg de folhas frescas foram trituradas em moinho com CTAB. O material foi incubado em banho-maria por 1 hora a -60 °C. Após incubação utilizou-se clorofórmio:álcool isoamílico – 24:1 para separação de proteínas por centrifugação. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. O DNA foi precipitado com isopropanol a -20 °C por, no mínimo, 1 hora e centrifugado. O pellet foi lavado em etanol 70%. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco dissolvido em NaCl a 1 M e adicionado isopropanol para precipitar o DNA e separar a proteína. O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante lavado duas vezes em etanol 70% e uma vez em etanol absoluto. Os pellets foram secos e, em seguida dissolvidos em TE com RNase e incubados por 1 hora a -37 °C. A concentração de DNA foi analisada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm para realizar diluição a 4 ng/μL.

2.3 Amplificação e Eletroforese de Microssatélites

Neste trabalho avaliou-se a transferibilidade de 98 pares de primers desenvolvidos para espécies arbóreas em barbatimão, pertencentes a várias famílias e gêneros, para amplificação, polimorfismo e ausência de alelos nulos. Utilizou-se 0,3 μL de cada um dos primers na concentração de 10 pmoles/μL no PCR mix (dNTPs, Taq polimerase, tampão de reação, MgCl₂), 2 μL de DNA na concentração de 4 ng/μL e água deionizada completando um total de 10 μL, sendo este protegido contra evaporação por 15 μL de óleo mineral. A amplificação foi realizada no termociclador, submetidas a 92 °C por 2 minutos para denaturação, 45 ciclos de 1 minuto a -92 °C, 1 minuto para anelamento variando de 47 a -60 °C conforme o primer e 1 minuto a 72 °C para extensão do fragmento, e incubando 10 minutos a 72 °C para terminar de completar todas as fitas de DNA. Os fragmentos gerados por amplificação foram separados de acordo com o tamanho em corrida em gel de poliacrilamida a 6% em 0,5X TBE na corrente de 150 V. Após corrida, os géis foram corados com nitrato de prata e fotografados com câmera digital em um transiluminador para posterior análise.

2.4 Análises dos resultados

Com o uso do software Popgene, que se baseia na metodologia de Wright (1978), estimou-se o total de alelos por loco (t_a), número efetivo de alelos (n_e), o teste qui-quadrado para desequilíbrio de segregação (χ^2), heterozigosidade esperada pela segregação de Hardy-Weinberg (h_e), heterozigosidade de Nei (h_{nei}), ambas como medida de diversidade genética, heterozigosidade observada (h_o), porcentagem de locos polimórficos (P) e índice de fixação de Wright que mede o equilíbrio de endogamia ($F_{IS} = (h_e - h_o) / h_e$) e estatística F de Wright que mede efeito da endogamia entre (F_{ST}) e dentro de populações (F_{IS}). Para o cálculo de tamanho efetivo populacional N_e de cada população considerada isoladamente, utilizou-se a expressão $N_e = N / (1 + F_{IS})$ de Vencovsky (1997) e taxa aparente de cruzamento representada como $t = (1 - F_{IS}) / (1 + F_{IS})$. A estatística F de Wright foi comparada também com o método de Weir e Cockerham (1984), baseado em análise de

variância, para estimar a endogamia dentro (f) e entre populações (θ p) com 1.000 reamostragens para testar a significância a 95% de probabilidade utilizando o software TFPGA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Amplificação de Marcadores Microssatélites e Variação Genética

Neste trabalho, foram identificados 23 microssatélites polimórficos (SP06, SP09, SCU039, SCU045, SCU049, SCU052, SCU056, SCU062, EE02, EE45, EE54, LMCH12, LMCH14, EMBRA03, EMBRA06, EMBRA72, EMBRA210, EMPaS02, EMPaS04, EMPaS11, EMPaS12, EMPaS15 e Cjgsrr26), dentre os quais 10 não apresentaram alelos nulos quando foi realizada a genotipagem das populações: EMBRA03, EMBRA06, EMBRA72, EMBRA210, EMPaS02, LMCH12, LMCH14, SCU056, SCU062 e SP06. Em transferências de primers entre espécies é esperado que alguns locos não sejam conservados por consequência de mutações nos microssatélites. Essas mutações, além de poderem alterar a localização do microssatélite, também podem modificar as sequências repetitivas deste com relação à espécie original na qual foi desenvolvido o marcador (Peakall et al., 2008).

O número médio de alelos observados por loco foi de 6,1 alelos, variando de 4 alelos (EMBRA72) a 9 alelos (LMCH14) (Tabela 1). O número efetivo de alelos no loco EMBRA03 variou de 2,57 (Rubião Júnior) a 3,43 (Vinte e Quatro de Maio), no loco EMBRA 210 variou de 3,76 (Rubião Júnior) a 4,52 (Floresta Estadual de Botucatu), no loco EMBRA06 variou de 2,24 (Avaré) a 3,05 (Vinte e Quatro de Maio), no loco EMBRA72 variou de 2,66 (Avaré) a 3,15 (Floresta Estadual de Botucatu), no loco EMPaS02 variou de 2,60 (Avaré) a 5,06 (Rubião Júnior), no loco LMCH14 variou de 2,12 (Vinte e Quatro de Maio) a 4,24 (Floresta Estadual de Botucatu), no loco LMCH12 variou de 1,92 (Avaré) a 6,23 (Floresta Estadual de Botucatu), no loco SP06 variou de 2,42 (Avaré) a 3,05 (Rubião Júnior), no loco SCU56 variou de 3,00 (Avaré) a 4,00 (Itu) e no loco SCU62 variou de 2,91 (Rubião Júnior) a 4,29 (Floresta Estadual de Botucatu), mostrando maior diversidade alélica na Floresta Estadual de Botucatu e no Bairro Rubião Júnior, com menor diversidade alélica em Avaré e no Bairro Vinte e Quatro de Maio.

Tais variações (Tabela 1) indicam uma distribuição ampla de alelos com alta diversidade genética, obtendo-se, na média final, um número médio de alelos entre as populações de 4,52 e o número efetivo de alelos médio de 3,27. Pôde-se ainda verificar desequilíbrio de Hardy-Weinberg somente nos locos EMBRA210, LMCH14, LMCH12, SP06 e SCU62 de algumas populações (Tabela 1).

Tabela 1. Total de alelos (ta), número efetivo de alelos (n_e) e probabilidade do teste qui-quadrado (χ^2) dos locos conservados encontrados nas populações Floresta Estadual de Botucatu–SP (1), Itu–SP (2), Avaré–SP (3), Bairro 24 de Maio, Botucatu–SP (4) e Distrito de Rubião Júnior, Botucatu–SP (5) de *Stryphnodendron adstringens*.

Microsatélite		Populações					total
		1	2	3	4	5	
EMBRA 03	ta	5	3	5	4	4	5
	n_e	3,03	2,84	3,00	3,43	2,57	-
	χ^2	0,615	0,501	0,739	0,944	0,099	-
EMBRA 210	ta	5	5	5	5	4	6
	n_e	4,53	4,15	4,08	3,92	3,77	-
	χ^2	0,543	1,000	0,098	0,014*	0,003**	-
EMBRA 06	ta	5	4	3	4	4	5
	n_e	2,55	2,86	2,25	3,05	2,56	-
	χ^2	0,051	0,213	0,429	0,445	0,501	-
EMBRA 72	ta	4	3	4	4	3	4
	n_e	3,16	2,67	3,08	2,66	2,80	-
	χ^2	0,059	0,527	0,213	0,099	0,270	-
EMPaS 02	ta	4	3	5	4	6	6
	n_e	2,60	2,60	3,18	2,95	5,06	-
	χ^2	0,036*	0,213	0,213	0,099	0,612	-
LMCH 14	ta	8	4	7	5	4	9
	n_e	4,25	3,77	3,88	2,12	2,78	-
	χ^2	0,006**	0,427	0,035*	0,540	0,025*	-
LMCH 12	ta	8	6	4	4	5	8
	n_e	6,23	4,89	1,92	2,97	3,77	-
	χ^2	0,002**	0,098	0,338	0,059	0,134	-
SP 06	ta	4	3	3	3	4	5
	n_e	2,70	2,46	2,74	2,42	3,05	-
	χ^2	0,014**	0,764	0,213	0,317	0,445	-
SCU 56	ta	6	5	4	5	5	6
	n_e	3,05	4,00	3,00	3,77	3,45	-
	χ^2	0,256	0,281	0,317	0,370	0,065	-
SCU 62	ta	7	3	5	5	5	7
	n_e	4,29	2,99	3,77	3,23	2,91	-
	χ^2	0,038*	0,755	0,014*	0,213	0,501	-

* Teste significativo a 5%.

** Teste significativo a 1%.

3.2 Diversidade Genética e Coeficiente de Endogamia

A heterozigosidade observada entre as populações variou de 0,436 (Distrito de Rubião Júnior–Botucatu–SP) a 0,534 (Itu–SP) com uma média entre populações de 0,4758. Em populações de espécies tropicais para os locos de microssatélites, pôde-se observar variações desde 0,217 a 0,379 em *Antirhea borbonica* (Litrico et al., 2005) até 0,697 a 0,840 em *Caryocar brasiliense* (Collevatti et al., 2001). Dessa forma, os resultados estão dentro do que é observado nas espécies arbóreas tropicais. Além disso, os índices de fixação resultantes foram de 0,220 (Itu) até 0,362 (Distrito Rubião Júnior), com uma média de 0,291 entre populações. Os valores desses índices foram altos em comparação com populações de outras espécies vegetais, como *Eugenia dysenterica* (Zucchi et al., 2003) e *Swietenia macrophylla* (Novick et al., 2003). O tamanho efetivo por população variou de 73,41 (Distrito Rubião Júnior–Botucatu–SP) até 82,64 (Avaré–SP), e uma média de 77,63 correspondente a uma taxa de cruzamento aparente de 0,47, 0,65 e 0,55, respectivamente.

Os resultados mostraram um índice de heterozigosidade (Nei, 1978) variando de 0,699 (Avaré) a 0,727 (Distrito de Rubião Júnior) e juntamente com os valores de número efetivo (Tabela 1) indica que as populações possuem boa diversidade genética. Confirmada também pela porcentagem de locos polimórficos nas populações (100%), que não ocorre em outras espécies tropicais (Collevatti et al., 2001; Litrico et al., 2005; Novick et al., 2003; Zucchi et al., 2003).

Tabela 2. Heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade ou diversidade genética de Nei (1978) (H_{nei}), porcentagem de locos polimórficos (P), índice de fixação de Wright (1978) (F_{IS}), tamanho efetivo de 100 indivíduos da população (N_{e100}) e taxa de cruzamento aparente (t) incluindo todos os locos para as populações Floresta Estadual de Botucatu–SP (1), Itu–SP (2), Avaré–SP (3), Bairro vinte e quatro de Maio, Botucatu–SP (4) e Distrito de Rubião Júnior, Botucatu–SP (5) de *Stryphnodendron adstringens*.

	Populações					Média
	1	2	3	4	5	
H_o	0,462	0,534	0,503	0,444	0,436	0,476
H_e	0,703	0,684	0,660	0,661	0,681	0,678
H_{nei}	0,716	0,723	0,699	0,705	0,727	0,714
P	100	100	100	100	100	100
F_{IS}	0,343	0,220	0,210	0,323	0,362	0,291
N_{e100}	74,48	82,00	82,64	75,61	73,41	77,63
t	0,49	0,64	0,65	0,52	0,47	0,55

Pelo método de Weir e Cockerham (1984) obtivemos as estimativas de coeficiente de endogamia total (F) de 0,3623, endogamia entre populações (θp) de 0,0145 e coeficiente de endogamia da população (f) de 0,3529, com pequenos desvios em cada locus estudado. Apenas os valores de F e f foram diferentes de zero a 95% de probabilidade, significando que a maior parte da fixação alélica está dentro das populações. O método de Wright (1978) detectou pequena endogamia entre as populações, assim como o teste de χ^2 nos locos EMBRA 06, EMPaS 02 e SCU 06. Foram obtidos valores de endogamia total (Fit) de 0,348 e de endogamia dentro de população (Fis) de 0,298, mas a endogamia pela divisão entre populações (Fst) de 0,070 apresentou valor pouco maior, o que mostra pouco isolamento, como observado pelo valor de fluxo gênico de 3,343. Comparando-se o valor de θp com outras espécies tropicais como *Swietenia macrophylla* (Lemes et al., 2003) e *Symphonia globulifera* (Aldrich et al., 1998), *S. adstringens* apresentou um valor mais baixo. Além disso,

em outro trabalho com microssatélites, demonstrando tais coeficientes em *Eugenia dysenterica* (Zucchi et al., 2003), podemos verificar uma estrutura diferente ($F_{IS} = -0,017$, $F_{IT} = 0,238$ e $F_{ST} = 0,250$), sendo F_{IS} não significativamente diferente de zero embora também seja uma espécie do cerrado.

Esses dados mostram que ocorre apenas fixação alélica dentro das populações, com fluxo histórico de alelos entre elas, talvez por dispersão de pólen ou sementes muito eficientes a grande distância, mas também com boa variabilidade alélica dentro dessas populações pelos mesmos motivos. Com a taxa de cruzamentos médio de 0,55, a taxa de autofecundação aparente em *S. adstringens* seria de 0,45 como uma espécie intermediária, embora esta taxa possa ser atribuída também a cruzamentos aparentados.

4 CONCLUSÕES

De 98 primers de várias famílias botânicas testados para transferabilidade, 23 amplificaram e se mostraram polimórficos mas apenas 10 não apresentaram alelos nulos.

A espécie *Stryphnodendron adstringens* apresenta alta variabilidade genética dentro de populações.

O índice de fixação dentro das populações f é de 0,353 e fixação entre populações θ_p de 0,015 porém não significativo.

5 AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelos recursos para o projeto e ao CNPq pela bolsa PIBIC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRICH, P.R.; et. al. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 8, p. 933-944, 1998.

ALMEIDA, S.P.; SANO, S. M. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Brasília, DF: EMPRAPA Cerrado, 1998. p. 347-351.

COLLEVATTI, R.G.; GRATTPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 349-356, 2001.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. 6. ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978. v. B 1, 590 p.

JACOBSON, T.K.B. et. al. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 3, p. 163-169, 2005.

LITRICO, I. et.al. Spatial structure of genetic variation and primary succession in the pioneer tree species *Antirhea borbonica* on La Reunion. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 5, p. 1575-1584, 2005.

BRANCO, E.A. et al. Estrutura genética de populações de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.)¹

LEMES, M.R. et. al. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 11, p. 2875-2883, 2003.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.

NOVICK, R.R. et. al. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 11, p. 2885-2893, 2003.

OLIVEIRA, P.E. The pollination and reproductive biology of a cerrado woody community in Brazil. 1991. 156 f. Thesis (Ph.D.) - University of St. Andrews, St. Andrews.

PEAKALL, R. et. al. Cross species amplification of Soybean (*Glycine max*) simple-sequence-repeats (SSRs) within the genera and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol. Biol. Evol.*, v. 15, p. 1275-1287, 1998.

ROGERS, J.S. Measures of genetic similarity and genetic distance. In: . **Studies in Genetics**. Austin: University of Texas, 1972. v. 7, p. 145-153. (Publ., 7213);

VENCOVSKY, R. Biometrical approaches for molecular markers: estimation of effective population size. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY, 1997, Piracicaba. Proceedings. Piracicaba: ESALQ-USP: SUNJ, 1997. p. 21-22.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F – Statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.

WRIGHT, S. Evolution and the Genetics of Populations. Vol 4. Variability Within and Among Populations. Chicago University Press, Chicago, IL, 256 p.,1978.

ZUCCHI, M.I.et. al. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 229-457, 2003.