



## VARIABILIDADE GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL UTILIZANDO MARCADORES ISSR EM *Tibouchina papyrus*

Eliane Cotrim Batista<sup>1</sup>, Mariana Pires de Campos Telles<sup>1</sup>, Juliana Rosa Ramos<sup>1</sup>, Thannya Nascimento Soares<sup>1</sup>, Lucileide, José Alexandre Felizola Diniz-Filho<sup>2</sup>, Heleno Dias Ferreira<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Universidade Católica de Goiás, Setor Universitário, Rua 232, n°128, área V, 3° andar, sala 19, CEP: 74605-140, Laboratório de Genética e Biodiversidade, Goiânia, GO. e-mail: [tellesmpc@gmail.com](mailto:tellesmpc@gmail.com), <sup>2</sup>Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO).

**Termos para indexação:** ISSR, diversidade genética, *Tibouchina papyrus*.

### Introdução

Considerando o grande endemismo de espécies e à atual velocidade de devastação, o cerrado é considerado, desde o ano 2000, um dos 25 *hot spots* mundiais de diversidade biológica, sendo assim, prioritário para a conservação (Myers et al., 2000). Muitas espécies da flora do cerrado estão sendo ameaçadas de extinção, principalmente em se tratando daquelas que apresentam áreas endêmicas e de distribuição restrita a determinadas fitofisionomias do cerrado, ficando, portanto mais vulneráveis às modificações dos seus habitats.

Estudos genético-populacionais têm como principal objetivo avaliar e quantificar a variabilidade genética existente nos indivíduos, ao longo de sua distribuição geográfica. O conhecimento desta distribuição entre e dentro das populações naturais permite um melhor entendimento de como os fatores microevolutivos estão atuando em sua diferenciação, uma vez que teoricamente, quanto maior a variabilidade genética existente na população maior é a chance de perpetuação da espécie (Solé-Cava, 2001). Outro aspecto bastante relevante desses estudos é a avaliação de como ocorre o fluxo gênico, considerando as características dos eventos de polinização e dispersão de semente dentro das populações, bem como a avaliação do sistema reprodutivo predominante na espécie (Epperson, 2003).

A *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo é uma espécie pertencente à família Melastomataceae, que apresenta uma área de ocorrência natural restrita, limitando-se a algumas áreas de campo rupestre no cerrado. Existe relato na literatura da ocorrência nas Serras Dourada e dos Pireneus (Estado de Goiás) e uma comunicação pessoal da existência da espécie em Natividade no Tocantins (Almeida et al., 1998; Montoro e Santos 2004).

Os marcadores moleculares são os dados básicos para os estudos em genética da conservação (Solé-Cava, 2001; Eizirik, 1996) uma vez que permitem a caracterização da

variabilidade genética e da estrutura genética nas populações. A estrutura genética da população refere-se à heterogeneidade na distribuição dos genótipos e da variabilidade genética dentro e entre as populações, a fim de se descrever como essa informação pode ser útil para a conservação e o manejo das espécies (Robinson, 1998; Diniz-Filho & Telles, 2002). Os marcadores moleculares aliados aos métodos de análise espacial possibilitam inferências sobre os processos microevolutivos, atuando nas populações, de maneira mais informativa (Telles et al., 2001). Nesse contexto, o ISSR (*Inter-simple sequence repeats*) é um marcador altamente informativo multiloco (Powell et al., 1996), uma vez que o iniciador (*primer*) se baseia em um motivo de região microsatélite (di-,tri-,tetra-, ou penta-nucleotídeos) do genoma, oferecendo uma ampla cobertura de regiões neutras do genoma (Zietkiewicz et al., 1994; Reddy et al., 2002).

### **Material e Métodos**

Foram coletadas folhas de 70 plantas da Serra Dourada, nas proximidades do município de Mossâmedes-Goiás. A extração do DNA foi realizada a partir de uma modificação do protocolo de que utiliza o detergente catiônico CTAB (*Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*), descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998).

A partir dos DNA de três amostras, após quantificadas e diluídas, foram realizados testes, com diferentes temperaturas de anelamento, para os 20 iniciadores ISSR disponíveis. As amplificações via reação em cadeia da polimerase (PCR), dos fragmentos de DNA foram conduzidas utilizando-se o seguinte protocolo, para um volume final de 20 $\mu$ l: 9,34 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O milli-Q, 3 $\mu$ l de DNA (5ng/ $\mu$ l), 2 $\mu$ l de iniciador ISSR, 2,60 $\mu$ l de tampão da enzima (10X), 0,78 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 2,08 $\mu$ l de dNTP's (2,5 mM) e 0,2 $\mu$ l Taq polimerase (5U-Phoneutria). O programa no termociclador consiste nos seguintes passos: (1<sup>o</sup>) Desnaturação do DNA a 94°C por 1 minuto; (2<sup>o</sup>) a 94°C por 45 segundos; (3<sup>o</sup>) anelamento do iniciador a X°C por 30 segundos; (4<sup>o</sup>) extensão da molécula pela enzima *Taq polimerase* a 72°C por 1 minuto e 15 segundos (5<sup>o</sup>) 34 ciclos seguindo do 2<sup>o</sup> ao 4<sup>o</sup> passo; (6<sup>o</sup>) passo final de extensão de 5 minutos a 72°C para finalizar os produtos amplificados (Camacho e Linston, 2001). Para realizar a seleção dos melhores iniciadores foram testadas cinco temperaturas de anelamento,

a primeira igual a  $T_m$  (*melting temperature*) de cada iniciadores, as demais abaixo e acima a 10% e 25% da  $T_m$ .

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese horizontal, em gel de agarose 1,5% com tampão TBE 1X por 4 horas. Ao final do processo, o gel foi submetido à coloração com brometo de etídeo e, em seguida, colocado sob luz ultravioleta para visualização dos fragmentos e captura da imagem com o auxílio do fotodocumentador KODAK EDAS 120.

A matriz de dados binários, originada da codificação, foi submetida inicialmente a uma análise descritiva dos iniciadores com relação ao número total de locos, número de locos polimórficos e diversidade genética, utilizando o software POPGENE (versão 1.32). Posteriormente, foi avaliado o índice de similaridade de *Jaccard* entre os indivíduos e a matriz de resultante foi utilizada em uma análise de agrupamento com base no critério UPGMA (*Unweighted pair-group method by arithmetic averages*). Estas análises foram realizadas com o uso do programa NTSYS versão 2.02 (*Numerical taxonomy and multivariate analysis system*) (Rohlf, 1989). O padrão espacial da variabilidade genética presente nas plantas dentro da população foi avaliado no software SGS versão 1.0 (Degen et al., 2001).

## Resultados e Discussão

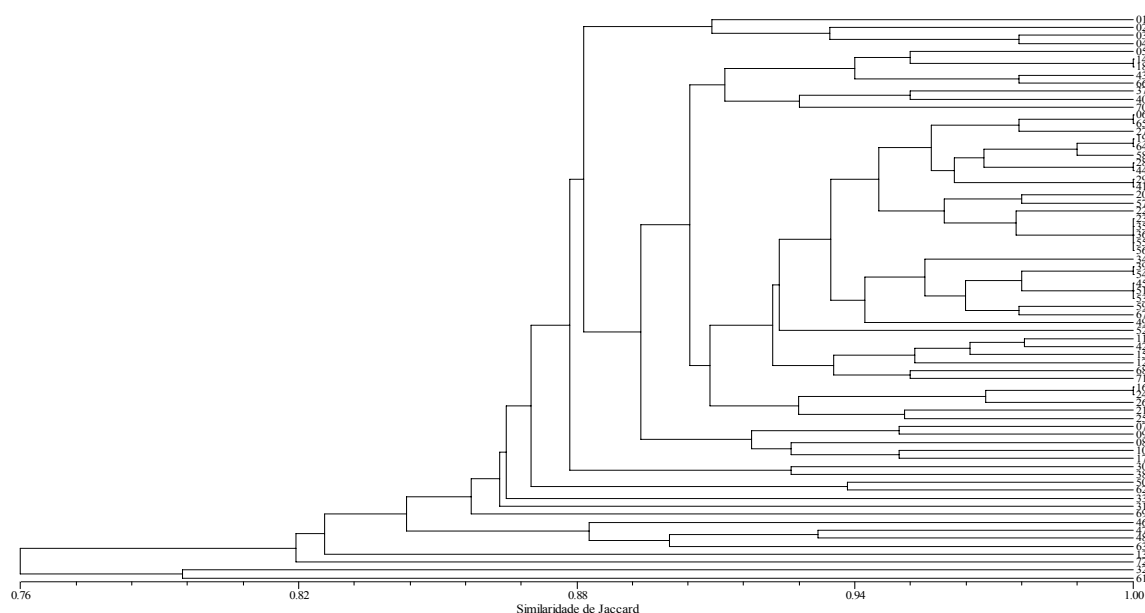
Dos 20 iniciadores ISSR testados 12 apresentaram um bom padrão de amplificação. A partir desses, seis foram selecionados e padronizados para a análise intra-populacional em *T. papyrus*, conforme temperaturas de anelamento descritas a seguir: ISSR868 (49,5°C), ISSR827 (58,7°C); ISSR861 (68,7°C), ISSR864 (51,2°C), ISSRK20 (48,7°C).

Os seis ISSR selecionados permitiram a codificação de 42 locos, variando entre 5 (ISSR861) e 10 (ISSRK20) por iniciador. O número total de locos polimórficos foi igual a 25, representando aproximadamente 60% dos locos, variando entre 2 e 5.

A diversidade genética de Nei (He) média foi igual a 0,23. Na população de *T. papyrus* analisada, o índice de Shannon (I) médio foi igual a 0,34. Este valor pode ser considerado razoável uma vez que o índice de Shannon varia de 0 a 1 e considera que quanto mais próxima de zero, mais baixa é a diversidade. Assim, a diversidade genética desta população pode ser considerada moderada com base nas duas estimativas, o que contribui

para a formação de novas combinações genéticas, aumentando a persistência desta subpopulação ao longo das gerações.

O método de agrupamento utilizado se mostrou adequado para a representação gráfica da similaridade genética entre as plantas, com um valor de correlação cofenética igual a 0,83. Ao observar o dendrograma (Figura 1) percebe-se a maioria dos pares de plantas apresentam índices de similaridade maiores do que 0,88, e que não há a formação clara de grupos.

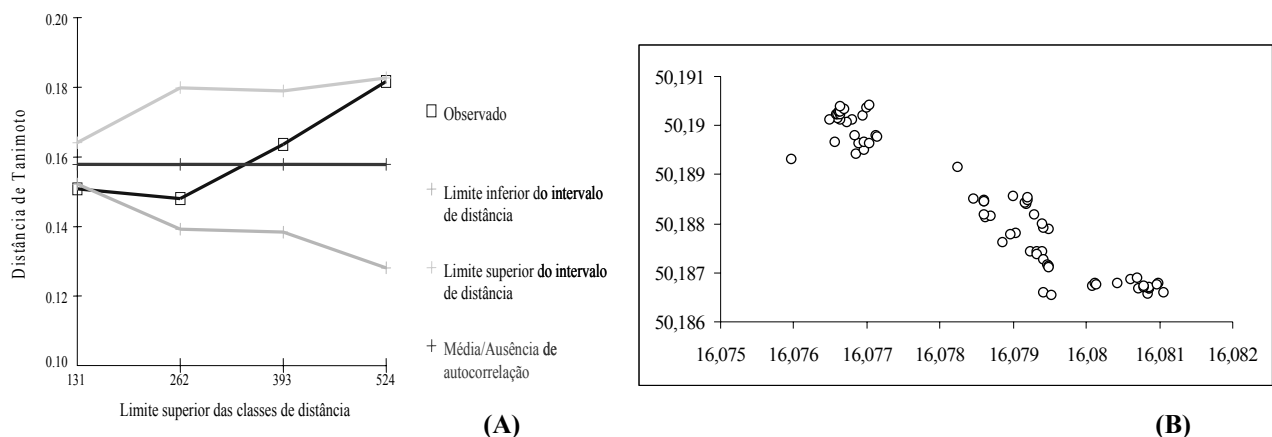


**Figura 1.** Dendrograma construído a partir da similaridade genética de Jaccard entre 71 plantas de *Tibouchina papyrus*, utilizando o critério de agrupamento UPGMA, com base em 42 locos ISSR.

Para a análise de estrutura genética espacial intrapopulacional os pares de plantas foram alocados em quatro classes de distância, por ter sido considerado um número adequado para representar os padrões de autocorrelação. A análise de padrão espacial da variabilidade genética entre as árvores de *T. papyrus*, apresentada na Figura 2A, apresenta valores significativos de autocorrelação espacial na primeira ( $p = 0,003$ ) e última ( $p = 0,03$ ) classes de distâncias, cujas amplitudes de distância geográfica são de 0 a 131 m e de 393 a 524 m, respectivamente e os valores de distância genética média nestas classes são de 0,15 e 0,18. O formato do distograma sugere a formação de um “cline” de variação, em que plantas mais próximas geograficamente são mais parecidas geneticamente e as mais distantes são menos parecidas geneticamente.



Uma das interpretações para este resultado é a própria distribuição espacial em agregado das plantas (Figura 2B), que apresenta um índice de agregação (R) igual a 0,35. Para este modo de distribuição espera-se que a distribuição geográfica exerça um papel importante na intensidade de fluxo gênico entre plantas, fazendo com que as mais próximas geograficamente tornem-se mais parecidas geneticamente.



**Figura 2.** (A) Distograma construído a partir das distâncias genéticas médias entre 71 plantas (*Tibouchina papyrus*) distribuídas em quatro classes de distâncias geográficas. (B) Distribuição espacial das 71 plantas de pau-papel (*Tibouchina papyrus*) coletadas na Serra Dourada - GO.

### Conclusões

Os resultados obtidos mostraram que os marcadores ISSR podem ser mais uma alternativa de detecção de variabilidade genética em espécies ainda pouco conhecidas e que não dispõem de marcadores espécie-específicos, assim como o RFLP e RAPD. Quando comparado aos outros marcadores multilocos, como por exemplo o RAPD, apresenta maior especificidade de sítio de anelamento, uma vez que os iniciadores são compostos pelo dobro de nucleotídeos, o que permite a padronização em temperaturas de anelamento mais altas, além de amplificar uma sequência que se encontra entre duas regiões microssatélites.

A diversidade genética encontrada, para os seis iniciadores ISSR avaliados, pode ser considerada moderadamente alta, o que, em teoria, pode possibilitar, juntamente com os outros determinantes ecológicos da estrutura genética, uma persistência da população ao longo das gerações. Além disso, o padrão de distribuição espacial dos indivíduos, em agregado, explica boa parte do padrão espacial intrapopulacional da variabilidade genética nessa população de *Tibouchina papyrus*.



### Referências bibliográficas

- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.; E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. p.156-161.
- CAMACHO, F.J. e LINSTON, A. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR). **American Journal of Botany**, p. 1065-1070. 2001.
- DEGEN, B.; PETIT, R.; KREMER, A. SGS - Spatial Genetic Software: A computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structures of individuals and populations. **Journal of Heredity**, p. 447-448. 2001.
- DINIZ-FILHO, J.A.F.; TELLES, M.P.C. Spatial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations. **Conservation Biology**, v. 16, p. 924-935. 2002.
- EIZIRIK, E. Ecologia Molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Genetics and Molecular Biology**, v. 19, p. 23-29. 1996.
- EPPELSON B.K. **Geographical Genetics**. Princeton University Press, New Jersey. 2003.
- FERREIRA, M.E. e GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa/Cenargen, 1998. 220p.
- MONTORO, G.R.; Santos, M.L. **Fenologia e Biologia Reprodutiva de *Tibouchina papyrus* (Pohl.) Toledo no Parque estadual de Serra dos Pirineus**. 2004. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Estadual de Goiás, Anápolis.
- MYERS, N.; MITTERMEIER R.A.; MITTERMEIER C.G.; FONSECA, G.D. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, p. 853-858. 2000.
- POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in plant science**, v.1, p.215-222. 1996.
- REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, p.9-17. 2002.
- ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. (Ed). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: Ed. UFV, 1998. p. 329-380.
- SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001. p. 172-192.
- TELLES, M.P.C.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; COELHO, S.G.; CHAVES, L.Z. Autocorrelação espacial das frequências alélicas em subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC., Myrtaceae) no sudoeste de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, p. 145-154. 2001.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprint by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, p. 176-183. 1994.