



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

ALESSANDRA ABREU RODRIGUES VIEIRA

**Diversidade e estrutura genética de *Astronium concinnum* Schott e
Senefeldera verticillata (Vell.) Croizat, espécies arbóreas da Floresta
Atlântica, ES**

**ALEGRE - ES
2017**

ALESSANDRA ABREU RODRIGUES VIEIRA

Diversidade e estrutura genética de *Astronium concinnum* Schott e *Senefeldera verticillata* (Vell.) Croizat, espécies arbóreas da Floresta Atlântica, ES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como pré-requisito para obtenção de título de Doutora em Genética e Melhoramento.

Orientador: Dr. Marcos Vinicius Winckler Caldeira.

Coorientadores: Dr. Fábio Demolinari de Miranda, Dr^a. Marcia Flores da Silva Ferreira

ALEGRE - ES
2017

Dados Internacionais de Catalogação

ALESSANDRA ABREU RODRIGUES VIEIRA

Diversidade e estrutura genética de *Astronium concinnum* Schott e *Senefeldera verticillata* (Vell.) Croizat, espécies arbóreas da Floresta Atlântica, ES

Tese apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Vinicius Winckler Caldeira
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof^a. Dr^a. Taís Cristina Bastos Soares
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Paulo André Trazzi
Instituto Federal Norte de Minas Gerais – Campus Salinas

Dr. Tiago de Oliveira Godinho
Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural

Dr^a. Sahar Ola Moreira
Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural

Dedico

A minha mãe Lourdes Abreu Rodrigues e ao meu pai José Rodrigues dos Santos, os amo incondicionalmente. Sou infinitamente grata a Deus por permitir que, em minha breve passagem por essa vida, eu tenha uma família linda e com dois anjos como pais que me passaram valores tão nobres, que despertam em mim uma luta interna, dia após dia, na busca de se tornar um ser humano melhor.

“Talvez eu não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que eu deveria ser, mas sou o que irei ser e graças a Deus não sou o que eu era”.

Martin Luther King

Agradecimentos

A Deus, O CRIADOR, por me amar e me guiar pelo caminho do bem. Por me dar a oportunidade para que eu conquistasse mais essa etapa em minha vida. Aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado, e com amor e incentivo, foram seres humanos fundamentais nessa caminhada. Ao companheiro que Deus colocou ao meu lado, me fazendo entender que nessa vida não se deve caminhar só, meu amado esposo Allan, muito obrigada! Aos sonhos da minha vida, minhas amadas filhas Samira e Valentina, por tornarem meus dias mais leves e por fazer de mim uma pessoa melhor. Aos meus irmãos queridos que Deus me enviou nessa vida, Sandro e Emerson, por me auxiliarem em algumas expedições, me incentivarem e ajudarem com meus estudos, mas, principalmente por serem quem são. A minha cunhada Aparecida Madella, que também me orientou em alguns momentos do meu trabalho, obrigada pelo seu carinho comigo. A minha sogra e segunda mãe Ladir e meu sogro Sebastião, por orarem e sempre torcerem por mim. Aos amigos que me acompanharam a campo e laboratório, Kelmer, Isabela, Liziane, Maressa, Ronald, Edilson, Rodrigo, Thammyres, Carla, Franciele, Bruno, Ramon, Thayllon, José Dias, Cássio, Liliana, Diego, William, Valéria, Rafael e Kallil, agradeço intensamente pela ajuda de vocês. Tenho também, e terei sempre, uma profunda gratidão aos amigos Lucimara, Mariana, Adelson, Alexia e Clever. Nossa convivência e companheirismo nem sequer foram de anos e anos, mas tenho a impressão de que os conheço de outros tempos. O sentimento por vocês, que levo na alma, é do tamanho do universo, ou MULTIVERSO??? rsrsrs. Obrigada por compartilhar comigo momentos difíceis e de alegria, sobretudo, por me oferecerem a amizade que é um bem maior. Ao orientador Professor Dr. Marcos Vinicius Winckler Caldeira, pelo carinho, paciência, incentivo e orientação. Para mim, foi um grande prazer ser sua primeira orientada de doutorado. Que Deus o abençoe e esteja sempre presente em sua vida. Ao coorientador professor Dr. Fábio Demolinari de Miranda, por estar sempre disposto a atender quando eu precisava, agradeço pela oportunidade, dedicação e pelos conhecimentos passados. Também, pelo carinho que você, junto a sua família, nos recebeu em sua casa em confraternização de final de ano. Obrigada pela amizade! A coorientadora professora Dr^a. Márcia Flores da Silva Ferreira e a professora Dr^a. Taís Cristina Bastos Soares por ceder o espaço para realização dos trabalhos, pelos auxílios prestados e oportunidade. Ao Senhor Paulo Ribeiro, por ter me acompanhado nas expedições e pelos conhecimentos passados sobre as espécies. A todos serei sempre grata! Rogo a Deus, que abençoe a vida de cada um! Ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa. À Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) - EDITAL FAPES Nº 11/2013 - Pesquisa Aplicada a Políticas Públicas Estaduais - Tema: Pesquisa em Agropecuária no Estado do Espírito Santo - Processo nº: 65766261/14.

Biografia

ALESSANDRA ABREU RODRIGUES VIEIRA, filha de Lourdes Abreu Rodrigues e José Rodrigues dos Santos, nasceu em 26 de abril de 1978, na Cidade de Alegre, Estado do Espírito Santo. Concluiu o ensino fundamental na Escola de 1º e 2º Aristeu Aguiar em Alegre, Espírito Santo. Em dezembro de 1996, concluiu o curso técnico em Contabilidade nesta mesma escola. Em 2003, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal do Espírito Santo, vindo a se graduar em agosto de 2008, recebendo o título de Engenheira Agrônoma. Em março de 2009, ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA/UFES, Alegre/ES), na área de Fitotecnia, submetendo-se à defesa de dissertação em agosto de 2011. Em março de 2013, iniciou os estudos no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA/UFES, Alegre/ES), na área de Melhoramento, submetendo-se à defesa de doutorado no mês de fevereiro de 2017.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	09
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REFERÊNCIAS	17
Capítulo 1 - Diversidade e estrutura genética de <i>Astronium concinnum</i> Schott em fragmentos florestais do Espírito Santo	21
RESUMO	21
ABSTRACT	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Local de estudo e amostragem	24
2.2 Extração, quantificação e diluição do DNA	25
2.3 Amplificação dos fragmentos de DNA	25
2.4 Análise dos dados	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4. CONCLUSÕES	36
5. REFERÊNCIAS	37
Capítulo 2 - Avaliação comparativa entre protocolos para obtenção de DNA de <i>Senefeldera verticillata</i> (Vell.) Croizat	41
RESUMO	41
ABSTRACT	42
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 Material vegetal	44
2.2 Protocolos	45
2.3 Procedimentos dos protocolos 1, 2 e 3	45
2.4 Procedimentos do protocolo 4	46
2.5 Quantificação e qualidade do DNA obtido	47
2.5.1 Quantificação por eletroforese	47
2.5.2 Quantificação por espectrofotometria	48
2.5.3 Amplificação por PCR	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4. CONCLUSÃO	52
5. AGRADECIMENTOS	53
6. REFERÊNCIAS	54
Capítulo 3 - Diversidade genética de <i>Senefeldera verticillata</i> (Vell.) Croizat por meio de marcadores ISSR	58
RESUMO	58
ABSTRACT	59

1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1 Local de estudo e amostragem	61
2.2 Extração, quantificação e diluição do DNA	62
2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese e documentação	63
2.4 Análise dos dados	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4. IMPLICAÇÕES PARA A RESTAURAÇÃO	73
5. AGRADECIMENTOS	74
6. REFERÊNCIAS	75
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
8. ANEXOS	79

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados e respectivas sequências de bases, número total de bandas, número de bandas polimórficas (BP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) e peso molecular (PM) mínimo e máximo com base em marcador de 100pb dos fragmentos obtidos de indivíduos de <i>Astronium concinnum</i>	28
Tabela 2. Diversidade genética de populações naturais de <i>Astronium concinnum</i> amostradas na FLONA de Pacotuba e RPPN Cafundó, Espírito Santo.	28
Tabela 3. Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro de duas populações naturais de <i>Astronium concinnum</i> com emprego de marcadores ISSR.	31

Capítulo 2

Tabela 1. Quantificação e pureza do DNA genômico obtido por diferentes protocolos de extração, utilizando amostras de tecido foliar de 300 mg de <i>Senefeldera verticillata</i>	49
--	----

Capítulo 3

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizados na análise ISSR de <i>Senefeldera verticillata</i> e respectivos resultados de amplificação.	65
Tabela 2. Variação genética em populações de <i>Senefeldera verticillata</i> detectada por marcadores ISSR.	66
Tabela 3. Análise de variância molecular para 39 indivíduos de <i>Senefeldera verticillata</i> em dois fragmentos florestais, Espírito Santo.	70

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Localização das áreas de amostragens da espécie <i>Astronium concinnum</i> , ES.	25
Figura 2. Representação dos 48 indivíduos de duas populações naturais de <i>Astronium concinnum</i> utilizando o programa Structure. Os indivíduos de 1 a 25 (FLONA de Pacotuba, ES) e de 26 a 48 (RPPN Cafundó, ES) estão representados por barras verticais.	29
Figura 3. Dendrograma construído por meio do método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA), a partir dos valores de similaridade genética entre 48 indivíduos <i>Astronium concinnum</i> . Amostras de 1 a 25 (FLONA de Pacotuba, ES), amostras de 26 a 48 (RPPN Cafundó, ES).	34

Capítulo 2

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose de quatro amostras de DNA de <i>Senefeldera verticillata</i> , obtidos por meio de diferentes protocolos. Figura 1A: protocolo 1; Figura 1B: protocolo 2; Figura 1C: protocolo 3; Figura 1D: protocolo 4.	51
Figura 2. Produtos de amplificação de DNA de quatro amostras de <i>Senefeldera verticillata</i> . Padrão de bandas geradas com iniciadores ISSRs, UBC810 (Figura 2A) e UBC811 (Figura 2B). Coluna 1 = protocolo 1, Coluna 2 = protocolo 2, Coluna 3 = protocolo 3, Coluna 4 = protocolo 4.	52

Capítulo 3

Figura 1. Localização dos locais de amostragem de <i>Senefeldera verticillata</i> , ES.	62
Figura 2. Dendrograma gerado por meio de marcadores ISSRs com o complemento aritmético do coeficiente de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA, das 39 matrizes de <i>Senefeldera verticillata</i> . Amostras de 1 a 17 (FLONA de Pacotuba, ES), amostras de 18 a 39 (RPPN Cafundó, ES).	68
Figura 3. Análise da estrutura genética dos 39 indivíduos provenientes das duas populações (FLONA de Pacotuba, ES - 1 a 17 e RPPN Cafundó, ES - 18 a 39) coletadas de <i>Senefeldera verticillata</i> . Os indivíduos foram classificados em três grupos (K = 3).	72

RESUMO GERAL

RODRIGUES-VIEIRA, Alessandra Abreu. **Diversidade e estrutura genética de *Astronium concinnum* Schott e *Senefeldera verticillata* (Vell.) Croizat, espécies arbóreas da Floresta Atlântica, ES.** 2017. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES. Orientador: Dr. Marcos Vinicius Winckler Caldeira. Coorientadores: Dr. Fábio Demolinari de Miranda e Dr^a. Márcia Flores da Silva Ferreira.

A fragmentação de habitats decorrente da perturbação antrópica, modifica a paisagem dos ambientes florestais, entre eles, a Floresta Atlântica que hoje se encontra como um conjunto de fragmentos florestais isolados. A situação atual desse bioma vem causando a extinção local de várias populações e outras vêm sofrendo perdas inestimáveis de variabilidade genética. *Astronium concinnum* Schott (Gonçalo-Alves) e *Senefeldera verticillata* (Vell.) Croizat (Sucanga), são espécies arbóreas que têm característica adequadas para serem aproveitadas nos projetos de parques e jardins, além do uso farmacológico. A compreensão sobre os padrões de diversidade genética de uma espécie é um fator determinante na tomada de decisões para preservação, manejo e recuperação de áreas degradadas. Nesse sentido, amostras foliares de *A. concinnum* e *S. verticillata* foram coletadas em duas unidades de conservação, na Floresta Nacional (FLONA) de Pacotuba e na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Cafundó, localizadas em Cachoeiro de Itapemirim, ES. O objetivo principal desse estudo foi avaliar a diversidade genética, utilizando marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) e, a partir dos resultados, inferir sobre o manejo mais adequado de preservação dessas espécies, além de selecionar árvores mais divergentes geneticamente para produção de mudas destinadas a recuperação de áreas degradadas da região. Também, foi realizada uma comparação entre quatro diferentes protocolos, tendo por objetivo, o isolamento de DNA genômico puro da espécie *S. verticillata*. Para a espécie *A. concinnum*, oito *primers* forneceram 121 fragmentos de DNA, com 73,55% de polimorfismo. A diversidade genética de Nei (H) e índice de diversidade de Shannon (I) foram 0,312 e 0,473, respectivamente. O fluxo gênico (Nm) foi de 10,629. A análise de variância molecular (AMOVA) identificou que, 92,54% da diversidade genética ocorrem dentro da população. Foi identificada a formação de três grupos, por meio da análise Bayesiana. Pelo método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA), foi observada a formação de sete grupos. Objetivando o isolamento de DNA genômico puro de *S. verticillata* quatro protocolos foram comparados. O protocolo 1, Doyle e Doyle (1990) modificado pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), forneceu DNA com pureza de 1,96 e a maior concentração média de DNA (224,22 ng/ μ L). O protocolo 2, Doyle e Doyle (1990) modificado pelo IAC, com alterações nas concentrações de Polivinilpirrolidona (PVP) e β -mercaptoetanol, forneceu pureza semelhante ao do protocolo 1 e concentração média de 201,02 ng/ μ L. Com o protocolo 3, Doyle e Doyle (1990) modificado pelo IAC, com alterações nas concentrações de PVP, β -mercaptoetanol e adição de Albumina de Soro Bovino (BSA), foram obtidos valores de 65,75 ng/ μ L e 1,5 de concentração e

pureza de DNA, respectivamente. Por fim, no protocolo 4, Doyle e Doyle (1990) com adição de Proteinase K, obteve-se valores de 67,6 ng/μL de concentração e pureza de 1,66. Os resultados de pureza de DNA, nos protocolos 3 e 4, indicaram que houve contaminação por proteínas durante o processo de extração. Sugere-se, a utilização do protocolo 1 para obtenção de DNA de boa qualidade de *S. verticillata*. Para as análises de diversidade genética de *S. verticillata* foram utilizados doze *primers* ISSR, resultando em um total de 179 produtos de amplificação, com 75,97% de bandas polimórficas. Os resultados de *H* e *I* foram 0,329 e 0,503, respectivamente. O *Nm* estimado foi de 13,542. Maior diversidade genética foi constatada dentro das populações (94,98%), por meio dos resultados da AMOVA e, entre populações, o resultado foi de 5,02%. A análise Bayesiana de agrupamento forneceu a formação de três grupos. O dendrograma obtido pelo método UPGMA forneceu a formação de seis grupos. Por meio dessa pesquisa, foi constatada que, a maior diversidade genética ocorre dentro das populações, para ambas as espécies. Foram identificados indivíduos de *A. concinnum* e *S. verticillata* mais divergentes geneticamente e que, podem ser selecionadas como árvores matrizes para o fornecimento de sementes com variabilidade genética. Também, foi possível obter um protocolo que resultou em amostras de DNA de *S. verticillata* com maior qualidade.

Palavras-Chave: Recursos genéticos, variabilidade genética, reflorestamento, extração de DNA, marcadores ISSR.

ABSTRACT

RODRIGUES-VIEIRA, Alessandra Abreu. **Diversity and genetic structure of *Astronium concinnum* Schott and *Senefeldera verticillata* (Vell.) Croizat, arboreal species of the Atlantic Forest, ES.** 2017. Thesis (PhD in Genetics and Improvement) - Federal University of Espírito Santo, Alegre-ES. Advisor: Dr. Marcos Vinicius Winckler Caldeira. Co-mentors: Dr. Fábio Demolinari de Miranda and Dr. Márcia Flores da Silva Ferreira.

Habitat fragmentation due to anthropic disturbance modifies the landscape of forest environments, among them the Atlantic Forest that today is a set of isolated forest fragments. The current situation of this biome has been causing the local extinction of several populations and others have been suffering invaluable losses of genetic variability. *Astronium concinnum* Schott (Gonçalo-Alves) and *Senefeldera verticillata* (Vell.) Croizat (Sucanga) are arboreal species that are suitable for use in parks and gardens projects, as well as pharmacological use. Understanding the patterns of genetic diversity of a species is a determining factor in decision making for preservation, management and recovery of degraded areas. In this sense, foliar samples of *A. concinnum* and *S. verticillata* were collected in two conservation units, in the Pacotuba National Forest (FLONA) and in the Private Natural Heritage Reserve (RPPN) Cafundó, located in Cachoeiro de Itapemirim, State of Espírito Santo. The main objective of this study was to evaluate genetic diversity using Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) molecular markers and, based on the results, to infer about the most appropriate management of these species preservation, besides selecting more genetically divergent trees for seedling production recovery of degraded areas of the region. Also, a comparison was made between four different protocols, aiming at the isolation of pure genomic DNA of the *S. verticillata* species. For the *A. concinnum* species, eight primers provided 121 DNA fragments, with 73.55% polymorphism. The genetic diversity of Nei (H) and diversity index of Shannon (I) were 0.312 and 0.473, respectively. The gene flow (Nm) was 10,629. The analysis of molecular variance (AMOVA) identified that, 92.54% of genetic diversity occur within the population. Three groups were identified through Bayesian analysis. By the unweighted arithmetic means clustering method (UPGMA), the formation of seven groups was observed. Aiming the isolation of pure genomic DNA from *S. verticillata* four protocols were compared. Protocol 1, Doyle and Doyle (1990) modified by the Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), provided DNA with a purity of 1.96 and the highest mean DNA concentration (224.22 ng / μ L). Protocol 2, Doyle and Doyle (1990) modified by IAC, with changes in the concentrations of Polyvinylpyrrolidone (PVP) and β -mercaptoethanol, provided purity similar to protocol 1 and a mean concentration of 201.02 ng / μ L. With protocol 3, Doyle and Doyle (1990) modified by IAC, with changes in the concentrations of PVP, β -mercaptoethanol and addition of Bovine Serum Albumin (BSA), values of 65.75 ng / μ L and 1.5 concentration and purity of DNA, respectively. Finally, in Protocol 4, Doyle and Doyle (1990) with Proteinase K addition, values of 67.6 ng / μ L concentration and purity of 1.66 were obtained. The DNA purity results, in protocols 3 and 4, indicated that there was contamination by proteins during

the extraction process. It is suggested that protocol 1 be used to obtain good quality *S. verticillata* DNA. Twelve ISSR primers were used to analyze the genetic diversity of *S. verticillata*, resulting in a total of 179 amplification products, with 75.97% of polymorphic bands. The results for H and I were 0.329 and 0.503, respectively. The estimated Nm was 13,542. Greater genetic diversity was observed within the populations (94.98%), through AMOVA results and, among populations, the result was 5.02%. Bayesian cluster analysis provided the formation of three groups. The dendrogram obtained by the UPGMA method provided the formation of six groups. Through this research, it was observed that the greatest genetic diversity occurs within the populations, for both species. The most genetically divergent individuals of *A. concinnum* and *S. verticillata* have been identified and can be selected as seed trees for the supply of seeds with genetic variability. Also, it was possible to obtain a protocol that resulted in higher quality *S. verticillata* DNA samples.

Key words: Genetic resources, genetic variability, reforestation, DNA extraction, ISSR markers.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Floresta Atlântica é considerada um Hotspot mundial, sendo composta de uma imensurável riqueza em biodiversidade e, ao mesmo tempo, representa um dos biomas mais ameaçados devido a ações antrópicas (MITTERMEIER et al., 2004). Esse bioma, atualmente, consiste de um mosaico de remanescentes florestais que, somados todos os fragmentos de floresta nativa acima de três hectares, totalizam 12,5% de mata restante (INPE, 2015).

De acordo com Assis et al. (2007), entre as tipologias que formam o bioma Floresta Atlântica no estado do Espírito Santo encontram-se as Florestas Estacionais Semidecíduas, estas representam a segunda mais importante formação vegetacional em termos de área ocupada, concentrada principalmente no sul do Estado. Nessa área, encontram-se duas unidades de conservação, a Floresta Nacional (FLONA) de Pacotuba e Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Cafundó, ambas localizadas no município de Cachoeiro de Itapemirim, ES.

A vegetação das áreas de estudo se classifica como Floresta Estacional Semidecidual Submontana (VELOSO et al., 1991). Contudo, quanto ao uso da terra prevalecem atividades como, plantios de café e cana-de-açúcar, pastagens, com remanescentes florestais localizados, sobretudo nos topos dos morros (PROJETO CORREDORES ECOLÓGICOS, 2005). A FLONA de Pacotuba e a RPPN Cafundó estão entre os maiores remanescentes florestais da Bacia do Rio Itapemirim, ES, esses fragmentos, compreendem remanescentes florestais significativos do município e adjacências, sendo de fundamental importância a conservação de ambos (Ipema, 2005).

Nas unidades referidas encontram-se as espécies arbóreas *Astronium concinnum* e *Senefeldera verticillata* as quais fazem parte desse estudo. Em estudos sobre análises fitossociológicas realizados nessas unidades de conservação, foi relatado que essas duas espécies estão entre as que apresentaram maior valor de importância, sendo *A. concinnum* a espécie com maior valor de importância na RPPN Cafundó e *S. verticillata* tendo o maior valor de importância na FLONA de Pacotuba (ARCHANJO et al., 2012; ABREU et al. 2013). Esses resultados foram considerados no momento da escolha das espécies avaliadas no presente trabalho.

Astronium concinnum Schott, conhecida popularmente como Gonçalo-Alves pertence à família Anacardiaceae. Ocorre no sul da Bahia, Espírito Santo e Zona da Mata de Minas Gerais, sendo especialmente comum na região norte do Espírito Santo onde floresce e frutifica entre os meses de agosto e novembro (LORENZI, 2002). A polinização é entomófila, não tendo a anemofilia qualquer participação nos processos que conduzem à fecundação. Entretanto, o vento torna-se primordial nos processos de dispersão das sementes. Trata-se de uma espécie dióica, contudo não tem 100% na taxa de alogamia (ALLEM, 1991).

De acordo com Lorenzi (2002), sua madeira é utilizada para confecções de móveis de luxo, objetos de adorno torneados, esquadrias, tacos e tábuas para assoalhos e para obras externas. Também é empregada na construção civil e naval e para obtenção de folhas faqueadas decorativas. A árvore pode ser aproveitada com sucesso no paisagismo rural e na arborização de parques e grandes jardins.

Senefeldera verticillata (Vell.) Croizat pertence à família Euphorbiaceae, conhecida vulgarmente por Sucanga. Sua ocorrência se estende aos estados de Pernambuco, Bahia, Alagoas, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (PSCHEIDT; CORDEIRO, 2012). A espécie tem flores unissexuais e de tamanho muito pequeno, a síndrome de dispersão é zoocórica (HANS, 2012). Segundo esse mesmo autor tem um grande valor econômico, como no uso terapêutico, contudo, essa espécie ainda é muito pouco estudada.

A conservação dos recursos genéticos florestais tem se tornado prioridade, principalmente, pelos impactos negativos na funcionalidade e na composição dos ecossistemas, ocasionados pelo aumento da população e por suas atividades econômicas (LAURANCE et al., 2006). O extrativismo constante ocorrido na Floresta Atlântica levou a formação, do que antes eram extensas áreas de florestas, em vários fragmentos florestais, reduzindo o tamanho efetivo das populações vegetais, causando o isolamento espacial entre elas (YOUNG et al., 2001).

Segundo Dick et al. (2008), processos assim causam redução da variabilidade genética e aumento da diferença entre populações por efeito da deriva genética. Também, podem levar ao aumento dos níveis de endogamia devido ao cruzamento entre indivíduos aparentados, além de poder interferir na

taxa de fluxo gênico, este, fundamental para a manutenção da variabilidade genética.

A análise da diversidade genética em populações abrange a descrição dos níveis de variabilidade genética existente dentro das populações e como essa variação encontra-se distribuída entre e dentro das mesmas. Assim, a variação genética entre indivíduos de uma determinada espécie, é uma condição essencial para que haja evolução, uma vez que a seleção natural opera nas diferenças existentes dentro das populações, dessa forma, uma ampla variabilidade genética contida na população corresponderá a maiores chances de sobrevivência frente às mudanças do meio (HAMRICK, 1983). A base da preservação de espécies é a conservação da variabilidade genética nas populações, a descrição e distribuição da variação genética inter e intrapopulacional são primordiais para o emprego de medidas mais eficazes de preservação das espécies (RENAU-MORATA et al., 2005).

Nos projetos de recuperação de áreas degradadas, particularmente aqueles que trabalham com a formação de pomares de sementes, é essencial o conhecimento da origem das sementes isso porque, dependendo do tipo de reprodução, dispersão de sementes e localização geográfica de uma determinada espécie, cada população poderá apresentar padrões de diversidade genética distintos. Assim, para recomendações quanto à constituição de lotes de sementes para plantios destinados a recuperação de áreas degradadas, é imprescindível o entendimento da variabilidade presente.

Neste sentido, o emprego de marcadores moleculares em estudos de caracterização de ecossistemas florestais é tido como uma ferramenta útil para detecção de variações no genoma, o que permite avanços no entendimento genético das populações naturais (CAIXETA et al., 2009). Análises moleculares fornecem a possibilidade de se determinar regiões de referência nos cromossomos, chamadas marcadores moleculares, sendo definido como qualquer fenótipo molecular originário de um gene expresso, como por exemplo, um segmento específico de DNA (CAIXETA et al., 2006).

Dentre os marcadores disponíveis para estudos moleculares, destacam-se os do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), que se caracterizam como marcadores dominantes e arbitrários multiloci. Os marcadores moleculares ISSR são regiões localizadas entre regiões microssatélites, que variam de 100

a 3000 pares de bases, e apresentam satisfatória sensibilidade a baixos níveis de variação genética (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

A técnica de marcadores com base em ISSR foi proposta através de microssatélites e busca a abundância aleatória das sequências simples repetidas que se encontram distribuídas ao longo dos genomas eucarióticos. A duplicação dessas sequências de DNA, contidas entre os microssatélites, ocorre por meio de amplificação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se para isso, um único *primer* que contém de 16 a 18 pares de bases e é composto por dois a quatro nucleotídeos que ancoram na extremidade 5' ou 3' da fita de DNA (RAKOCZY-TROJANOWSKA; BOLIBOK, 2004).

Os marcadores ISSR são amplamente utilizados em estudos de diversidade genética, por serem altamente polimórficos, não necessitam de conhecimento prévio do genoma, apresentam alta reprodutibilidade, corresponde a uma técnica menos onerosa em relação a outros marcadores, além de, possibilitar seu emprego em várias espécies de plantas (NYBOM 2004, KUMAR et al., 2011).

Diante de tais considerações, com a finalidade de auxiliar nos planos de recuperação de áreas degradadas, o presente trabalho avaliou os padrões de diversidade genética de possíveis matrizes fornecedoras de sementes, para formação de mudas compostas por progênies com boa representatividade da variabilidade genética existentes nas unidades de conservação supracitadas.

Para tanto, essa pesquisa foi dividida em três capítulos, sendo o primeiro com o objetivo de avaliar o padrão de diversidade genética de árvores da espécie arbórea *A. concinnum* presentes na FLONA de Pacotuba e RPPN Cafundó. O segundo capítulo, consta de uma análise comparativa entre quatro protocolos de extração para isolamento de DNA puro, livre de polissacarídeos e compostos fenólicos, para a espécie *S. verticillata*, uma vez que, em ensaios preliminares de extração, houve dificuldade em obter DNA livre de tais compostos. E por fim, no terceiro capítulo, foram realizadas para a espécie *S. verticillata*, as mesmas avaliações de diversidade genética que foram feitas em *A. concinnum*.

2. REFERÊNCIAS

ABREU, K. M. P. de; SILVA, G. F. da; SILVA, A. G. da. Análise fitossociológica da Floresta Nacional de Pacotuba, Cachoeiro de Itapemirim, ES – Brasil. *Cerne*, Lavras, v. 19, n. 1, p. 157-168, 2013.

ALLEM, A. C. Estudo da biologia reprodutiva de duas espécies florestais (Aroeira e Gonçalves) da região do Cerrado. CENARGEM. 1991. Disponível em <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/168062/1/1712Estudodabiologia.pdf>>. Acesso em 3 de nov. de 2016.

ARCHANJO, K. M. P. A.; SILVA, G. F.; CHICHORRO, J. F.; SOARES, C. P. B. Estrutura do componente arbóreo da Reserva Particular do Patrimônio Natural Cafundó, Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, Brasil. *Floresta*, Curitiba, v. 42, n. 1, p. 145-160, 2012.

ASSIS, A. M.; MAGNAGO, L. F. S.; FERNANDES, H. Q. B. Floresta estacional semidecidual de terras baixas, submontana e montana. In: M. Simonelli, & C.N. Fraga (orgs.). *Espécies da Flora Ameaçada de Extinção no Estado do Espírito Santo*. Ipema, Vitória, p. 52-54, 2007.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). *Marcadores moleculares*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, cap.1, p. 9-78, 2006.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Org.). *Marcadores moleculares*. 2. ed. Viçosa: Editora Jard, v. 1, p. 11-101, 2009.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.H.; MacBYDE, B.; THOMAS, L. *Genetics and conservation*. California: Benjamin Cummings, p. 335-348, 1983.

HANS, J. E. The tribe Hippomaneae (Euphorbiaceae) in Brazil: A tribo Hippomaneae (Euphorbiaceae) no Brasil. *Rodriguésia* vol. 63(1), p. 209-225, 2012. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/rod/v63n1/a13v63n1.pdf>>. Acesso em 28 de dez. de 2016.

INPE. INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS - ATLAS DOS REMANESCENTES FLORESTAIS DA MATA ATLÂNTICA PERÍODO 2013-2014. São Paulo. (2015). Disponível em <http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=3891>. Acesso em 16 de nov. de 2016.

IPEMA. Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica. *Conservação da Mata Atlântica no Estado do Espírito Santo: Cobertura florestal e unidades de*

conservação (Programa Centros para a Conservação da Biodiversidade – Conservação Internacional do Brasil) / IPEMA. Vitória, ES: IPEMA. 2005.

KUMAR, R.; DWIVEDI, N.; SINGH, R. K.; KUMAR, S. A review on molecular characterization of pepper for Capsaicin and Oleoresin. Intl. J. Plant Breed. vol. 5, p. 99-110. 2011.

LAURANCE, W. F. et al. Rapid decay of tree-community composition in Amazonian forest fragments. PNAS, 103: p. 19010-19014, 2006.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 368 p., 2002.

MITTERMEIER, R. A.; GIL, P. R.; HOFFMAN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOREUX, J; FONSECA, G. A. B. Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Ecoregions. CEMEX e Agrupacion Sierra Madre. Mexico City, 390p., 2004.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Molecular Ecology, v. 13, p. 1143-1155, 2004.

PROJETO CORREDORES ECOLÓGICOS. Síntese dos encontros regionais realizados com os municípios do Estado do Espírito Santo. Cariacica, 52 p., 2005.

PSCHEIDT, A. C.; CORDEIRO, I. Sinopse da tribo Hippomaneae (Euphorbiaceae) no Estado de São Paulo, Brasil. Hoehnea, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 347-368, 2012.

RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. Cellular and Molecular Biology Letters, Wroclaw, v.9, p. 221-238, 2004.

RENAU-MORATA, B.; NEBAUER, S. G.; SALES, E.; ALLAINGUILLAUME, J.; CALIGARI, P.; SEGURA, J. Genetic diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus atlantica* (Pinaceae) assessed using random amplified polymorphic DNA). American Journal of Botany, Columbus, v. 92, n. 5, p. 875-884, 2005.

VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: IBGE, 123 p., 1991.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. Trends in Ecology and Evolution, London, v. 11, n. 10, p. 413-418, 2001.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplication. Genomics, SanDiego, v. 20, p. 176-183, 1994.

Capítulo 1

Manuscrito de artigo científico a ser submetido à revista

***Scientia Forestalis* (Piracicaba, SP)**

Diversidade e estrutura genética de *Astronium concinnum* Schott em fragmentos florestais do Espírito Santo

RESUMO. *Astronium concinnum* é uma importante espécie arbórea que pode ser empregada em diversos fins, como no fornecimento de sombra para parques e jardins, além de ser utilizada em projetos de recuperação de áreas degradadas. Foram avaliados os padrões de diversidade genética de indivíduos de *A. concinnum* nas unidades de conservação, Floresta Nacional (FLONA) de Pacotuba e Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Cafundó, empregando-se marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR). Os oito *primers* produziram 121 fragmentos de DNA e com uma porcentagem de bandas polimórficas de 73,55%. Os parâmetros, diversidade genética de Nei (H) e índice de diversidade de Shannon (I), forneceram valores de 0,312 e 0,473, respectivamente. O valor do fluxo gênico (Nm) foi de 10,629. A análise de variância molecular (AMOVA) indicou a ocorrência de diferenciação genética moderada entre as populações (7,46%). A análise Bayesiana identificou pequena variação genética entre as populações. O método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA) revelou a formação de sete grupos. Sugere-se a preservação de um número representativo de indivíduos, em cada localidade, para a conservação da variabilidade existente dentro das populações. Foram identificadas árvores de Gonçalves-Alves mais divergentes geneticamente, assim, as árvores localizadas na FLONA de Pacotuba poderão ser selecionadas para coleta de sementes, uma vez que, essa unidade de conservação é integrada a rede de sementes de florestas nativas. As mudas produzidas a partir dessas árvores e destinadas à recuperação de áreas degradadas irão representar melhor a diversidade genética local.

Palavras-chave: Biodiversidade, Gonçalves-Alves, marcador ISSR; variabilidade genética

ABSTRACT. *Astronium concinnum* is an important tree species that can be used for various purposes, such as providing shade for parks and gardens, as well as being used for reclamation projects in degraded areas. The patterns of genetic diversity of individuals of *A. concinnum* in conservation units, National Forest (FLONA) of Pacotuba and Private Reservation of Natural Patrimony (RPPN) Cafundó, were evaluated using molecular markers Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). The eight primers produced 121 DNA fragments and a percentage of polymorphic bands of 73.55%. The parameters, genetic diversity of Nei (H) and diversity index of Shannon (I), provided values of 0.312 and 0.473, respectively. The value of the gene flow (Nm) was 10,629. The analysis of molecular variance (AMOVA) indicated the occurrence of moderate genetic differentiation among populations (7.46%). Bayesian analysis identified small genetic variation among populations. The unweighted arithmetic means clustering (UPGMA) method revealed the formation of seven groups. It is suggested the preservation of a representative number of individuals, in each locality, for the conservation of the variability existing within the populations. Gonçalves-Alves trees were identified as being more genetically divergent, thus, the trees located in the FLONA of Pacotuba could be selected for seed collection, as this conservation unit is integrated into the seed network of native forests. The seedlings produced from these trees and intended for the recovery of degraded areas will better represent the local genetic diversity.

Keywords: Biodiversity, Gonçalves-Alves, ISSR marker; genetic variability

1. INTRODUÇÃO

Localizadas no sul do estado do Espírito Santo encontram-se as unidades de conservação Floresta Nacional de Pacotuba (FLONA de Pacotuba) e Reserva Particular do Patrimônio Natural Cafundó (RPPN Cafundó), juntas, essas unidades representam importantes áreas de preservação ambiental da região (IPEMA, 2005). A FLONA de Pacotuba é integrada ao projeto do governo federal, Rede de Sementes Florestais Nativas, que visa identificar áreas de floresta naturais, potenciais produtoras de sementes por meio de critério de seleção de matrizes (ICMBIO, 2011).

Astronium concinnum Schott (Anacardiaceae), conhecida popularmente como Gonçalo-Alves, é uma espécie que pode ser aproveitada com sucesso no paisagismo rural e para a arborização de parques e grandes jardins, sendo também empregada em trabalhos destinados a recuperação de áreas degradadas. A espécie ocorre principalmente no sul da Bahia, Espírito Santo e Zona da Mata de Minas Gerais (LORENZI, 2002).

Um dos principais temas nas análises dos processos microevolutivos refere-se à genética de populações, que tem por princípio investigar e compreender sobre as alterações de frequências alélicas e genotípicas de populações ao longo do espaço e do tempo (FUTUYMA, 1998). O conhecimento sobre a organização da variabilidade genética de populações é um passo fundamental para a determinação de estratégias mais adequadas de conservação da biodiversidade, como por exemplo, na formação de pomares de sementes para recuperação de áreas degradadas (AVISE, 2010). A produção de mudas a partir de lotes de sementes oriundos de matrizes aparentadas pode levar ao estreitamento da base genética, encadeando em futuras populações desprovidas de variabilidade genética que por consequência, serão mais vulneráveis a doenças e condições climáticas adversas (LINS et al., 2003).

Considerados como uma ferramenta eficaz no estudo de genomas, pois detecta polimorfismo diretamente no DNA, os marcadores moleculares possibilitam analisar a variabilidade genética em populações. Neste aspecto, o marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), que se baseia na amplificação de regiões entre sequências microssatélites adjacentes do DNA

via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se destaca, pois, além de não exigir um conhecimento prévio do genoma, pode ser empregado em várias espécies, apresenta elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo (GONZÁLEZ et al., 2002).

Assim, o presente trabalho objetivou avaliar os padrões de diversidade genética de *A. concinnum* inseridas na FLONA de Pacotuba e RPPN Cafundó, por meio de marcadores moleculares ISSR, a fim de determinar estratégias mais adequadas de manejo e preservação. Também, selecionar matrizes mais divergentes geneticamente que pertencem a FLONA de Pacotuba, que é integrada ao projeto rede de sementes florestais, para coleta de sementes e produção de mudas destinadas a recuperação de áreas degradadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de estudo e amostragem

Um total de 48 indivíduos de *A. concinnum* foi selecionado, aleatoriamente, para análise de diversidade genética. Folhas jovens e sadias foram coletadas, entre os meses de março e abril de 2016, sendo, 25 árvores pertencentes à FLONA de Pacotuba (20°45' latitude Sul e 41°17' de longitude Oeste) e 23 a RPPN Cafundó (20°43' latitude Sul e 41°13' de longitude Oeste) (Figura 1). Cada árvore selecionada teve uma distância mínima de 50 m, com intuito de evitar a coleta de indivíduos aparentados ou de clones. As amostras vegetais depois de embaladas em sacos plásticos contendo sílica gel foram levadas para laboratório, mantidas a -30 °C, liofilizadas e armazenadas até a extração do DNA.

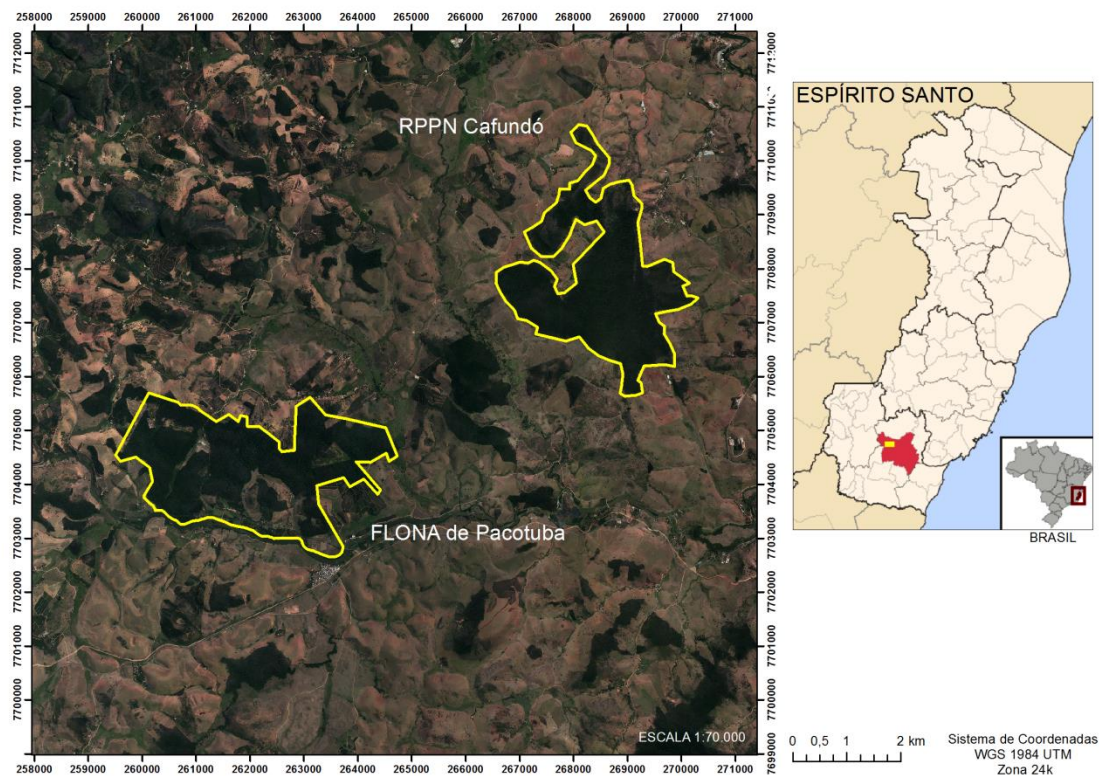


Figura 1. Localização das áreas de amostragens da espécie *Astronium concinnum*, ES.

2.2 Extração, quantificação e diluição do DNA

A extração do DNA foi realizada com base no protocolo de extração de tecidos vegetais CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) com adição de proteinase K, proposto por (DOYLE e DOYLE, 1990). A quantificação e pureza foram determinadas por espectrofotometria no aparelho NanoDrop (*Thermo Scientific 2000C*). Com base nesses dados, foram preparadas soluções de trabalho de $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e armazenadas a -20°C para análises posteriores.

2.3 Amplificação dos fragmentos de DNA

Inicialmente, foi realizado um ensaio testando-se 29 *primers* ISSR da *University of British Columbia* em quatro amostras para determinar quais seriam utilizados no estudo de diversidade genética das matrizes. Os oito *primers* de ISSR (Tabela 1) considerados adequados por apresentarem bom padrão de amplificação, bandas nítidas e bem definidas, foram selecionados para caracterização das 48 amostras de *A. concinnum*.

Cada reação de amplificação apresentou um volume final de 20 μL contendo 2,5 mmol L^{-1} de MgCl_2 ; 0,8 mmol L^{-1} de dNTP; 1 unidade de enzima Taq DNA polimerase; tampão da enzima 1X (10 mmol L^{-1} ; Tris-HCl pH 8,5; 50 mmol L de KCl); 50 ng de DNA; 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de *primer*. As amplificações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems, modelo Veriti) programado para 1 ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos constituídos por três etapas: a) 45 segundos a 94 °C, b) 45 segundos a 52 °C e c) 90 segundos a 72 °C, seguidos por uma extensão final de 7 minutos a 72 °C.

Os produtos de amplificação do DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio (0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em tampão TBE (tris, ácido bórico e EDTA) a 94 volts com duração de aproximadamente 4 horas. O tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig). Após eletroforese os géis foram expostos à luz ultravioleta em fotodocumentador (*ChemiDoc MP Imaging System – Bio Rad*) para visualização dos fragmentos.

2.4 Análise dos dados

Na avaliação dos géis, a presença (1) e ausência (0) de bandas foram usadas para a construção de uma matriz binária. Com auxílio do software POPGENE versão 3.2 (YEH e BOYLE, 1997), foram calculados alguns parâmetros de diversidade: número de alelos efetivos (N_e), porcentagem de locos polimórficos (PLP), índice de diversidade de Shannon (I) e diversidade genética de Nei (H). Também, com este mesmo software, foram calculados o coeficiente de diferenciação genética (G_{ST}) e fluxo gênico (Nm).

Com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013), foi calculada uma matriz de similaridade entre os indivíduos por meio do coeficiente de Jaccard, a qual foi convertida em uma matriz de dissimilaridade pelo seu complemento aritmético ($d = 1 - S$). Um dendrograma foi construído pelo método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA). O ponto de corte para o dendrograma obtido foi estabelecido pelo método proposto por Mojema (1977).

Para averiguar a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações, como também, avaliar como elas estavam estruturadas, foi utilizada a análise de variância molecular (AMOVA) por meio do software Arlequin versão 3.11 (EXCOFFIER et al., 1992).

O programa Structure (PRITCHARD et al., 2000), baseado na estatística Bayesiana foi utilizado para definir o número de grupos (k). Foram realizadas 20 corridas para cada valor de K, 250.000 burn-ins e 1.000.000 simulações de Monte Carlo de Cadeias de Markov (MCMC). Para a definição do valor de K mais provável empregou-se a média e o desvio padrão de cada valor de probabilidade de K e o método ΔK proposto por Evanno et al. (2005), por meio do software Structure Harvester (EARL; VONHOLDT, 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos um total de 121 produtos de amplificação, dentre os quais, 89 (73,55%) apresentaram polimorfismo, o que infere sobre a validação dos iniciadores ISSR testados na avaliação de diversidade genética de *A. concinnum*.

Esses dados estão próximos aos resultados encontrados por outros autores que empregaram marcadores ISSR. Liu et al. (2013), em estudos de diversidade genética em populações naturais de *Machilus thunbergii*, espécie arbórea ameaçada de extinção no leste da China, encontraram um total de 92 locos dos quais, 84 foram polimórficos (91,30%). Tiago et al. (2015), em avaliações sobre a variabilidade genética da espécie arbórea *Hymenaea courbaril*, obtiveram amplificações de 54 locos, sendo 41 polimórficos (75,9%). De acordo com Xia et al. (2007), a porcentagem de locos polimórficos tem sido empregada para avaliar a diversidade genética em trabalhos com populações naturais e marcadores dominantes.

A quantidade de bandas por *primer* variou entre 9 e 24, apresentando, em média, 15,12 por *primer* e os pesos moleculares dos diferentes locos variaram entre 200 e 2080 pares de bases (pb). O *primer* mais informativo foi o UBC878 que forneceu o maior número de bandas polimórficas (18), já o iniciador UBC856 foi considerado o menos informativo produzindo apenas seis bandas polimórficas (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* utilizados e respectivas sequências de bases, número total de bandas, número de bandas polimórficas (BP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) e peso molecular (PM) mínimo e máximo com base em marcador de 100pb dos fragmentos obtidos de indivíduos de *Astronium concinnum*.

Primer	Sequências (5'- 3')	Total de bandas	BP	PBP %	PM (min-max)
UBC807	(AG) ₈ T	9	7	77,77	320 - 900
UBC808	(AG) ₈ C	16	11	68,75	200 - 1550
UBC818	(CA) ₈ G	15	11	73,33	400 - 2080
UBC827	(AC) ₈ G	16	12	75,00	420 - 2040
UBC836	(AG) ₈ YA	18	16	88,88	210 - 2080
UBC856	(AC) ₈ YA	10	6	60,00	300 - 2080
UBC868	(GAA) ₆	13	8	61,53	250 - 2080
UBC878	(GGAT) ₄	24	18	75,00	300 - 2080
TOTAL		121	89	73,55	

A diversidade genética entre as populações de *A. concinnum* foi estimada em 1,503 para *Ne*; 0,298 para *He* e 0,455 para *I* para FLONA de Pacotuba. Esses parâmetros de diversidade apresentaram valores de 1,502; 0,297 e 0,455; respectivamente, para RPPN Cafundó. Os valores de diversidade genética foram semelhantes entre as unidades de conservação, e o valor da PLP (73,55%) de locos polimórficos foi o mesmo em ambas as localidades (Tabela 2).

Tabela 2. Diversidade genética de populações naturais de *Astronium concinnum* amostradas na FLONA de Pacotuba e RPPN Cafundó, Espírito Santo.

População	N	<i>Ne</i>	<i>He</i>	<i>I</i>	PLP (%)
FLONA de Pacotuba	25	1,503	0,298	0,455	73,55
RPPN Cafundó	23	1,502	0,297	0,455	73,55
Espécie	48	1,533	0,312	0,473	73,55

N: número de amostras; *Ne*: número de alelos efetivos; *He*: diversidade genética de Nei; *I*: índice de Shannon. PLP: porcentagem de locos polimórficos.

As estimativas de H_e e I de *A. concinnum* são consideradas altas, quando comparadas com dados de outras espécies arbóreas. Estopa et al. (2006), encontraram valores um pouco maiores para os mesmos parâmetros de diversidade, sendo 0,40 para H_e e 0,58 para I , ao analisarem a diversidade genética de três populações de *Eremanthus erythropappus* empregando marcadores RAPD, também marcadores dominantes assim como os ISSR. Santos et al. (2015), avaliaram a variação genética de *Attalea speciosa* com marcadores RAPD e encontraram valores de 0,32 para H_e e 0,48 para I .

O índice de diversidade de Shannon avalia o grau de certeza em que se prediz o quão é a proximidade genética entre os indivíduos. Assim, quanto menor a estimativa do índice, menor diversidade ocorre entre as plantas. Os resultados obtidos na presente pesquisa foram considerados altos, indicando alta diversidade genética entre os indivíduos de *A. concinnum*.

Os resultados da abordagem Bayesiana indicaram a divisão dos indivíduos de *A. concinnum* da FLONA de Pacotuba (amostras de 1 a 25) e RPPN Cafundó (amostras de 26 a 48) em três grupos genéticos identificados por diferentes cores na figura abaixo (Figura 2).

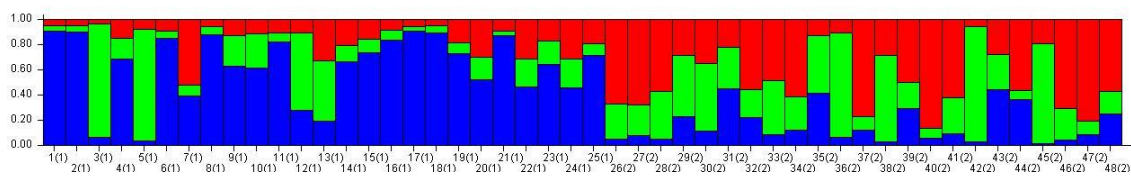


Figura 2. Representação dos 48 indivíduos de duas populações naturais de *Astronium concinnum* utilizando o programa Structure. Os indivíduos de 1 a 25 (FLONA de Pacotuba, ES) e de 26 a 48 (RPPN Cafundó, ES) estão representados por barras verticais.

Por meio do gráfico construído pelo Structure conclui-se que, entre as árvores e, em ambos os fragmentos florestais, há mistura de material genético, sendo essa mistura mais proeminente na RPPN Cafundó. Esse aspecto indica que está havendo, entre as duas localidades, um intenso intercâmbio de material genético. Segundo Allem (1991), *A. concinnun* é uma espécie dioica e com polinização entomófila, sendo a dispersão das sementes realizada pelo vento. As unidades FLONA de Pacotuba e RPPN Cafundó apresentam considerável similaridade nas características da paisagem como também, uma

distância de cerca de 1,5 quilômetros. Dessa forma estas características, aliadas ao tipo de reprodução e dispersão de sementes, certamente estão contribuindo para que ocorra intercâmbio de material genético entre as duas localidades.

Portanto, infere-se que não há grande diferença genética entre as unidades de conservação, uma vez que não houve separação de grupos genéticos por localidade. Entretanto, por meio de um contraste de distribuição de cores no gráfico, observa-se que a distribuição do grupo azul foi mais proeminente na população da FLONA de Pacotuba e o grupo vermelho foi mais proeminente da RPPN Cafundo, esse aspecto indica existir certa diferenciação genética entre as duas unidades de conservação, o que foi comprovado por meio do resultado do Φ_{st} (0,074) que revelou diferenciação genética moderada.

As estimativas da avaliação Bayesiana junto aos métodos de Monte Carlo, por meio das Cadeias de Markov (MCMC), nas análises de alocação de indivíduos, fornecem estimativas paramétricas com maior precisão devido a maior robustez dos estimadores utilizados nesta estatística (PRITCHARD et al., 2000; EVANNO et al., 2005; FALUSH et al., 2007). O agrupamento é realizado fundamentado no princípio proposto por Rannala e Mountain (1997), que considera situações em que a partir de dados genéticos de uma amostra de indivíduos, e assumindo-se que os mesmos têm origem de populações desconhecidas, os algoritmos Bayesianos agrupam indivíduos geneticamente similares e identificam grupos formados.

Os resultados presentes na tabela 3 foram fornecidos pela análise de variância molecular (AMOVA), que indicou que a diversidade genética, em sua maioria, ou seja, 92,54% ocorre dentro das populações e 7,45% da diversidade está inserida entre as populações.

Tabela 3. Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro de duas populações naturais de *Astronium concinnum* com emprego de marcadores ISSR.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Componentes de variância	Variação (%)
Entre fragmentos	1	42,60	1,19	7,46
Dentro dos fragmentos	46	664,88	14,84	92,54
Total	47	707,49	16,04	
$\Phi_{st} = 0,074$				

Tem sido relatado na literatura que, espécies com extensa distribuição geográfica, vida longa, com reprodução predominantemente realizada por fecundação cruzada e dispersão de sementes feita por meio de animais têm maiores níveis de variação genética em relação a espécies que possuem outras combinações de características, já nas espécies em que predomina a alogamia, maior variação genética é encontrada dentro de suas populações, diferentemente do que ocorre com espécies autógamas (Hamrick e Godt, 1989).

A forma como a variabilidade genética encontra-se distribuída entre e dentro de populações está relacionada às síndromes de dispersão de pólen e sementes, ao tipo de reprodução que a espécie apresenta e de como os indivíduos se encontram distribuídos dentro da população considerada (EPPERSON, 2003; SEBBENN et al., 2011). Segundo Hamrick e Godt (1989), espécies que apresentam sistema de reprodução cruzada ou mista, com dispersão de pólen pelo vento, a variação genética entre populações ocorre em média 10%, já para espécies autógamas a média dessa variação é de 51%.

Os resultados de maior diversidade genética presente dentro da população, constatada no presente estudo, corroboram com outros estudos com populações naturais de espécies arbóreas. Brandão et al. (2011), avaliaram a estrutura genética de *Myrcia splendens*, utilizando marcadores moleculares ISSR, em áreas fragmentadas e corredores de vegetação de floresta semidecidual, localizadas em Lavras, MG, e encontraram nos dois tipos

de ambiente, maior diversidade genética intrapopulacional, 96,49% e 91,15%, respectivamente. Em estudos de variabilidade genética de populações de *Butia eriospatha*, inseridas em floresta ombrófila mista, localizadas em Barra Grande SC, Gavião et al. (2007), encontraram 89,86% da variabilidade genética dentro das populações e 10,14% entre as populações, utilizando marcador molecular RAPD.

As diferenças genéticas entre populações diminuem conforme o aumento de fluxo alélico, este pode ser realizado via pólen e/ou sementes. Considerando o tipo de polinização de *A. concinnum*, a proximidade e a semelhança de paisagem, anteriormente mencionados, das unidades de conservação, já eram esperados os resultados de menor divergência genética ocorrendo entre as mesmas.

Ainda que a variabilidade genética intrapopulacional seja maior, a estimativa de diferenciação genética entre as localidades foi considerada moderada ($\Phi_{ST} = 0,074$), segundo WRIGHT (1978). Este autor relata ainda que, a diferenciação genética não se torna, de forma alguma, insignificante mesmo que o valor de Φ_{ST} seja igual ou ainda, inferior a 0,05. Esse resultado, portanto, deve ser considerado nos programas de conservação da espécie. A variabilidade genética é responsável pela manutenção das espécies ao longo do tempo, ela determina processos como a adaptação evolutiva perante as variações do ambiente. A compreensão da variação genética é crucial acerca das decisões do manejo florestal e para o emprego de ações de conservação.

O coeficiente de diferenciação populacional (G_{ST}) e fluxo gênico (Nm) forneceram valores de 0,044 e 10,629, respectivamente. Essas análises também foram aplicadas com o objetivo de avaliar sobre a diversidade genética entre os fragmentos florestais. Os valores encontrados indicaram a taxa de fluxo gênico alta entre as duas localidades, processo que pode levar a menor diferenciação entre populações. Essa suposição é confirmada segundo dados fornecidos pela AMOVA que indicaram moderada diferenciação genética entre as duas áreas de estudo ($\Phi_{ST} = 7,46\%$), também, pela análise Bayesiana que não distinguiu as duas áreas com formação de grupos genéticos separados.

Quando o fluxo gênico entre populações ultrapassa quatro migrantes por geração, ocorre homogeneização dos alelos entre elas que passam a funcionar como populações panmíticas (HARTL e CLARK, 1997). O fluxo gênico

desempenha um papel fundamental na manutenção da variabilidade genética dentro das populações, interferindo nos fatores genéticos negativos do processo de fragmentação ambiental, como a deriva genética e depressão por endogamia, que podem causar divergência genética entre populações (SLATKIN, 1987). No processo de deriva genética ocorrem modificações aleatórias nas frequências alélicas das populações com o passar das gerações, o que leva a fixação e à perda de alelos levando a redução da variação das populações (FALCONER, 1996).

É importante ressaltar que, o material genético avaliado, corresponde a indivíduos de *A. concinnun* adultos de vida longa, portanto, o fluxo gênico calculado refere-se a uma estimativa histórica, reflexo de acontecimentos passados que levaram aos padrões atuais de estrutura genética. Para o entendimento acerca das implicações da fragmentação atual sobre os índices de diversidade genética, estudos com teste de progênie seriam mais adequados (KAGEYAMA et al., 2003).

Com base nos marcadores ISSR a dissimilaridade entre as matrizes variou de 0,26 a 0,87. O menor valor para dissimilaridade (0,26) foi observado entre as matrizes 1 e 2, já o valor máximo (0,87), ocorreu entre as matrizes 40 e 42. A semelhança genética detectada entre as matrizes 1 e 2, possivelmente é devido a proximidade que existe entre essas árvores na FLONA de Pacotuba, podendo se tratar de indivíduos aparentados.

A análise visual dos dados do dendrograma, adotando-se com ponto de corte a dissimilaridade média de 85,23%, permitiu a separação dos indivíduos em sete grupos (Figura 3).

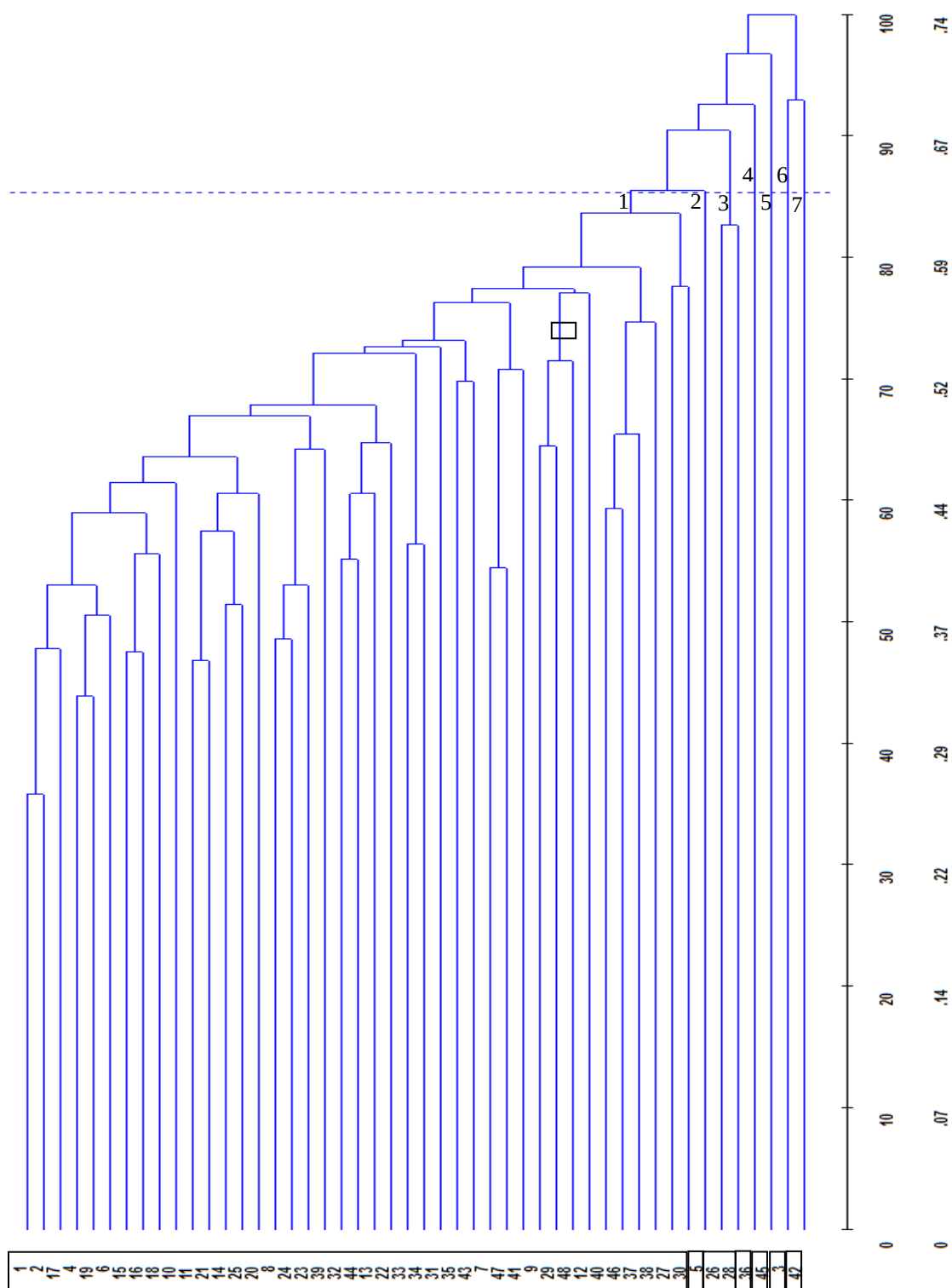


Figura 3. Dendrograma construído por meio do método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA), a partir dos valores de similaridade genética entre 48 indivíduos *Astronium concinnum*. Amostras de 1 a 25 (FLONA de Pacotuba, ES), amostras de 26 a 48 (RPPN Cafundó, ES).

O coeficiente de correlação cofenética foi de 82% (CCC = 0,82), indicando que houve um bom ajuste entre a dissimilaridade obtida pelo coeficiente de Jaccard e as representadas no dendrograma. Pois, segundo Sokal e Rohlf (1995), ajustes apropriados são aqueles referentes a valores superiores a 80%.

Os grupos dois, quatro, cinco, seis e sete foram formados, cada um, por uma única matriz as quais foram as de número 5, 36, 45, 3, e 42 respectivamente, sendo as matrizes 3 e 5 pertencentes a FLONA de Pacotuba, e as demais, a RPPN Cafundó, esses resultados sugerem que essas matrizes são geneticamente mais distintas. O par de matrizes 26 e 28 formou o grupo dois. O restante das matrizes foi inserido no grupo um que reuniu o maior número de indivíduos com matrizes de ambas às unidades de conservação. Os indivíduos 1 e 2 foram mais próximos geneticamente, entre todos os indivíduos avaliados.

Com base na distribuição das matrizes no dendrograma, nota-se que não há grande diferença entre as duas unidades avaliadas, pelo fato de não haver predominância de formação de grupos com indivíduos distribuídos por fragmento florestal, tal como foi evidenciado pela análise Bayesiana. Também, os resultados do dendrograma corroboram com o resultado de Φ_{st} que indicou uma diferenciação genética moderada entre os fragmentos.

O número mínimo de árvores, indicado para coleta de sementes buscando a manutenção genética nas populações naturais, varia entre os diferentes autores encontrados na literatura. De acordo com Sebbenn (2006), deve-se selecionar, no mínimo, 30 árvores matrizes para realização de coleta de sementes. Contudo, Nogueira e Medeiros (2007), constataram sobre a importância de se selecionar um número entre 10 a 20 árvores matrizes, ao acaso, para coleta de sementes nas diferentes populações. Contudo, uma estratégia mais adequada seria a seleção de uma quantidade mínima de árvores, como referenciado acima, com base em um conhecimento prévio a cerca da variabilidade genética dos indivíduos de uma população.

Desse modo, para produção de mudas destinadas a recuperação de áreas degradadas na região, sugere-se a formação de lotes de sementes a partir das árvores de *A. concinnum* pertencentes à FLONA de Pacotuba, consideradas nesse estudo, como mais divergentes geneticamente, como os pares: 1 e 5; 3 e 22; 6 e 12; 7 e 12; 9 e 13; 10 e 14; 14 e 23; 17 e 23; 19 e 20 e

21 e 23. Formando assim, um lote de sementes proveniente de 16 árvores que contêm alto valor de dissimilaridade entre si e, portanto, apresentando variabilidade genética adequada.

Tendo em vista, com essa estratégia, conduzir as coletas dentro de uma sistematização procedimental que tem por objetivo compor lotes de sementes com baixa taxa de endogamia, evitando assim, problemas com deriva genética nas gerações sucessoras.

4. CONCLUSÕES

A caracterização molecular, por meio do marcador ISSR, foi eficaz para avaliar a diversidade genética entre os indivíduos de *A. concinnum*, identificando polimorfismo entre os indivíduos na população.

Foi constatada moderada diferenciação genética entre os fragmentos analisados, indicando que o fluxo gênico histórico entre as populações é ainda alto o que limita os efeitos a deriva genética. Não foi comprovada consequências genéticas significativas incidindo sobre as populações de *A. concinnum* nos fragmentos estudados.

As populações naturais de *A. concinnum* apresentam alta variabilidade genética intrapopulacional, portanto, como estratégia para preservação sugere-se que sejam conservados vários indivíduos por população, de forma a permitir a manutenção dessa variabilidade. A espécie tem a possibilidade de ser preservada nas condições que se encontram atualmente, nas reservas em fragmentos florestais.

As árvores que apresentam maior dissimilaridade genética devem ser priorizadas, uma vez que a partir delas, será possível formar lotes de sementes que irão representar a variabilidade genética existente.

5. REFERÊNCIAS

ALLEM, A. C. Estudo da biologia reprodutiva de duas espécies florestais (Aroeira e Gonçalo-alves) da região do Cerrado. CENARGEM. 1991. Disponível em <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/168062/1/1712Estudodabiologia.pdf>>. Acesso em 29 de dez. de 2016.

AVISE, J. C. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. *Conservation Genetics*, Dordrecht, v. 11, p. 665-669, 2010.

BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. de A.; CARVALHO D. de. ESTRUTURA GENÉTICA EM MICROESCALA ESPACIAL DE *Myrcia splendens* (MYRTACEAE). *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v. 35, n. 5, p. 957-964, 2011.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*. v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12:, n.1, p.13-15, 1990.

EARL, D. A.; VONHOLDT B. M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour*. v. 4, p. 359-361, 2012.

EPPERSON, B. K. *Geographical Genetics*. Princeton University Press, New Jersey. 2003.

ESTOPA, R. A.; SOUZA, A. M. de; MOURA, M. C. de O.; BOTREL, M. C. G.; MENDONÇA, E. G.; CARVALHO, D. de. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). *Scientia Forestalis*, n. 70, p. 97-106, 2006.

EVANNO, G.; REGNAUT. S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, Oxford, v.14, p. 2611-2620, 2005.

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

FALCONER, D. S. *Introduction to quantitative genetics*. Longman: Harlow, 1996.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, Oxford, v. 7, n. 4, p. 574-578, 2007.

FUTUYMA, D. J. *Evolutionary Biology*. 3rd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 604p., 1998.

GAVIÃO, C. F. C.; SUJII, P. S.; INGLIS, P. W.; CIAMPI, A. Y. Análise genética em populações de *Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc utilizando marcadores moleculares RAPD. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico, 170, 2007.

GONZÁLEZ, A.; COULSON, M.; BRETTELL, R. Development of DNA markers (ISSRs) in mango. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v. 575, p. 139-143, 2002.

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

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. *Principles of population genetics*. Sunderland: Sinauer Associates. 1997.

ICMBIO. INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Plano de Manejo da Floresta Nacional de Pacotuba, localizada no estado do Espírito Santo. Vila Velha, ES, v. 1, 2011.

IPEMA. INSTITUTO DE PESQUISAS DA MATA ATLÂNTICA. Conservação da Mata Atlântica no Estado do Espírito Santo: Cobertura florestal e unidades de conservação (Programa Centros para a Conservação da Biodiversidade – Conservação Internacional do Brasil) / IPEMA. Vitória, ES: IPEMA. 2005.

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

LINS, P. M. P.; FARIAS NETO, J. T.; MULLER, A. A. Avaliação de híbridos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) para produção de frutos e de albúmen sólido fresco. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 468-470, 2003.

LIU, J.; SUN, H. G.; JIANG, J. M.; SHAO, W. H.; LUAN, Q. F. Genetic diversity of natural populations of *Machilus thunbergii*, an endangered tree species in eastern China, determined with ISSR analysis. *Genetics and Molecular Research*, v. 12, n. 3, p. 3689-3697, 2013.

LORENZI, H. *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 368p. 2002.

MOJEMA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. *The Computer Journal*, v. 20, p. 359-363, 1977.

NOGUEIRA, A. C.; MEDEIROS, A. C. de S. Coleta de Sementes Florestais Nativas. Circular Técnico 144, Colombo - PR: Embrapa Florestas, p. 11, 2007.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, Baltimore, v. 155, p. 945-959, 2000.

RANNALA, B.; MOUNTAIN, J. L. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, La Jolla, v. 94, p. 9197-9201, 1997.

SANTOS, M. F.; DAMASCENO-SILVA, K. J.; CARVALHAES, M. A.; LIMA, P. S. C. Genetic variation detected by RAPD markers in natural populations of babassu palm (*Attalea speciosa* Mart.). *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 2, p. 6124-6135, 2015.

SLATKIN, M. The average number of sites separating DNA sequences drawn from a subdivided population. *Theoretical Populations Biology*, v. 32, p. 42-49, 1987.

SEBBENN, A. A. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: Higa AH, Silva LD, coordenadores. Pomar de sementes de espécies florestais nativas. Curitiba: FUPEF; p. 93-138, 2006.

SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low level of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. *Heredity*. v. 106, n. 1, p. 134-145, 2011.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. WH Freeman and Company. New York. USA, 3ª edição, 1995.

TIAGO, P. V.; CARPEJANI, A. A.; TIAGO, A. V.; ROCHA, V. D.; ROSSI, A. A. B. Variabilidade genética em genótipos de *Hymenaea courbaril* L. por meio de marcadores ISSR. In: III SEMINÁRIO DE BIODIVERSIDADE E AGROECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS. Conservação de solos na Amazônia Meridional. Cáceres, v. 2, n. 1, 2015.

WRIGHT, S. Evolution and genetics of populations. Chicago: The University of Chicago Press, 465p., 1978.

YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belg J Bot*, v. 29, p. 157, 1997.

Capítulo 2

Manuscrito de artigo científico a ser submetido à revista

***Genetics and Molecular Research* (Ribeirão Preto, SP)**

Avaliação comparativa entre protocolos para obtenção de DNA de *Senefeldera verticillata* (Vell.) Croizat

RESUMO. Compreender os padrões de variabilidade genética de uma determinada espécie é fundamental para o planejamento de projetos de preservação. Assim, os marcadores moleculares correspondem uma técnica eficiente para estudos de diversidade genética. Independente da técnica molecular utilizada, primeiramente torna-se necessário a obtenção de DNA livre de impurezas, para o sucesso das análises moleculares. Com o objetivo de obter DNA genômico puro, amostras foliares de *Senefeldera verticillata* foram utilizadas para testar quatro diferentes protocolos de extração de DNA. Foi constatado que o protocolo 1, Doyle e Doyle (1990), modificado pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), forneceu a maior concentração de DNA (224,22 ng/μL), com resultados de pureza 1,96. A qualidade de DNA obtido pelo protocolo 2, Doyle e Doyle (1990), modificado pelo IAC com alterações nas concentrações de PVP e β-mercaptoetanol, foi semelhante ao do protocolo 1, porém, com menores concentrações de DNA (201,02 ng/μL). O protocolo 3, Doyle e Doyle (1990), modificado pelo IAC com alterações nas concentrações de PVP, β-mercaptoetanol e adição de BSA, forneceu a menor concentração e qualidade de pureza, 65,75 ng/μL e 1,5, respectivamente. O protocolo 4, Doyle e Doyle (1990), com adição de Proteinase K, forneceu médias de concentração de 67,6 ng/μL e pureza 1,66. O BSA não proporcionou melhor desempenho ao protocolo 3 para extração de DNA, também, a proteinase K, não contribuiu para melhores resultados de extração do protocolo 4, sendo que os resultados de pureza para estes dois protocolos indicaram que houve contaminação por proteínas. Sugere-se a utilização do protocolo 1 para obtenção de DNA livre de impurezas de *S. verticillata*.

Palavra chave: Análises moleculares; marcadores ISSR; métodos; PCR; protocolo

ABSTRACT. Understanding the patterns of genetic variability of a given species is critical to the planning of preservation projects. Thus, molecular markers correspond to an efficient technique for studies of genetic diversity. Regardless of the molecular technique used, it is first necessary to obtain DNA free of impurities, for the success of the molecular analyzes. In order to obtain pure genomic DNA, leaf samples of *Senefeldera verticillata* were used to test four different DNA extraction protocols. It was found that protocol 1, Doyle and Doyle (1990), modified by the Agronomic Institute of Campinas (IAC), provided the highest DNA concentration (224.22 ng / μ L), with results of purity 1.96. The quality of DNA obtained by protocol 2, Doyle and Doyle (1990), modified by IAC with changes in the concentrations of PVP and β -mercaptoethanol, was similar to that of protocol 1, however, with lower concentrations of DNA (201.02 ng / μ L). Protocol 3, Doyle and Doyle (1990), modified by IAC with changes in the concentrations of PVP, β -mercaptoethanol and addition of BSA, provided the lowest concentration and purity quality, 65.75 ng / μ L and 1.5, respectively . Protocol 4, Doyle and Doyle (1990), with Proteinase K addition, provided concentration averages of 67.6 ng / μ L and purity 1.66. BSA did not provide better performance for protocol 3 for DNA extraction. Also, proteinase K did not contribute to better extraction results from protocol 4, and the purity results for these two protocols indicated that there was contamination by proteins. It is suggested using protocol 1 to obtain DNA free of *S. verticillata* impurities.

Key words: Molecular analysis; ISSR markers; methods; PCR; protocol

1. INTRODUÇÃO

Senefeldera verticillata (Vell.) Croizat, conhecida como Sucanga, pertence a família Euphorbiaceae, é uma espécie endêmica do Brasil, com ocorrência nos estados de Pernambuco, Bahia, Alagoas, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Pscheidt e Cordeiro, 2012). Segundo Hans (2012), a espécie é monóica e apresenta síndrome de dispersão zoocórica e, apesar de sua importância econômica, principalmente devido a suas propriedades farmacológicas, ainda é muito pouco estudada.

O processo de fragmentação junto à degradação dos remanescentes florestais, principalmente daqueles próximos a centros urbanos, leva a modificações do ambiente original, afetando diretamente na base genética de muitas espécies que sobrevivem nesses locais (Pinto e Carvalho, 2004). Dessa forma, pesquisas que buscam estudar o padrão de variabilidade genética ainda existente são imprescindíveis, pois auxiliam em estratégias mais adequadas de manejo e conservação de espécies, tanto para a implantação de bancos de germoplasma, coleções de estudo ou para conservação *in situ* (Cruz et al., 2011).

Conforme relatado por Caixeta et al. (2009), os marcadores moleculares são uma ferramenta poderosa para estudos de variabilidade genética, atribuindo qualidade nas análises genéticas das espécies. Independente da técnica molecular empregada é fundamental a obtenção de DNA livre de contaminantes como polissacarídeos, proteínas e substâncias fenólicas que algumas espécies de plantas contêm (Mazza e Bittencourt, 2000). Segundo Romano (1998), os co-isolamentos dessas substâncias podem afetar a qualidade do DNA e inibir a ação da Taq Polimerase, interferir na PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou na separação dos fragmentos de DNA durante a eletroforese.

A metodologia mais empregada para extração de DNA em diferentes espécies vegetais é baseada no método que emprega, em seu tampão de extração, o detergente catiônico CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimetyl Ammonium Bromide*), descrito por Doyle e Doyle (1990), sendo, contudo, frequente a realização de alterações dependendo das propriedades da espécie. O emprego do CTAB na purificação de DNA foi primeiramente descrito para um

procedimento que envolvia a precipitação de DNA por meio de baixas concentrações de cloreto de sódio ($0,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) na presença desse detergente (Murray e Thompson, 1980). O sal atua auxiliando no processo de dissociação das proteínas do DNA, e dependendo da concentração de NaCl no tampão de extração, forma um complexo com o DNA-CTAB que pode ser utilizado para precipitar o DNA seletivamente em situações em que é difícil a separação, como em folhas maduras (Kidwell e Osborn, 1992; Lodhi et al., 1994; Vroh Bi et al., 1996; Ferreira e Grattapaglia, 1996; Bered, 1998).

Uma vez que os contaminantes podem comprometer os resultados obtidos em diferentes etapas do processo de extração de DNA, as adequações aos protocolos são de fundamental importância quando se deseja desenvolver procedimentos simples, rápidos e baratos e que forneçam DNA isento de impurezas (Molinari e Crochemore, 2001; Kotchoni e Gachomo, 2009).

A justificativa do presente trabalho baseia-se no insucesso de testes preliminares de extração de DNA de *S. verticillata*. O protocolo inicialmente adotado foi o proposto por Doyle e Doyle (1990) com adição de proteinase K, como descrito no protocolo 4 nesse estudo. Devido aos resultados de obtenção de DNA contaminado, como pôde ser observado por meio de quantificação seguida de eletroforese, houve a necessidade de novos ensaios laboratoriais com a finalidade de obter DNA puro. Assim, nesse trabalho foram avaliados protocolos para extração de DNA genômico, objetivando obtê-los, livre de impurezas para a espécie *S. verticillata*, visando estudos de diversidade genética, utilizando para tal, o marcador molecular *Inter Simple Sequence Repeated* (ISSR).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram coletadas folhas maduras de quatro indivíduos de *S. verticillata* em duas unidades de conservação, duas amostras da Floresta Nacional de Pacotuba (FLONA de Pacotuba) e duas da Reserva Particular do Patrimônio Natural Cafundó (RPPN Cafundó), ambas localizadas no município de Cachoeiro de Itapemirim, ES. As amostras foram colocadas em sacos plásticos

contendo sílica gel e transportadas para laboratório, onde foram armazenadas a -30 °C, liofilizadas e reservadas até a sua utilização.

2.2 Protocolos

Para o presente estudo foram testados quatro protocolos:

Protocolo 1: Protocolo Doyle e Doyle (1990), com modificações propostas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC): 1,4 mol L⁻¹ de NaCl₂; 100 mmol L⁻¹ de Tris-HCl a pH 8,0; 20 mmol L⁻¹ de ácido etileno diamino tetracético (EDTA); 1% de Polivinilpirrolidona (PVP); 2% de brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB); 0,2% de β-mercaptoetanol.

Protocolo 2: Protocolo Doyle e Doyle (1990), com modificações propostas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC): 1,4 mol L⁻¹ de NaCl₂; 100 mmol L⁻¹ de Tris-HCl a pH 8,0; 20 mmol L⁻¹ de EDTA; 2% de PVP; 2% de CTAB e 1% de β-mercaptoetanol.

Protocolo 3: Protocolo Doyle e Doyle (1990), com modificações propostas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC): 1,4 mol L⁻¹ de NaCl₂; 100 mmol L⁻¹ de Tris-HCl a pH 8,0; 20 mmol L⁻¹ de EDTA; 3% de PVP; 2% de CTAB; 2% de β-mercaptoetanol e 0,5% de Albumina de Soro Bovino (BSA).

Protocolo 4: Protocolo Doyle e Doyle (1990): 1,4 mol L⁻¹ de NaCl₂; 100 mmol L⁻¹ de Tris-HCl a pH 8,0; 20 mmol L⁻¹ de EDTA; 1% de PVP; 2% de CTAB; 0,2% de β-mercaptoetanol e 0,1 mg/mL de Proteinase K.

2.3 Procedimentos dos protocolos 1, 2 e 3

1. Aproximadamente 300 mg de folhas foram maceradas com auxílio de pistilo e almofariz, até obtenção de um pó bem fino, posteriormente, foram transferidos para microtubos de 2,0 mL.
2. Em cada microtubo foram adicionados 700μL de tampão de extração e homogeneizado.
3. Incubou-se em banho maria a 65°C por 30 minutos, invertendo-se os microtubos a cada 10 minutos, posteriormente foram colocados para secar por 5 minutos.

4. Foram adicionados um volume de 650 μL de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA) 24:1 (v/v), para desproteinização homogeneizando-os por 10 minutos.
5. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm durante 10 minutos (todos os passos de centrifugação foram realizados em centrífuga Pico 21 da Thermo Scientific, raio de 7,5 cm).
6. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 2,0 mL.
7. Foram adicionados 200 μL de tampão de extração e homogeneizado durante 5 minutos.
8. Adicionou-se 650 μL de CIA (24:1) e homogeneizado por 5 minutos.
9. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm durante 10 minutos.
10. A fase aquosa foi transferida para novo tubo onde se adicionou 650 μL de CIA 24:1.
11. Novamente foram centrifugados a 12.000 rpm durante 10 minutos.
12. As etapas 10 e 11 foram realizadas mais duas vezes.
13. O DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol gelado mais 230 μL de Acetato de Amônio e homogeneizado por 5 minutos.
14. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm durante 10 minutos.
15. O precipitado foi lavado com 250 μL de etanol 70% e depois passou por centrífuga a 12000 rpm por 3 minutos, essa etapa foi realizada por mais duas vezes.
16. O etanol foi retirado e o tubo colocado para secar em temperatura ambiente.
17. O DNA foi ressuspendido em 40 μL de TE com RNase ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) e colocado em banho maria a 37 °C por 30 minutos.

2.4 Procedimentos do protocolo 4

1. As folhas foram maceradas com auxílio de pistilo e almofariz, até obtenção de um pó bem fino, aproximadamente 300 mg do tecido vegetal macerado foram transferidos para microtubos de 2,0 mL.
2. Em cada microtubo foram adicionados 800 μL de tampão de extração e homogeneizados.

3. Incubou-se em banho maria a 65°C por 40 minutos, invertendo-se os microtubos a cada 10 minutos, posteriormente foram colocados para secar por 5 minutos.
4. Os microtubos foram homogeneizados em centrífuga a 14.000 rpm durante 5 minutos e depois inverteu-se o sobrenadante em um novo microtubo.
5. Foi adicionado um volume de 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA) 24:1 (v/v) para desproteinização, homogeneizando-os por 5 minutos.
6. Os microtubos passaram por centrífuga a 14.000 rpm durante 5 minutos.
7. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo.
8. Foi adicionado o mesmo volume de CIA 24:1 e homogeneizado por 10 minutos.
9. Os microtubos foram centrifugados a 14.000 rpm durante 5 minutos.
10. A fase aquosa foi transferida para novo microtubo.
11. A este volume foi adicionado 2/3 de Isopropanol gelado, os microtubos foram invertidos suavemente e incubados em freez -80 °C por 30 minutos.
12. Os microtubos foram centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante invertido dentro de um Becker, preservando-se o pellet no fundo do microtubo.
13. O precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70% gelado e depois passou por centrífuga a 14.000 rpm por 5 minutos. Esse passo foi repetido mais duas vezes, sendo que, na segunda repetição o pellet foi lavado com Etanol 95% gelado.
14. O etanol foi retirado e o microtubo colocado para secar em temperatura ambiente.
15. O DNA foi ressuspendido em 200 µL de TE com RNase (40 µg mL⁻¹) e colocado em banho maria a 37 °C por 30 minutos.

2.5 Quantificação e qualidade do DNA obtido

2.5.1 Quantificação por eletroforese

Uma alíquota de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8% já corado com brometo de etídio (0,50 µL mL⁻¹), para verificar a integridade do DNA extraído por meio do gel de concentração.

2.5.2 Quantificação por espectrofotometria

A quantificação e pureza foram determinadas por espectrofotometria no aparelho NanoDrop (Thermo Scientific 2000C). De acordo com as concentrações obtidas, foram preparadas soluções de trabalho de 10 ng μL^{-1} e armazenadas a -20 °C para análises posteriores.

2.5.3 Amplificação por PCR

Para averiguar a qualidade das amostras, foram efetuadas reações de amplificação foi efetuada com um volume final para cada reação de 20 μL contendo: 2,5 mmol L^{-1} de MgCl_2 ; 0,8 mmol L^{-1} de dNTP; 1 unidade de enzima Taq DNA polimerase; tampão da enzima 1X (10 mmol L^{-1} ; Tris-HCl pH 8,5; 50 mmol L^{-1} de KCl); 50 ng de DNA; 0,2 μM de *primer*.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems, modelo Veriti) com as seguintes condições: uma etapa inicial de 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos constituídos por três etapas: a) 45 segundos a 94 °C, b) 45 segundos a 52 °C e c) 90 segundos a 72 °C, seguidos por uma extensão final de 7 minutos a 72 °C. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio (0,50 $\mu\text{g/mL}$), em tampão TBE (tris, ácido bórico e EDTA) a 94 volts com duração de aproximadamente 4 horas. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados, por comparação, com o marcador molecular de 100 pb DNA *Ladder* (Ludwig). Após eletroforese os géis foram expostos à luz ultravioleta e fotodocumentados (ChemiDoc MP Imaging System – Bio Rad).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias da quantificação e pureza do DNA obtido a partir das quatro amostras de *S. verticillata*, para cada método empregado, encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Quantificação e pureza do DNA genômico obtido por diferentes protocolos de extração, utilizando amostras de tecido foliar de 300 mg de *Senefeldera verticillata*.

Protocolos	Concentração (ng μL^{-1})	Razão (A_{260}/A_{280} nm)
Protocolo 1	224,22	1,96
Protocolo 2	201,02	1,96
Protocolo 3	65,75	1,50
Protocolo 4	67,60	1,66

Por meio dos resultados obtidos, é possível verificar uma variação entre os protocolos empregados. A menor concentração média de DNA (65,75 ng μL^{-1}) e qualidade de pureza (1,5) para *S. verticillata* foi obtida na extração baseada no método 3, seguido do protocolo 4, com médias de concentração de DNA e qualidade de pureza de 67,6 ng μL^{-1} e 1,66, respectivamente.

Segundo Oliveira et al. (2007), metodologias que empregam a digestão enzimática (proteinase K), independente do tipo de extração de DNA genômico, possibilitam a obtenção de materiais com concentração de ácidos nucleicos e pureza satisfatórias para posterior amplificação do DNA, por meio da técnica de PCR. De acordo com Hubner et al. (2004), essa enzima atua no rompimento das proteínas nas ligações peptídicas, que possuam o grupo carboxila de lisina ou de arginina.

O uso do BSA no mix de reação possibilita a obtenção de bandas mais claras, homogeneidade entre as amostras e principalmente evita que ocorram falhas de reações (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). O BSA atua como estabilizador de atividades enzimáticas contra a desnaturação durante o armazenamento, diluições ou reações *in vitro*. Contudo, a adição de BSA a 0,5% no protocolo de extração 3 não lhe proporcionou melhor eficiência, assim como não se obteve muito êxito com o método 4 que, emprega Proteinase K no tampão de extração, para a espécie desse estudo.

Estudos realizados por Barbosa (1998) demonstraram que, amostras que apresentam A_{260}/A_{280} variando entre 1,8 a 2,0 correspondem a DNA livre de

impurezas. Já relações com níveis inferiores a 1,8, representam amostras de DNA contaminado por proteínas e/ou outros contaminantes presentes nas amostras, e uma relação superior a 2,0 é indicativo de contaminação por clorofórmio ou fenol. Para estes casos uma nova precipitação do DNA seria aconselhável. Assim, de acordo com os resultados de pureza de DNA obtidos pelos protocolos 3 e 4, possivelmente as amostras foram contaminadas por compostos secundários como polissacarídeos e/ou polifenóis presentes em *S. verticillata* o que resultou em amostras de DNA com presença de contaminantes.

De acordo com Hummel e Herrmann (1994), muitas espécies de plantas têm em seus tecidos, níveis altos de compostos secundários, como compostos fenólicos, além de polissacarídeos, o que é uma adaptação das plantas ao longo dos anos em resposta a herbivoria. Esses compostos, particularmente os fenólicos, dificultam ou inviabilizam a PCR, por inibirem a atuação da enzima DNA polimerase, o que reflete na qualidade final do DNA extraído.

O protocolo 2 forneceu uma quantidade média de DNA de 201,02 ng μL^{-1} livres de impurezas (1,96), contudo, o protocolo 1 possibilitou, entre os quatro protocolos empregados, a maior quantidade de DNA (224,22 ng μL^{-1}) com pureza igual ao método 2 (1,96). O aumento nas concentrações de PVP e β -mercaptoetanol no protocolo 3, não resultou em melhores condições para obtenção de DNA puro. Por outro lado, foi observado que, menores concentrações desses reagentes no tampão de extração, como foi utilizado nos protocolos 1 e 2, forneceram bons resultados de concentração e pureza do DNA, como foi observado por meio dos dados fornecidos na Tabela 1.

O β -mercaptoetanol atua como um redutor de oxidação, no presente estudo forneceu, mesmo em uma pequena concentração (0,2%), no protocolo 1, o melhor resultado para quantidade de DNA, assim como ocorreu para a concentração de PVP (1%) nesse mesmo protocolo.

Também, para verificação da qualidade do DNA de *S. verticillata*, foi realizada a eletroforese das amostras em gel de concentração, como também, a amplificação por meio de PCR. Comparando-se os padrões de bandas entre os métodos utilizados é possível observar, pelo gel de concentração, melhor desempenho para o protocolo de extração 1, uma vez que houve a formação de bandas mais nítidas e mais robustas sem aparente degradação (Figura 1A).

O método 2, mesmo não fornecendo padrão de bandas semelhante ao protocolo 1, expressou razoável qualidade de DNA (Figura 1B).

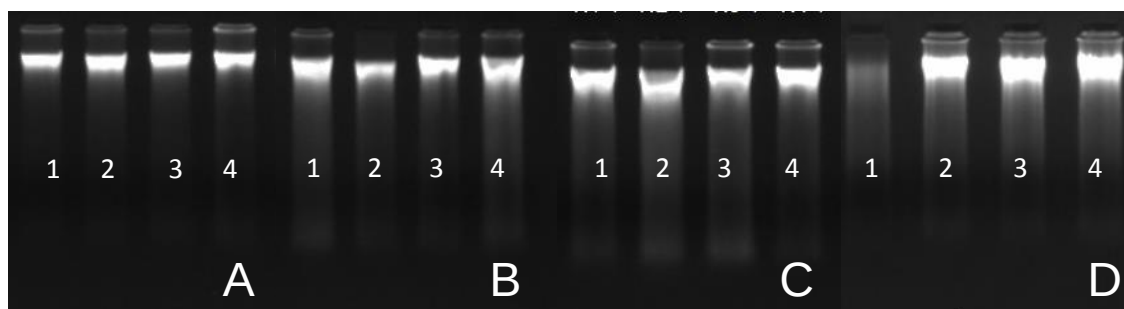


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose de quatro amostras de DNA de *Senefeldera verticillata*, obtidos por meio de diferentes protocolos. Figura 1A: protocolo 1; Figura 1B: protocolo 2; Figura 1C: protocolo 3; Figura 1D: protocolo 4.

Os padrões de bandas dos protocolos 3 e 4, foram menos nítidos além de apresentar um certo arraste vertical, indicativo de impurezas presentes no DNA e degradação das amostras. Os resultados da figura 1 corroboram com os resultados de quantificação e qualidade de DNA fornecidos na Tabela 1.

As metodologias, comumente utilizadas em laboratório, seguem protocolos padrões para extração de DNA, todavia, torna-se quase rotina a realização de testes com esses procedimentos, buscando-se adequar os protocolos aos tipos de tecidos ou espécies em que se trabalha onde o objetivo final é um DNA livre de impurezas. Dessa forma, torna-se complexo comparar resultados descritos na literatura, porém, é plausível, fazer uma comparação baseado na quantidade de tecido vegetal (Borges et al., 2012).

De acordo com Ferreira e Grattapaglia (1996) com o emprego da metodologia CTAB, é possível chegar a concentrações de 10 a 200 ng μL^{-1} utilizando de 50 a 200 mg de tecido foliar. No presente estudo, foram utilizados aproximadamente 300 mg do tecido vegetal e os resultados encontram-se próximos aos citados por este autor. Arriel et al. (2002), compararam a eficiência de quatro métodos de extração de DNA genômico de gergelim e obtiveram uma média, a partir dos métodos empregados, de 409,49 ng μL^{-1} com relação de pureza de 1,60, a partir de uma quantidade de 50 a 100 mg de tecido foliar. Em extração de DNA de Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), a partir de 500mg de tecido vegetal, Cansanção e Coutinho (2013), obtiveram resultados que

variaram entre 0,89 e 1,35 e 95 e 425 ng μL^{-1} para pureza e quantidade de DNA, respectivamente.

Os testes de amplificação tiveram bons resultados para o DNA extraído pelos protocolos 1, 2, 3 e 4, obtendo-se boas amplificações por meio dos marcadores moleculares ISSR UBC810 e UBC811 (Figura 2).

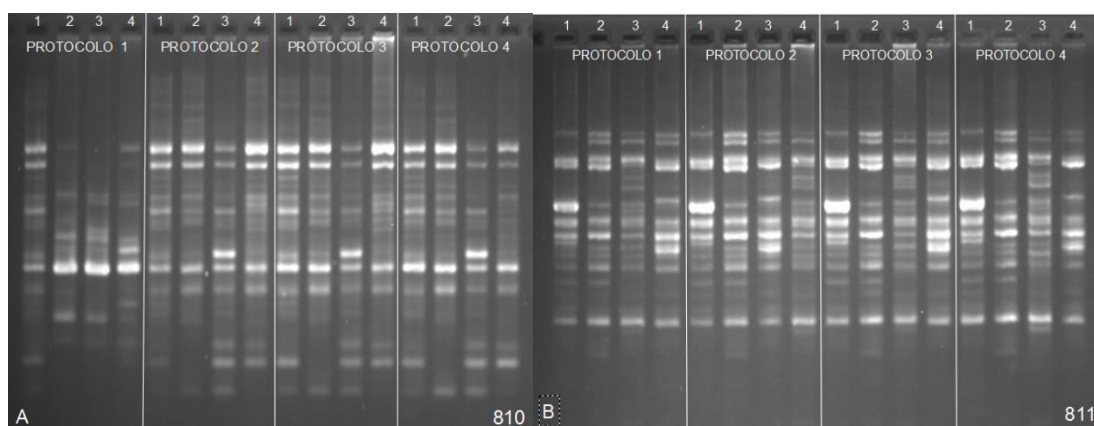


Figura 2. Produtos de amplificação de DNA de quatro amostras de *Senefeldera verticillata*. Padrão de bandas geradas com iniciadores ISSRs, UBC810 (Figura 2A) e UBC811 (Figura 2B). Coluna 1 = protocolo 1, Coluna 2 = protocolo 2, Coluna 3 = protocolo 3, Coluna 4 = protocolo 4.

A quantidade e qualidade de DNA extraído, não interferiram nos padrões de amplificação, em outras palavras, apesar da presença de contaminantes observadas nos protocolos 3 e 4, houve amplificação por meio de todos os métodos de extração testados. Contudo, na prática, durante os ensaios realizados em laboratório tem sido observado que, a utilização no decorrer do tempo de DNA com qualidade de pureza inferior, tende a resultar em aumento de falhas no processo de amplificação. Dessa forma, fica clara a importância, para o sucesso da PCR, o emprego de DNA livre de impurezas, como é o caso dos resultados encontrados nos protocolos 1 e 2.

4. CONCLUSÃO

Os protocolos 1 e 2 mostraram-se adequados para extração de DNA de tecidos foliares de *S. verticillata* fornecendo quantidade e qualidade superior em relação aos outros procedimentos, para realização de reações de PCR-ISSR. Contudo, o protocolo 1 requer menores quantidades de PVP e β -

mercaptoetanol para fornecer a mesma qualidade em maior concentração de DNA, sugere-se, portanto, o emprego deste método para extração de DNA da espécie em questão.

Os resultados dessa pesquisa irão permitir análises genéticas por meio de marcadores moleculares ISSR, para verificar os padrões de diversidade genética de populações de *S. verticillata*.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Centro de Ciências e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES, Alegre/ES), ao Núcleo de Pesquisa Científica e Tecnológica em Meio Ambiente, Silvicultura e Ecologia (NUPEMASE) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

6. REFERÊNCIAS

- Arriel NHC, Unêda-Trevisoli SH, Capeloto A, Mauro SMZD, Mauro AOD (2002). Análise comparativa de quatro protocolos de extração de DNA genômico, em gergelim. Rev. bras. ol. fibros., Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 525-535.
- Barbosa MM (1998). Quantificação e controle da qualidade do DNA genômico. In: MILACH, S. ed. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre, p. 99-106.
- Bered F (1998). Extração de DNA - considerações e prática. In: MILACH, S. (Ed) Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre, p. 91-98.
- Borges DB, Amorim MB, Waldschmidt AM, Mariano-Neto E, Vivas CV, Pereira DG (2012). Optimization of DNA extraction from fresh leaf tissues of *Melanoxylon brauna* (Fabaceae). Genetics and Molecular Research 11 (2): 1586-1591.
- Caixeta ET; Oliveira ACB; Brito GG; Sakiyama NS (2009). Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Org.). Marcadores moleculares. 2. ed. Viçosa: Editora Jard, v. 1, p. 11-101.
- Cruz DT; Schnadelbach AS; Lambert SM; Ribeiro PL; Borba EL (2011). Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in Notheastern Brazil. Plant Systematics and evolution, Beijing, v. 294, p. 87-98.
- Doyle JJ; Doyle, JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, v. 12, p. 13-15.
- Ferreira ME; Grattapaglia D (1996). Introdução ao uso de marcadores. RAPD e RFLP em análise genética. Brasília, EMBRAPA-CENARGEN. Documento 20, Brasil, 220 p.
- Hans JE (2012). The tribe Hippomaneae (Euphorbiaceae) in Brazil: A tribo Hippomaneae (Euphorbiaceae) no Brasil. Rodriguésia vol. 63(1), p. 209-225. Disponível em [<http://www.scielo.br/pdf/rod/v63n1/a13v63n1.pdf>]. Acessado em 12 de dezembro de 2016.
- Hubner CSO; Pescador C; Coberllini LG (2004). Otimização da imunoistoquímica para detecção de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) em tecidos do sistema nervoso central fixado com formaldeído. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 57, p. 1-6.
- Hummel S; Herrmann B (1994). General aspects of sample preparation. In Ancient DNA: Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Arhcaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimens. Springer-Verlag, New York, p. 59-67.

- Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE (2015). ATLAS DOS REMANESCENTES FLORESTAIS DA MATA ATLÂNTICA PERÍODO 2013-2014. São Paulo. Disponível em [http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=3891]. Acessado em 16 de novembro de 2016.
- Kidwell KK; Osborn TC (1992). Simple plant DNA isolation procedures. In: BECKMANN, J.S.; OSBORN, T.C. Plant genomes: Methods for genetic and physical mapping. ed. London: Kluwer Academic Publishers, p. 1-13.
- Kotchoni SO; Gachomo EW (2009). A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. Molecular Biology Reports, Worcester, v. 36, n. 6, p. 1633-1636.
- Lodhi MA; Ye GN; Weeden NF; Reisch BI (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. Plant Molecular Biology Reporter, v. 12, n. 1, p. 6-13.
- Mazza MCM; Bittencourt JVM (2000). Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo, n. 41, p. 12-17.
- Molinari HB; Crochemore ML (2001). Extração de DNA genômico de Passiflora spp. para análises PCR-RAPD. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 447-450.
- Murray MG; Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, Standford, v. 8, n. 19, p. 4321-4325.
- Oliveira MCS; Regitano LCA; Roese AD (2007). Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 43 p.
- Pinto SIC; Carvalho D (2004). Estrutura genética de população de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Sprengel) por isoenzimas. Revista Brazil. Bot. 27: 597-605.
- Pscheidt AC; Cordeiro I (2012). Sinopse da tribo Hippomaneae (Euphorbiaceae) no Estado de São Paulo, Brasil. Hoehnea, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 347-368.
- Romano E (1998). Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed). Manual de transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, p. 163-177.

Vroh Bi I; Harvengt L; Chandelier A; Mergeai G; Du Jardin P (1996) . Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding*, v. 115, n. 205, p. 205-206.

Capítulo 3

Manuscrito de artigo científico a ser submetido à revista

***Genetics and Molecular Research* (Ribeirão Preto, SP)**

Diversidade genética de *Senefeldera verticillata* (Vell.) Croizat por meio de marcadores ISSR

RESUMO. No Espírito Santo destaca-se a Floresta Estacional Semidecídua que forma a tipologia do bioma Floresta Atlântica, localizadas principalmente no sul do Estado. *Senefeldera verticillata* é uma espécie de ocorrência exclusiva da Floresta Atlântica e tem importância no uso terapêutico. Devido à escassez de informações sobre padrões de diversidade genética, caracterizou-se a diversidade genética com o emprego de marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR), para tanto, foram coletadas amostras foliares da espécie, em duas populações localizadas na Floresta Nacional (FLONA) de Pacotuba e na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Cafundó. Foram utilizados doze *primers* ISSR, que resultaram em um total de 179 produtos de amplificação, com 75,97% de bandas polimórficas. Os valores de diversidade genética de Nei (H) e índice de fixação de Shannon (I) foram 0,329 e 0,503, respectivamente. O fluxo gênico estimado para os fragmentos foi alto ($Nm=13,542$). A análise molecular de variância mostrou que maior parte da diversidade genética se encontra dentro das unidades de conservação (94,99%) e a diferenciação genética entre populações foi considerada moderada ($\Phi_{ST}=0,0501$), dessa forma, propõe-se que um grande número de indivíduos, nas duas localidades, seja conservado para que a variabilidade existente seja preservada. A análise Bayesiana indicou que uma pequena variação genética ocorre entre as populações, pois não foi constatada, por meio do Structure, a organização de grupos por localidade. Foi identificada a formação de seis grupos por meio do método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA), em que 30 matrizes, de ambas os fragmentos, foram reunidas em um único grupo. Com esse trabalho, foi possível identificar divergência genética entre as árvores avaliadas nas unidades de conservação. Dessa forma, esses indivíduos mais divergentes e, localizados na FLONA de Pacotuba, que faz parte da rede de sementes de florestas nativas, poderão ser selecionados para o fornecimento de sementes com maior variabilidade genética.

Palavras-chave: Fluxo gênico; marcador molecular; preservação; variabilidade genética

ABSTRACT. In Espírito Santo stands out the Semideciduous Seasonal Floresta that forms the typology of the Atlantic Forest biome, located mainly in the south of the State. *Senefeldera verticillata* is a species of exclusive occurrence of the Atlantic Forest and has importance in the therapeutic use. Due to the scarcity of information on genetic diversity patterns, genetic diversity was characterized by the use of Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) molecular markers. For this purpose, leaf samples were collected from two species located in the National Forest (FLONA) of Pacotuba and in the Private Reserve of Natural Patrimony (RPPN) Cafundó. Twelve ISSR primers were used, resulting in a total of 179 amplification products, with 75.97% of polymorphic bands. The genetic diversity values of Nei (H) and Shannon (I) fixation index were 0,329 and 0,503, respectively. The estimated gene flow for the fragments was high ($Nm = 13,542$). The molecular analysis of variance showed that most of the genetic diversity is within conservation units (94.99%) and genetic differentiation between populations was considered moderate ($\Phi_{ST} = 0.0501$), so it is proposed that a large number of individuals, in both locations, is conserved so that the existing variability is preserved. The Bayesian analysis indicated that a small genetic variation occurs among the populations, since it was not verified, through Structure, the organization of groups by locality. It was identified the formation of six groups by means of the unweighted arithmetic means clustering (UPGMA) method, in which 30 matrices of both fragments were collected in a single group. With this work, it was possible to identify genetic divergence among the trees evaluated in conservation units. Thus, these more divergent individuals, located in the FLONA of Pacotuba, which is part of the network of seeds of native forests, can be selected to supply seeds with greater genetic variability.

Keywords: Gene flow; molecular marker; preservation; genetic variability

1. INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica é conhecida mundialmente como uma floresta com vasta riqueza em biodiversidade e endemismo. O Espírito Santo é detentor de uma área de 45.597 km², sendo que aproximadamente 90% de sua cobertura vegetal eram compostas por Floresta Atlântica (Inpe, 2015). Segundo Assis et al. (2007), entre as tipologias que formam o bioma Floresta Atlântica no Estado, destacam-se as Florestas Estacionais Semidecíduas, que representam a segunda mais importante formação vegetacional em termos de área ocupada, concentrada principalmente na região sul.

No sul do estado do Espírito Santo encontram-se as unidades de conservação Floresta Nacional de Pacotuba (FLONA de Pacotuba) e Reserva Particular do Patrimônio Natural Cafundó (RPPN Cafundó), esses fragmentos representam remanescentes florestais significativos da região, sendo de fundamental importância a conservação desses ambientes (Ipema, 2005).

Senefeldera verticillata (Vell.) Croizat (Euphorbiaceae) conhecida vulgarmente por Sucanga, é endêmica do Brasil e ocorre nos estados de Pernambuco, Bahia, Alagoas, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Pscheidt e Cordeiro, 2012). A espécie é monóica com síndrome de dispersão zoocórica, sua ocorrência é exclusiva da Floresta Atlântica e, apesar de sua importância econômica como a sua utilização para fins terapêuticos, esta espécie ainda é muito pouco estudada (Hans, 2012).

A variabilidade genética de uma espécie é a base para sua adaptação e sobrevivência, sendo o fator principal para que ocorra a evolução, a sua introdução ocorre, continuamente, por meio de fatores evolutivos como mutação e migração e, pode ser perdida por deriva genética, acasalamento entre indivíduos aparentados e seleção natural (Cole, 2003). O conhecimento acerca da diversidade genética de uma espécie torna-se primordial para tomada de decisões na constituição de lotes de sementes que irão compor mudas destinadas a conservação e melhoramento genético.

Atualmente, existe uma ampla variedade de marcadores moleculares disponíveis, que permitem analisar a variabilidade genética entre e dentro de populações. Entre esses marcadores, destaca-se os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) (Zietkiewicz et al., 1994), que são marcadores moleculares

dominantes e semiarbitrários (Souza et al., 2005). Esses marcadores são cada vez mais utilizados em avaliações de diversidade genética de espécies arbóreas, constituem uma técnica menos onerosa, são altamente reprodutíveis e os procedimentos laboratoriais podem ser utilizados para várias espécies de plantas (Nybom 2004; Kumar et al., 2011).

Com essas perspectivas, objetivou-se, por meio do marcador molecular ISSR, avaliar o padrão de diversidade genética de matrizes de *Senefeldera verticillata* localizadas nas unidades de conservação supracitadas, e assim, definir estratégias mais adequadas para sua preservação. Ainda, selecionar matrizes mais divergentes geneticamente presentes na FLONA de Pacotuba, a qual faz parte do projeto do governo federal, Rede de Sementes Florestais Nativas, para formação de pomar de sementes e produção de mudas a serem empregadas em trabalhos de recuperação de áreas degradadas na região.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de estudo e amostragem

Folhas jovens e de aspecto saudável foram coletadas, aleatoriamente, de 39 árvores maduras da espécie *Senefeldera verticillata*, entre os meses de março e abril de 2016, sendo, 17 árvores inseridas na FLONA de Pacotuba (20°45' latitude Sul e 41°17' de longitude Oeste) e 22 localizadas na RPPN Cafundó (20°43' latitude Sul e 41°13' de longitude Oeste) (Figura 1). Cada árvore selecionada teve uma distância mínima de 50 m com intuito de evitar a coleta de indivíduos aparentados ou de clones. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos contendo sílica gel e encaminhadas ao laboratório, mantidas a -30 °C, liofilizadas e armazenadas até a extração do DNA.

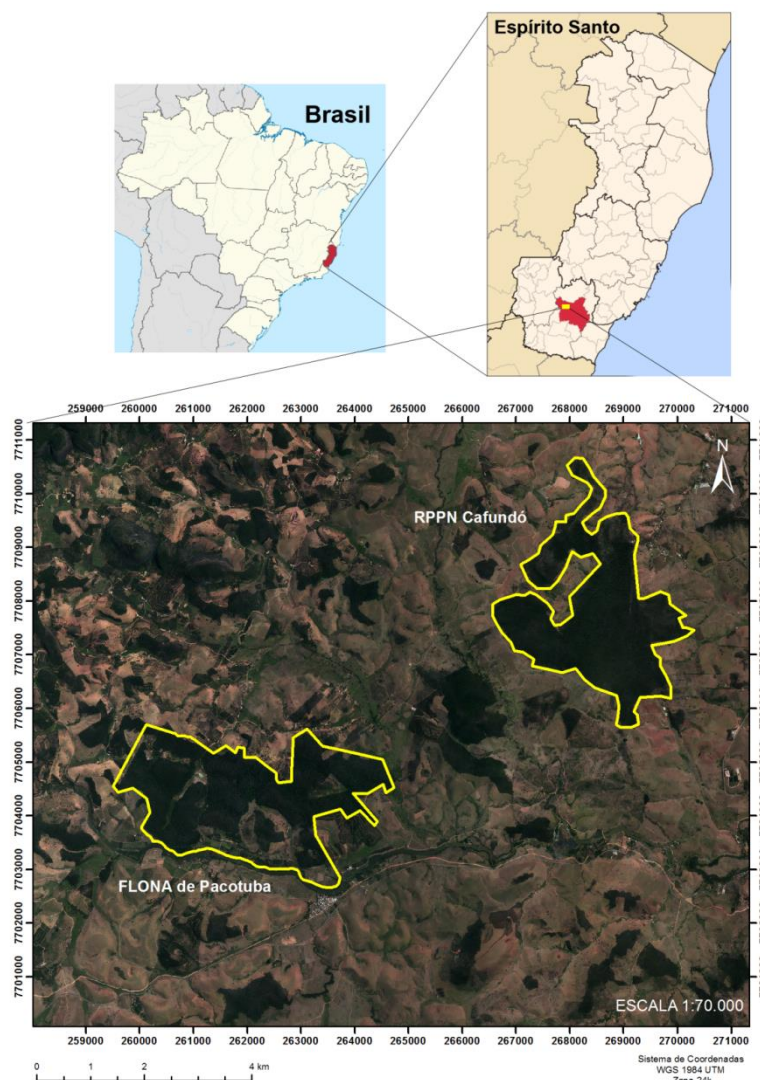


Figura 1. Localização dos locais de amostragem de *Senefeldera verticillata*, ES.

2.2 Extração, quantificação e diluição do DNA

A extração do DNA utilizada para avaliações de diversidade genética de *S. verticillata*, foi realizada de acordo com o protocolo testado no capítulo 2 desse estudo e que forneceu os melhores resultados, sendo o mesmo sugerido para a extração de DNA dessa espécie. Assim, a metodologia empregada foi a extração de tecidos vegetais CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) proposto por (Doyle e Doyle, 1990), com modificações propostas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC).

A quantificação e pureza foram determinadas por espectrofotometria no aparelho NanoDrop (*Thermo Scientific 2000C*). Com base nesses dados, foram

preparadas soluções de trabalho de $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e armazenadas a -20°C para análises posteriores.

2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese e documentação

Inicialmente, realizou-se um ensaio com 33 *primers* ISSR obtidos da *University of British Columbia* e, a partir desses testes, foram selecionados 12 iniciadores ISSR para as análises definitivas em todos os indivíduos de *S. verticillata* por produzirem número de bandas confiáveis e polimorfismo reproduzível nas amostras.

Cada reação de amplificação teve um volume final de $20 \mu\text{L}$ contendo $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de MgCl_2 ; $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de dNTP; 1 unidade de enzima Taq DNA polimerase; tampão da enzima 1X (10 mmol L^{-1} ; Tris-HCl pH 8,5; 50 mmol L de KCl); 50 ng de DNA; $0,2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de *primer*. As amplificações foram conduzidas em termociclador (Applied Biosystems, modelo Veriti) sob as seguintes condições: uma etapa inicial de 5 minutos a 94°C , seguido por 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 52°C por 45 segundos e 72°C por 90 segundos e uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos de amplificação do DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio ($0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$), em tampão de corrida TBE 1X (tris, ácido bórico e EDTA) a 94 volts por aproximadamente 4 horas. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados comparando-os com marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig). Em seguida os géis foram fotografados sob luz ultravioleta por meio de fotodocumentação (*ChemiDoc MP Imaging System – Bio Rad*).

2.4 Análise dos dados

Apenas bandas robustas e inequívocas foram selecionadas para as análises estatísticas. Os fragmentos ISSR amplificados foram analisados como 1 para presença e 0 para ausência. O software POPGENE versão 3.2 (Yeh e Boyle, 1997) foi utilizado para calcular os seguintes parâmetros de diversidade genética: número de alelos efetivos (N_e), porcentagem de loci polimórficos (PLP), índice de diversidade de Shannon (I), diversidade genética de Nei (H).

O coeficiente de diferenciação genética (G_{ST}) e fluxo gênico (Nm) também foram calculados com o auxílio deste software. Por meio do programa Genes (Cruz, 2013), foi calculada uma matriz de similaridade entre os indivíduos, a qual foi convertida em uma matriz de dissimilaridade por meio do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard e o dendrograma foi construído pelo método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA).

Foi determinado, pelo método proposto por Mojema (1977), o ponto de corte para o dendrograma. A análise de variância molecular (AMOVA) foi empregada para avaliar a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações, além de inferir sobre sua estruturação utilizando o software Arlequin versão 3.11 (Excoffier et al., 1992).

O programa Structure (Pritchard et al., 2000), baseado em estatística Bayesiana foi utilizado para inferir o número de grupos (k). Foram realizadas 20 corridas para cada valor de K , 250.000 burn-ins e 1.000.000 simulações de Monte Carlo de Cadeias de Markov (MCMC). Para a definição do valor de K mais provável foi utilizado a média e o desvio padrão de cada valor de probabilidade de K e o método ΔK proposto por Evanno et al. (2005) por meio do uso do software Structure Harvester (Earl; VonHoldt, 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os doze *primers* utilizados possibilitaram a obtenção de 179 produtos de amplificação (bandas) dos quais 136 (75,97%) foram polimórficos. A utilização dos *primers* utilizados nesse estudo foi satisfatória para detecção de polimorfismo em populações naturais de *S. verticillata*, o valor do percentual de bandas polimórficas pode ser comparado com resultados de outros trabalhos encontrados na literatura.

Almeida et al. (2015), em estudo de diversidade genética por meio de marcadores AFLP, em populações de *Cenostigma tocanthum* espécie arbórea nativa da Amazônia, observaram um total de 186 locos, sendo 132 (71%) polimórficos. Aguiar et al. (2013), avaliaram a diversidade genética em populações selvagens de *Eugenia uniflora* em remanescentes florestais com diferentes estádios sucessionais, e encontraram 79% de locos polimórficos nas

área em que se encontravam em estágio avançado de sucessão e 70% para a área em estágio de sucessão inicial.

O número de bandas por iniciador variou entre 8 e 24, com uma média de 14,91 bandas por *primer*, sendo observada uma variação de pesos moleculares dos diferentes loci desde 150 a 2080 pares de bases (pb). O *primer* UBC818 revelou o maior número de bandas polimórficas (20), enquanto o UBC842 representou o *primer* menos informativo produzindo somente três bandas polimórficas de oito (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizados na análise ISSR de *Senefeldera verticillata* e respectivos resultados de amplificação.

Primer	Sequência	NTB	NBP	PBP %	PM (min-max)
UBC807	(AG) ₈ T	13	11	84,61	150 – 1600
UBC808	(AG) ₈ C	18	15	83,33	250 – 2080
UBC811	(GA) ₈ C	13	10	76,92	250 – 1520
UBC812	(GA) ₈ A	17	10	58,82	240 – 2080
UBC818	(CA) ₈ G	24	20	83,33	360 – 2080
UBC836	(AG) ₈ YA	9	5	55,55	260 – 2080
UBC842	(GA) ₈ YG	8	3	37,50	250 – 2080
UBC856	(AC) ₈ YA	17	13	76,47	480 – 2080
UBC864	(ATG) ₅	16	14	87,50	280 – 1500
UBC868	(GAA) ₆	17	13	76,47	300 – 2080
UBC880	(GGAGA) ₃	18	16	88,88	230 – 1020
UBC891	HVH(TG) ₇	9	6	66,66	260 – 1220
TOTAL		179	136	75,97	

NTB = número total de bandas; NPB = número de bandas polimórficas; PBP = porcentagem de bandas polimórficas; PM = peso molecular (mínimo e máximo).

Em nível de espécie, as diversidades genéticas medidas por N_e , H_e e I foram 1,538; 0,329 e 0,503, respectivamente. Com base nos cálculos de H_e e I , as variações genéticas das duas populações as classificaram como FLONA > RPPN, contudo, não havendo grande variação nos níveis de diversidade entre os dois fragmentos. O valor da PLP (75,97%) foi o mesmo para as duas unidades de conservação (Tabela 2).

Tabela 2. Variação genética em populações de *Senefeldera verticillata* detectada por marcadores ISSR.

População	N	N_e	H_e	I	PLP(%)
FLONA de Pacotuba	17	1,544	0,327	0,498	75,97
RPPN Cafundó	22	1,501	0,310	0,478	75,97
Espécie	39	1,538	0,329	0,503	75,97

N: número de amostras; N_e : número de alelos efetivos; H_e : diversidade genética de Nei; I : índice de Shannon. PLP: porcentagem de locos polimórficos

Segundo Pádua e Ferreira (2008), o valor de I pode variar entre 0 e 1, sendo que valores iguais a 1 indicam a máxima diversidade observada em uma população. Em condições naturais, o valor de H_e nunca é zero, devido a frequente incorporação de novos alelos pelos cruzamentos, mesmo em pequenas populações ou ambientes fragmentados, como também, por meio de perdas ocorridas pela deriva genética (Silva et al., 2014).

Com a utilização de marcadores moleculares ISSR nessa pesquisa, quando comparada a outros trabalhos com espécies arbóreas e com emprego de metodologia semelhante, a diversidade em *S. verticillata* pode ser considerada alta. Santana et al. (2016), ao utilizarem marcadores moleculares ISSR para avaliar a diversidade genética de uma população natural de *Myrciaria tenella* (Myrtaceae) localizada na Reserva Particular do Patrimônio Natural em área de restinga, no município de Caju-SE, encontraram valores para I e H_e de 0,52 e 0,35; respectivamente, e os consideraram como níveis relevantes de diversidade. Em estudos sobre a diversidade e estrutura genética em população natural de *Nectandra megapotamica*, espécie de fecundação cruzada, localizada em área de Floresta Atlântica em Itaara-Rio Grande do Sul,

Costa (2015), encontraram valores muito próximos aos resultados do presente estudo para H_e e I , e porcentagem de locos polimórficos, utilizando marcadores RAPD.

Os resultados de diversidade genética encontrados no presente trabalho podem estar relacionados com as características da espécie arbórea, assim como, com as características do local onde ela se encontra. Por se tratar de uma espécie de vida longa e estar em área de preservação, onde o corte seletivo não é permitido, a fragmentação ocorrida não foi o suficiente para afetar a diversidade genética existente. Também, devido à presença da fauna, especialmente pássaros, a dispersão de sementes por esses animais provavelmente tem contribuído para a manutenção da diversidade.

A dissimilaridade entre as matrizes com base nos marcadores ISSR variou de 0,47 a 0,90. A dissimilaridade máxima (0,90) foi observada entre as matrizes 6 e 22, enquanto a menor (0,47) ocorreu entre as matrizes 14 e 16, sendo as quatro matrizes pertencentes a FLONA de Pacotuba.

Com posse do agrupamento hierárquico (UPGMA) dos valores de dissimilaridade e tomando-se como ponto de corte a dissimilaridade média de 94,46%, foi possível identificar a formação de seis grupos (Figura 2).

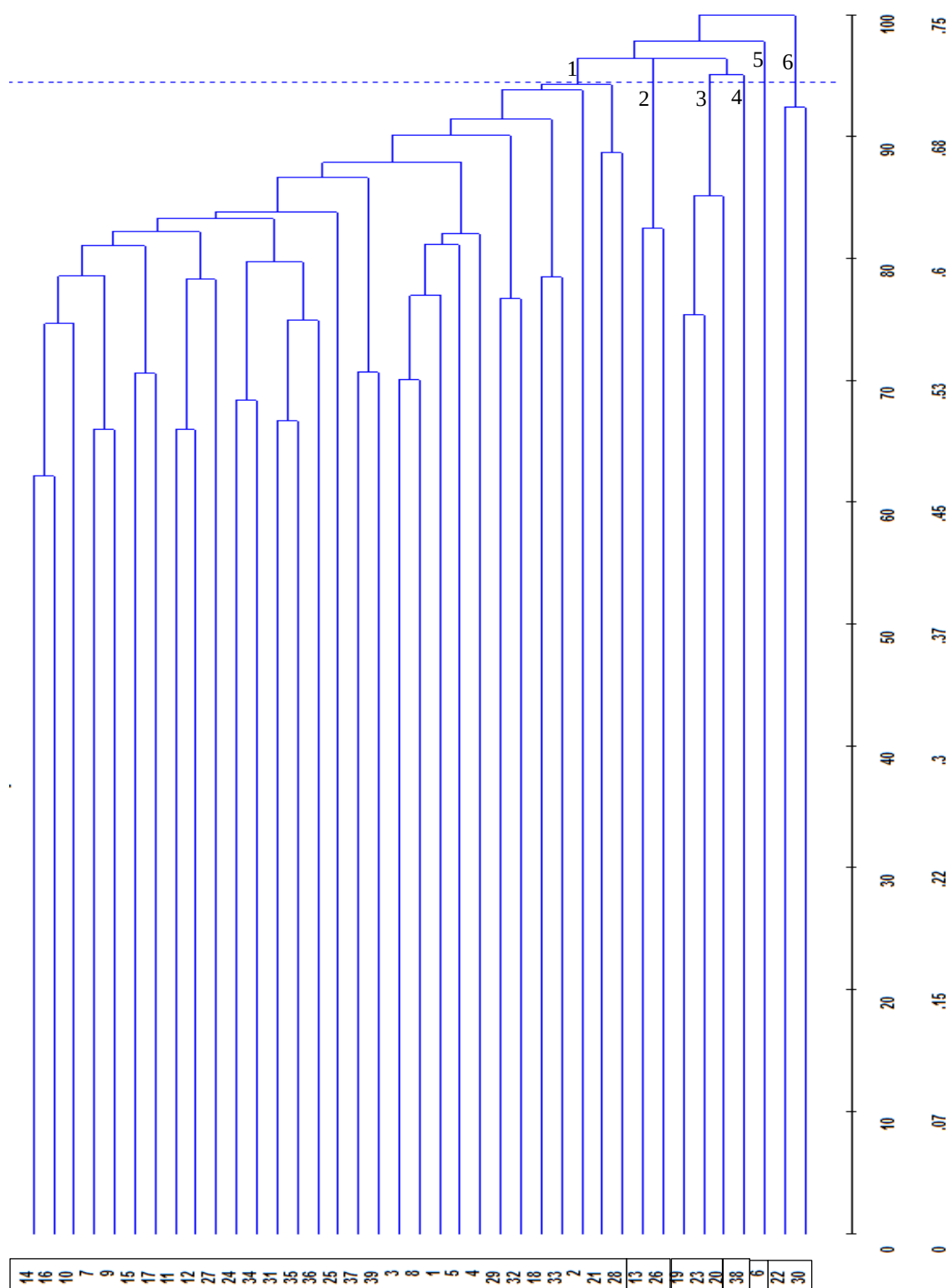


Figura 2. Dendrograma gerado por meio de marcadores ISSRs com o complemento aritmético do coeficiente de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA, das 39 matrizes de *Senefeldera verticillata*. Amostras de 1 a 17 (FLONA de Pacotuba, ES), amostras de 18 a 39 (RPPN Cafundó, ES).

As matrizes 38 e 6 foram posicionadas em grupos distintos, quatro e cinco, respectivamente, o que indica uma maior distinção genética entre esses indivíduos. Os pares, matrizes 13 e 26 e matrizes 22 e 30, formaram os grupos dois e seis, respectivamente. As matrizes 19, 23 e 20 foram reunidas formando o grupo três e, por fim, o grupo um, foi formado por 30 matrizes o qual englobou tanto indivíduos pertencentes à FLONA de Pacotuba como da RPPN Cafundó. Por meio da avaliação do dendrograma construído pelo agrupamento das matrizes, foi possível perceber maior variabilidade dentro dos fragmentos florestais do que entre eles, uma vez que, no dendrograma, não predominou a formação de grupos contendo indivíduos distribuídos por fragmento florestal.

O coeficiente de correlação cofenética foi de 71% ($CCC = 0,71$) revelando alta associação entre as similaridades obtidas pelo coeficiente de Jaccard (matriz de dissimilaridade) e as representadas no dendrograma (matriz cofenética). Segundo Vaz Patto et al. (2004), valores de CCC superiores a 0,56 correspondem a uma boa concordância entre as matrizes, dessa forma, o valor cofenético encontrado nesse estudo foi aceitável. Cruz et al. (2011) relatam que, quanto maior o valor da correlação, menor será a distorção provocada pelo agrupamento.

Outras análises como (G_{ST}) e fluxo gênico (Nm) também foram realizadas, os dados fornecidos ($G_{ST}=0,035$; $Nm=13,542$) inferiram sobre intenso fluxo gênico entre as duas populações, diminuindo as diferenças entre as mesmas, sendo possível ser observado no dendrograma pela formação do grupo um, onde reuniu indivíduos de ambos os fragmentos florestais.

A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que 5,01% da variância total está entre populações e 94,99% dentro de populações, demonstrando que a maior variação genética está no componente intrapopulacional (Tabela 3). Esse resultado, possivelmente, é um reflexo do intenso fluxo gênico histórico que ocorre entre as unidades, dado que foi constatado no presente estudo.

Tabela 3. Análise de variância molecular para 39 indivíduos de *Senfeldera verticillata* em dois fragmentos florestais, Espírito Santo.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Componentes de variância	Varição (%)
Entre fragmentos	1	55,630	1,47551	5,01
Dentro dos fragmentos	37	1005,056	27,92171	94,99
Total	38	1060,685	29,39723	

$$\Phi_{ST} = 0,0501$$

GL=Graus de liberdade

Em espécies alógamas ou de sistema misto de reprodução, em que predomina alogamia, a variação genética concentra-se dentro das populações e uma menor variação ocorre entre elas, sendo que a divergência entre populações será menor quanto maior for o fluxo gênico (Loveless e Hamrick, 1987). Os resultados dessa pesquisa correspondem com os resultados encontrados na literatura para populações naturais de espécies arbóreas tropicais que informam que, em geral, a maior parte da diversidade genética está presente dentro das populações (Gomes et al., 2011; Rossi et al, 2014).

A capacidade dos indivíduos em trocar genes, agregada à troca de material genético entre populações, diminui a diferença entre populações ocasionada por deriva genética e seleção natural, diminuindo assim, a diversidade genética entre populações. Dessa forma, como *S. verticillata* se trata de uma espécie tipicamente alógama os resultados de variabilidade encontrados estão de acordo com o esperado.

O coeficiente de diversidade relativa entre grupos (G_{ST}) foi 0,0356, indicando que 3,56% da variação genética total ocorrem entre as populações. Este resultado é comparável com a variância entre populações fornecida pela AMOVA. A medida G_{ST} varia de 0 a 1 e expressa a proporção da diversidade total explicada por diferenças entre grupos (Cruz, 2011).

O baixo valor de Φ_{ST} encontrado (0,0501) indica não haver estruturação entre as populações, em outras palavras, a ocorrência de fluxo gênico histórico entre elas é alta. Segundo Wright (1931), valores de Nm abaixo de 1 refletem em isolamento genético. Por outro lado, estimativas de Nm acima de 1

impedem perdas aleatórias de alelos dentro de populações por efeitos de deriva (Wright, 1951). O fluxo gênico, que nas espécies vegetais envolve a dispersão de pólen e de sementes, é o fator evolutivo responsável pela homogeneização das populações, contrapondo os efeitos da deriva genética e seleção, podendo também, ocasionar aumento de variabilidade genética em populações receptoras (Wright, 1931; Ridley, 2006).

Mesmo não estando os dois fragmentos florestais isolados pela distância geográfica, cabe ressaltar que, considerando que *S. verticillata* se trata de uma espécie arbórea de ciclo de vida longo e, uma vez que foram selecionadas árvores adultas para a realização das avaliações, a estimativa da divergência genética é um reflexo do fluxo de genes histórico. Portanto, determinou os padrões observados de estrutura genética, logo, não necessariamente está havendo troca gênica em determinado evento reprodutivo. Para avaliação do fluxo gênico contemporâneo técnicas como a realização de testes de paternidade com emprego de marcadores mais informativos, como os microssatélites, seriam mais adequadas (Gaiotto et al., 2003).

Os resultados de Nm e variabilidade genética intrapopulacional obtidos nesse trabalho indicam que, mesmo que a FLONA e a RPPN não formem juntas uma paisagem contínua, a fragmentação de habitats não afeta de forma significativa a diversidade genética de *S. verticillata* nesses ambientes. Contudo, Wright (1978), abordou que entre as subpopulações a diferenciação não é considerada insignificante, mesmo que os valores de F_{ST} sejam iguais ou menores que 0,05. Dessa forma, o resultado encontrado para Φ_{ST} , deve ser considerado frente às tomadas de decisões de preservação das unidades de conservação.

Por fim, o valor do fluxo gênico histórico obtido nesse estudo pode ser reflexo, entre outros fatores, do considerável número de indivíduos presentes em ambos os fragmentos, além, da eficiência dos mecanismos de dispersão de sementes e de pólen. Dada à síndrome de dispersão zoocórica que a espécie apresenta (Hans, 2012).

A partir de simulações realizadas pelo programa Structure utilizando a abordagem bayesiana, observa-se a divisão das matrizes de *S. verticillata*, pertencentes à FLONA de Pacotuba (amostras de 1 a 17) e RPPN Cafundó (amostras de 18 a 39) em três grupos genéticos, representados em cores

distintas, ficando clara a presença de mistura de material genético entre as matrizes (Figura 1).

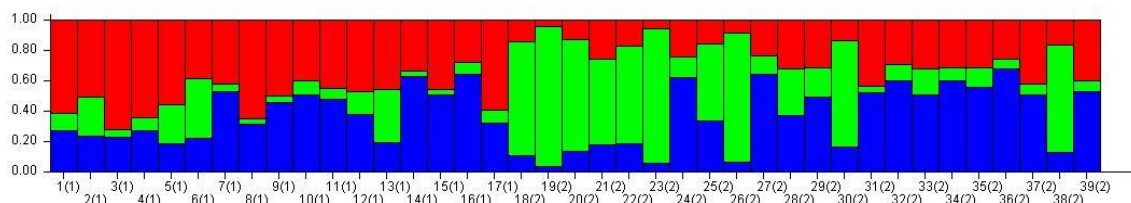


Figura 3. Análise da estrutura genética dos 39 indivíduos provenientes das duas populações (FLONA de Pacotuba, ES - 1 a 17 e RPPN Cafundó, ES - 18 a 39) coletadas de *Senefeldera verticillata*. Os indivíduos foram classificados em três grupos ($K = 3$).

Por meio da visualização gráfica da estrutura populacional é possível observar que não houve uma separação padronizada de grupos genéticos por unidade de conservação, o que indica não haver grande diferença genética entre os fragmentos, conforme já evidenciado no dendrograma.

Contudo, é possível observar um contraste na distribuição do grupo verde, mais proeminente na população da RPPN Cafundó e, do grupo vermelho, que foi mais acentuado na população da FLONA de Pacotuba, indicando existir uma certa diferenciação entre as duas localidades. Este fato foi confirmado pelo resultado do Φ_{ST} (0,0501) que revelou uma diferenciação genética moderada entre as unidades, segundo WRIGHT (1978)

Esses resultados também estão de acordo com os dados da AMOVA que indicou que a maior parte da diferenciação genética incide em nível intrapopulacional, e também, pelo valor de fluxo gênico encontrado ($Nm = 13,542$) que é responsável pelo intercâmbio de genes entre os fragmentos florestais, processo pelo qual permite a manutenção de variabilidade genética entre as matrizes de *S. verticillata* deste estudo.

4. IMPLICAÇÕES PARA A RESTAURAÇÃO

A porcentagem de polimorfismo detectada pelo marcador ISSR em *S. verticillata* indicou que os *primers* utilizados nesse estudo, foram adequados nas análises de diversidade genética e auxiliarão nos trabalhos de preservação da espécie.

Por meio dos resultados da AMOVA e G_{ST} foi constatada moderada diferenciação genética entre as unidades de conservação, assim, ambas as localidades possuem matrizes de *S. verticillata* que detêm variabilidade genética entre os indivíduos. Logo, devido à maior variabilidade genética encontrada dentro dos fragmentos florestais, recomenda-se a preservação de vários indivíduos de *S. verticillata* em ambas as unidades de conservação, com a finalidade de manter a variabilidade genética intrapopulacional existente.

A recomendação de um número mínimo de árvores a serem selecionadas para coleta e formação de lote de sementes, pode variar entre os autores. De acordo com Sena e Gariglio (2008), a recomendação para coleta de sementes é de, no mínimo, 15 árvores por espécie. Já Martins (2012), propõe, para os projetos de recuperação de ecossistemas degradados, a coleta de sementes em um número de árvores que podem variar de 12 a 15 indivíduos e quando possível, em fragmentos distintos, ou de árvores que se encontrem distantes entre si, quando se tratam de fragmentos florestais de maiores dimensões, objetivando-se a formação de lotes de sementes que irão proporcionar a diversidade genética.

Ainda que haja uma variação entre autores, quanto à proposta para seleção de um número mínimo de árvores, a finalidade em todos os casos é a aquisição de lotes de sementes com alta variabilidade genética. Em estudos de diversidade genética de *Enterolobium contortisiliquum* Santana et al. (2008), sugeriram que se devem priorizar árvores geneticamente mais distintas como matrizes fornecedoras de sementes para recuperação de áreas próximas.

Essas propostas podem ser utilizadas para *S. verticillata* como estratégia na formação de pomares de sementes. Dessa forma, recomenda-se a coleta e formação de lotes de sementes a partir dos pares de árvores 1 e 16; 2 e 6; 3 e 16; 4 e 6; 5 e 6; 9 e 13; 10 e 17; 12 e 16; 13 e 16 e 16 e 17. Essas árvores foram avaliadas no presente estudo, como os indivíduos com maior

dissimilaridade genética entre si, dentre os indivíduos analisados na FLONA de Pacotuba, sendo importante priorizá-las, uma vez que as mesmas representam alta variabilidade genética.

Assim, a constituição de um lote de sementes a partir dessas árvores irá permitir a produção de mudas, provenientes de 12 árvores de *S. verticillata* e que irão representar uma variabilidade genética adequada para a recuperação de áreas degradadas na região.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Centro de Ciências e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES, Alegre/ES), ao Núcleo de Pesquisa Científica e Tecnológica em Meio Ambiente, Silvicultura e Ecologia (NUPEMASE) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

6. REFERÊNCIAS

- Aguiar RV, Cansian RL, Kubiak GB, Slaviero LB, Tomazoni TA, Budke JC, Mossi AJ (2013). Variabilidade genética de *Eugenia uniflora* L. em remanescentes florestais em diferentes estádios sucessionais. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 60, n. 2, p. 226-233.
- Almeida FV de, Lopes MTG, Valente MSF, Bentes JLDAS (2015). Diversidade genética entre e dentro de populações de *Cenostigma tocanthinum* Ducke. *Sci. For.*, Piracicaba, v. 43, n. 108, p. 753-762, 2015.
- Assis AM, Magnago LFS, Fernandes HQB (2007). Floresta estacional semidecidual de terras baixas, submontana e montana. In: M. Simonelli, & C.N. Fraga (orgs.). *Espécies da Flora Ameaçada de Extinção no Estado do Espírito Santo*. Ipema, Vitória, pp. 52-54.
- Cole TC (2003). Genetic variation in rare and common plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 34, p. 213-237.
- Costa LS, Reinige LRS, Heinzmann BM, Amaral LP, Serrote CML (2015). Study of the genetic diversity and structure of a natural population of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. using RAPD markers. *Genetics and Molecular Research* 14 (4): 18407-18413.
- Cruz DT; Schnadelbach AS; Lambert SM; Ribeiro PL; Borba EL (2011). Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in Northeastern Brazil. *Plant Systematics and evolution*, Beijing, v. 294, p. 87-98.
- Cruz CD (2013). GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*. v. 35, n. 3, p. 271-276.
- Doyle JJ; Doyle, JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15.
- Earl DA, VonHoldt BM (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour*, v. 4, p. 359-361.
- Excoffier L, Smouse PE and Quattro JM (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet, J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 14, p. 2611-2620.

- Gaiotto FA, Grattapaglia D, Vencovsky R (2003). Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of Palm (*Euterpe edulis* Mart.). *J. Heredity*, 5: 399-406.
- Gomes LRP, Lopes MTG, Bentes JLDS, Barros WS, Neto C, Queiroz Pde, Contim LAS (2011). Genetic diversity in natural populations of Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, Vicosa, v. 11, n. 3, p. 216-223.
- Hans JE (2012). The tribe Hippomaneae (Euphorbiaceae) in Brazil: A tribo Hippomaneae (Euphorbiaceae) no Brasil. *Rodriguésia* vol. 63(1), p. 209-225. Disponível em [<http://www.scielo.br/pdf/rod/v63n1/a13v63n1.pdf>].
- Ipema (2005). INSTITUTO DE PESQUISAS DA MATA ATLÂNTICA. Conservação da Mata Atlântica no Estado do Espírito Santo: Cobertura florestal e unidades de conservação (Programa Centros para a Conservação da Biodiversidade – Conservação Internacional do Brasil) / IPEMA. Vitória, ES: IPEMA.
- Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE (2015). ATLAS DOS REMANESCENTES FLORESTAIS DA MATA ATLÂNTICA PERÍODO 2013-2014. São Paulo. Disponível em [http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=3891].
- Kumar R, Dwivedi N, Singh RK, Kumar S (2011). A review on molecular characterization of pepper for Capsaicin and Oleoresin. *Intl. J. Plant Breed.* Vol. 5, p. 99-110.
- Loveless MD, Hamrick JL (1987). Distribution de la variation genética en espécies arbóreas tropicales. *Revista de Biología Tropical*, San Jose, v. 35, n. 1, p. 165-176.
- Martins SV (2012). Restauração ecológica de ecossistemas degradados. Viçosa, MG: UFV, 293p.
- Mojena R (1977). Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. *The Computer Journal* 20: 359-363.
- Nybom H (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, v. 13, p. 1143-1155.
- Pádua JG, Ferreira FR (2008). Recursos genéticos de fruteiras. In: Fundamentos do melhoramento de fruteiras (Bruckner CH, ed.). Editora UFV, Viçosa.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, Baltimore, v. 155, p. 945-959.

- Pscheidt AC, Cordeiro I (2012). Sinopse da tribo Hippomaneae (Euphorbiaceae) no Estado de São Paulo, Brasil. Hoehnea, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 347-368.
- Ridley M (2006). Evolução. 3ª edição, Porto Alegre: Artmed.
- Rossi FS, Rossi AAB, Dardengo JFE, Brauwiers LR, Silva ML, Sebbenn AM (2014). Diversidade genética em populações naturais de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) com uso de marcadores ISSR. Scientia Forestalis, Piracicaba, v. 42, n. 104, p. 631-639.
- Santana GC et al. (2008). Diversidade genética de indivíduos de *Enterolobium contortisiliquum* Vell. Morong., por meio de marcadores RAPD no Baixo Rio São Francisco. Revista Árvore, v. 32, p. 427-433.
- Santana JGS, Nascimento ALS, Costa TS, Almeida TMB de, Rabbani ARC e Silva AVC (2016). Estimation of genetic diversity in a natural population of cambui tree (*Myrciaria tenella* O. Berg) using ISSR markers. Genetics and Molecular Research 15 (4): gmr.15048819.
- Sena, CM, Gariglio, MA (2008). Sementes Florestais: Colheita, Beneficiamento e Armazenamento. Guia Técnico, Natal: MMA. Secretaria de Biodiversidade e Florestas, v. 2, p. 28, 2008.
- Silva, AVCda, Freire KCS, Lédo AdaS, Rabbani ARC (2014). Diversity and genetic structure of jenipapo (*Genipa americana* L.) Brazilian Scientia Agricola. v. 71, n. 5, p. 345-355.
- Souza VQ, Pereira AS, Marinikopp M, Coimbra JLM, Carvalho FIF, Luz VK, Oliveira AC (2005). Dissimilaridade genética em mutantes da aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. Bragantia, Campinas, v. 64, n. 4, p. 569-575.
- Wright JW (1931). Evolution in mendelian populations. Genetics, v. 16, p. 97-159.
- Wright S (1951). The genetical structure of populations. Annals of Eugenics, London, v. 15, n. 4, p. 323-354.
- Wright S (1978). Evolution and genetics of populations. Chicago: The University of Chicago Press, 465p.
- Yeh FC, Boyle TJB (1997). Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Belg J Bot. 29:157.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994). Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, SanDiego, v. 20, p. 176-183.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Grande parte das ações voltadas para preservação de espécies florestais, bem como a recuperação ambiental de áreas perturbadas, desconhecem a variabilidade genética contida nos indivíduos e das sementes provenientes dos mesmos. Projetos direcionados nessa perspectiva podem representar em um fracasso para o estabelecimento das gerações futuras das espécies.

As pesquisas em genética de populações são uma medida eficaz para recuperação de áreas degradadas e conservação florestal, uma vez que, avaliam a conservação genética das espécies e, de como a diversidade genética existente pode ser comprometida com os processos de fragmentação dos habitats.

O emprego da técnica ISSR na caracterização da diversidade genética das possíveis árvores matrizes, indiscutivelmente, agrega qualidade a produção das mudas provindas dessas árvores. Esse direcionamento de trabalhos resulta em lotes de sementes que irão compor de forma mais representativa a diversidade genética existente.

Constata-se que o período em que as áreas de estudo se encontram fragmentadas, não foi o suficiente para afetar os índices de diversidade genética das populações de *A. concinnum* e *S. verticillata* de modo significativo, além do que, a proximidade e similaridade da paisagem possivelmente vêm contribuindo para a ocorrência de fluxo gênico e consequente manutenção da diversidade genética.

Contudo, diante das considerações e resultados obtidos, entende-se a importância do aprofundamento a cerca do conhecimento genético das espécies florestais que concorrem como matrizes fornecedoras de sementes para os projetos de recuperação ambiental.

8. ANEXOS



Figura 1. Foto da espécie *Astronium concinnum*.

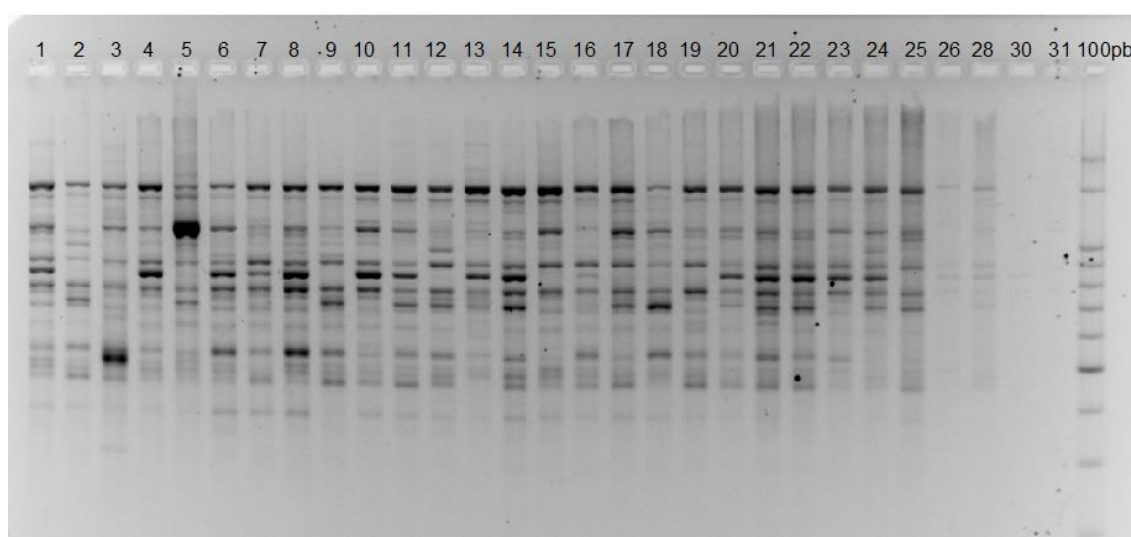


Figura 2. Padrão de bandas do marcador molecular ISSR amplificadas a partir do emprego do *primer* UBC878 para amostras de *Astronium concinnum* da população da Floresta Nacional de Pacotuba, Cachoeiro de Itapemirim, ES.

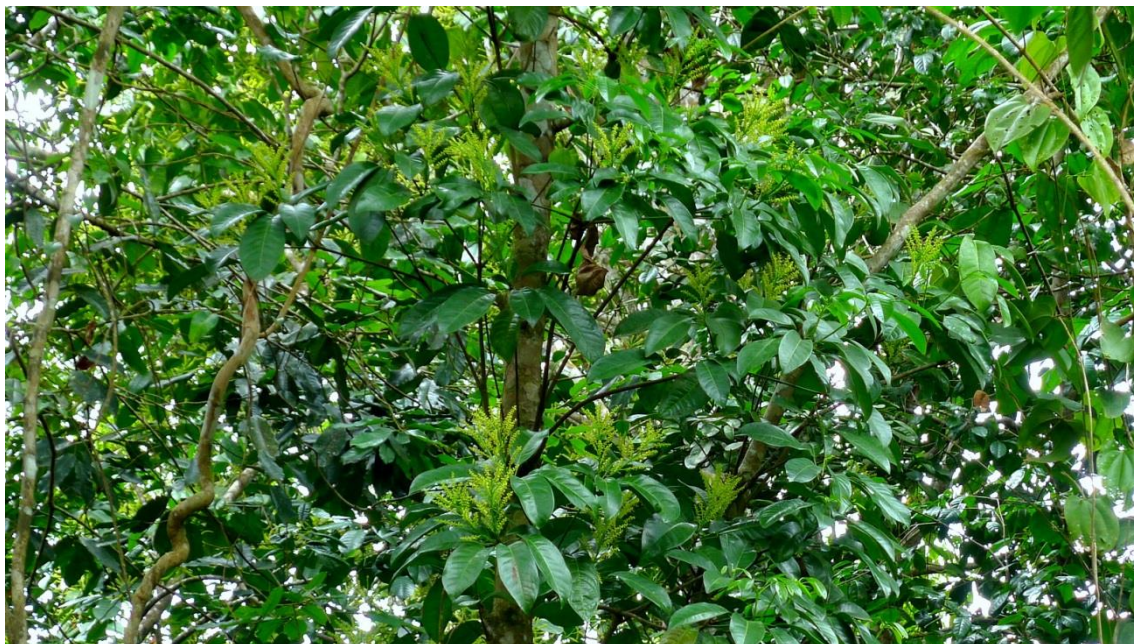


Figura 3. Foto da espécie *Senefeldera verticillata*.

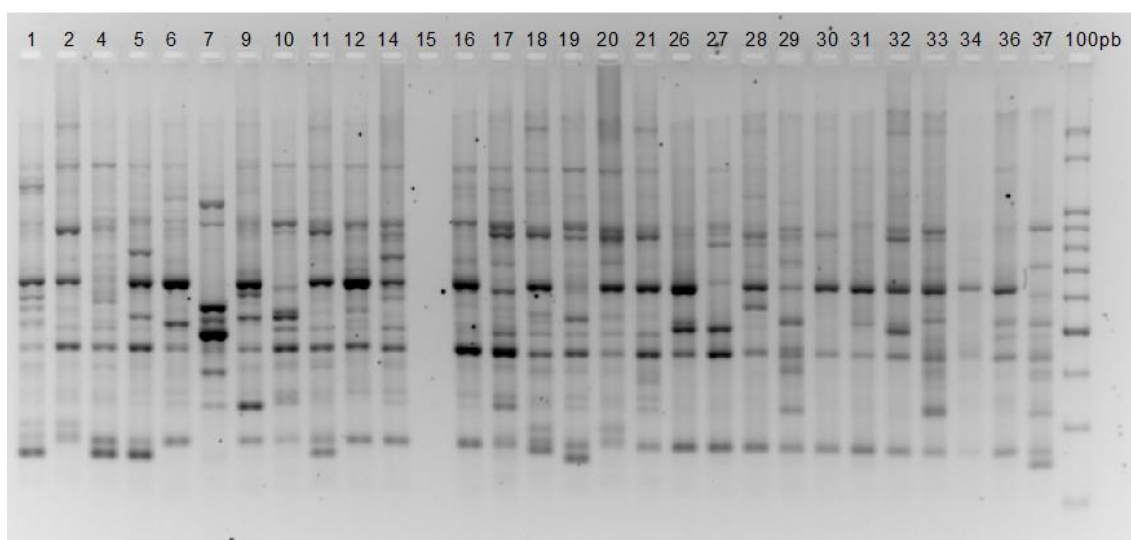


Figura 4. Padrão de bandas do marcador molecular ISSR amplificadas a partir do emprego do *primer* UBC808 para amostras de *Senefeldera verticillata* da população da Floresta Nacional de Pacotuba, Cachoeiro de Itapemirim, ES.