

## VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *PIRESIA SYMPODICA* SODERSTR. (POACEAE, OLYREAE) OCORRENTES NO BRASIL

**Iasmin Laiane Castro Oliveira<sup>1</sup>; Reyjane Patrícia Oliveira<sup>2</sup>; Maria Luiza Silveira Carvalho<sup>3</sup>**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: iasminlaiane@gmail.com

2. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, UEFS, e-mail: rpatricia.oliveira@gmail.com

3. Coorientadora, Doutoranda pelo PPGBot/UEFS, e-mail: silveiradecarvalho@gmail.com

**Palavras-chave:** Bambus herbáceos, conservação, ISSR.

### INTRODUÇÃO

Poaceae constitui uma importante família entre as monocotiledôneas e seus representantes mais expressivos são conhecidos como capins, cereais e bambus (Viana & Filgueiras, 2008). Estes últimos estão divididos em grupos com representantes lenhosos (tribos Bambuseae e Arundinarieae) e herbáceos (Olyreae) (Sungkaew *et al.*, 2009).

*Piresia sympodica* (Döll) Swallen é uma espécie de bambu herbáceo, que cresce no interior de florestas ao longo da Bacia Amazônica (Judziewicz *et al.*, 1999). Assim como os outros representantes de *Piresia* Swallen, essa espécie se caracteriza pela presença de colmos decumbentes diferenciados, quase sem folhas e com inflorescências racemosas, que crescem rentes ao solo, geralmente cobertos por serapilheira, dando às plantas uma aparência de sempre estéril (Oliveira, 2001). *P. sympodica* também é a espécie mais polimórfica do gênero e por conta disso, espécimes depositados em herbário ou observados em campo são difíceis de identificar, muitos deles não se encaixando na descrição original da mesma.

Estudos de variabilidade genética têm sido muito úteis tanto na determinação de espécies de plantas (Borba *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2006), quanto para subsidiar ações de conservação de populações na natureza, na medida que fornecem dados sobre a situação das espécies e indicando se a perda de habitat compromete a manutenção das populações (Provan *et al.*, 1999; Collevatti *et al.*, 2001). Dentre os marcadores moleculares utilizados para acessar os níveis de variabilidade genética, os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), de herança dominante, têm sido amplamente indicados. Apresentam alto polimorfismo e sua posição no DNA é conhecida, cujos primers ancoram entre duas regiões repetidas de microssatélites (Wolfe *et al.*, 1998).

Estudos dessa natureza foram aplicados recentemente em espécies de bambus herbáceos (Braz, 2012; Ferreira, 2012) e neste trabalho tais marcadores foram utilizados para detectar os níveis de variabilidade genética e a estrutura das populações de *P. sympodica*.

### MATERIAIS E MÉTODOS

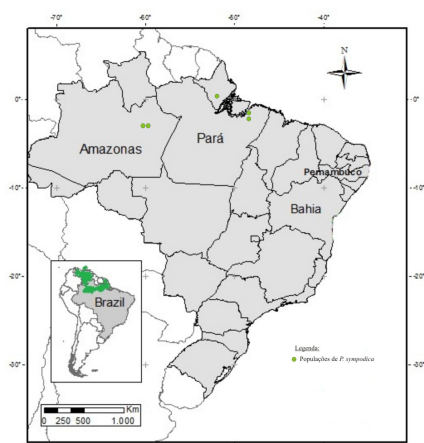
Foram coletadas folhas em sílica gel, de 75 indivíduos provenientes de cinco populações de *Piresia sympodica*, de Manaus-AM (2 populações), de Belém-PA (2) e de Porto Grande-AP (1) (Figuras 1; 2). De cada uma delas foram amostrados 15 indivíduos e seus vouchers estão depositados no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS). Para a obtenção do DNA total seguiu-se o protocolo de extração Doyle & Doyle (1987) modificado, utilizando tampão CTAB 2% e clorofórmio álcool isoamílico (24:1) para purificação. As amostras foram posteriormente incluídas no banco de populações do Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas (LAMOL).

Os fragmentos de DNA das populações foram amplificados exponencialmente pelo método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando os kits Top Taq Master Mix e Top Taq DNA Polymerase (*Quiagen Quality*). Foram testados 20 primers ISSR e os quatro mais

polimórficos foram escolhidos para análise (DAT, ISSR4, ISSR6 e MANNY). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e fotodocumentados com o sistema Kodak 1D 3.6. Para a determinação do tamanho dos fragmentos foi utilizado o marcador 100 pb DNA Ladder (*Invitrogen Quality*).

Foram então determinados os perfis genéticos de todos os indivíduos para cada *primer* como o auxílio do GelCompar II versão 5.0 (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium). Este perfil foi convertido em uma matriz binária, para cada locus: 1 (presença), 0 (ausência) e -1 ou -9 (dados faltantes). O cálculo da relação genética entre pares de indivíduos, através do estimador de relação genética de Ritland (1996) foi feito pelo GenAlEx versão 6.0 (Peakall & Smouse, 2006), sendo estimados os seguintes parâmetros de variabilidade: heterozigosidade média esperada ( $He$ ), Índice de Shannon ( $I$ ), a porcentagem de locus polimórficos ( $%P$ ) e o número de loci exclusivos (Nei, 1973).

Também foi calculada por esse programa a distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações, através de Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992). Já para o cálculo da heterozigosidade média total ( $Ht$ ) e dos componentes de variância entre as populações foi utilizado o AFLPsurv (Vekemans *et al.*, 2002), que também gerou as análises de agrupamento, a partir da matriz de distância genética não enviesada de Nei (Nei, 1973), juntamente com o programa PHYLIP (Felsenstein, 2011). O dendrograma obtido, foi então editado através do programa TreeView 1.6.1 (Page, 2000), com o método de agrupamento Neighbourjoining (Saitou & Nei, 1987).



**Figura 1:** Localização das populações de *P. sympodica* analisadas no presente trabalho.



**Figura 2.** Indivíduo de *P. sympodica* (Foto M.L.S.Carvalho).

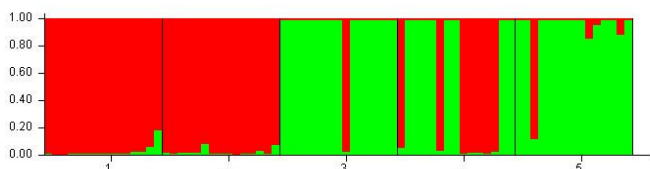
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos, no presente trabalho, 21 loci polimórficos para as cinco populações de *Piresia sympodica*, com uma média de 5,25 loci por *primer*. O percentual de loci polimórficos por população variou de 19,05% (AM1) a 80,95 (PA2) (Tabela 1).

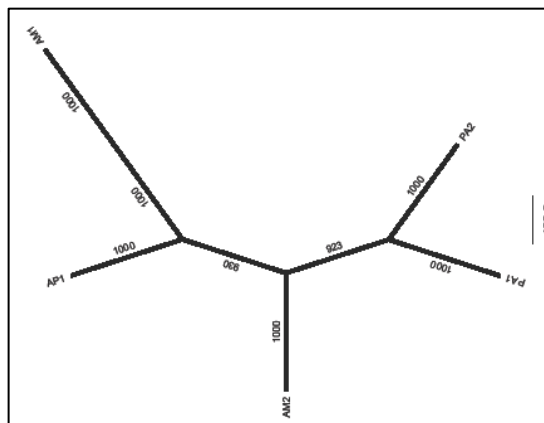
**Tabela 1:** Parâmetros de variabilidade genética de *P. sympodica*. %P (loci polimórficos);  $He$  (heterozigosidade);  $I$  (Índice de Shannon).

Voucher	Códigos no texto	%P	$He$	$I$	Locus exclusivos
<i>Carvalho 297</i>	PA1	42,86%	0,123	0,192	01
<i>Carvalho 303</i>	PA2	80,95%	0,231	0,359	03
<i>Carvalho 283</i>	AM1	19,05%	0,012	0,028	00
<i>Carvalho 284</i>	AM2	42,86%	0,098	0,164	00
<i>Oliveira 1873</i>	AP1	38,10%	0,114	0,175	01
<b>Média</b>	-----	<b>44,76%</b>	<b>0,116</b>	<b>0,184</b>	-----

O estudo da estrutura genética das populações envolvendo Análise de Variância Molecular (AMOVA) revelou alta divergência entre as populações (46%), o que indica um baixo fluxo gênico entre as mesmas, possivelmente devido à grande distância geográfica entre elas. Dentro das populações, a AMOVA indicou 54% de diversidade, valor considerado abaixo do esperado.



**Figura 3.** Gráfico da estruturação genética gerado pelo STRUCTURE para as populações de *P. sympodica*.



**Figura 4:** Dendrograma não enraizado a partir da matriz não enviesada de Nei.

Dois grupos foram observados tanto no dendrograma baseado no AFLPsurv quanto no Structure (Figuras 3; 4) O primeiro é composto pelas populações do Pará (PA1 e PA2), e o segundo, com as populações do Amazonas (AM1 e AM2) e Amapá (AP1). É possível observar na Figura 3, a clara mistura entre os dois *pools* gênicos detectados.

O estudo da variabilidade genética das populações revelou heterozigiosidade média de 0,116, com variações de 0,012 na população AM1 a 0,231 em PA2 (Tabela 1). Esses valores são considerados abaixo do esperado para monocotiledôneas (Nybom, 2004) e foram mais baixos também do que aqueles encontrados por Braz (2012), para *Raddia portoi* Kuhlman., uma espécie de bambu herbáceo ocorrente no Leste do Brasil. Esses baixos valores podem estar relacionados ao comportamento reprodutivo da espécie, o qual é desconhecido, e ainda à perda de hábitat pela degradação ambiental, muito frequente na Bacia Amazônica, dentre outros processos ocorrentes nas populações.

Apenas uma das populações apresentou alta diversidade genética (PA2), com alta heterozigiosidade esperada (0,231), alto número de loci polimórficos (80,95%) e índice de Shannon (0,359), também apresentou o maior número de loci exclusivos (três) (Tabela 1), o que a torna uma população importante para fins de conservação. Mostrando a eficiência do emprego de marcadores moleculares ISSR para estimar a variabilidade genética de *P. sympodica*. Porém, o aumento da amostragem tanto de populações quanto de primers é considerado fundamental, assim como a realização de estudos reprodutivos nessa espécie, para melhor entendimento das questões aqui levantadas. Esse estudo revelou também a necessidade do conhecimento dos níveis de variabilidade genética de outras espécies de *Piresia*, principalmente aquelas ocorrentes na Mata Atlântica, a preencher as lacunas ainda existentes sobre *P. sympodica*, além de comparar esses dados com os das espécies ocorrentes em outras áreas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORBA, E.L.; G.J. SHEPHERD; C. VAN DEN BERG; J. SEMIR. 2002. Floral and vegetative morphometrics of five Pleurothallis (Orchidaceae) species: correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. *Ann Bot-London* 90: 219-230.
- BRAZ, M. 2012. Variabilidade genética em populações de *Raddia* Bertol. (Poaceae, Bambusoideae) inferida por marcadores moleculares ISSR. Universidade Estadual de Feira de Santana, Trabalho de Conclusão de Curso.
- COLLEVATTI, R.G.; D. GRATTAPAGLIA; J.D. HAY. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Mol Ecol* 10: 349-356.
- DOYLE, J.J.; J.L. DOYLE. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- EXCOFFIER, L.; P.E. SMOUSE; J.M. QUATTRO. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- FELSENSTEIN, J. 2011 [online]. *Phylip: phylogeny inference package version 3.69*. Homepage: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
- FERREIRA, F.M. 2012. Filogenia da subtribo Parianinae e sistemática de *Eremitis* Döll (Poaceae: Bambusoideae: Olyreae). Universidade Estadual de Feira de Santana, Tese de Doutorado.
- JUDZIEWICZ, E.J.L.; L.G. CLARK; X. LONDOÑO; M.J. STERN (eds.) 1999. *American Bamboos*. Washington D.C., Smithsonian Institution Press, 392p.
- LAMBERT, S.M.; E.L. BORBA; M.C. MACHADO; S.C.S. ANDRADE. 2006. Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-eastern Brazil. *Ann Bot-London* 97: 389-403.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *P Natl Acad Sci Usa* 70:3321-3323.
- NYBOM, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol*, 13: 1143-1155.
- OLIVEIRA, R.P. 2001. A tribo Olyreae (Poaceae: Bambusoideae) no estado da Bahia, Brasil. Universidade Estadual de Feira de Santana, Msc diss
- PAGE, R.D.M. 2000 [online]. *Tree View software, version 1.6.1*. Homepage: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>
- PEAKALL, R.; P.E. SMOUSE. 2006. GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetics software for teaching and research. *Mol Ecol* 6: 288-295.
- PROVAN, J.; N. SORANZO; N.J. WILSON; J.W. MCNICOL; M. MORGANTE; W. POWELL. 1999. In: P.M. HOLLINGSWORTH; R.M. BATEMAN; R.J. GORNALL (eds.), *Molecular Systematics and Plant Evolution*. London, Taylor & Francis, p. 35-50.
- RITLAND, K. 1996. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Gen Res* 67: 175-185.
- SAITOU, N.; M. NEI. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425,
- SUNGKAEW, S.; C.M.A. STAPLETON; N. SALAMIN; T.R. HODIKINSON. 2009. Nonmonophyly of the woody bamboos (Bambusae; Poaceae): a multi-gene region phylogenetic analysis of Bambusoideae s.s. *J Plant Res* 122: 95-108.
- VEKEMANS, X. 2002. *AFLP-surf version 10*. Belgium, Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles.
- VIANA, P.L.; T.S. FILGUEIRAS. 2008. Inventário e distribuição geográfica das gramíneas (Poaceae) na Cadeia do Espinhaço, Brasil. *Megadiversidade* 4: 1-2.
- WOLFE, A.D.; Q.Y. XIANG; S.R. KEPHART. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Mol Ecol* 7: 1107-1125.