

ESTUDOS DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *PIRESIA SWALLEN* (POACEAE, OLYREAE) DA MATA ATLÂNTICA DO NORDESTE DO BRASIL

Iasmin Laiane de Castro Oliveira¹; Maria Luiza Silveira de Carvalho²; Alessandra Selbach Schnadelbach³; Reyjane Patrícia Oliveira⁴

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: iasminlaiane@gmail.com
2. Co-orientadora, Doutoranda pelo PPGBot/UEFS, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: silveiradecarvalho@gmail.com
3. Colaboradora, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal da Bahia, e-mail: alessandra.schnadelbach@gmail.com
4. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: rpatricia.oliveira@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: ISSR, bambus herbáceos, delimitação específica.

INTRODUÇÃO

Piresia Swallen (Poaceae, Olyreae) é um gênero de bambus herbáceos neotropicais, caracterizado por apresentar dois tipos de colmos: os folhosos, os quais são eretos e possuem folhas desenvolvidas; e os ascendentes, que são afilos ou possuem folhas reduzidas às bainhas ou escamas (Carvalho 2013), e crescem rentes ao solo. Geralmente estão cobertos pela serapilheira, o que confere às plantas uma aparência estéril (Oliveira 2001). A distribuição do gênero apresenta uma disjunção entre a Amazônia e a Mata Atlântica da região Nordeste, sendo a Bahia o limite Sul de sua distribuição (Carvalho 2013).

Estudos recentes comprovam que *Piresia* é um gênero monofilético (Carvalho 2013; Oliveira et al. in prep.), formado por dois clados bem sustentados e correspondentes a essa disjunção Amazônia – Mata Atlântica, no entanto, o clado representando as espécies da Mata Atlântica possui pouca resolução interna (Carvalho 2013). Possivelmente, essa baixa resolução indica que as mesmas possuem especiação recente e/ou que estão envolvidas em processos de hibridação, como anteriormente suposto Oliveira (2001). Estudos recentes envolvendo morfometria uni e multivariada discriminaram sete morfotipos dentre as amostras da Mata Atlântica, as quais representam potenciais novas espécies para o grupo (Carvalho 2013). Porém, esses dados precisam ser comparados a marcadores moleculares, para maior certificação quanto à sua utilidade na delimitação específica do grupo.

Tais marcadores foram selecionados por apresentarem posição conhecida no DNA, expressando as regiões repetitivas entre microssatélites (SSRs, Simple Sequence Repeats) (Wolfe et al. 1998), com aplicabilidade destacada para o estudo dos padrões de variação intra e interpopulacionais, devido ao alto polimorfismo detectado e à capacidade para avaliar a variabilidade genética inclusive em populações pequenas, além do custo relativamente baixo (Liu & Wendel 2001). Nesse sentido, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de estruturação e diversidade genética nos morfotipos de *Piresia* encontrados na Mata Atlântica do Nordeste do Brasil, avaliando sua aplicabilidade para subsidiar a taxonomia e conservação do grupo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas folhas de 177 indivíduos pertencentes a onze populações de *Piresia*, provenientes de seis localidades na área da Mata Atlântica do Nordeste do Brasil (Tabela 1; Figura 1). Para a obtenção do DNA total seguiu-se o protocolo de extração Doyle & Doyle (1987) modificado. Os fragmentos de DNA foram amplificados pelo método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e utilizados os seis *primers* mais polimórficos para análise

(CHRIS, GOOFY, ISSR4, ISSR6, MANNY e UBC899). 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, e posteriormente utilizada para as análises seguintes.

A distribuição da variabilidade genética das populações foi estimada através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992), através do software GenAlEx versão 6.0 (Peakall & Smouse 2006). Já para o cálculo da heterozigosidade média total (H_t) 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 dendograma obtido foi então editado através do programa TreeView 1.6.1 (Page 2000), com o método de agrupamento Neighbor-joining (Saitou & Nei 1987).

Foi implementada uma análise bayesiana para a inferência dos *pool* gênicos, obtida com o auxílio do software Structure 2.3.3 (Printchard et al. 2000). Por fim, foi feita a análise de “agrupamento modal” (Reeves & Richards 2009), realizada no módulo Mclust do pacote R *version* 4.2 (Fraley et al. 2013) a partir da matriz binária de ISSR.

Tabela 1 – Populações de *Piresia* utilizadas no presente trabalho

Códigos das populações	Voucher	Número de indivíduos	Estado	Localidade	Localização
M1A	K.M. Pimenta 61	13	Bahia	Igrapiúna	Big Rock
M1B	M.L.S. Carvalho 308	15	Bahia	Igrapiúna	Rainha
M2A	K.M. Pimenta 52	11	Bahia	Ituberá	Mata P. Grande
M2B	M.L.S. Carvalho 322	20	Bahia	Igrapiúna	Mata Pacangê
M2C	M.L.S. Carvalho 323	15	Bahia	Igrapiúna	Mata Vila 5
M2D	M.L.S. Carvalho 324	20	Bahia	Cairú	Rotatória
M3A	K.M. Pimenta 59	14	Bahia	Ituberá	Mata P. Grande
M3B	M.L.S. Carvalho 281	19	Bahia	Aurelino Leal	Faz. Sta. Maria
M3C	M.L.S. Carvalho 309	20	Pernambuco	Igarassu	Usina S. José
M3D	M.L.S. Carvalho 279	15	Bahia	Serra Grande	BA 001
PP	K.M. Pimenta 63	15	Bahia	Igrapiúna	Mata Vila 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 135 loci polimórficos para as onze populações de *Piresia*, com uma média de 22,5 loci por primer. O percentual de loci polimórficos variou de 42,96% (M2A) e 93,33% (*P. palmula*), com uma média de 55,62%.

O estudo da estruturação genética através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) revelou uma divergência relativamente alta entre as populações (32%), sugerindo a ocorrência de mais de uma espécie no conjunto de dados, provavelmente devido ao fluxo gênico reduzido entre as populações. E dentro das mesmas, a diversidade foi mais baixa do que o esperado (68%).

A estruturação genética obtida a partir do programa STRUCTURE apontou para dois possíveis valores de delta K, sendo um K=5 e o outro, K=10 (Figura 2). Esse último foi mais congruente com os resultados obtidos através de uma análise de agrupamento modal e pelos

grupos formados a partir da matriz não enviesada de Nei, sendo também explicáveis do ponto de vista morfológico.

Dos grupos formados através dos dados genéticos, os seguintes apresentam caracteres morfológicos suficientes para serem tratados em espécies diferentes: M1A; M1B; M2A; M3A; M3D; M2B+M2C; M3B; M3C; *P. palmula* e M2D. Apenas dois pares de espécies parecem incluir uma diversidade críptica, uma vez que correspondem a diferentes grupos genéticos, com morfologias quase idênticas, pelo menos nos macrocaracteres (Carvalho 2013).



Figura 1 – Diferentes morfotipos de *Piresia* e suas respectivas populações, testados no presente estudo. A. M3B; B. M1B; C. M2D; D. M2B; E. M1A; F. M2A; G. *P. palmula*; H. M3C; I. M3D; J. M3A.

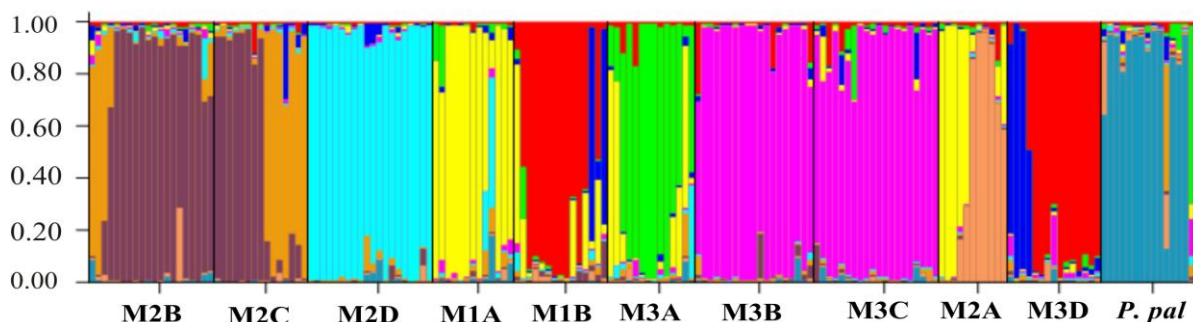


Figura 2 - Gráfico da estruturação genética gerado pelo STRUCTURE para as populações de *Piresia*.

O estudo da variabilidade genética das populações revelou que o número de loci polimórficos encontrados variou entre 42,96% (M2A) e 93,33% (PP, *P. palmula*), com uma média de 55,62%. A porcentagem da heterozigosidade média esperada variou entre 12,4% em M2A e 22,0% em PP, com uma média de 14,9%, um valor abaixo do proposto por Nybom (2004) = 0,19 para monocotiledôneas, mas que por sua vez, encontra-se próximo aos limites por ele estabelecido ($He = 0,15-0,19$). O Índice de Shannon aqui mostrou que a população mais variável geneticamente é a aquela correspondente à *P. palmula* ($I = 36,2\%$; $P = 93,3\%$; $He = 22\%$) e da mesma forma, foi a população que obteve o maior número de loci polimórficos (5), indicando uma maior distância genética em relação às outras populações.

As populações de todas as espécies que podem ser reconhecidas de acordo com esses dados apresentam distribuição restrita, e podem ser consideradas ameaçadas de extinção segundo os critérios da IUCN Red List (2013). As populações com menor variabilidade são a

M1A ($I = 19,4\%$; $P = 43,7\%$; $He = 12,6\%$), M1B ($I = 19,5\%$; $P = 48,15\%$; $He = 12,4\%$) e M2A ($I = 20,4\%$; $P = 42,96\%$; $He = 13,2\%$), essa baixa variabilidade pode estar relacionada ao modo de reprodução das mesmas, o que ainda precisa ser detalhadamente estudado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego de marcadores moleculares ISSR mostrou-se eficiente para estimar a variabilidade genética em membros de *Piresia*. Os dados genéticos subsidiaram o reconhecimento de dez novas espécies para a Mata Atlântica, complementando os estudos morfométricos realizados paralelamente (Carvalho 2013) e tornando a delimitação específica no grupo mais objetiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, M.L.S. 2013. Estudos biossistemáticos em *Piresia Swallen* (Poaceae: Bambusoideae: Olyreae) Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia.
- 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>.
- FRALEY, C.; RAFTERY, A.E. & SCRUCCLA L. 2013. Normal Mixture Modeling for Model-Based Clustering, Classification, and Density Estimation. *Version 4.2.*, Disponível em: <http://cran.r-project.org/web/packages/mclust/mclust.pdf>
- LIU, B. & WENDEL, J.F. 2001. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology*, 1: 205-208.
- 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. GenAIEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetics software for teaching and research. *Mol Ecol* 6: 288-295.
- PRINTCHARD, J.K., STERHENS, P. & DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- REEVES, P.A. & RICHARDS, C.M. 2009. Accurate inference of subtle population structure (and other genetic discontinuities) using principal coordinates. *PLOS One* 4(1): e4269.
- SAITOU, N.; M. NEI. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- VEKEMANS, X. 2002. *AFLP-surf version 10*. Belgium, Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles.
- 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.