

DIVERSIDADE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO NATURAL DE *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore EM RUSSAS, CE

Jéssica Ritchele Moura dos Santos; Gean Carlos da Silva Santos; Fernanda Moura Fonseca Lucas;
Fábio de Almeida Vieira

(Universidade Federal do Rio Grande do Norte, jessicaritchele182@hotmail.com)

INTRODUÇÃO

Conhecida popularmente por carnaúba, *Copernicia prunifera* é uma palmeira nativa do Nordeste brasileiro, representante da família Arecaceae. Sua distribuição ocorre principalmente nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, podendo ser encontrada na Bahia, Alagoas, Sergipe, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Mato Grosso e Tocantins (LEITMAN et al., 2015). A espécie é conhecida como árvore da vida, pois oferece uma infinidade de usos ao homem, tendo seus produtos boa aceitação do mercado e valor econômico (GOMES et al., 2009).

O extrativismo da *C. prunifera* vem mantendo há várias décadas grande importância econômica no Nordeste brasileiro, principalmente em períodos de estiagem com o corte das folhas dos carnaubais. As atividades de produção de cera e fabricação de utensílios a partir da palha de carnaúba representam atividades extrativistas artesanais sustentáveis e contribuem para o manejo sustentável de *C. prunifera* (D'ALVA, 2007).

Dessa forma, estudos sobre diversidade genética são importantes para fornecer informações que possam ser úteis no estabelecimento de estratégias de conservação e manutenção, principalmente, de espécies que passam por extensa exploração dos seus recursos naturais, como a *C. prunifera*. Alguns fatores podem influenciar a distribuição da variabilidade genética como o tamanho efetivo populacional (JABEEN et al., 2015), ocorrência geográfica das espécies (SANTOS et al., 2015), modo de reprodução e sistema de cruzamento (ABREU et al., 2012) e o fluxo alélico (SILVA et al., 2011), que é resultado da eficiência dos dispersores e polinizadores em alcançar outras populações, e de possíveis barreiras geográficas existentes entre elas (BAWA, 1992).

Para se estimar a diversidade genética faz-se necessário o uso de marcadores moleculares que se baseiam na amplificação da sequência de DNA, e podem ser utilizados como ferramenta para estudos de diversidade e estrutura genética entre indivíduos (CHAGAS et al., 2015) e dentro e entre populações (SANTOS et al., 2015).

Neste contexto, o trabalho tem como objetivo quantificar a diversidade genética em uma população natural de *C. prunifera*.

METODOLOGIA

Amostragem

Foram coletadas amostras foliares de 24 indivíduos representantes de uma população natural localizada no município de Russas, CE. As amostras foliares foram acondicionadas em tubos plásticos de 2 mL contendo CTAB 2X (brometo de cetiltrimetilamônio), identificadas e armazenadas em freezer a -20°C, até o momento da extração do DNA.

Extração do DNA, PCR e Eletroforese

A extração do DNA foi realizada pelo método de CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987). Após a extração, o DNA foi diluído e mantido em geladeira até o momento do uso. Para reação de polimerase em cadeia (PCR) foi utilizado o Termociclador automático Veriti em volume de 12 µL contendo DNA genômico. Foram testados 29 iniciadores ISSR e selecionados sete que melhor amplificaram o DNA de *C. prunifera*. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), corados com GelRed™ em tampão 1 X TAE (Tris-Acetato-EDTA), a uma voltagem de 120 V, por duas horas e meia. Foi utilizado o marcador de peso molecular (Ladder) de 100 pares de bases. Posteriormente, os géis foram fotografados sobre fonte de luz ultravioleta com auxílio do equipamento E-Box VX2.

Análise dos dados

Uma matriz binária foi construída a partir da presença (1) e ausência (0) dos locos para utilização nas análises estatísticas. Para análise dos parâmetros de diversidade genética foi utilizado o programa POPGENE versão 1.3 (YEH et al., 1997), onde foram analisados o número de alelos observados (N_a), número de alelos efetivos (N_e), diversidade genética de Nei (H_e) e Índice de Shannon (H_o), para cada população.

Foi calculado o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) para testar a eficiência dos iniciadores ISSR utilizados em indicar o polimorfismo entre indivíduos, tendo como indicadores a ausência ou presença de bandas. Segundo Botstein et al. (1980), os marcadores moleculares são classificados como pouco informativos, com valores inferiores a 0,25; mediamente informativos, com valores que vão entre 0,25 a 0,5; e satisfatório em conteúdo, informativo quando apresentam PIC superior a 0,5. Para o cálculo, foi utilizada a fórmula proposto por Anderson et al. (1993):

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

onde: P_{ij} é a frequência do alelo "j" no marcador "i".

O programa NTSYS (ROHLF, 1993) foi utilizado para produzir um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA - *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean* - para representar simplificada à identidade genética de Nei (1978), obtida pelo programa POPGENE. Para verificar se houve uma diminuição recente e efetiva no tamanho populacional da espécie, foi utilizado o programa Bottleneck versão 1.2 (CORNUET; LUIKART, 1996). Foram utilizados os modelos IAM (Modelo de Alelos Infinitos) e SMM (Modelo de Passos de Mutação) para calcular a heterozigosidade esperada das populações em equilíbrio de mutação-deriva. O modelo de mutação para os locos ISSR é intermediário entre o IAM e o SMM. A partir da frequência dos alelos, foi utilizado o teste do sinal ($\alpha = 0,05$) (CORNUET; LUIKART, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversidade genética e PIC

O número de locos por iniciador variou de 13 a 18 com média de 14,4. O PIC de cada iniciador utilizado variou entre 0,435 e 0,499, com média de 0,469 (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores ISSR, número de locos e o valor de PIC de cada iniciador.

Iniciadores ISSR	Sequência (5' – 3')	Número de Locos	PIC
UBC 825 (AC)8-T	ACACACACACACACT	14	0,435
UBC 841 (GA)8-YC	GAGAGAGAGAGAYC	18	0,482
UBC 857 (AC)8-YG	ACACACACACACACYG	14	0,489
UBC 873 (GACA)4	GACAGACAGACAGACA	15	0,499
UBC 880 (GGAGA)3	GGAGAGGAGAGGAGA	13	0,453
UBC 881 (GGGTG)3	GGGTGGGGTGGGGTG	14	0,437
M1 CAA (GA)5	CAAGAGAGAGAGA	13	0,486
Média		14,4	0,469

R = purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T); PIC = Conteúdo de informação polimórfica

O PIC serve para definir a eficiência do marcador molecular em detectar o polimorfismo entre indivíduos (RESENDE et al., 2009). Dessa forma, de acordo com Botstein et al. (1980), todos os iniciadores do presente trabalho foram classificados como mediamente informativos pois os valores que vão entre 0,25 a 0,5. De acordo com os trabalhos de Tiwari et al. (2015) e Vieira et al. (2015) utilizando iniciadores ISSR, encontraram valores de PIC variando de 0,240 a 0,390; e 0,057 a 0,444 respectivamente, mostrando que os valores obtidos neste trabalho são semelhantes aos encontrados na literatura.

Os sete iniciadores selecionados forneceram 101 locos sendo 70 polimórficos. Esse resultado representou 69,31% de polimorfismo genético na população estudada. O número de alelos foi igual a 1,69 e o número de alelos efetivos foi igual a 1,49. A diversidade genética de Nei assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi de 0,208 e o índice de Shannon de 0,408.

De acordo com o trabalho realizado por Vieira et al. (2015), utilizando iniciadores ISSR em uma população natural de *C. prunifera* (Arecaceae), encontraram valor de índice de Nei de 0,288. No trabalho realizado por Santos et al. (2015), com *Attalea vitrivir* Zona (Arecaceae), o índice de Shannon variou entre 0,377 a 0,516 um pouco superior ao do presente trabalho. Tais resultados são semelhantes ao do presente trabalho.

A partir dos valores de identidade genética (Nei, 1978), foi construído um dendrograma pelo método UPGMA (Figura 1), que retrata um padrão hierárquico de divergência genética. De acordo com o dendrograma, os indivíduos com maior similaridade genética entre si foram o 12 e o 13; 15 e o 16. A árvore mais divergente foi a 20.

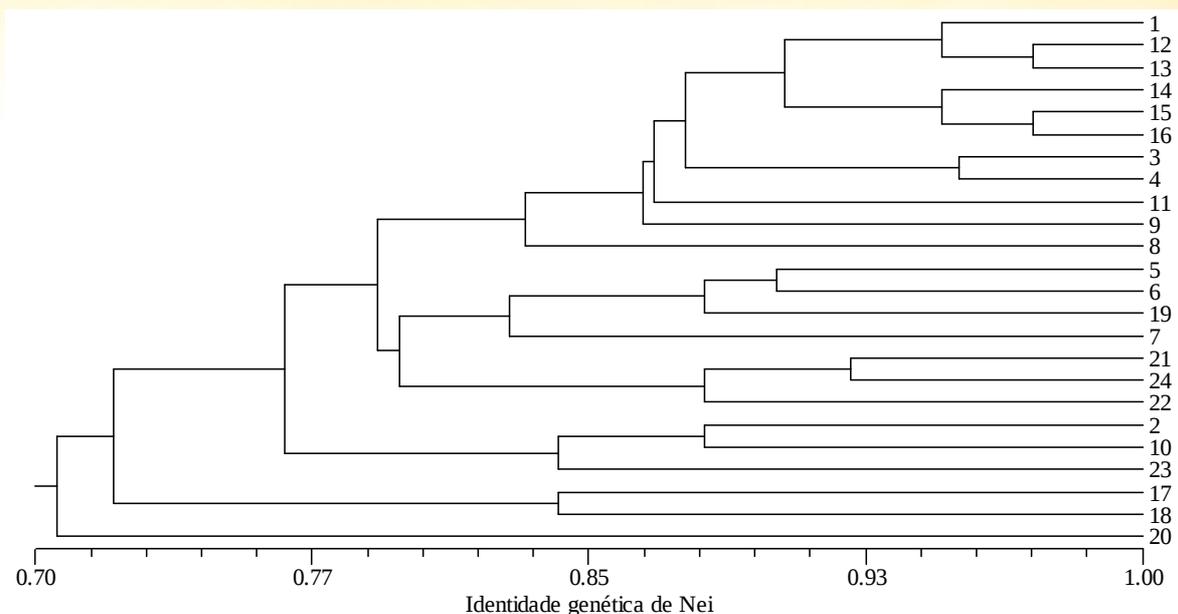


Figura 1 - Dendrograma UPGMA baseado na identidade genética de Nei entre as 13 populações de *C. prunifera*.

Gargalo genético (bottlenecks)

Os modelos IAM e SMM indicaram significativamente a ocorrência de gargalo genético (bottlenecks) (Tabela 2).

Tabela 2 - Testes de equilíbrio entre mutação e deriva genética para as populações de *Copernicia prunifera* sobre os modelos IAM e SMM.

Populações	n	IAM		n	SMM	
		Hd/He	P		Hd/He	P
RUS	45,58	35/66	0,00003**	48,92	35/66	0,00045**

n = número esperado de locos com excesso de heterozigosidade sob o respectivo modelo; Hd/He = número de loci com déficit heterozigosidade e excesso de heterozigosidade; P = probabilidade; * e ** = significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

A redução do tamanho efetivo populacional da população de *C. prunifera* do presente trabalho, pode ser devido a extensa exploração da espécie, que possui diversidades de uso na indústria e comércio (ARRUDA; CALBO, 2004), comprometendo a diversidade genética desta população. Chagas et al. (2015) com *Elaeis guineenses* Jacq. (Arecaceae), sugeriram que a redução do tamanho populacional da espécie poderia ser devido às atividades agrícolas locais e à perda de habitats. Dessa forma, é importante detectar populações que passaram por decréscimos populacionais, por permitir compreender sobre os riscos da possível extinção local, por consequência do tamanho populacional reduzido (LEE et al., 2002).

CONCLUSÕES

A população estudada possui diversidade genética intermediária. A análise de decréscimo populacional apontou que a população sofreu significativa redução genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. G.; PRIOLLIR, H. G.; FILHO, J. A. A.; NUCCI, S. M.; ZUCCHI, M. I.; COELHO, R. M.; COLOMBO, C. A. The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 119-121, 2012.

ANDERSON, J. A.; CHURCHILL, G. A.; AUTRIQUE, J. E.; TANKSLEY, S. D.; SORRELLS, M. E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**, v. 36, p. 181-186, 1993.

ARRUDA, G. M. T.; CALBO, M. E. R. Efeitos da inundação no crescimento, trocas gasosas e porosidade radicular da carnaúba (*Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore). **Acta Botânica Brasileira**, v.18, n.2, p.219-224, 2004.

BAWA, K. S. Mating systems, genetic differentiation and speciation in tropical rain forest plants. **Biotropica**, St. Louis, v. 24, n. 2, p. 250-255, 1992.

BOTSTEIN, D.; WHITE R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

CHAGAS, K. P. T.; SOUSA, R. F.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineenses*. **Agrária**, v.10, n.1, p.147-152, 2015.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014, 1996.

D'ALVA, O. A. **O extrativismo da carnaúba no Ceará**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil. 172 p, 2007.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.1315, 1987.

GOMES, J.A.F.; LEITE, E.R.; CAVALCANTE, A.C.R.; CÂNDIDO, M.J.D.; LEMPP, B.; BOMFIM, M.A.D.; ROGÉRIO, M.C.P. Resíduo agroindustrial da carnaúba como fonte de volumoso para a terminação de ovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.1, p.58- 67, 2009.

JABEEN, R.; PRENTIS, P.; ANJUM, T.; ADKINS, S. W. Genetic Structure of Invasive Weed *Parthenium hysterophorus* in Australia and Pakistan. **International journal of agriculture & biology**, v. 17, n. 2, p. 327–333, 2015.

LEE, S. L.; NG, K.K. S.; SAW, L. G.; NORWATI, A.; SALWANA, M. H. S.; LEE, C. T.; NORWATI, M. Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation

of Virgin Jungle Reserves in Peninsular Malaysia. **American Journal of Botany**, v. 89, p.447-459, 2002.

LEITMAN, P.; SOARES, K.; HENDERSON, A.; NOBLICK, L.; MARTINS, R.C. Areaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15706>>. Acesso em: 01 Set. 2016.

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

RESENDE, R. K. S.; VILELA, P. L.; CHALFUN, J. A.; PEREIRA, T. P.; ELISA, M. T. Divergência genética entre cultivares de gérbera utilizando marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2435-2440, 2009.

ROHLF, F. J. **NTSYS: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (v. 1.8)**. Exeter Software, New York. 1993.

SANTOS, R. R. M.; CAVALLARI, M. M.; PIMENTA, M. A. S.; ABREU, A. G.; COSTA, M. R.; GUEDES, M. L. Population genetic structure of *Attalea vitrivir* Zona (Arecaceae) in fragmented areas of southeast Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.14, p. 6472-6481, 2015.

SILVA, M. S.; VIEIRA, F. A. CARVALHO, D. Diversity and genetic structure in natural populations of *Geonoma schottiana* Mart (Arecaceae): implications for conservation. **Cernea**, v. 17, n. 2, p. 195-201, 2011.

TIWARI, V.; MATHAR, K. S.; SINGH, N.; MEENA, B. NAIR, K. N.; DATT, B.; UPRETI, D. K.; TAMTA, S.; RANA, T. S. Genetic variability and population structure of *Bergenia ciliate* (Saxifragaceae) in the Western Himalaya inferred from DAMD and ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 60, p. 165-170, 2015.

VIEIRA, F. A.; SOUSA, R. F., SILVA, R. A. R.; FAJARDO, C. G.; MOLINA, W. F. Diversidade genética de *Copernicia prunifera* com o uso de marcadores moleculares ISSR. **Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.10, n.4, p.525-531, 2015.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. B. J.; YE, Z. H.; MAO, J. X. **POPGENE**, theuserfriendly shareware for population genetic analysis molecular biology and biotechnology center. Edmonton. 1997.