

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE INFALÍVEL

Ana Valéria de Souza¹; Bianca Waléria Bertoni², Suzelei de Castro França²; Mariana Pires de Campos Telles³; Ana Maria Soares Pereira²

¹Embrapa Semi-Árido – CPATSA, Km 458, Zona Rural, Cx.P. 601, CEP 56304-010, Perolina, PE; ²Deptº de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP); ³Laboratório de Genética & Biodiversidade, Universidade Católica de Goiás (UCG), Goiânia, GO, Brasil; e-mail: ana.valeria@cpatsa.embrapa.br, bbertoni@unaerp.br, scfranca@unaerp.br, apereira@unaerp.br, tellesmpc@gmail.com

RESUMO

Mandevilla velutina (Apocynaceae) é uma espécie endêmica do Cerrado, conhecida popularmente como infalível ou batata-infalível, utilizada na medicina popular na forma de extrato alcoólico ou infusões do sistema subterrâneo, no tratamento de processos inflamatórios e acidentes com serpentes. Atualmente, esta espécie é apontada como uma das prioritárias em programas de conservação, e por isso, estudos de diversidade genética e conservação em bancos de germoplasma *in vitro* a fim de evitar sua extinção, são relevantes. O objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética em diferentes populações de infalível por meio de marcador molecular RAPD visando fornecer subsídios para a conservação da espécie em bancos de germoplasma. A análise molecular de variância (AMOVA) mostrou que a variabilidade dentro das populações (81,25%) foi maior que entre populações (18,75%). Esses resultados foram confirmados pelo Índice de diversidade de Nei. As estimativas de variação de PHI_{ST} (0,188) e q_P (0,1586) indicam alta estruturação populacional. Não existe uma relação direta entre as distâncias genéticas e geográficas das três populações estudadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Mandevilla velutina*, extinção, planta medicinal, sistema subterrâneo.

ABSTRACT

Genetic diversity among natural populations of Infalível

Mandevilla velutina (Apocynaceae) is an endemic species of the Cerrado, known as infalível (guaranteed) or batata-infalível (guaranteed potato). *M. velutina* alcoholic extract and root infusions are extensively used in the popular medicine for the treatment of inflammatory diseases and against snake bites. Currently, this species has been pointed out as crucial in conservation programs, therefore studies on its genetic diversity and development of methodology for conservation in *in vitro* germplasm banks are imperative in order to avoid its extinction. The objective of this work was to investigate the genetic variability of *M. velutina* intra and inter populations using RAPD molecular markers to optimize the conservation of the species in germplasm banks. Analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that the variability intra population (81,25%) was superior to inter population (18,75%). Those results were confirmed by the Nei's diversity Index. The PHI_{ST} value of (0,188) and q_P (0,1586) of the genetic variation indicate high population structuring. There seems to be no direct correlation between geographic distances and genetic similarity among the three studied populations.

KEYWORDS: *Mandevilla velutina*, extinction, medicinal plant, root system.

INTRODUÇÃO

O marcador molecular do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é uma técnica que tem sido empregada para a análise da diversidade genética de espécies vegetais nativas, estudos de mapeamento genético, genética de populações, sistemática molecular, “fingerprinting” de genótipos e seleção assistida por marcadores no melhoramento de plantas (Bittencourt, 2000; Gauer & Cavalli-Molina, 2000; Ciampi, 2001; Sales et al. 2001; Souza et al. 2004). *Mandevilla velutina* é uma espécie endêmica do Cerrado, conhecida popularmente como infalível ou batata infalível, utilizada na medicina popular na forma de extrato alcoólico ou infusões do sistema subterrâneo, no tratamento de processos inflamatórios e acidentes com serpentes (Almeida *et al.*, 1998).

Atualmente, esta espécie é apontada como prioritária em programas de conservação, devido o alto grau de endemismo e a maneira extrativista que vem sendo coletada pela população. Como a técnica RAPD possibilita a seleção de genótipos de interesse, para posterior conservação em bancos de germoplasma, o objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética em populações naturais de infalível, visando fornecer subsídios para a conservação da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Folhas jovens de infalível foram coletadas nos municípios de São Carlos (SC), Pedregulho (PD) e Araxá (AR) e acondicionadas separadamente em tubos falcon devidamente identificados contendo sílica gel azul e posteriormente estocadas no freezer a - 20°C até o momento da extração. A coleta foi aleatória e os dados de localização geográfica foram mapeados por Sistema de Posicionamento Global (GPS). Para extração do DNA genômico, utilizou-se o protocolo proposto por Doyle & Doyle (1987).

O DNA extraído foi quantificado através da visualização da banda, sobre luz ultravioleta, em gel de agarose 1% (p/v) e corado com brometo de etídio. Esse DNA foi comparado com DNA padrão de concentrações conhecidas. Para a amplificação RAPD, as amostras de DNA foram avaliadas inicialmente com 100 iniciadores e somente as bandas reprodutíveis em diferentes análises foram consideradas. A partir da ausência ou presença de bandas dos fragmentos amplificados, obteve-se uma matriz de dados binários, os quais foram utilizados para estimar as frequências alélicas, com base na correção proposta por Lynch & Milligan (1994). Em seguida foi realizada uma análise descritiva da variabilidade total calculando-se a porcentagem de locos polimórficos. As distâncias genéticas de Nei (1973, 1978) foram utilizadas em uma análise de agrupamento do tipo UPGMA (“*unweighted pair-group method by arithmetic averages*”) (Legendre & Legendre 1998).

A segunda forma de decompor a variância utilizada neste trabalho foi a AMOVA (Análise da Variância Molecular), conforme proposto por Excoffier *et al.* (1992). Para tanto utilizou-se os programas TFGA (Miller 1997), AMOVA-PREP 1.01 (Miller 1998) e WINAMOVA 1.04 (Excoffier, 1992), onde as frequências alélicas foram submetidas a uma análise de variância de frequências alélicas (Weir 1996; Telles, 2000), que permite a decomposição da variância genética total em seus componentes entre e dentro de populações, possibilitando a avaliação da estruturação da variabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os iniciadores avaliados, foram selecionados aqueles que permitiram a melhor intensidade de bandas e alto grau de polimorfismo.

Os onze iniciadores escolhidos produziram 111 bandas, sendo a maioria polimórfica nas três populações. O número mínimo de bandas por iniciador foi sete e o máximo quinze (Tabela 1). Os resultados da variabilidade genética, obtidos com as diferentes estimativas estatísticas indicaram que o marcador RAPD permitiu uma estimativa consistente na análise genética das três populações naturais de infalível estudadas. Nos 67 indivíduos analisados a porcentagem total de locos polimórficos foi de 81,08%, sendo que a população de Araxá apresentou o maior valor (77,48%), seguida das populações de Sacramento (64,86%) e Pedregulho (49,55%). (Tabela 2). A AMOVA baseada nos marcadores RAPD mostrou que a maior variabilidade genética está no componente intrapopulacional (81,25%), quando comparado ao componente interpopulacional (18,75%), o que torna os resultados interessantes, porque a esta espécie apresenta cleistogamia.

O valor de PHI_{ST} foi 0,188 (valor de $p < 0,001$), indicando uma estruturação significativa da variabilidade genética nestas populações (Tabela 3). A análise de variância de frequências alélicas utilizada para avaliar a estruturação da variabilidade genética nas populações de *M. velutina* mostrou valores de q que variaram de 0,027 a 0,2833, com um valor global de 0,1586 (IC a 95% 0,2251 e 0,1037).

O processo de dispersão das sementes é realizado pelo vento, uma vez que as suas sementes são leves e coroadas por denso tufo apical de pêlos finos, de 15 a 20 mm de comprimento (Almeida *et al.*, 1998), que facilita o deslocamento das sementes a grandes distâncias. De acordo com Loveless & Hamrick (1984), a dispersão de sementes pelo vento aumenta a variação dentro das populações, mas isso depende da velocidade do vento e das características das sementes. Pequenas migrações de sementes a longas distâncias podem evitar a divergência populacional. Esses dados corroboram com os resultados obtidos para a espécie em estudo, pois a maior parte da variabilidade genética das populações foi identificada dentro da população (81,25%). Para estimativas PHI_{ST} significativamente diferentes de zero, valores superiores a 0,05 são considerados indicadores de alta estruturação populacional, enquanto que valores abaixo de 0,05 indicam baixa estruturação (Solé-Cava, 2001). Como pode ser verificado na análise de variabilidade genética entre e dentro das populações descritas anteriormente, as estimativas de variação PHI_{ST} (0,188), foi superior ao valor limite de 0,05, indicando alta estruturação populacional, o que foi confirmado pela análise do padrão de variação espacial, que foi realizada utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (r) entre as matrizes de distâncias genéticas de Nei e as distâncias geográficas entre populações.

O valor r encontrado para as matrizes foi de 0,80227, o que é um valor relativamente alto. As populações de Pedregulho e São Carlos apesar de serem mais próximas geneticamente, são mais distantes no espaço geográfico. As populações de espécies ameaçadas de extinção se encontram frequentemente estruturadas. Isso ocorre devido à degradação ambiental, que pode favorecer a formação de refúgios (fragmentos), onde pequenas populações dessas espécies persistem, sem poder trocar genes com outros acessos localizados em áreas não alteradas.

Portanto, a análise do padrão de variação espacial para estudos de conservação é muito importante, porque se uma espécie ameaçada que ocupa uma determinada área, apresenta-se estruturada, a estratégia de conservação deve procurar preservar a diversidade da espécie naquela área, pois já podem existir adaptações locais que se perderiam no caso da população ser misturada com outras (Solé-Cava, 2001).

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Fundação de apoio a pesquisa do estado de São Paulo) e a Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

LITERATURA CITADA

ALMEIDA SP; PROENÇA CEB; SANO SM; RIBEIRO JF. 1998. Cerrado: Espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 464 p.

BITTENCOURT JVM. 2000. Variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD. Universidade Federal do Paraná. 58p (Tese mestrado).

CIAMPI AY. 2001. Uso de marcadores moleculares nos estudos de genética de populações de espécies florestais. In: III SIMPOSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE. Anais... Londrina, IAPAR. p. 19-22.

DOYLE JJ; DOYLE JL. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus (Rockville), 12(1): 13-15.

EXCOFFIER L; SMOUSE PE; QUATTRO JM. 1992. Analysis of molecular variant inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

EXCOFFIER L. WINAMOVA 1.04: ANALYSIS OF MOLECULAR VARIANCE (Programa para computadores livre distribuído pelo autor). Disponível em: http://www.tien.utk.edu/~gross/WWW_pt2d.html. Acessado em fevereiro de 2005.

GAUER L; CAVALLI-MOLINA S. 2000. Genetic variation in natural population of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. *Heredity*. 84: 647-656.

LEGENDRE, P; LEGENDRE L. 1998. Numerical Ecology. Elsevier. Amsterdam.

LOVELESS MD; HAMRICH JL. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review and Systematics* 15: 65-95.

LYNCH M; MILLIGAN BG. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.

MILLER MP. TFGGA 1.03: 1997. Tools for populations genetics analyses (Programa para computador livre distribuído pelo autor) Disponível em <<http://www.marksgeneticssoftware.net/tfpga.htm>>. Acessado em fevereiro de 2005.

MILLER MP. AMOVA-PREP 1.01: 1998. A program for preparation of AMOVA input from dominant-marker of raw data (Programa para computador livre distribuído pelo autor) Disponível em <<http://www.marksgeneticssoftware.net/amovaprep.htm>>. Acessado em fevereiro de 2005.

NEI M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 70(12): 3321-3323.

NEI M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.

SALES E; et al. 2001. Population genetic study in the Balearic endemic plant species *Digitalis minor* (scrophulariaceae) using RAPD markers. American Journal of Botany 88(10): 1750-1759.

SOLÉ-CAVA AM. 2001. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI SR. (ed.) Biologia Molecular e conservação. Ribeirão Preto: Editora Holos, p.172-192.

SOUZA LMFI.; KAGEYAMA PY; SEBBENN AM. 2004. Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). Scientia Forestalis 65: 70-79.

TELLES MPC. 2000. Diversidade genética e estrutura populacional de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) do sudeste de Goiás. Goiânia. Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Univeridade Federal de Goiás, 129p (Tese mestrado).

WEIR BS. 1996. Genetic Data Analysis II. Sunderland, Massachussets: Sinauer Associates.445p.

Tabela 1. Iniciadores utilizados e marcadores RAPD obtidos para 67 indivíduos de infalível. Primers used and RAPD markers obtained for 67 individuals from infalível. Ribeirão Preto, UNAERP, 2007.

Iniciadores	Seqüências (5'→3')	Número de bandas		
		Total	Polimórficas	Monomórficas
1	CAGGCCCTTC	9	5	4
2	TGCCGAGCTG	12	12	0
3	AGGTGACCGT	8	7	1
4	GTCCACACGG	9	8	1
5	CAGCACCCAC	10	10	0
6	TCGCCAGTG	7	6	1
7	TGCCGAGCTG	8	7	1
8	GAATATGGGTGCGCTCTG	8	8	0
9	AGGGTCTTG	13	10	3
10	AAGGGATTGTTCTGTTTCGCTG	15	11	4
11	TGATTACACCAATTACCACG	12	8	4
	Total	111	92	19

Tabela 2. Estatística descritiva básica das populações de infalível estudadas. Assumiu-se equilíbrio de Hardy-Weimberg. Tamanho médio da amostragem (\bar{n}) e porcentagem de locos polimórficos (P). Resultados obtidos pelo programa POPGENE (Yeh *et al.* 1999). Basic descriptive statistics of the populations studied infalível. Have assumed equilibrium of Hardy-Weimberg. Average sample size (\bar{n}) and percentage of polymorphic loci (P). Results obtained by the program POPGENE (Yeh *et al.* 1999). Ribeirão Preto, UNAERP, 2007.

População	\bar{n}	P
PD	10	49,55
SC	16	64,86
AR	41	77,48
Total	67	81,08

Tabela 3. AMOVA entre e dentro de populações para os 111 indivíduos de infalível G. L., grau de liberdade. S. Q., soma dos quadrados. S. Q. M., soma dos quadrados médios. p, nível de significância da estimativa de variação genética, utilizando 1000 permutações. Estatística PHI_{ST} , variação genética estimada para fonte de variação, análoga à estatística- F_{ST} de Wright. Resultados obtidos pelos programas AMOVA-PREP 1.01 (Miller 1998) e WINAMOVA 1.04 (Excoffier, 1992). AMOVA among and within populations for the 111 individuals from infallible GL, degree of freedom. SQ, sum of squares. SQM, sum of mean squares. p, level of significance of the estimate of genetic variation, using 1000 permutations. Statistics PHI_{ST} , genetic variation estimated for source of variation, similar to the statistics of Wright- F_{ST} . Results obtained by the program AMOVA-PREP 1.01 (Miller 1998) and WINAMOVA 1.04 (Excoffier, 1992). Ribeirão Preto, UNAERP, 2007.

Fonte de variação	G. L.	S. Q.	S. Q. M.	Componentes de variância	% do Total de variação	p	Estatística $-PHI_{ST}$
Entre populações	2	142,22	71,11	3,37	18,75	<0,001	0,188
Dentro de populações	61	890,84	14,60	14,60	81,25	-	-
Total	63	1033,06	-	-	-	-	-

Congresso Brasileiro de Olericultura