

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**



**DIVERSIDADE GENÉTICA DE PAU-BRASIL E
AMPLIFICAÇÃO CRUZADA DE ESPÉCIES DE
CAESALPINIA L. s.l. COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

EULLAYSA NASCIMENTO SABÓIA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Abril de 2013

EULLAYSA NASCIMENTO SABÓIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE PAU-BRASIL E
AMPLIFICAÇÃO CRUZADA DE ESPÉCIES DE
CAESALPINIA L. s.l. COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Abril de 2013

S113 Sabóia, Eullaysa Nascimento.

Diversidade genética de Pau-Brasil e amplificação cruzada de espécies de *Caesalpinia* L. s. l. com marcadores microssatélites / Eullaysa Nascimento Sabóia. – Ilhéus,BA: UESC, 2013.

x, 53 f. : il.

Orientador: Ronan Xavier Corrêa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Genética vegetal. 2. Pau-Brasil. 3. Leguminosa. 4. Microssatélites (Genética). 5. Diversidade genética. I. Título.

CDD 581.35

EULLAYSA NASCIMENTO SABÓIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE PAU-BRASIL E
AMPLIFICAÇÃO CRUZADA DE ESPÉCIES DE
CAESALPINIA L. s.l. COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 26 de abril de 2013

Prof.^a Dra. Simone Gualberto Santos
(UESC)

Prof. Dr. Roberto Tarazi
(UESC)

Prof. Dr. Fabio Demolinari de Miranda
(UFES)

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
(UESC – Orientador)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Dalila e Sabóia*, pelo exemplo de vida.

Aos meus irmãos Cleidiana, Maria dos Remédios, Fábio por nunca medir esforços e incentivos para que todos os meus anseios e objetivos pudessem ser alcançados. Ao meu namorado Lucas Ferraz por sempre estar ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, sobre tudo, por me abençoar todos os dias.

A Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pela realização de minha formação profissional, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade concedida, e por toda conhecimento que me foi passado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa, pela orientação, oportunidade, paciência e pelos ensinamentos fundamentais que me passou. Não só meu agradecimento, mas toda minha admiração. Obrigada!

À Prof. Dra. Fernanda Amato Gaiotto, pelo grande apoio na realização do trabalho, pelas valiosas dicas, pelo incentivo e por toda atenção.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Ao Dr. Roberto Tarazi, pelo apoio e pelas sugestões na realização da pesquisa.

Às pessoas mais importantes da minha vida, a família Sabóia! Minha mãe (mamãe) Dalila e meu pai Sabóia, por serem tão presentes na minha vida. Meus irmãos Cleidiana, Maria dos Remédios e Fábio, pelo amor, meus sobrinhos Usahuã, Àidan, Ana Luísa, Áislan Jesus e Isabel pela alegria. Meus cunhados Gilfran e Luciano, pelo incentivo.

Ao meu grande amor Lucas Ferraz, por fazer os problemas se tornarem mais fáceis. Pelo apoio emocional, e pelas mudanças na minha vida. Sem você tudo seria mais difícil.

Aos amigos do laboratório Marcadores moleculares, pela ajuda, troca de experiência, alegria na hora que tudo dava certo, pela disponibilidade. Obrigada, Dani Borges, Caio, Ramiris, Douglas, Flora, Allan, Rodrigo, Alexandro, Acácia, Marília, Jamille e Mariana.

Ao Horley, pela dedicação e atenção com que realiza seu trabalho.

A Samara e ao Raul meus amigos de curso, pelo companheirismo e pela amizade. Vocês fazem parte disso.

À minha grande amiga Elaine a qual tive o prazer de conhecer na Bahia. Obrigada pela amizade, pelo companheirismo, pelos momentos alegres, pelas companhias no almoço, por fazer os finais de semana no laboratório divertidos.

A Isabela, a qual tenho um carinho especial. Obrigada por ter feito parte dessa etapa da minha vida, por se fazer sempre presente, pela companhia nos momentos em que uma só tinha a outra, obrigada pelas gargalhadas (elas foram muito importantes). Obrigada por ter sido a minha família.

Aos amigos Márcia, Joice, Dayse, Josiane, Joseane, Manú, Dani, Mara, Gonçalo, Cristina, Luciana e Dayane. Obrigada pelos momentos de descontração.

Aos amigos do prédio, pelos divertidos encontros, pelos cafés da noite e pelas resenhas.

Agradeço desde já aos membros da banca de defesa, pela leitura e pelas futuras contribuições críticas no aperfeiçoamento de minhas ideias.

ÍNDICE

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| EXTRATO..... | vii |
| ABSTRACT | ix |
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 1.1 Diversidade genética em espécies arbóreas ameaçadas de extinção | 5 |
| 1.2 Variabilidade e conservação de espécies de <i>Caesalpinia</i> | 7 |
| 1.3 Amplificação cruzada com marcadores SSR em leguminosas..... | 9 |
| 1.4 Estrutura populacional e parâmetros de diversidade genética | 11 |
| 1.5 Diversidade e estrutura populacional em <i>Caesalpinia echinata</i> | 13 |
| CAPÍTULO 1 | 17 |
| Diversidade genética de <i>Caesalpinia echinata</i> proveniente de população natural e arboreto..... | 17 |
| Resumo..... | 17 |
| Introdução..... | 19 |
| Material e métodos..... | 21 |
| Resultados..... | 22 |
| Discussão | 26 |
| Conclusões..... | 30 |
| CAPÍTULO 2 | 35 |
| Amplificação cruzada de espécies de <i>Caesalpinia</i> com marcadores SSR de <i>Senna multijuga</i> e <i>Caesalpinia echinata</i> | 35 |
| Resumo..... | 35 |
| Introdução..... | 36 |
| Material e Métodos | 37 |
| Resultados..... | 39 |
| Discussão | 41 |
| Conclusão..... | 44 |

| | |
|----------------------------------------|-----------|
| Referências..... | 44 |
| CONCLUSÕES GERAIS..... | 47 |
| REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES..... | 48 |

EXTRATO

SABÓIA, Eullaysa Nascimento, MSc, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Abril de 2013. **DIVERSIDADE GENÉTICA DE PAU-BRASIL E AMPLIFICAÇÃO CRUZADA DE ESPÉCIES DE CAESALPINIA s.l. COM MARCADORES MICROSSATÉLITES.** Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientadora: Fernanda Amato Gaiotto.

Os domínios Caatinga e Mata Atlântica encontram-se em elevado grau de fragmentação. Isso reflete em redução de habitat e elevação do número de espécies ameaçadas de extinção, especialmente aquelas que são alvo de corte seletivo. Este é o caso de *Caesalpinia echinata* Lam (pau-brasil) que se encontra ameaçada de extinção. Em todo esse gênero, apenas *C. echinata* possui marcadores microssatélites (SSR) desenvolvidos, possibilitando o estudo genético de populações dessa espécie. Conhecer os níveis de diversidade genética das populações fornece informações genéticas sobre as espécies ameaçadas e dá um suporte para atitudes de preservação das mesmas. Uma das maneiras para obter dados genéticos de populações naturais é a aplicação dos marcadores SSR. Nesse contexto, a diversidade genética de duas populações de pau-brasil foi avaliada, e a amplificação cruzada entre espécies do gênero *Caesalpinia* foi testada, com o intuito de gerar informações genéticas para conservação do pau-brasil e disponibilizar marcadores SSR para espécies de *Caesalpinia*. Dez *primers* SSR foram utilizados no estudo de diversidade em uma população natural (38 indivíduos de Potiraguá, BA) e uma população *ex situ* (58 indivíduos do arboreto da Universidade Estadual de Santa Cruz). Observou-se que todos os locos foram polimórficos em pau-brasil, com uma média alta do número de alelos

por loco (A) (Potiraguá, A = 8,0; Arboreto, A = 10,4). As estimativas de diversidade gênica (H_e) mostraram tendências semelhantes entre as duas populações analisadas ($H_e = 0,61$ para as duas populações), demonstrando um alto índice de variabilidade gênica. Os valores de heterozigosidade observada (H_o) foram menores ($H_o = 0,52$ em Potiraguá e $H_o = 0,59$ no arboreto). O índice de fixação (F) estimado variou entre as duas populações, sendo próximo de zero no arboreto UESC ($F = 0,03$), e maior na população de Potiraguá ($F = 0,15$). A comparação entre os parâmetros de diversidade genética da população de Potiraguá e do Arboreto mostram valores semelhantes, entretanto a população de Potiraguá revela uma diminuição de heterozigotos, diferente do Arboreto UESC no qual o índice de fixação se aproxima de zero. Os indivíduos do Arboreto UESC são originados de sementes advindas de distintas populações, provavelmente contendo baixo endocruzamento. A população natural de Potiraguá mantém altos níveis de diversidade gênica, mas com uma tendência a diminuição de heterozigotos, comprovado pelo índice de fixação positivo. O Arboreto UESC possui grande representatividade genética, podendo ser utilizado para produção de sementes visando reflorestamentos e conservação de pau-brasil. Para a amplificação cruzada foram utilizados dez *primers* SSR de *Senna multijuga* Rich. I. & B. e cinco *primers* SSR de *C. echinata*. Amostras de cinco indivíduos das seguintes espécies foram analisadas: *Caesalpinia microphylla* Mart., *Caesalpinia laxiflora* Tul., *Caesalpinia calycina* Benth., *Caesalpinia ferrea* Benth., *Caesalpinia pluviosa* DC., *Caesalpinia pulcherrima* Sw., *Caesalpinia bracteosa* Tul., *Caesalpinia pyramidalis* Tul. *Caesalpinia gardneriana* Benth., *Caesalpinia sp cf sulcata*, *Caesalpinia sp cf sympatrica*. Os testes de amplificação cruzada resultaram em sete *primers* transferidos, dos quais pelo menos cinco espécies amplificaram com cinco *primers*. Todos os locos amplificados na transferência apresentaram padrões de amplificação típicos de microssatélites e poderão ser úteis para pesquisa em genética de população dessas espécies.

Palavras-chave: Leguminosae, fragmentação florestal, transferência, população *ex situ*, marcadores SSR, genética da conservação.

ABSTRACT

SABÓIA, Eullaysa Nascimento, MSc, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Abril de 2013. **GENETIC DIVERSITY OF BRAZILWOOD AND CROSS-SPECIES AMPLIFICATION OF CAESALPINIA S.L. WITH MARKERS MICROSATELLITE.** Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientadora: Fernanda Amato Gaiotto.

The Caatinga and Atlantic Forest are domains in high degree of fragmentation. This reflects in reduction of habitat and in increase the number of endangered species, especially those that are subject to selective cutting. This is the case of *Caesalpinia echinata* Lam (Brazil wood) which is threatened with extinction. In all this genus, only *C. echinata* has microsatellite markers (SSR) developed, enabling the genetic study of populations of this species. Know the levels of genetic diversity of the populations provides the genetic information about endangered species and gives a support for the preservation of the same. One of the ways of obtain genetic data from natural populations is the application of SSR markers. In this context, the genetic diversity of two populations of Brazilwood was evaluated, and the cross-species amplification in the genus *Caesalpinia* was tested, with the objective of generate genetic information for conservation of Brazilwood and make available SSR markers to species *Caesalpinia*. Ten SSR primers were used in the study of diversity in a natural population (38 individuals of Potiraguá, BA) and in a ex situ population (58 individuals do Arboretum of Universidade Estadual de Santa Cruz). It was observed that all the loci were polymorphic in the Brazilwood population, with a high average number of alleles per locus (A)

(Potiraguá, $A = 8.0$; Arboretum, $A = 10.4$). The estimates of genetic diversity (H_e) showed similar trends between the two populations ($H_e = 0.61$ for the two populations), demonstrating high genetic variability. The values of observed heterozygosity (H_o) were lower ($H_o = 0.52$ in Potiraguá and $H_o = 0.59$ at the arboretum). The fixation index (F) Estimated varied between the two populations, Arboreto UESC ($F = 0.03$), and larger in the population of Potiraguá ($F = 15$). The comparison between the parameters of population genetic diversity of Potiraguá and Arboretum show similar values, though the population of Potiraguá shows a decrease of heterozygotes, different of the Arboretum UESC with fixation index next of zero. The individuals of the Arboretum UESC are sourced from seeds produced from distinct populations, probably containing low inbreeding. The natural population of Potiraguá maintains high levels of genetic diversity, but with a tendency to decrease in heterozygotes, verified by fixation index positive. The Arboretum UESC has great genetic representativeness, and can be used to seed production aimed at reforestation and conservation of Brazilwood. For the cross amplification ten primers were used SSR of *Senna multijuga* Rich. I. & B. and five SSR primers *C.echinata*. Samples of five individuals of the following species were analyzed: *Caesalpinia microphylla* Mart., *Caesalpinia laxiflora* Tul., *Caesalpinia calycina* Benth., *Caesalpinia ferrea* Benth., *Caesalpinia pluviosa* DC., *Caesalpinia pulcherrima* Sw., *Caesalpinia bracteosa* Tul., *Caesalpinia pyramidalis* Tul *Caesalpinia gardneriana* Benth., *Caesalpinia sp cf sulcata*, *Caesalpinia sp cf simpatica*. Os testes de amplificação cruzada resultaram em sete primers transferidos, dos quais pelo menos cinco espécies amplificaram com cinco primers. The tests of cross amplification resulted in seven transferred primers, of which at least five species with five primers amplified. All the loci amplified in the transferibility showed typical standards of amplification of microsatellites and may be useful for research in population genetics of these species.

Key-words: *Leguminosae*, *forest fragmentation*, *transferibility*, *population ex situ*, *SSR markers*, *genetic of conservation*.

INTRODUÇÃO

Juntos o Cerrado e a Mata Atlântica abrangem mais da metade dos estados brasileiros. Ambos apresentam elevada taxa de espécies endêmicas e são considerados “hotspots” de biodiversidade do mundo (MYERS et al., 2000; IBGE 2003; KLINK; MACHADO, 2005). No entanto, o alto grau de devastação a que estão submetidos reflete-se em um acentuado número de espécies ameaçadas de extinção. Em *Caesalpinia L. sensu lato (s.l.)*, há seis espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2012), dentre as quais se encontra o pau-brasil, espécie nativa da Mata Atlântica. A fim de preservar espécies ameaçadas, e dessa forma entender como os domínios estão respondendo a pressão antrópica e subsidiar práticas conservacionistas, o conhecimento dos níveis de diversidade genética das populações é bastante útil. Assim, uma das maneiras mais eficazes de se obter dados genéticos de populações naturais é a aplicação dos marcadores moleculares, dentre os quais os microssatélites (SSR) são eficientes para geração de dados úteis para formular estratégias de conservação (OLIVEIRA et al., 2006).

O intenso desmatamento que vem ocorrendo nos domínios brasileiros, resulta em uma grande perda de biodiversidade, pois ao reduzir e isolar vegetações contínuas ela limita a migração de dispersores e polinizadores, leva a perda de alelos ao separar as populações por deriva genética, além de causar a mortalidade de muitos indivíduos. No decorrer do tempo, esse processo reduz a diversidade genética das populações, comprometendo a capacidade de adaptação às mudanças ambientais. Espécies arbóreas sofrem diretamente esses efeitos, demonstrando alterações do ponto de vista

genético, daí ver-se uma grande quantidade de árvores ameaçadas de extinção (YOUNG et al. 1996). Diante disso é muito importante a aplicação de ferramentas moleculares em estudos populacionais de árvores, devido a capacidade de responder a que nível se encontra a diversidade genética, e dessa forma avaliar como elas estão respondendo as mudanças ambientais. Essas pesquisas auxiliam nas práticas de conservação de espécies ameaçadas (PETIT et al. 1998).

O desenvolvimento de ferramentas moleculares para estudar espécies ameaçadas de extinção é uma alternativa bastante útil para conservação dessas espécies. Atualmente além de *C. echinata* encontram-se mais cinco espécies de *Caesalpinia*, provenientes de outros países, descritas como ameaçadas de extinção na lista da União internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 2013). A comercialização de produtos originados a partir da exploração dessas espécies possivelmente seja a causa desse grande número de espécies ameaçadas nesse gênero. No entanto, mesmo com a divulgação na lista de espécies ameaçadas poucos estudos são voltados para conservação. Além disso, outras espécies desse gênero que ocorrem domínios brasileiros como Cerrado e Mata Atlântica também não possuem informações acerca da diversidade genética e biologia reprodutiva. Dessa forma é notória a importância de desenvolvimento de pesquisas que visem gerar informações a respeito de gêneros com grande quantidade de espécies ameaçadas de extinção (CARDOSO et al. 1998; CoP14, 2007)

O pau-brasil, uma espécie nativa da Mata Atlântica, foi fortemente explorada e hoje está incluída na lista da IUCN, como espécie ameaçada de extinção. Por esse motivo e por ser uma espécie símbolo do Brasil, existem alguns trabalhos voltados para o estudo dessa espécie. O desenvolvimento de SSR é um exemplo, no entanto ainda faltam muitas informações necessárias para efetiva conservação do pau-brasil, devido à progressiva fragmentação que existe na área de ocorrência dessa árvore (MELO et al. 2007).

Similares ao pau-brasil existem outras espécies ameaçadas de extinção ou espécies que não estão registradas como ameaçadas, mas que têm como habitat florestas fragmentadas, com grande carência de informações genéticas devido ao custo oneroso para desenvolvimento de

marcadores específicos que dariam informações mais precisas da atual situação em que a diversidade genética se encontra. Para isso a aplicação da técnica de amplificação cruzada, que consiste na transferência de *primers* específicos de uma espécie, para outras espécies do mesmo gênero e até de gêneros diferentes, é uma alternativa promissora. Essa técnica é bastante benéfica, pois possibilita que espécies que não possuem grande visibilidade por não ter interesse econômico, ou cultural, possam ser estudadas (NAZARENO et al. 2009). Com isso a amplificação cruzada é uma opção oportuna para gerar informações com maior abrangência de espécies diminuindo o custo, o tempo e fornecendo respostas mais rápidas sobre espécies que habitam regiões fragmentadas.

Devido à exploração e fragmentação da Mata Atlântica o pau-brasil uma espécie de ampla distribuição geográfica que no passado era encontrada em várias regiões da Mata Atlântica, hoje está restrita a locais de reserva ou em pequenos isolados de mata (CARDOSO, 1994). Com a finalidade de evitar que uma espécie nativa de domínio brasileiro seja extinta, é importante gerar informações genéticas, quanto ao nível de diversidade e estrutura genética, abrangendo uma grande representatividade de populações, para que essas informações possam dar suporte a estratégias de conservação. Com isso a avaliação da diversidade genética de populações *ex situ* é uma importante forma de auxílio para conservação de pau-brasil, pois a manutenção de indivíduos que possuam representatividade genética para serem aplicados em programas de reflorestamento é muito importante para conservação de uma espécie (NETO et al. 2005). Além disso, outra forma de auxiliar na conservação dessa espécie é analisar a diversidade genética de populações naturais e comparar com outras populações já estudadas, para que uma visão mais ampla da diversidade genética de pau-brasil possa ser gerada (MISTURA et al. 2012)

Além da Mata Atlântica a Caatinga e o Cerrado são outros domínios que também se encontram criticamente fragmentados, devido intensa exploração (BACELLAR-SCHITTINI et al. 2009; MACHADO et al. 2004). Essa crescente fragmentação, leva acreditar que muitas espécies desses domínios possam estar com suas dinâmicas populacionais alteradas. Muitas espécies do gênero *Caesalpinia* habitam regiões de Cerrado e Caatinga, no

entanto mesmo com espécies desse gênero ameaçadas de extinção em outros domínios, existem poucos estudos voltados para entender a diversidade genética e a estrutura de populações dessas espécies. Diante dessa situação a aplicação de amplificação cruzada utilizando *primers* de espécie do gênero *Caesalpinia*, e de espécie de outro gênero mais de mesma família, é uma ótima opção para obter respostas sobre um grande número de espécies como maior rapidez e menor custo. A importância de obter estudos sobre espécies que habitam esses domínios vem do fato de que além de direcionar ações de conservação para as espécies em estudo, informações sobre a dinâmica e o nível de preservação existente no Cerrado e Caatinga podem ser conhecidas.

Nesse contexto diante do atual status de conservação do pau-brasil, e da carência de estudos relacionados a espécies do gênero *Caesalpinia* existentes no Cerrado e Caatinga, o objetivo geral desse trabalho foi analisar a diversidade genética em populações de pau-brasil, e testar a amplificação cruzada de SSR em diferentes espécies de *Caesalpinia*. Com intuito de atingir o objetivo geral foram traçados como objetivos específicos: i) Amplificar DNA de espécies de *Caesalpinia* com cinco *primers* SSR de pau-brasil e 10 SSR de *Senna multijuga*, ii) Avaliar a diversidade genética de uma populações *ex situ*, e uma população natura de pau-brasil.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Diversidade genética em espécies arbóreas ameaçadas de extinção

No Brasil existe uma grande biodiversidade em diferentes biomas, porém a exploração desses ecossistemas tem levado a degradação de importantes domínios que mantêm a biodiversidade do planeta. Por causa disso, muitas espécies da fauna e da flora estão ameaçadas de extinção (GALINDO-LEAL et al. 2005). Um reflexo da exploração ambiental é a fragmentação florestal, que consistem na conversão de uma vegetação contínua em áreas isoladas com redução e isolamento das populações. A fragmentação de ecossistemas naturais tem efeitos danosos sobre a biodiversidade, pois em decorrência dela pode ocorrer redução nas taxas de migração, aumento das taxas de mortalidade, deriva genética, efeito de borda e perda de espécies raras e ameaçadas de extinção. Todos esses fatores podem levar a uma perda da diversidade genética das espécies (YOUNG et al. 1996).

A diversidade genética consiste no nível de variabilidade gênica existente em cada população (FUTUYMA, 1992). A sua importância para as espécies vem da variação alélica entre os indivíduos o que torna os seres com constituição genética diferenciada, e assim com maior capacidade de suportar mudanças. Dessa forma, populações que mantêm a diversidade genética original têm maior capacidade evolutiva. Por isso, muitos estudos voltados para conservação tem o objetivo de conhecer a diversidade genética de espécies, através de investigações sobre a distribuição da variabilidade

genética entre as populações e a composição genética das mesmas (FRANKHAM, 2008).

Pesquisas apontam a perda da diversidade genética em espécies arbóreas que habitam paisagens fragmentadas e demonstram alterações nas suas dinâmicas do ponto de vista genético. Estas alterações genéticas referem-se à limitação no fluxo gênico, aumento de endogamia, deriva genética, e podem ser identificadas através da aplicação dos marcadores moleculares (LEMES, 2003). Os marcadores moleculares são eficientes na identificação da diversidade genética e são capazes de gerar uma grande quantidade de informações bastante úteis na aplicação de estratégias de conservação (FALEIRO et al. 2007). Atualmente os marcadores moleculares microssatélites, por serem codominantes e amplamente distribuídos no genoma, têm sido os mais usados nas investigações que requerem grande quantidade de informações (GUPTA E VARSHNEY, 2000).

Devido a essa capacidade de responder sobre a identificação da diversidade genética, muitos trabalhos concentram-se no desenvolvimento de marcadores moleculares específicos para árvores ameaçadas. Por exemplo, oito marcadores microssatélites foram desenvolvidos para *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn. (BRONDANI et al. 2003). Posteriormente esses SSRs possibilitaram avaliar o efeito da polinização de morcegos no sistema de cruzamento dessa árvore, e revelaram importantes informações, mostrando que apesar dessa espécie ser aparentemente auto-incompatível, em ambientes com baixas taxas de visitação de polinizadores há uma mudança para um sistema misto de cruzamento com altos níveis de autofecundação (LOBO et al. 2005).

A diversidade genética em populações de *Elaeagnus mollis* Diels, árvore ameaçada de extinção, revelou-se alta ao ser quantificada por meio de marcadores microssatélites (WANG, 2012). No entanto, os estudos de diferenciação dessas populações levaram à constatação de que o atual *status* de conservação dessa árvore está relacionado com exploração humana e não com pobreza alélica, sugerindo a adoção de estratégias de conservação *in situ* e *ex situ*, podendo dessa forma aproveitar a grande variabilidade genética que essa espécie ainda tem disponível.

Para *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), uma importante árvore brasileira em risco de extinção, 10 marcadores SSR foram desenvolvidos (MELO et al. 2007). Esses *primers* têm possibilitado mostrar que, apesar de existir uma razoável riqueza de alelos em algumas populações desta espécie,, essa diversidade encontra-se altamente estruturada entre populações (S.C.O. Melo, comunicação pessoal). Visando gerar importantes informações nesses aspectos, atualmente estudos moleculares continuam desenvolvendo microssatélites, como é o caso de *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae) na qual 12 SSRs foram desenvolvidos (TELLES et al. 2011).

Estudos atuais que envolvem genética de populações buscam conhecer como as espécies ameaçadas comportam-se diante das reduções nas suas áreas de ocorrência. Essa questão pode ser respondida através da investigação de nível de polimorfismo, fixação de alelos entre gerações, estrutura populacional, distância de fluxo gênico e parentesco entre os indivíduos. De posse desses conhecimentos, podem-se indicar maneiras de minimizar o impacto da exploração e inferir possíveis causas diretas das perdas genéticas que as populações estão sofrendo, auxiliando na conservação das espécies ameaçadas (SEBBENN et al. 2011,WANG et al. 2012, KATSUKI et al. 2011).

1.2 Variabilidade e conservação de espécies de *Caesalpinia*

O gênero *Caesalpinia* é caracterizado por uma grande variabilidade morfológica, tanto interespecífica como intra-específica, que leva a dificuldades na determinação da taxonomia de populações estreitamente relacionadas (LEWIS, 1998). A análise da anatomia da madeira possibilitou a atribuição de espécies de *Caesalpinia s.l.* a diferentes gêneros (GASSON, 2009). Demonstra-se que vários caracteres anatômicos corroboram para que essas espécies sejam redistribuídas. Por exemplo, *C. echinata* passaria a *Poincianella echinata*. No entanto, por causa desses problemas de identificação, pesquisas desenvolvidas com espécies desse gênero visam à resolução de impasses classificatórios, buscando definir através de

marcadores moleculares a que grupo elas pertencem, unindo informações sobre a distribuição da variabilidade genética molecular e da morfologia (SOTUYO et al. 2004).

O pau-brasil ilustra a grande plasticidade morfológica do gênero *Caesalpinia*, a qual possui uma grande variação na morfologia foliar apresentando três variedades de tamanho e forma diferentes. A existência de grupos com diferenças morfológicas tão acentuadas dentro de espécie desperta atenção para pesquisas filogenéticas. Por exemplo, a existência de diferentes táxons dentro dos morfotipos de pau-brasil levou à análise com base em DNA cloroplastidial, resultando na proposição de que se trata de um complexo de espécies (JUCHUM et al., 2005).

O pau-brasil é uma árvore que faz parte da história de colonização do Brasil, pois nesse período a comercialização do lenho foi um dos principais responsáveis pelo ciclo econômico desse país, no qual ela sofreu intensa exploração da sua madeira pelas indústrias naval, civil, tintorial, e também para fabricação de instrumentos (CARVALHO, 1994). Além disso, o domínio Mata Atlântica, habitat natural dessa árvore, tem sofrido uma grande redução das suas florestas. Todos esses fatores são responsáveis pelo atual *status* de conservação do pau-brasil, uma espécie ameaçada de extinção (VARTY, 1998).

Trabalhos que envolvem a conservação dessa espécie até então priorizam avaliar a variabilidade genética intra e inter populacional, em florestas naturais ou coleções *ex situ*, a fim de conhecer a estrutura genética das populações e indicar indivíduos com representatividade genética para conservação. Os marcadores isoenzimáticos e RAPD possibilitaram evidenciar a distribuição da diversidade genética de pau-brasil e mostrar relação entre a origem geográfica e a diferenciação genética (NETO et al. 2005; OLIVEIRA et al. 2006; CARDOSO et al. 1998; CARDOSO et al., 2004). A fim de responder mais profundamente questões relativas ao comportamento genético de pau-brasil nos remanescentes florestais atuais, marcadores microssatélites foram desenvolvidos, os quais vêm sendo utilizados em estudos sobre essa espécie realizados na UESC (MELO et al. 2007). Contudo, para as diversas espécies de *Caesalpinia*, ainda não há marcadores microssatélites desenvolvidos.

Atualmente além de *C. echinata* encontram-se mais cinco espécies de *Caesalpinia* descritas como ameaçadas de extinção na lista da União internacional para Conservação da Natureza (IUCN) são elas: *Caesalpinia kavaiensis* H. Mann, *Caesalpinia merxmeullerana* A.Schreib, *Caesalpinia nhatrangense* J.E.Vidal (Vietnam), *Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burkart, *Caesalpinia sappan* L. (IUCN, 2012). Esse número expressivo em apenas um gênero está relacionado às múltiplas aplicações das espécies desse gênero, como a comercialização da madeira, e também na farmacologia. Além disso, as pesquisas não estão diretamente ligadas a conservação, um exemplo disso é a carência de estudos sobre a biologia reprodutiva desse grupo (SILVA, et al. 2009; CAVALHEIRO, et al. 2009; BORGES et al. 2007).

Alternativas para a conservação desse gênero podem estar em espécies que, embora já estejam escassas em algumas regiões, ainda apresentam uma significativa variabilidade genética como a que ocorre com *Caesalpinia ferrea* Mart. Dessa forma essas alternativas podem ser aplicadas em programas de recuperação de áreas degradadas (SANTOS et al. 2011). Informações valiosas para conservação de grupos ameaçados foram mostradas em pesquisas desenvolvidas com outras espécies de Leguminosas como *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. e *Astragalus ampullarioides* (S. L. Welsh) S. L. Welsh, que demonstram a importância da preservação não apenas de grandes áreas, mas também de pequenos fragmentos, os quais também podem conter variabilidade genética e contribuir para preservação de espécies. Além disso, as informações sobre conservação destacam a importância de conhecer e considerar a composição genética e a origem das populações para que a reintrodução de indivíduos seja possível (BREINHOLT et al. 2009; RIBEIRO et al. 2005).

1.3 Amplificação cruzada com marcadores SSR em leguminosas

Os marcadores microssatélites ou seqüências simples repetitivas (SSR) são co-dominantes e altamente informativos, por isso são ferramentas úteis na aplicação de mapeamento genético, estudos de estrutura de

populações e diversidade genética. Eles são espécie-específicos e necessitam de um grande investimento financeiro além de exigirem grande esforço para o seu desenvolvimento. No entanto a genética comparativa revelou que espécies relacionadas, por exemplo, as de mesmo gênero, possuem regiões que flanqueiam os sítios microssatélites, as quais os primers se anelam, conservadas. Essas regiões conservadas entre diferentes espécies possibilitam que haja amplificações de locos microssatélites entre espécies utilizando os mesmos iniciadores. Por esse motivo a amplificação cruzada de SSR mostra-se eficiente em estudo com espécies de plantas do mesmo gênero (BOWCOCK et al. 1994, VAN DEYNZE et al. 1998).

O método de transferir marcadores SSR de uma espécie para outra, conhecido como transferibilidade de *primers* ou amplificação cruzada, tem revelado sucesso como no caso da transferência dentro de diferentes famílias de plantas, especialmente nas leguminosas. Os SSR de soja (*Glycine Max*(L.) Merr.) foram transferidos para 3 espécies do gênero *Glycine*: *Glycine clandestina* Wendl., *Glycine microphylla* (Benth.) Tind., *Glycine falcata* Benth. Mas também foram transferidos para legumes de gêneros diferentes como *Vigna unguiculata* (L.) Walp., *Kennedia rubicunda* (Schneev.) Vent., *Vicia faba* L., *Trifolium subterraneum* L., *Lupinus angustifolius* L. e *Albizia julibrissin*. No entanto, as taxas de amplificação cruzada são maiores quando as espécies são de mesmo gênero, como observado no caso da soja, em que houve transferência para 65% para espécies de *Glycine* e apenas 13% para espécies dos outros gêneros. Esses trabalhos ressaltam a possibilidade de estudar espécies de menor interesse econômico, que por isso em muitos casos ainda não foram estudadas (KULEUNG et al. 2003; PEAKALL et al. 1998).

Além das espécies agronômicas, há também demonstração de amplificação cruzada em leguminosas arbóreas que desempenham importante função ecológica, como é o caso de *Parkia panurensis* Benth. ex H. C. Hopkins, uma importante fonte de alimentação de duas espécies de mico-leão. Todos os nove SSR desenvolvidos para essa espécie foram transferidos para seis espécies desse gênero, são elas: *P. ingneiflora*, *P. multijuga*, *P. nítida*, *P. plathycephala*, *P. bahiae* e *P. pendula*. Com isso a

análise de estrutura genética e fluxo gênico de mais 6 espécies de *Parkia* podem ser desenvolvidas (LUETTMANN et al. 2010).

A escolha de espécies para estudos de diversidade genética geralmente é realizada de acordo com o ambiente de ocorrência, e com o *status* de conservação de cada espécie. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne é uma leguminosa de ampla distribuição no cerrado, e por isso pode ser utilizada na recuperação de áreas degradadas, com isso a amplificação cruzada de *primers* de *Hymenaea coubaril* L. para *Hymenaea stigonocarp* foi bastante útil para gerar informações genéticas e conhecer essa importante árvore do cerrado (CIAMPI, et al. 2008).

Além da detecção de polimorfismos em espécies relacionadas, o nível de transferência de *primers* está diretamente relacionado com a proximidade das espécies, levando a inferir sobre aspectos evolutivos (DIRLEWANGER, et al. 2002). Como por exemplo, o sucesso na transferência de SSR entre os gêneros de leguminosas como *Arachis* L. e *Glycine* Max aponta que existem regiões SSRs conservadas entre diferentes leguminosas (GAUTAMI, et al. 2009; MACE, et al, 2008; PEAKALL, et al. 1998).

Em suma dentre os possíveis benefícios dessa técnica, constam em viabilizar muitas possibilidades de estudos que vão desde gerar informações para espécies de baixo interesse econômico e visibilidade, até inferir sobre a proximidade evolutiva. Além disso, a amplificação cruzada entre espécies ecologicamente importantes e que habitam domínios que estão sofrendo progressivos impactos ambientais, é uma importante ferramenta para conservação genética. Informações úteis como o nível de estruturação genética de populações e os parâmetros genéticos podem ser fornecidas com mais rapidez e maior abrangência (NAZARENO, et al. 2009).

1.4 Estrutura populacional e parâmetros de diversidade genética

Os estudos em genética de populações têm como base avaliar as diferenças genéticas entre indivíduos ou populações. Essas diferenças podem ser identificadas diretamente no DNA de cada indivíduo, através de marcadores moleculares. A partir da identificação da variação de diferentes

genótipos de uma população, o nível de variabilidade genética intra e inter-populacional pode ser determinado, e dessa forma pode-se sugerir estratégias de conservação (HAMRICK, 1983; HARTL, 2000).

O agrupamento de subpopulações menores é chamado de estrutura populacional, nas quais geralmente ocorrem cruzamentos dentro de uma população. Esse fato geralmente leva a diferenciação genética, ou seja, a diferenças nas frequências alélicas. Quando as subpopulações estão completamente isoladas de migração, todos os cruzamentos devem ocorrer entre indivíduos de cada subpopulação, ou seja, haverá endocruzamentos. Desta forma, com o passar do tempo, esses indivíduos compartilham de alelos ancestrais que podem ser diferentes daqueles que passaram a predominar em outra subpopulação. Uma relação existente entre a estrutura populacional e o endocruzamento é a redução na proporção média de heterozigotos, já que os organismos de mesma subpopulação podem resultar em descendentes cujos alelos em um loco são idênticos por descendência (HARTL, 2010).

Os parâmetros que geralmente descrevem a diversidade genética e que avaliam a estrutura genética de populações são: porcentagem de locos polimórficos (P), diversidade gênica segundo o princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e), heterozigosidade observada (H_o), número de alelos por loco (A) e coeficiente de endogamia (f) ou índice de fixação (F) (FRANKHAM, 2008; VENCOVSKY e COELHO, 2000).

O polimorfismo indica a taxa de alelos por loco em uma espécie, o seu princípio é de que os alelos são compartilhados entre subpopulações. A diversidade alélica (A) representa o número médio de alelos por loco. Quando mais de um loco é estudado, a diversidade alélica representa a média do número de alelos de todos os locos, ela também é usada para caracterizar o nível de diversidade genética (FRANKHAM, 2008)

A heterozigosidade é dada pela frequência total de heterozigotos, ela é dita como heterozigosidade esperada (H_e) quando as frequências alélicas são calculadas usando as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Entretanto se não for considerado o sistema reprodutivo a H_e deve ser referida como diversidade gênica. Com tudo se a heterozigosidade for obtida contando diretamente os heterozigotos, é dita como heterozigosidade

observada (H_0). O coeficiente de endogamia (f) e índice de fixação de alelos (F) estão relacionados com a heterozigosidade e com o sistema reprodutivo, estes índices demonstram a probabilidade da progênie herdar em um loco dois alelos idênticos, e como consequência avaliam o aumento de homocigotos, sendo que o coeficiente de endogamia (f) é usado apenas quando há endogamia. (GRIFFITHS, 2008; VENCOVSKY e COELHO, 2000).

A aplicação desses parâmetros é bastante útil para mensurar a diversidade genética em espécies arbóreas de florestas tropicais, pois devido à grande redução de habitat, pode ocorrer perda de variação genética nas populações (GANDARA; KAGEYAMA 1998). Um das causas de perda de variabilidade genética é a deriva genética que consiste na mudança aleatória da frequência de alelos de geração em geração, por redução no tamanho de uma população. Outro efeito que também causa a perda de variabilidade genética é a restrição de fluxo gênico entre as populações, pois o grau no qual uma população pode ser delimitada de outras, depende do nível de fluxo gênico entre elas, essa restrição proporciona a endogamia (ALLENDORF; LUIKART 2007; FUTUYMA 1992; YOUNG et. al. 1996).

Endogamia e deriva são fatores evolutivos muito influenciados pelos processos de fragmentação (GANDARA; KAGEYAMA 1998). Ao isolar espacialmente populações de árvores, a fragmentação impede a movimentação de dispersores, que em alguns casos se limitam a habitar apenas um fragmento e dessa forma restringe o fluxo gênico entre populações levando a ocorrência de altos níveis de endogamia (OUINSAVI et al. 2009; TELLES et al. 2001). Além da limitação do fluxo gênico o isolamento de populações pequenas pode levar a deriva genética. Em arbóreas um dos efeitos que ocorrem em decorrência da deriva genética é a presença de alelos exclusivos em cada população aumentando a diferenciação entre as populações (MARTINS et al. 2007).

1.5 Diversidade e estrutura populacional em *Caesalpinia echinata*

O pau-brasil uma árvore que ocorre em floresta ombrófila densa, como descrito anteriormente, foi intensamente explorada com a chegada dos

portugueses ao Brasil. Eles extraíam desta árvore um pigmento chamado brasilina para atender a indústria tintorial européia. Além disso, devido a sua madeira de alta qualidade, ele também foi utilizado para fabricação de móveis e para construção de navios. Nos últimos anos a sua madeira tem sido usada para fabricação de instrumentos musicais de alta qualidade, principalmente, na confecção de arcos de violino. Todas essas aplicações comerciais acarretaram uma grande redução populacional dessa espécie na Mata Atlântica (CARDOSO et al. 2001; CARVALHO, 1994).

Devido às reduções nas populações de pau-brasil, causadas por exploração desordenada da espécie e fragmentação de habitat, poucas populações naturais protegidas são encontradas. Isso dificulta que elas possam ser preservadas, sendo importante obter informações sobre a diversidade genética e estrutura populacional. Os parâmetros de diversidade genética revelam que algumas populações *ex situ* geralmente apresentam menor heterozigosidade que as populações naturais. No estudo de três populações de pau-brasil, duas naturais (conservada *in situ*) e uma em área de reflorestamento (*ex situ*), verificou-se que a população *ex situ* apresentou menor heterozigosidade observada, apesar de essa população ter sido formada com sementes provenientes de uma das populações naturais que revelou alto índice de H_o no presente estudo. Portanto, houve falta de representatividade da variabilidade genética nas coletas de sementes para o reflorestamento. Esse resultado comprovou a necessidade de enriquecimento da referida área reflorestada (OLIVEIRA et al. 2006).

Além de quantificar a diversidade, é necessário demonstrar como ela se encontra distribuída entre as diferentes populações, de modo a orientar decisões de manejo. O número médio de alelos por loco foi alto nas três populações de pau-brasil analisadas por Oliveira et al. (2006). No entanto, quando foram estimadas as estatísticas F de Wright, notou-se que parte da diversidade genética encontra-se dentro das populações, porém existe grande variação entre as populações. Todos esses dados são importantes, pois indicam populações propícias para coleta de sementes e assim possibilitam a formação de mudas com representatividade genética para reflorestamento (OLIVEIRA et al. 2006), bem como enriquecer áreas

reflorestadas, parques ou jardins, coleções de trabalho ou áreas de conservação *ex situ*.

Para espécies florestais a conservação *ex situ* é uma forma de preservação bastante adequada, principalmente para espécies nas quais as populações naturais estão comprometidas. Ela consiste na manutenção e proteção de material fora da área de ocorrência da população genitora (KAGEYAMA 1987). Na análise de estrutura e diversidade genética de duas gerações de uma população *ex situ* de pau-brasil, foram detectados altos valores nas gerações de adultos e progênies, para número de alelos por loco (média de 2,00 a 2,27), diversidade gênica (H_e 0,298 a 0,321), e heterozigosidade observada (H_o 0,248 a 0,291). Essa alta variabilidade genética é esperada para espécies com ampla distribuição geográfica. No entanto, todos esses dados foram maiores nas progênies do que nos adultos, provavelmente devido à ocorrência de alelos raros que podem ser ocasionados por mutações nas progênies (NETO, et al. 2005).

Com relação a populações naturais de pau-brasil o reflexo da formação de áreas isoladas de Mata Atlântica foi demonstrado nos resultados obtidos na análise de diversidade genética de sete populações naturais de pau-brasil, através do marcador genético AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). A análise da diversidade genética entre as populações mostrou a ocorrência de diferenciação genética, fortemente corroborada pelas análises filogenéticas de Neighbour-joining e distância geográfica. Então elevados níveis de isolamento genético por distância foi demonstrado, sendo que mais da metade da variação genética foi distribuída entre regiões (51,67%, $p < 0,001$). Trabalhos como esse realizado nas principais regiões onde a espécie é encontrada, fornecem um conhecimento básico para planos de conservação da espécie estudada e para outras espécies semelhantes (CARDOSO, et al. 2004).

Além da verificação de diversidade e estrutura genética de populações naturais em gerações atuais, a investigação de mudanças genéticas ao longo das gerações são de grande importância para subsidiar trabalhos e fornecer conhecimento sobre os níveis de manutenção da variabilidade genética atuais. Isso foi constatado na comparação da diversidade genética entre gerações de adultos e regenerantes de pau-brasil, utilizando marcadores

SSR. Com base nesses marcadores, Melo (2007) constatou um maior número de heterozigotos nos adultos ($H_o=0,53$) do que nos jovens ($H_o=0,37$), demonstrando que na geração de adultos ocorria uma seleção a favor de heterozigotos (S.C.O. Melo, comunicação pessoal, dissertação de mestrado).

CAPÍTULO 1

Diversidade genética de *Caesalpinia echinata* em uma população natural e um arboreto

Eullaysa Nascimento Sabóia, Fernanda Amato Gaiotto, Ronan
Xavier Corrêa

(A ser submetido para publicação em Tree Genetics & Genome)

Resumo

O processo de fragmentação da Mata Atlântica vem sendo associado à perda de diversidade genética das espécies encontradas nessas regiões. No caso do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), a fragmentação foi agravada com a sua exploração comercial, levando-o à situação de espécie ameaçada de extinção. Desta forma, torna-se importante a caracterização da diversidade das populações remanescentes dessa espécie. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de uma população natural de pau-brasil e uma população *ex situ*, visando auxiliar em práticas de conservação e caracterizar novos *primers* para essa espécie. Dez pares de *primers* SSR foram utilizados para genotipar 38 indivíduos da população natural (Potiraguá, BA) e 58 do arboreto (UESC). Os locos apresentaram em média 8,0 alelos na população de Potiraguá e 10,4 no Arboreto. A diversidade gênica (H_e) foi igual nas duas

populações e revela alto índice de variabilidade ($H_e=0,61$). A heterozigosidade observada (H_o), inferior a H_e em ambas as populações ($H_o=0,52$ em Potiraguá e $H_o=0,59$ no arboreto UESC), evidencia diminuição de heterozigotos. O índice de Fixação (F) encontrado para o arboreto UESC foi um valor próximo de zero (0,03), o que pode ser explicado pela provável formação a partir de sementes de diferentes populações. A população natural de Potiraguá apresenta tendência a excesso de homozigotos, comprovado pelo índice de fixação positivo ($F= 0,15$). Quatro novos *primers* foram caracterizados para pau-brasil no presente trabalho. Dois foram obtidos por amplificação cruzada (SM21, SM25). Os outros dois foram de sequências microssatélites isoladas de DNA genômico de pau-brasil. As duas populações analisadas revelaram altos níveis de variabilidade genética, demonstrando que população natural de Potiraguá possui um grande potencial para conservação *in situ*. O Arboreto UESC devido a grande representatividade genética que possui é recomendado para aplicação em projetos de reflorestamento e conservação do pau-brasil.

Palavras-chave: Conservação *in situ*, pau-brasil, população *ex situ*, marcadores SSR, genética da conservação.

Introdução

Árvore símbolo do Brasil, *Caesalpinia echinata* Lam.(pau-brasil), foi intensamente explorada com chegada dos portugueses. Além disso, a Mata Atlântica seu habitat natural, vem sofrendo intenso processo de fragmentação. Atualmente as populações remanescentes de Pau-brasil se encontram em fragmentos florestais, ou reservas de Mata Atlântica (CARVALHO, 1994). Esses fatores levaram o pau-brasil a ser incluído na lista da União internacional para Conservação da Natureza, como espécie ameaçada de extinção (IUCN, 2013).

A fim de auxiliar na conservação dessa espécie que teve uma grande participação no desenvolvimento econômico do Brasil e que é um importante indicador do Domínio Mata Atlântica, trabalhos visam gerar conhecimento sobre os níveis de diversidade genética e estrutura populacional do Pau-brasil fornecem informações para estratégias de conservação dessa espécie, pois baixos níveis de diversidade genética e a distribuição desigual da mesma diminuem as chances das espécies suportarem mudanças ambientais (FRANKHAM, 2008).

Os níveis de diversidade genética das populações de espécies ameaçadas de extinção podem ser mensurados a partir da aplicação de ferramentas moleculares, como os microssatélites que são marcadores moleculares altamente informativos. No caso de Pau-brasil alguns trabalhos já avaliaram a diversidade e estrutura genética dessa espécie gerando informações relevantes sobre muitas populações, e apesar de uma diversidade razoável ser encontrada em populações de pau-brasil, há elevada diferenciação genética entre elas. Com isso um número maior de populações estudadas forneceria com mais precisão o nível de diversidade genética e estrutura atual dessa espécie (CARDOSO et al. 1998; CARDOSO et al. 2004).

A estratégia de conservação *in situ* é preferencialmente indicada para espécies florestais, pois esse modo de conservação permite que o equilíbrio entre a população e o ambiente seja mantido, e os processos evolutivos possam atuar em todo o ecossistema (KAGEYAMA, 1987). Populações que mantêm alta diversidade genética são ideais para conservação *in situ* devido

o intuito de preservar a maior quantidade de diversidade possível. No caso do pau-brasil sítios que conservam raras variedades morfológicas podem ser encontrados por exemplo em regiões de Mata Atlântica do sul da Bahia, as quais não possuem nenhum tipo de ação para preservação dessas áreas. Essas diferentes variantes encontradas podem ser um indicativo para o desenvolvimento de pesquisas que avaliem a possibilidade da conservação *in situ* dessas áreas (JUCHUM et al. 2008).

Uma alternativa para a conservação da variabilidade genética de espécies florestais ameaçadas é a manutenção de populações *ex situ*, a qual possibilita que a variabilidade genética de uma espécie seja conservada através da preservação de indivíduos que possuam a representatividade genética. No entanto a indicação de sementes ou mudas para projetos de reflorestamento deve ser feita com base no conhecimento dos parâmetros de diversidade genética, para isso é importante o estudo genético de populações *ex situ* antes de serem empregados em projetos de conservação. Com relação ao pau-brasil o emprego de marcadores genéticos em populações *ex situ* permitiu indicar populações que detinham níveis de diversidade gênica adequados para projetos de manejo e conservação e também definir que atitudes podem ser tomadas para aumentar ainda mais a variabilidade dessas populações (NETO et al. 2005; OLIVEIRA et al. 2006).

Diante desse contexto dois questionamentos foram abordados nesse trabalho: i) O nível de diversidade genética da população de Potiraguá assemelha-se aos de outras populações de pau-brasil? ii) As árvores do arboreto UESC poderiam ser consideradas um banco de germoplasma de Pau-brasil? A fim de responder essas perguntas o objetivo do atual trabalho foi avaliar a diversidade genética de uma população natural de pau-brasil e uma população *ex situ*, visando analisar relevância de conservação *in situ* e *ex situ* a partir desses materiais.

Material e métodos

2.1. Material vegetal

As coletas de amostras foliares de *C. echinata*, foram feitas na Bahia, em áreas de Mata Atlântica. As amostras da coleção *ex situ* foram coletadas no arboreto da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), já as amostras da população natural foram coletadas em fragmentos florestais próximos a cidade de Potiraguá.

O material foliar após coletado foi mantido em sílica gel até ser armazenado em freezer a -20°C no Laboratório marcadores moleculares no Centro de Biotecnologia e Genética (CBG) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

2.2 *Primers* microssatélites

Dos dez *primers* microssatélites utilizados, seis foram desenvolvidos por MELO et al. (2007) (CE9, CE11, CE14, CE18, CE25, CE26), dois foram resultados de transferibilidade, sendo inicialmente desenvolvidos para *S. multijuga* (J.S. Amorim, comunicação pessoal, dissertação de mestrado) (SM21, SM25) e transferidos para *C. echinata* (ver capítulo 2 do presente trabalho), e dois *primers* foram padronizados no presente trabalho (CE4, CE13) a partir de sequências fornecidas por Rosana Vianello Brondani.

2.3 Extração de DNA e amplificação via PCR-SSR

O DNA genômico total foi extraído do material foliar pelo método CTAB Doyle e Doyle (1990). e diluídas para a concentração de 10 ng/μL para realização da PCR. As amostras de DNA extraídas de folhas foram submetidas a reações de PCR contendo os dez pares de *primers* de regiões de microssatélites em *C. echinata* (MELO et al. 2007).

A mistura de 13 μL para a realização da reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando *primers* de *C. echinata* foi composta por 30 ng de DNA genômico, 2,5 mM de dNTP, 25mM de MgCl₂, tampão 10X

(FERMENTAS), 2 μM de cada *primer reverse* e *forward* com cauda M13, 0,2 μM de primer M13 marcado com fluorescência NEDTM, 6-FAMTM, PET[®] ou VIC[®] a 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Fermentas). As amplificações foram realizadas em termociclador LifePro da BioEr programado para: 94 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, temperatura de anelamento específica para cada par de “primer” (TABELA 1 e TABELA 2) por 1 min, 8 ciclos de 94 °C por 1 min, 53 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, terminando com 7 min a 72 °C.

O produto da PCR foi verificado no analisador genético ABI3500 (Applied Biosystems) com marcador GS500LIZ. O tamanho dos alelos foi definido pelo GeneMarker[®] (FIGURA 1).

2.3 Análise estatística

Os parâmetros de diversidade genética intra-populacional foram estimados com uso do programa GDA versão 1.0 (LEWIS; ZAYKIN, 2002): número médio de alelos por loco (A); diversidade gênica (H_e); heterozigosidade observada (H_o) e; Índice de Fixação (F).

Sendo que a diversidade gênica esperada ou heterozigosidade esperada (H_e) para cada loco pode ser calculada segundo Nei (1987) de acordo coma seguinte fórmula:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

Resultados

A faixa de alelos amplificados com os *primers* microssatélites específicos de pau-brasil foi compatível com o esperado para cada primer (TABELA 1), levando em consideração uma faixa de tamanho de 19 Pb a mais devido o tamanho adicional da cauda M13. Da mesma forma, a riqueza de alelos amplificados no presente trabalho é similar aquela encontrada previamente no desenvolvimento dos *primers* por Melo et al. (2007).

Quatro novos *primers* foram caracterizados para pau-brasil no presente trabalho (FIGURA 1, TABELA 2). Dentre estes, dois foram obtidos por amplificação cruzada com *primers* de *S. multijuga* (J.S. Amorim, comunicação pessoal, dissertação de mestrado) (SM21, SM25). Os outros dois foram de sequências microssatélites isoladas de DNA genômico de pau-brasil em trabalhos previos (MELO, 2006).

Tabela 1. Temperatura de amplificação (Ta) e amplitude alélica de *primers* SSR em diferentes populações de *Caesalpinia echinata*

| <i>Primer</i> * | Arboreto UESC e Potiraguá* | | Serra do Teimoso** | |
|-----------------|----------------------------|--------------|--------------------|-----------|
| | Ta | Amplitude | Ta | Amplitude |
| CE 09 | 56 °C | 120 – 200 pb | 59 | 140-160 |
| CE 11 | 56 °C | 100 - 200 pb | 59 | 100-140 |
| CE 14 | 57 °C | 140 – 180 pb | 59 | 120-200 |
| CE 18 | 52 °C | 130 – 200 pb | 59 | 178-200 |
| CE 25 | 59 °C | 160 – 200 pb | 59 | 170-200 |
| CE 26 | 60°C | 170 – 210 pb | 63 | 170-190 |

Fonte: *Dados do presente trabalho. **Dados de Melo et al 2007.

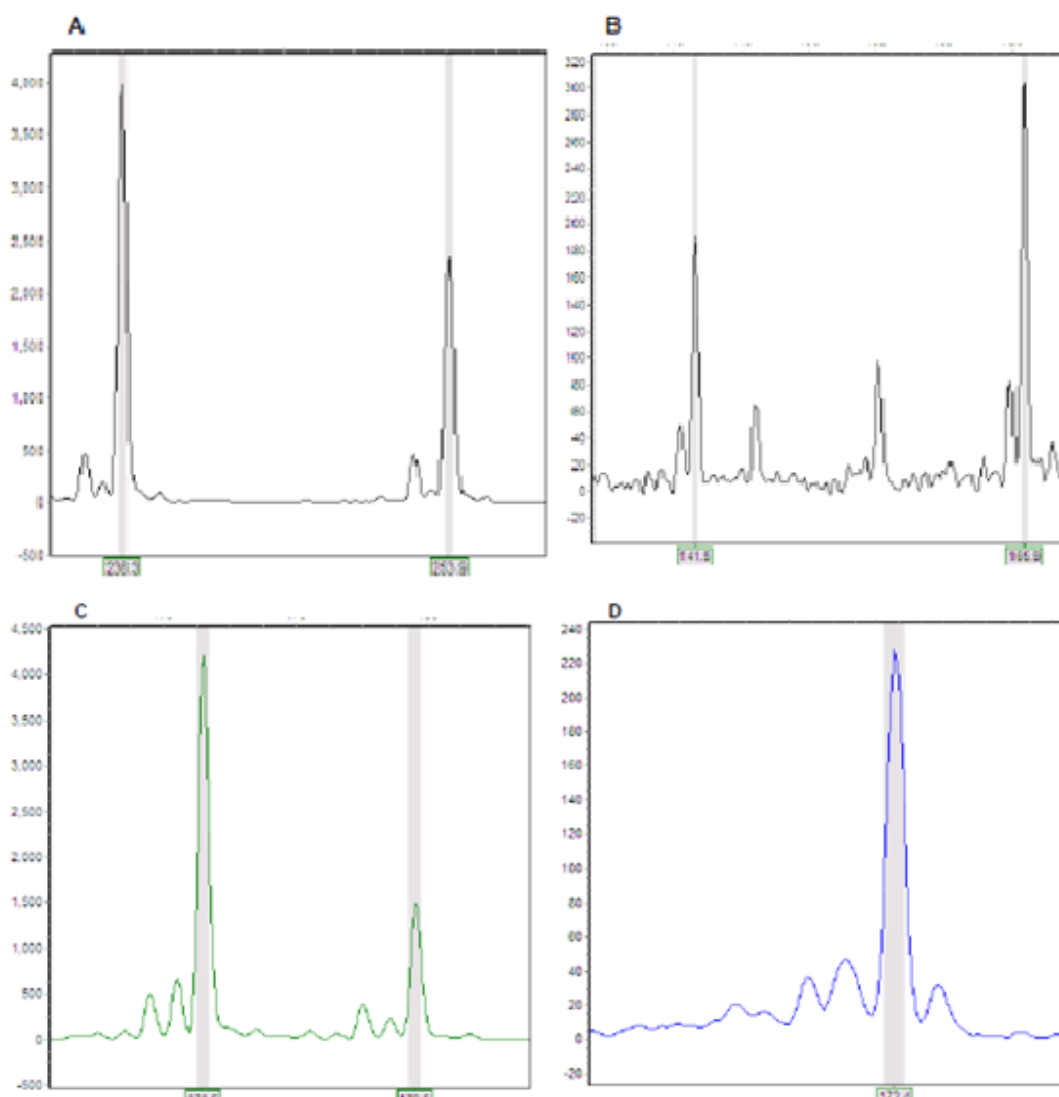


Figura 1. Picos correspondentes aos alelos detectados em genotipagem semiautomática dos locos SM21(A)-CE4(B)-SM25(C)-CE13(D).

Tabela 2. Caracterização de locos microssatélites para *Caesalpinia echinata*, quanto às estimativas do número de alelos por loco (A), estimativas da diversidade gênica (H_e) e heterozigosidade observada (H_o)

| Loco | Sequência (5'-3') | Ta °C | Alelos (pb) | Potiraguá | | | Arboreto | | |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------|-----------|------|------|----------|------|-------|
| | | | | A | He | Ho | A | He | Ho |
| CE 04 | TggAgACTTAgggAAggC CCAgCTTCCAAGTgAgTg | 54 | 100-150 | 11 | 0,73 | 0,61 | 12 | 0,75 | 0,62 |
| CE 13 | CTAggAAgAgACgAAgACC TCTTTCTCAgTCgCTCAC | 52 | 170-220 | 7 | 0,70 | 0,81 | 9 | 0,68 | 0,92 |
| SM 21 | TCAG ₍₃₎ CT ₍₂₎ GGA ₍₂₎ T ₍₆₎ CTACAGCCAACCCACCTAA | 49 | 210-270 | 10 | 0,71 | 0,44 | 20 | 0,76 | 0,67 |
| SM 25 | TCCTAGCCCTTCTTGGGATT CCGAGATGGACGCTATACCT | 55-49 | 150-240 | 10 | 0,38 | 0,34 | 12 | 0,25 | 0,081 |
| Media | | | | 9,5 | 0,63 | 0,55 | 13,25 | 0,61 | 0,57 |

A média do número de alelo por loco (A) foi ligeiramente menor na população natural (Potiraguá) do que na *ex situ* (Arboreto UESC) (TABELA 3). Os 10 locos analisados foram eficientes para fazer a análise descritiva das populações de pau-brasil, com variação da temperatura de anelamento de 49°C a 62°C, e com o tamanho dos fragmentos variando de 100 pb a 280 pb. Todos os locos foram polimórficos, com uma média do número de alelos por loco (A) alta, sendo de 10,4 para o Arboreto UESC e 8,0 para a população Potiraguá, os locos menos variáveis foram os locos amplificados pelos *primers* SM25 e CE11, e os mais variáveis foram os locos amplificados pelos *primers* SM21 e CE18 respectivamente.

As estimativas de diversidade gênica mostram tendências semelhantes entre as duas populações analisadas (TABELA 3). O valor de heterozigosidade esperada (H_e) para as duas populações foi de 0,61, demonstrando um alto índice de variabilidade gênica. Já os valores de heterozigosidade observada (H_o) foram menores, constando de 0,59 para o arboreto UESC e 0,52 para a população de Potiraguá. As diferenças encontradas entre H_e e H_o para as duas populações indicam um excesso de homozigotos.

O índice defixação (F) estimado foi contrastante entre as duas populações, sendo que para o arboreto UESC foi encontrado um valor próximo de zero (0,03), já para população Potiraguá foi estimado um maior valor ($f = 0,15$). O valor de F encontrado para a população Potiraguá indica a ocorrência de endogamia. O loco mais maior índice de fixação na população natural foi o loco amplificado pelo *primer* CE14 com F de 0,4, no entanto os locos amplificados pelos *primer* CE 25 e CE26 apresentaram F negativo.

Tabela 3. Estimativas dos parâmetros de diversidade genética para amostras de *Caesalpinia echinata* da população natural de Potiraguá e do arboreto da UESC. Número de alelos por loco (A), estimativas da diversidade gênica (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e coeficiente de endogamia(f).

| <i>Amostras</i> | <i>n</i> | <i>n'</i> | <i>A</i> | H_e | H_o | <i>f</i> |
|-----------------|----------|-----------|----------|-------|-------|----------|
| Potiraguá | 38 | 33,6 | 8,0 | 0,615 | 0,520 | 0,156 |
| Arboreto UESC | 58 | 53,5 | 10,4 | 0,611 | 0,590 | 0,034 |
| Média | 48 | 43,5 | 9,1 | 0,613 | 0,555 | 0,095 |

n = número total de indivíduos genotipados.

n' = número de indivíduos, excluindo-se os dados perdidos.

Discussão

SM21 apresentou uma quantidade de alelos extremamente alta (21 alelos) nas plantas do arboreto da UESC examinadas no presente trabalho, tal como os *primers* CE02 e CE07 (18 e 23, respectivamente) em duas populações naturais (MELO et al. 2007). Dessa forma, verifica-se que tanto os *primers* transferidos de *S. multijuga* como aqueles desenvolvidos a partir de bibliotecas de pau-brasil apresentaram número de alelos semelhante. A similaridade entre a grande quantidade de alelos encontrada em espécies de *Caesalpinia* tanto em locos amplificados com *primers* de *C. echinata* como em locos amplicados por *primers* de *S. multijuga* aponta que as sequencias que flanqueiam esses locos encontram-se altamente conservadas entre gêneros, diminuindo a chances de mutação nos sítios de anelamento dos primers, com isso uma maior quantidade de alelos podem ser amplificados (YASODHA et al. 2005).

A diversidade alélica encontrada nos dez locos microssatélites no presente estudo, apontou a eficiência dos mesmos para detecção de polimorfismo, de modo que um total de 104 e 80 alelos (Arboreto UESC e Potiraguá, respectivamente) foram encontrados. Além disso uma elevada média do número de alelos por loco (A) revelou um alto número de alelos por loco nessas populações (TABELA 3). Semelhante a *C. echinata* outros trabalhos com espécies arbóreas em perigo de extinção também indicaram alta diversidade alélica (GONELA et al. 2013; LIU et al. 2012; TARAZI et al. 2013). Além disso, a média do número de alelos por loco igual a 8,0 encontrada para a população de Potiraguá foi semelhante a encontrada em outras duas populações naturais de pau-brasil (ESPAB, S. Teimoso), as quais tiveram uma média de 7,45 alelos por loco (S.C.O. Melo, comunicação pessoal, dissertação de mestrado). Esses dados demonstram que mesmo espécies estando em risco de extinção ainda podem conter altos níveis de variabilidade genética. Isso poderia ser explicado por ser este estudo realizados com árvores adultas, ainda não refletindo as perdas de alelos devido a fragmentação. Isso é valido para especies longevas.

Embora os valores de diversidade (A , H_e , H_o) tenham revelado elevada diversidade na população natural (Potiraguá), essa região encontra-se com um nítido processo de exploração, sendo possível observar queimadas e derrubada de árvores. Como consequência, o número de indivíduos de pau-brasil encontrado é muito baixo para que essa diversidade seja mantida por várias gerações. Por outro lado, trata-se de um sítio que os variantes morfológicas foliares encontram-se em simpatria, representando uma condição especial. Assim, ações como a proteção e limitação para preservação dessa área deve favorecer o aumento populacional.

O valor de diversidade gênica ($H_e = 0,61$) encontrado na população de Potiraguá demonstra uma alta variabilidade genética para essa população, entretanto esperava-se um valor menor devido a intensa exploração da área, a ocorrência de queimadas e desmatamento. Outras arbóreas que também se encontram em estado de conservação vulnerável apresentaram similarmente altos níveis de diversidade gênica, uma justificativa consiste no fato da fragmentação ser um evento recente comparado com o ciclo de vida das árvores, sendo dessa forma difícil detectar o total impacto desse evento nas espécies adultas (COLLEVATTI et al. 2001; SOUZA et al. 2012). Contudo a heterosigosidade observada na população de Potiraguá foi menor ($H_o = 0,52$) do que a H_e , mesmo a diferença entre os valores de H_e e H_o sendo baixa, ela indica uma deficiência na quantidade de indivíduos heterozigotos. Esse contraste entre alto nível de diversidade gênica e presença de endogamia também foi encontrado por Defavari et al. (2009) ao analisar a diversidade genética de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne, uma árvore Leguminosa.

Novamente fazendo um comparativo, pode-se observar semelhança nos valores de heterozigosidade entre as duas populações naturais de pau-brasil da ESPAB e S. Teimoso, com a população de Potiraguá, no qual a população da ESPAB demonstrou um H_e de 0,59 e H_o de 0,24 e a população de S. Teimoso um H_e de 0,63 e H_o de 0,53, com isso é perceptível a existência de alta variabilidade gênica nas populações de pau-brasil, mas com uma aumento de homozigotos. Fazendo uma relação entre o índice de fixação (F), positivo encontrado para a população de Potiraguá ($F = 0,15$) com o coeficiente de endogamia (f) das outras duas populações de pau-brasil

(ESPAB $f=0,59$, S.Teimoso $f= 0,15$) pode-se dizer que embora esses dois parâmetros sejam aplicados em diferentes situações os dois avaliam os níveis de heteroziguidade e os seus resultados para essas populações corroboram com o fato de que há um aumento de homozigotos vistos nos valores de heteroziguidade (S.C.O. Melo, comunicação pessoal, dissertação de mestrado). Além da endogamia outros fatores também podem estar relacionados com aumento de homozigotos, como presença de alelos nulos ou a seleção contra indivíduos heterozigotos.

Das três populações citadas a única que não se restringe a um pequeno fragmento é a população da ESPAB, no entanto pode-se observar que ela possui os maiores níveis de endogamia, menor diversidade gênica e menor heteroziguidade observada. Esse fato, também constatado no estudo anterior (S.C.O. Melo, comunicação pessoal, dissertação de mestrado), pode ser explicado devido a processos históricos em que no período da glaciação, as regiões onde o pau-brasil era encontrado eram secas e isso deu condições para que a espécie se distribuisse amplamente, entretanto com o fim da época seca e com o surgimento das florestas úmidas o pau-brasil ficou restrito a regiões mais secas, formando populações isoladas as quais a variabilidade genética é variável, de acordo com possíveis eventos como o efeito fundador, não sendo a variabilidade genética dependente de efeitos antrópicos (CUNHA; LIMA, 1992).

A comparação entre os parâmetros de diversidade genética da população de Potiraguá e do Arboreto UESC, demonstram valores muito semelhantes, entretanto a população de Potiraguá revela uma tendência a diminuição de heterozigotos, diferente do Arboreto UESC em que o coeficiente de endogamia se aproxima de zero ($f=0,03$) (TABELA 3). A diferença no coeficiente de endogamia das duas populações está relacionada ao fato de que os indivíduos do Arboreto UESC são originados de distintas populações, permitindo inferir que um grande número deles não sejam resultados de cruzamentos entre indivíduos aparentados. Além disso, a insignificante endogamia é uma evidência de que a constituição de Arboreto UESC é originado de sementes provenientes de diferentes populações que resultou também na alta variabilidade gênica encontrada. Esses fatos apontam potencial de aplicação dessa coleção *ex situ* em projetos de

reflorestamento e conservação de pau-brasil, devido à representatividade genética dessa coleção.

Outro estudo com pau-brasil realizado por Neto et al. (2005) comparou a diversidade genética entre duas gerações de uma população *ex situ* (adultas x progênies) e detectou maiores níveis de variabilidade genética nas progênies do que nos adultos. Ele explica que esse aumento de variabilidade genética de uma geração para outra pode ser devido ao delineamento experimental. Outra justificativa pode ter sido a seleção contra indivíduos homocigotos. Diferente dos resultados encontrados por Neto et al. (2005), Oliveira et al. (2006) detectaram um baixo nível de H_o na população *ex situ* de pau-brasil, entretanto a H_o da população natural a qual deu origem a população *ex situ* foi alto. Esse fato demonstra que, embora tenha tido disponibilidade de variabilidade genética, houve falhas na coleta de sementes para formação da coleção *ex situ*. Da mesma forma, o Arboreto UESC, antes do ano 2000, ao ser avaliado por marcador molecular RAPD, demonstrou que possuía uma baixa diversidade genética pelo fato de ter sido formado de poucas matrizes. Porém o número de árvores provenientes de diferentes localidades foram aumentadas e 13 anos depois o atual trabalho demonstra ótimos níveis de diversidade genética (Corrêa e Gaiotto, 2009). Esses trabalhos demonstram que para a formação de populações *ex situ* que detenham grande diversidade genética é importante que as sementes sejam advindas de diferentes localidades e que haja estudos moleculares para que delineamento favorável a manutenção da diversidade genética seja adotado.

Conclusões

A população natural de Potiraguá apresenta alto índice de diversidade genética e é útil para conservação *in situ*.

O Arboreto da UESC possui alto nível de diversidade gênica e pode ser recomendado para aplicação em projetos de reflorestamento e conservação de pau-brasil.

Referências

CARDOSO, M.A.; PROVAN, J.; POWELL, W.; FERREIRA, P.C.G.; OLIVEIRA, D.E. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Molecular Ecology**, v. 7, p. 601-608, 1998.

CARDOSO, S.R.S; PROVAN,J.; LIRA, C. F, PEREIRA L. O. R.; FERREIRA P. C. G.; M. A. CARDOSO. High levels of genetic structuring as a result of population fragmentation in the tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. **Biodiversity and Conservation**, p. 1–11, 2004.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo: EMBRAPA-CNPQ, p.116-117, 1994.

COLLEVATTI, R. G., GRATTAPAGLIA, D., HAY, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**. v. 10, p. 349–356, 2001.

CORRÊA, R.X; GAIOTTO, F.A.; **Princípios genéticos para o manejo e a conservação de espécies arbóreas.** Capítulo 3. **Nossas árvores. Conservação, uso e manejo de árvores nativas do sul da Bahia.** Editus,. P. 269, 2009.

CUNHA, M.; LIMA, H.C. **Viagem à Terra do Pau Brasil**. 1 ed. Rio de Janeiro: Agência Brasileira de Cultura, 1992.

DEFAVARI, G.R. TARAZI, R. MORENO, M.A. FERRAZ, E.M. GANDARA, F.B. Kageyama, P.Y. Estrutura genética espacial intrapopulacional de *Hymenaea sigonocarpa* Mar. Ex Hayne nea Estação Ecológica de Itirapina, SP. **Scientia Forestalis (Brazil)**.v.37, n. 81, p. 89-98, 2009.

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

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D. ; BRISCOE, D. A. **Fundamentos da genética da Conservação**. Editora da Sociedade Brasileira de genética, p.13-20 2008.

GONELA A., SEBBENN A.M., SORIANI H.H., MESTRINER M.A., MARTINEZ C.A. E ALZATE-MARIN A.L., Genetic diversity and mating system of *Copaifera langsdorffii* (Leguminosae/Caesalpinioideae). **Genetics and Molecular Research** .v. 12 ,n. 1, p. 569-580, 2013.

IUCN, 2012. Red List of Threatened species. Disponível em: <http://www.iuncredlist.org>. Cited on February 07 2012.

JUCHUM, F. S., M. A. COSTA.; AMORIM, A. M.; CORRÊA, R. X.; Phylogenetic relationships among morphotypes of *Caesalpinia echinata* Lam. (Caesalpinioideae: Leguminosae) evidenced by *trnL* intron sequences. **Naturwissenschaften**, v. 95, p. 1085–1091, 2008.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data. GDA Version 1.0** (d15), 2002.

LIU, J.; ZHENG, X; POTTER, D; HU, C; TENG, Y. Genetic diversity and population structure of *Pyrus calleryana* (Rosaceae) in Zhejiang province, China. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 69–78, 2012.

MELO, S.C. O., GAIOTTO, F. A., CUPERTINO, F. B., CORRÊA, R. X., REIS, A. M. M., GRATTAPAGLIA D., BRONDAN, I R. P.V. Microsatellite markers for *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), a tree that named a country. **Conservation Genetic** .v. 8, p. 1269–127, 2007.

MELO, S.C.O.; **Diversidade, estrutura genética e estimativa de fluxo gênico de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) por meio de marcadores microssatélites** 2005. Dissertação (Mestrado em Genética e biologia molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2005.

NETO, J.D.G; SEBBEN, A.M; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade genética de uma população “ex situ” de *Caesalpinia echinata* Lam. **Scientia Forestalis**. n. 69, p.125-133, 2005.

OLIVEIRA E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVCKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 2, n. 39, p. 294-307, 2006.

SOUZA, H. A. V., COLLEVATTI, R. G., LEMOS-FILHO, J.P., SANTOS F.R., LOVATO, M. B. Development of microsatellite markers for *Dimorphandra mollis* (leguminosae), a widespread tree from the brazilian CERRADO. **American Journal of Botany**, p. 102–104, 2012.

TARAZI, R; SEBBEN, A. M; KAGEYAMA, P. Y ; VENCOVSKY, R. Edge effects enhance selfing and seed harvesting efforts in the insect-pollinated Neotropical tree *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). **Heredity**, p. 1–8, 2013.

YASODHA, R.; HOSH, M. G.; SUMATHI, R.; GURUMURTHY, K. Cross-species amplification of eucalyptus SSRmarkers in Casuarinaceae. **Acta. Bot. Croat.** v. 64, p. 115–120, 2005.

CAPÍTULO 2

Amplificação cruzada de espécies de *Caesalpinia* com marcadores SSR de *Senna multijuga* e *Caesalpinia echinata*

Eullaysa Nascimento Sabóia, Fernanda Amato Gaiotto, Ronan Xavier Corrêa

Resumo

No Brasil muitas espécies de *Caesalpinia* L. s.l. são encontradas em ecossistemas com alto nível de fragmentação. Dentre as espécies desse gênero, apenas *Caesalpinia echinata* Lam. possui marcadores microssatélites disponíveis. Apesar de os microssatélites serem uma das ferramentas moleculares mais utilizadas nos estudos de populações, o desenvolvimento de *primers* ainda representa alto custo, restringindo o número de espécies para os quais eles estão disponíveis. Dessa forma, a amplificação cruzada de diferentes espécies com SSR de espécie filogeneticamente próxima é uma alternativa para aumentar a quantidade de espécies com marcadores SSR disponíveis. Assim, objetivou-se testar a amplificação cruzada de diferentes espécies de *Caesalpinia*, utilizando-se marcadores SSR de *Senna multijuga* (Rich.) H.S.Irwin & Barneby e *C. echinata*. Amostras de DNA de cinco plantas de cada uma de 12 espécies de *Caesalpinia* foram amplificadas com 10 *primers* SSR de *S. multijuga* e 5 de *C. echinata*. As amplificações foram visualizadas em gel de agarose 2% e poliacrilamida 6%. Um total de sete *primers* foi transferido, dos quais pelo

menos cinco espécies tiveram cinco *primers* transferidos. Todos os locos amplificados na transferência apresentaram padrões de amplificação típicos de microssatélites, devendo ser caracterizados em amostras populacionais. Assim, os *primers* que amplificam locos informativos poderão ser utilizados em estudos populacionais das espécies analisadas.

Palavras-chave: *Transferibilidade, Leguminosae, microssatélites, marcador molecular, Caatinga, Mata Atlântica.*

Introdução

O gênero *Caesalpinia* L s.l. é formado por um grande número de espécies (cerca de 140), é caracterizado por uma grande plasticidade morfológica (GASSON et al. 2009; JUCHUM et al. 2008). No Brasil uma grande quantidade de espécies desse gênero pode ser encontrada em domínios com alto nível de exploração, e em processo de fragmentação, como a Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga. No entanto existem poucas informações sobre a genética dessas espécies.

A avaliação da diversidade genética populacional possibilita inferir sobre o impacto ambiental, notadamente aquele que acarreta redução populacional de espécies. Entretanto, em todo o gênero *Caesalpinia*, apenas *Caesalpinia echinata* Lam. possui marcadores microssatélites (SSR) disponíveis, que propiciam a investigação da diversidade genética dessa espécie e a geração de informações que auxiliam na tomada de decisões para conservação da mesma (MELO et al. 2007). Dentre as ferramentas moleculares, os SSR são codominantes, e por isso são amplamente usados em estudos de populações. Porém o alto custo e o desprendimento de tempo necessário para o desenvolvimento dos *primers* para cada espécie dificultam na utilização desse marcador (GUPTA; VARSHNEY, 2000).

Contudo as regiões que flanqueiam os microssatélites geralmente mantêm-se conservadas entre espécies próximas filogeneticamente. Como os *primers* SSR anelam nessas regiões flangeadoras para a amplificação da

região alvo, então a amplificação cruzada de diferentes espécies com *primers* desenvolvidos para uma delas torna-se possível, minimizando o custo e permitindo que um maior número de espécies possam ser estudadas (BOWCOCK et al. 1994). Dessa forma, o presente estudo objetivou testar a amplificação cruzada em diferentes espécies de *Caesalpinia*, utilizando *primers* SSR de *C. echinata* e *Senna multijuga* (Rich.) H.S.Irwin & Barneby, visando disponibilizar ferramentas para estudos das espécies de *Caesalpinia* nativas do Brasil.

Material e Métodos

Amostras foliares de 12 espécies de *Caesalpinia* foram coletadas em diferentes municípios da Bahia, incluindo-se ecossistemas dos domínios Mata Atlântica e Caatinga (TABELA 1). Para o *C. echinata* e *C. microphylla*, foram amostradas algumas variantes morfológicas foliares. Essas amostras foram mantidas nos dias de coleta em sílica gel e, posteriormente, armazenadas em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA. A nomenclatura disponível no IPNI (*international plant name index*) foi adotada para referir-se às espécies, mesmo para aquelas que foram recentemente realocadas em distintos gêneros.

2.2 Extração de DNA e amplificação via PCR-SSR

O DNA genômico total foi extraído do material foliar pelo método CTAB Doyle e Doyle (1990) e diluídas para a concentração de 10 ng/μL para realização da PCR. Cinco pares de *primers* de regiões microssatélites de *C. echinata* (MELO et al., 2007), e 10 pares de *primers* microssatélites de *S. multijuga* (AMORIM, J.S. 2012, comunicação pessoal dissertação de mestrado) foram utilizados nas amplificações cruzadas.

A mistura de 13 μL para a realização da reação de polimerização em cadeia (PCR), utilizando *primers* de *C. echinata*, foi composta por 30 ng de DNA genômico, 2,5 mM de dNTP, 25mM de MgCl₂, tampão 10X (FERMENTAS), 2 μM de cada *primer reverse* e *forward* e uma unidade de

Taq DNA polimerase (Fermentas). Amostra de DNA de *C. echinata* (10 ng/ μ L) foi utilizada como controle nas reações PCR dos 10 *primers*.

Tabela 1. Relação de espécies de *Caesalpinia s.l.*, localidade de coleta no Estado da Bahia com identificação de ecossistema ou domínio (F = Floresta ombrofila; R = Restinga; C = Caatinga) e número de plantas amostradas (n).

| Nome da espécie* | Local de coleta | n |
|----------------------------------------|------------------|----|
| <i>Caesalpinia echinata</i> Lam SV | Potiraguá (F) | 6 |
| <i>C. echinata</i> MV | Potiraguá (F) | 3 |
| <i>C. echinata</i> LV | Potiraguá (F) | 7 |
| <i>Caesalpinia bracteosa</i> Tul. | Brejinhos (C) | 5 |
| <i>Caesalpinia calycina</i> Benth. | Brumado (C) | 5 |
| <i>Caesalpinia ferrea</i> Benth. | UEFS (C) | 5 |
| | UESC (F) | |
| <i>Caesalpinia laxiflora</i> Tul. | B.J. da Lapa (C) | 5 |
| <i>Caesalpinia microphylla</i> Mart. | Xique-Xique (C) | 5 |
| <i>C. microphylla cf intermediária</i> | Xique-Xique (C) | 5 |
| <i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul. | B.J. da Lapa (C) | 5 |
| <i>Caesalpinia gardneriana</i> Benth. | Camaçari (R) | |
| <i>Caesalpinia pluviosa</i> DC. | Ibotirama (C) | 5 |
| | UESC (F) | |
| <i>Caesalpinia pulcherrima</i> Sw. | UESC (F) | 5 |
| <i>Caesalpinia sp cf sulcata</i> | Xique-Xique (C) | 5 |
| <i>Caesalpinia sp cf simpátrica</i> | Ibotirama (C) | |
| <i>Caesalpinia sp cf sulcata</i> | Ibotirama (C) | 5 |
| Total | | 76 |

*SV, MV e LV correspondem às variedades de pau-brasil de folhas pequenas, médias e grandes, respectivamente (Juchum et al., 2008). Sulcata e simpátrica referem-se a características da planta coletada.

Para as PCR utilizando *primers* de *S. multijuga* uma mistura de reação semelhante àquela utilizada para os *primers* de *C. echinata*, sendo que o controle experimental, constitui-se de 7,5 ng de *S. multijuga*. As amplificações com ambos os lotes de *primers* foram realizadas em termociclador programado para: 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, temperatura de anelamento de cada primer e 72°C por 1 min. Posteriormente, um passo final de 72 °C por 5 min foi realizado. Os produtos PCR foram separados em

gel de agarose 1,5%, apenas para confirmação das ampliações, e poliacrilamida 6% para a genotipagem dos indivíduos.

As ampliações foram realizadas em termociclador programado para: 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, temperatura de anelamento específica para cada par de *primer* (TABELA 2) por um minuto, 72 °C por 1 minuto, terminando com 7 minutos a 72 °C.

2.3 Análises estatísticas

Os fragmentos visualizados em gel de poliacrilamida 6% tiveram os seus tamanhos comparados com o marcador de peso molecular, *ladder* 10 pb (Invitrogen). Bandas do *ladder* e os fragmentos tiveram as suas alturas medidas, com uma régua milimetrada, do local de aplicação até a banda. Os dados obtidos com essa comparação da quantidade de pares de base com a distância em cm no gel foram analisados por regressão linear, estimando-se os tamanhos dos fragmentos com base na regressão. Neste procedimento, a coincidência entre os valores estimados na regressão e aqueles medidos com a régua foram sempre menores que 5% (menor estresse).

Resultados

As amostras de DNA apresentaram qualidade satisfatória para realização do trabalho, no entanto houve variação na quantidade de DNA entre as espécies de *Caesalpinia*. As espécies com maior concentração de DNA foram *C. echinata* e *C. laxiflora* e as espécies que apresentaram maior dificuldade para obtenção de DNA foram *C. gardneriana*, *C. ferrea* e *C. microphylla*.

A amplificação cruzada com os 10 *primers* de *S. multijuga* ocorreu em uma taxa de 50%. Desses, os *primers* SM21 e SM22 apresentaram transferência para o maior número de espécies (SM21 para 11 espécies e SM22, dez). O *primer* que abrangeu uma menor quantidade de espécies foi o SM06 que ainda assim foi possível ser transferido para quatro espécies. Considerando os cinco *primers* transferidos a espécie com maior taxa de

transferência dos SSR de *S. multijuga* foi *C. echinata* com 100%, enquanto que a espécie com menor quantidade de *primers* transferidos foi *C. Calycina* com apenas 40%. O *primer* que amplificou um loco com maior variação no tamanho dos fragmentos foi o SM22, demonstrando a ocorrência de três tamanhos de fragmentos diferentes considerando todas as espécies em houve transferência.

Os resultados obtidos com os cinco pares de *primers* de *C. echinata* demonstraram uma taxa de transferência de 40%. O *primer* que foi transferido para um maior número de espécies foi o CE14 no qual obteve amplificação em 10 espécies. O CE9 foi transferido para apenas quatro espécies, no entanto foi o que revelou o maior grau de heteromorfismo, indicando a presença de até quatro fragmentos variados em *C. microphylla*. Apenas para *C. pyramidalis* não houve transferência de nenhum dos *primers* de *C. echinata*.

Um total de sete *primers* foram transferidos entre espécies, considerando-se os 15 *primers* testados, (TABELA 2). As temperaturas de anelamento dos *primers* com melhores resultados de amplificação foram específicas para os de *C. echinata* e *touchdown* para os de *S. multijuga*. A amplitude de tamanho dos alelos foi compatível com o esperado para os locos analisados.

Tabela 2. Relação de *primers*, temperatura de anelamento e amplitude dos fragmentos amplificados.

| <i>Primer</i> * | Temperatura de anelamento encontrada | Amplitude alélica esperada |
|-----------------|--------------------------------------|----------------------------|
| SM 06 | 58 °C a 48 °C | 236 - 288 pb |
| SM 08 | 58 °C a 48 °C | 159 - 187 pb |
| SM 21 | 57 °C a 47 °C | 146 - 204 pb |
| SM 22 | 57 °C a 47 °C | 236 - 258 pb |
| SM 25 | 57 °C a 47 °C | 253 - 267 pb |
| CE 09 | 57 °C | 178 - 200 pb |
| CE 14 | 57 °C | 220 - 250 pb |

* SM corresponde a *Senna multijuga* e CE a *Caesalpinia echinata*

** O *primers* de *S.multijuga* foram desenvolvidos por (AMORIM, J.S. 2012, comunicação pessoal dissertação de mestrado), e os de *C. echinata* por (MELO et al., 2007)

Os *primers* transferidos apresentaram perfil eletroforético típico de microssatélites e com polimorfismos entre os indivíduos. Para os sete locos foi possível observar heteromorfismos entre os cinco indivíduos analisados já que nenhum dos locos amplificados revelou menos de dois fragmentos de tamanhos diferentes.

Dentre as 12 espécies, pelo menos seis tiveram o mínimo de cinco primers transferidos. As espécies *C. pluviosa*, *C. microphylla* e *C. sp sulcata* apresentaram maior grau de transferência (seis primers), ao passo que *C. calycina* teve a menor transferência (apenas 3 primers) (TABELA 3).

Tabela 3. Amplificação cruzada de cinco amostras de DNA para cada uma das 12 espécies de *Caesalpinia*, com cinco primers SSR desenvolvidos para *Caesalpinia echinata* (CE) e 10 primers SSR de *Senna multijuga* (SM).

| Espécies\ | Primers SSR | | | | | | |
|------------------------|-------------|---------|---------|---------|---------|-----------------|---------|
| | SM06 | SM08 | SM21 | SM22 | SM25 | CE9 | CE14 |
| <i>C. echinata</i> | 253/267 | 169/180 | 180/170 | 240/250 | 273/263 | 160/150 | 150/160 |
| <i>C. calycina</i> | - | 169/180 | 180/170 | - | - | - | 150/160 |
| <i>C. laxiflora</i> | 253/267 | - | 180/170 | 240/250 | - | - | 150/160 |
| <i>C. pulcherrima</i> | - | 169/180 | 180/170 | 250/260 | - | - | 150/160 |
| <i>C. microphylla</i> | 253/267 | 169/180 | - | 240/250 | 273/263 | 160/150/ 130 | 150/160 |
| <i>C. bracteosa</i> | - | 169/180 | 180/170 | - | 273/263 | 140/116 | 150/160 |
| <i>C. pyramidalis</i> | 253/267 | - | 180/170 | 250/260 | 273/263 | - | - |
| <i>C. ferrea</i> | - | - | 180/170 | 250/260 | 273/263 | - | 150/160 |
| <i>C. pluviosa</i> | - | 169/180 | 180/170 | 250/260 | 273/263 | 140/116 | 150/160 |
| <i>C. gardneriana</i> | - | 169/180 | 180/170 | 250/260 | 273/263 | - | 150/160 |
| <i>C.sp simpátrica</i> | - | 169/180 | 180/170 | 250/260 | 273/263 | - | 150/160 |
| <i>C. sp sulcata</i> | - | 169/180 | 180/170 | 250/260 | 273/263 | 140/130 | 150/160 |

(-) = não amplificou banda típica de microssatélite.

Discussão

Nos estudos sobre espécies para as quais ainda não há marcadores moleculares especificamente desenvolvidos, têm-se utilizado de *primers*, inicialmente desenvolvidos para única espécie, para avaliar outras espécies

relacionadas, como também em espécies mais distantes. Esta técnica é conhecida como amplificação cruzada. Resultados positivos de amplificação cruzada podem ser encontrados no caso de plantas, tanto em espécies cultivadas como silvestres, visando estudos agrônômicos e ecológicos. Por exemplo, no trabalho de Mottura et al. (2005), todos os sete *primers* desenvolvidos para *Prosopis chilensis* Stuntz(Mol.) e *Prosopis flexuosa* D.C. foram transferidos para três espécies do mesmo gênero, possibilitando que essas espécies sejam estudadas com uso de marcadores SSR. Em centeio e triticale, houve transferência de 57% de SSR de trigo; 39% de SSR de arroz foram transferidos para triticale (KULEUNG et al. 2004).

No presente estudo foi possível a transferência de *primers* tanto de mesmo gênero como de gênero distinto para diferentes espécies de *Caesalpinia*. Em um total de 15 *primers* testados (10 de *S. multijuga* e cinco de *C. echinata*), obteve-se uma taxa de 46,6 % de transferibilidade, sendo que desses, 33,2 % foram de *S. multijuga* e 13,3% de *C. echinata*. Esse fato deve-se provavelmente a uma maior conservação das regiões que flanqueiam os locos amplificados pelos *primers* de *S. multijuga* em relação aos locos amplificados pelos *primers* de *C. echinata*. Costa et al. (2012) obtiveram também alta taxa de transferência entre gêneros (77,7%), quando testou a amplificação cruzada entre arbóreas de leguminosa (de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. para 12 espécies de oito diferentes gêneros dessa família). Estes trabalhos aproximam-se dos resultados de Mace et al. (2008), onde foi encontrada uma média de 60% de transferência entre seis gêneros de leguminosas, podendo observar que, em todos esses casos, a transferência entre gênero foi alta. Entretanto, Peakall et al. (1998) relata que a transferibilidade entre gêneros ocorre com menor sucesso, pois em seu trabalho utilizando *primers* de *Glycine max* houve apenas 13% de transferência entre gêneros, diante de 65% de transferência dentro do gênero *Glycine*. Portanto, as taxas de transferência devem refletir distintas proximidades filogenéticas entre os diferentes gêneros de leguminosas.

Os trabalhos com transferibilidade de *primers* apontam o amplo uso dos microssatélites, até mesmo em gêneros não relacionados, pois as sequências que desempenham funções semelhantes mantêm-se conservadas em uma grande variedade de espécies, assim como as

sequências que flanqueiam os SSR (GUPTA; VARSHNEY, 2000). A partir de sequenciamento dos fragmentos de 11 SSRs, Gutierrez et al. (2005) demonstraram que as regiões que flanqueiam os microssatélites mantêm-se conservadas em três espécies de leguminosas, enquanto que o nível de conservação das sequências dos microssatélites é baixo, explicando o sucesso na amplificação cruzada.

Similar aos trabalhos realizados com transferibilidade, todos os fragmentos gerados através de amplificação cruzada foram comparados com o controle, e apenas os amplicons que estavam próximos da faixa de tamanho esperado de acordo com a espécie original foram considerados, critério utilizado em diferentes trabalhos (LUETTMANN et al. 2010; MOTTURA, et al. 2005). Para 71% dos primers transferidos, a obtenção dos fragmentos de tamanho esperado foi gerada através do programa de PCR touchdown. Peakall et al. (1998), também utilizaram o touchdonw para a maioria dos primers utilizados em transferência, sendo que dos 31 primers transferidos entre leguminosas 20 foram obtidos com touchdonw.

A presença de stutters e a maior precisão no tamanho das bandas encontradas com a transferência confirmaram a natureza de bandas típicas de SSR, através da eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Os stutters em SSR são frequentes e está ligado à quantidade de repetições dos microssatélites (BAKKER et al. 2005).

Os sete primers transferidos mostraram-se polimórficos, mesmo tendo sido utilizada uma amostra de apenas 5 indivíduos por espécie ou variedade. Portanto, fica evidente seu potencial de detecção de polimorfismo. Esses primers deverão ser caracterizados em amostras populacionais representativas, genotipando-se pelo menos 30 indivíduos amostrados em pelo menos uma população de cada uma dessas espécies. Essa genotipagem possibilitará que os locos em estudo possam ser caracterizados, visando disponibilizá-los para análises de fluxo-gênico, estrutura populacional e outros estudos genéticos e ecológicos dessas espécies de *Caesalpinia*.

Conclusão

Os primers transferidos apresentam padrão de amplificação típico de microsatélite e podem ser úteis para pesquisa de genética de população das espécies *Caesalpinia* em estudo.

Referências

AMORIM, J.S. **Desenvolvimento de ssr para *Senna multijuga* Rich. (Leguminosae): Uma espécie pioneira da floresta atlântica brasileira.** 2012. Dissertação (Mestrado em Genética e biologia molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2012.

BAKKER SC, SINKE RJ, PEARSON PL. Chapter 8: **Differences in stutter intensities between microsatellites are related to length and sequence of the repeat.** Unravelling the genetics of schizophrenia and ADHD. Utrecht: University of Utrecht. p. 81-94, 2005.

BOWCOCK, A.M.; RUIZ-LINARES, A.; TOMFOHRDE, J.; MINCH,, E., KIDD J.R., CAVALLI SFORZA, L.L. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. **Nature.** p. 455–457, 1994.

COSTA, B.F; RODRIGUES, L.A; RUAS, E.A; SOUZA, L.B;. RUAS, C.F;. VIEIRA, B.G.; CONSON, A.R.O; RUAS, P.M. Characterization of nine microsatellite loci for the tree species *Parapiptadenia rigida* (Fabaceae-Mimosoideae) and their transferability. **Genetics and Molecular Research.** v. v.11, p. 2338-2342, 2012.

GUPTA, P.K. AND VARSHNEY R.K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica.** v. 113, p 163-185, 2000.

GUTIERREZ, M.V., PATTO, M.C.V.; HUGUET, T.; CUBERO, J.I.; MORENO MT, TORRES AM. Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 110, p. 1210–1217, 2005.

KULEUNG, C.P.S.; BAENZIGER, I.; DWEIKAT. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. **Theoretical and Applied Genetics** n.108, p. 1147-1150, 2004.

LUETTMANN, K.; MICHALCZYK, IM.; MENGELE, C. ZIEGENHAGEN, B.; HEYMANN, EW. Characterization of nuclear microsatelliteloci in the Neotropical tree *Parkia panurensis* (Fabaceae). **American journal of botany**. v. 97, p. 34–36, 2010.

MACE E.S.; VARSHNEY, R.K; MAHALAKSHMI V; SEETHA, K.; GAFOOR, A.; LEELADEVI, Y.; CROUCH J.H. In silico development of simple sequence repeat markers within the aeschynomenoid/dalbergoid and genistoid clades of the Leguminosae family and their transferability to *Arachis hypogaea*, groundnut. **Plant Science**, n.174, p 51– 60, 2008.

MELO, S.C. O., GAIOTTO, F. A., CUPERTINO, F. B., CORRÊA, R. X., REIS, A. M. M., GRATTAPAGLIA D., BRONDAN, I R. P.V. Microsatellite markers for *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), a tree that named a country. **Conservation Genetics** v. 8, p. 1269–127, 2007.

MOTTURA, M.; FINKELDEY, A.; VERGA, A. Y GAILING, O. Development and characterization of microsatellite markers for *Prosopis chilensis* and *Prosopis flexuosa* and cross species amplification. **Molecular Ecology Notes**. v.5, p. 487-489, 2005.

PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANTE, M.; RAFASKE, A. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeat (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. **Molecular Biology and Evolution**. n. 15, p. 1275–1287, 1998.

CONCLUSÕES GERAIS

Há elevados níveis de diversidade genética da população natural de pau-brasil de Potiraguá e no arboreto da UESC. Os marcadores microssatélites caracterizados e transferidos para pau-brasil revelam-se informativos da diversidade genética existente nas populações, tal como aqueles previamente publicados para essa espécie.

A amplificação cruzada de amostras de DNA das diferentes espécies de *Caesalpinia* com cerca de metade dos primers SSR de *Senna multijuga* e *Caesalpinia echinata* é consistente para detectar produtos típicos de regiões microssatélites e assegurar viabilidade de sua futura caracterização em amostras populacionais representativas, visando estudos populacionais nas 12 espécies analisadas. Regiões flanqueadoras de microssatélites em espécies de *Senna* e *Caesalpinia s.l.* são conservadas em cerca de 50 % dos locos e encorajam sua utilização em um maior número de espécies de Leguminosas arbóreas.

A alta variabilidade genética encontrada para a população de Potiraguá e para o arboreto UESC com os marcadores SSR demonstra que a população de Potiraguá possui um grande potencial para conservação *in situ* e que o arboreto deve ter sido constituído de sementes provenientes de diferentes populações, apresentando potencial de utilização dessa coleção *ex situ* em projetos de reflorestamento e conservação de pau-brasil.

REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

ALLENDORF, F. W., LUIKART, G. Conservation and the Genetics of Populations. **Victoria: Blackwell Publishing, Malden, MA.** p.118-122, 2007.

BACELLAR-SCHITTINI, A.E. F.; DÉSTRO, G.F.G.; DIAS, J.; BOTTURA, G. **Unidades de conservação na bacia do São Francisco: uma análise da representatividade de unidades da paisagem.** In: Internacional Association of Landscape Ecology, 1, Rio de Janeiro. Anais Rio de Janeiro: UFRJ. 2007.

BORGES, L.A.. SOUSA SOBRINHO, M.; LOPES, A. V. Phenology, pollination, and breeding system of the threatened tree *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae), and a review of studies on the reproductive biology in the genus. **Flora.** n. 204, p. 111-130, 2009.

BOWCOCK, A.M.; RUIZ-LINARES, A.; TOMFOHRDE, J.; MINCH,, E., KIDD J.R., CAVALLI SFORZA, L.L. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. **Nature.** p. 455–457, 1994.

BREINHOLT, J.W.; BUREN, R.V.; KOPP, O.R.; STEPHEN, C.L. Population genetic structure of an endangered utah endemic, *Astragalus ampullaroides* (Fabaceae). **American Journal of Botany.** n. 96, v. 3, p. 661–667, 2009.

BRONDANI, R . P. V., GAIOTTO, F . A., MISSIAGGIA, A . A., KIRST, M., GRIBEL R., GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (*Bombacaceae*) an endangered tree species of the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes.** v. 3, p.177–179, 2003.

CARDOSO, M.A.; CARDOSO, S.R.S.; FERREIRA, P.C.G. Protegendo os remanescentes de pau-brasil. *Ciência hoje.* V. 7, p65-68, 2011.

CARDOSO, M.A.; PROVAN, J.; POWELL, W.; FERREIRA, P.C.G.; OLIVEIRA, D.E. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Molecular Ecology**. v. 7, p. 601-608, 1998.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, p.116-117, 1994.

CAVACAVALLI-SFORZA, L.L. High-resolution human evolutionary trees from polymorphic microsatellites. **Nature**. n. 368, p. 455–457, 1994.

CIAMPI, A.Y. ; AZEVEDO, V. C. R. ; GAIOTTO, F. A. ; RAMOS, A. C. S. ; LOVATO, M. B. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Molecular Ecology Notes**. v. 8, p. 1074-1077, 2008.

CoP14 - CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA . 2007. Hague-NED.

DEFAVARI, G.R. TARAZI, R. MORENO, M.A. FERRAZ, E.M. GANDARA, F.B. Kageyama, P.Y. Estrutura genética espacial intrapopulacional de *Hymenaea sigonocarpa* Mar. Ex Hayne nea Estação Ecológica de Itirapina, SP. **Scientia Forestalis (Brazil)**.v.37, n. 81, p. 89-98, 2009.

DIRLEWANGER, E.; COSSON, P.; TAVAUD, M.; ARANZANA, M.J.; POIZAT, C.; ZANETTO, A.; ARÚS, P. and LAIGRET, F. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Theoretical and Applied Genetics**. v. 105, n. 1, p. 127-138, 2002.

FALEIRO, F.G., **Marcadores genético-moleculares aplicados a programa de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: EMBRAPA, p.102, 2007.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D. ; BRISCOE, D. A. **Fundamentos da genética da Conservação**. Editora da Sociedade Brasileira de genética, p.13-20, 2008.

FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. p 613, 1992.

GALINHO-LEAL, C.; JACOBSEN, T.R.; LANGHAMMER, P.F.; OLIVIERI, S. **Estado dos hotspots: a dinâmica da perda da biodiversidade**. In: GALINHO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. Belo Horizonte: Conservação Internacional. p. 12-23, 2005.

GANDARA, P. Y.; KAGEYAMA, P. Y. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **IPEF**, v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.

GAUTAMI B, RAVI K, NARASU M. L.; HOISINGTON D. A.; VARSHNEY R. K. Novel set of groundnut SSRs for genetic diversity and interspecific transferability. **International Journal of Integrative Biology (IJIB)**. v.7, p. 100-106, 2009.

GRIFFITHS, A. J. F. **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 527, 2008.

GUPTA, P.K. AND VARSHNEY R.K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**. v. 113, p. 163-185, 2000.

HAMRICK, J.L. **The distribution of genetics variation within and among natural plant populations**. In: SCHONEWALD – COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRIDE, B.; THOMAS, S.L. (Ed.) **Genetics and Conservation**. Menlo Park: The Benjamin/ Cumming Publishing Company. p. 335-348, 1983.

HARTL, D. L. **A primer of population genetics**. 3 Ed. Sunderland: Sinauer Associates, p.219, 2000.

IUCN, 2012. Red List of Threatened species. Disponível em: <http://www.iuncredlist.org>. Cited on February 07 2012.

JUCHUM, F. S., M. A. COSTA.; AMORIM, A. M.; CORRÊA, R. X.; Phylogenetic relationships among morphotypes of *Caesalpinia echinata* Lam. (Caesalpinioideae: Leguminosae) evidenced by trnL intron sequences. **Naturwissenschaften** . v. 95, p. 1085–1091, 2008.

KAGEYAMA, P.Y. Conservação “*in situ*” de recursos genéticos de plantas. **IPEF**, Piracicaba. n.35, p.7-37, 1987.

KLINK, C.A. E MACHADO, R.B. Conservation of Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**. v. 19, p. 707-713, 2005.

KULEUNG, C.P.S.; BAENZIGER, I.; DWEIKAT. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. **Theor. Appl. Genet.** n.108, p. 1147-1150, 2004.

LEMES, M. R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**. v. 22, p. 2875-2883, 2003.

LEWIS, G.P. *Caesalpinia*, a revision of the *Poincianella* – *Erythrostemon* group. **London: Royal Botanic Gardens, Kew**. p. 233, 1998.

LOBO, J. A.; QUESADA, M. E.; STONER, Y. K. Effects of pollination by bats on the mating system of *Ceiba pentandra* populations in two tropical life zones in Costa Rica. **American Journal of Botany**.v. 92, n. 2, p. 370–376, 2005.

LUETTMANN, K.; MICHALCZYK, IM.; MENGELE, C. ZIEGENHAGEN, B.; HEYMANN, EW. Characterization of nuclear microsatellite loci in the Neotropical tree *Parkia panurensis* (Fabaceae). **American journal of botany**. v. 97: p. 34–36, 2010.

MACE E.S.; VARSHNEY, R.K; MAHALAKSHMI V; SEETHA, K.; GAFOOR, A.; LEELADEVI, Y.; CROUCH J.H. In silico development of simple sequence repeat markers within the aeschynomenoid/dalbergoid and genistoid clades of the Leguminosae family and their transferability to *Arachis hypogaea*, groundnut. **Plant Science**. n. 174, p 51– 60, 2008.

MACHADO, R.B., RAMOS, M.B.; PEREIRA, P.G.P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D.A.; SANTOS, N.S.; TABOR K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado**. Conservação Internacional, Brasília, DF. 2004

MARTINS,K., RIBAS, L. A., MORENO, M.A., OLIVEIRA L.H., Consequências genéticas da regeneração natural de espécies arbóreas em área antrópica, AC, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**. v.22(3). p. 897-904, 2008.

MELO, S.C. O., GAIOTTO, F. A., CUPERTINO, F. B., CORRÊA, R. X., REIS, A. M. M., GRATTAPAGLIA D., BRONDAN, I R. P.V. Microsatellite markers for *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), a tree that named a country. **Conserv Genet** .v. 8, p.1269–127, 2007.

MYERS, N., R.A. MITTERMEIER, C.G. MITTERMEIER, G.A.B. DA FONSECA, J. KENT.. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. v. 403, p. 853-858, 2000.

NAZARENO, A. G.; PEREIRA , R. A. S.; FERES, J. M.; MESTRINER, M. A.; ALZATE-MARIN, A. L. Transferability and characterization of microsatellite markers in two Neotropical *Ficus* species. **Genetics and Molecular Biology**, p. 32 , p. 568 – 571, 2009.

NETO, J.D.G; SEBBEN, A.M; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade genética de uma população“ex situ” de *Caesalpinia echinata* Lam. **Scientia Forestalis**. n. 69, p.125-133, 2005.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVCKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 2, n. 39, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, L.F.C.; EDWARDS, H.G.M.; VELOZO, E.S.; NESBITT, M. Vibrational spectroscopic study of brazilian and brazilain, the main constituents of brazilwood from Brazil. **Vibrational Spectroscopy**, v. 28, p. 243-249, 2002.

OUIINSAVI, C., SOKPON, N., KHASA, D. P. Genetic Diversity and Population Structure of a Threatened African Tree Species, *Milicia excelsa*, Using Nuclear Microsatellites DNA Markers. **Hindawi Publishing Corporation International Journal of Forestry Research**. v. 2009, 2009.

PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANTE, M.; RAFASKE, A. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeat (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. **Mol. Biol. Evol.**, n. 15, p. 1275–1287, 1998.

remanescentes de pau-brasil. **Ciência Hoje**. v. 29, n. 174, p. 65-68, 2001.

RIBEIRO, R. A.; LEMOS-FILHO, J. P.; RAMOS, A. C. S.; LOVATO M B; Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, v. 1, n. 106, p. 46-57, 2011.

RIBEIRO, R.A.; RAMOS, A.C.S.; LEMOS FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. Genetic Variation in Remnant Populations of *Dalbergia nigra* (Papilionoideae) and Endangered Tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Annals of Botany**, n. 95, p. 1171-1177, 2005.

SANTOS, A.R.F.; SOUZA, E.M.; SILVA-MANN, R., FERREIRA, R.A., SILVA, A.V.C. Perfis Enzimáticos de Genótipos de *Caesalpinia ferrea* var. *leyostachia* e *Cassia grandis*. **Floresta e Ambiente**, v.1, n.17, p.37-43, 2011.

SEBBENN, A.M., CARVALHO, A.C., FREITAS, M.L., MORAES, S.M., GAINO, A.P., DA SILVA, J.M., JOLIVET, C., MORAES, M.L. Low levels 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 (Edinb)**.v.106. p.134-45, 2011.

SOTUYO, S., CONTRERAS, J. L., DELGADO-SALINAS A., OYAMA, K. Genetic diversity and structure of the endemic *Caesalpinia hintonii* complex (Leguminosae: Caesalpinioideae) in Mexico. **Plant Syst. Evol.** v. 247, p.131–143, 2004.

TELLES, M.P.C., PEIXOTO, F.P., LIMA, J.S., RESENDE, L.V., VIANELLO R.P., WALTER, M.E.M.T, COLLEVATTI R.G. Development of microsatellite markers for the endangered Neotropical tree species *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae). **Genetics and Molecular Research**. V. 10, p.321-325, 2011.

VAN DEYNZE, A.E.; SORRELLS, M.E.; PARK, W.D.; AYRES, N.M.; FU, H; CARTINHO, S.W.; PAUL, E; MCCOUCH, S.R. Anchor probes for comparative mapping of grass genera. **Theor. Appl. Genet.** n. 97 p. 356–369, 1998.

VARTY, N. 1998. *Caesalpinia echinata*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 11 July 2012.

WANG, A.Y., YONGYAN QIN A.B., ZHEN DU A.C., GUIQIN YAN A. Genetic diversity and differentiation of the endangered tree *Elaeagnus mollis* Diels (*Elaeagnus* L.) as revealed by Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. **Biochemical Systematics and Ecology** . v. 40, p. 25–33, 2012.

YOUNG, A, BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends Ecology Evolution**. v. 11, p. 413-418, 1996.

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.V.; PINHEIRO, J.B.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.G.S.; VENCOSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**. v. 26, p. 449-457, 2003.