

Variabilidade genética do jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius* Lemaire; Rutaceae) em populações naturais da região noroeste do Rio Grande do Sul

ANA JÚLIA BANDEIRA¹
LUIS IRINEU DEIMLING²
JANAÍNA ENDRES GEORG-KRAEMER³

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a diversidade e a estrutura genética de cinco populações naturais de *P. pennatifolius*, utilizando marcadores ISSR. Os dados de distância genética mostraram que as maiores identidades genéticas não ocorreram necessariamente entre as populações mais próximas geograficamente. Os resultados da AMOVA mostraram que a diversidade genética dentro das populações foi mais elevada do que a diversidade genética entre as populações. O baixo valor de Φ_{ST} obtido indica não existir uma estruturação entre as populações, ou seja, ocorreria fluxo gênico entre as mesmas. Sugere-se que a baixa diferenciação genética detectada entre as populações seja devido ao isolamento recente das mesmas, considerando-se o tempo de geração da espécie em estudo.

Palavras-chave: espécie nativa, marcador ISSR, diversidade genética.

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas/ULBRA. Bolsista PIBIC/CNPq

² Técnico do Laboratório da Biodiversidade Vegetal/PPGGTA – ULBRA

³ Professora – Orientadora do Curso de Ciências Biológicas e do PPG em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA (janaina.endres@ulbra.br)

ABSTRACT

The present study aimed at assessing the genetic diversity and structure of five natural *P. pennatifolius* populations using ISSR markers. The genetics distance data showed that the higher genetic identities do not necessarily occur between the populations geographically closest to one another. The AMOVA results revealed that the genetic diversity within populations was higher than the value found between populations. The low Φ_{ST} value obtained indicates that there is no interpopulation structure, which means that gene flow occurs between *P. pennatifolius* populations. The present study suggests that the low genetic differentiation observed between populations is due to the fact that isolation is relatively recent, considering the species' life cycle in study.

Keywords: native species, ISSR markers, genetic diversity.

INTRODUÇÃO

O gênero neotropical *Pilocarpus* compreende dezessete espécies, das quais catorze são encontradas no Brasil. Entre estas espécies, está o jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius* Lemaire) (Dr. José Rubens Pirani, comunicação pessoal, 18 de junho de 2008).

O jaborandi é uma arvoreta perene e pouco ramificada. Apresenta flores monoclinas e a sua polinização ocorre por entomofilia, preferencialmente por insetos do grupo das moscas e das vespas (BARBOSA, 1999). Produz anualmente grandes quantidades de sementes (REITZ et al., 1988), que são dispersas por autocoria (SOUZA et al., 2005), isto é, sem a participação de agentes externos.

É uma planta da flora nativa brasileira de grande interesse econômico, pelo seu valor medicinal e cosmético. Esta espécie apresenta vários alcalóides como a pilocarpina isopilocarpina, jaborina, joboridina, pilosina, entre outros (ROCHA; ROCHA, 2006). As plantas do gênero *Pilocarpus* são as únicas fontes naturais da pilocarpina, um alcalóide ativador do sistema nervoso autônomo parassimpático. Este alcalóide é utilizado na oftalmologia para contração da pupila, um procedimento importante

em cirurgias ópticas e em outros tratamentos. A pilocarpina tem se mostrado clinicamente eficaz também no tratamento da acne, da queda de cabelo, da seborréia e em outras afecções do couro cabeludo (LORENZI; MATOS, 2002).

A importância do jaborandi não está relacionada somente aos fatores econômicos, mas principalmente ao seu papel ecológico. Com relação à sua ecologia sucessional, esta espécie nativa é considerada secundária e ombrófila e em programas de reflorestamento deve ser utilizada para o enriquecimento das espécies (LOPES; GONÇALVES, 2008).

Nativa da América do Sul, a espécie em estudo é encontrada predominantemente no Paraguai, na Argentina e no Brasil. Em nosso país, ocorre nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (FLORA BRASILIENSIS REVISITADA, 2008). Em nosso Estado, a sua distribuição é irregular e descontínua podendo ser encontrada em solos úmidos e rochosos, abrangendo regiões de Floresta Ombrófila Densa, Campos Sulinos e Floresta Estacional Decidual. Esta ocorrência natural inclui a Região Noroeste do Estado, a qual, nas últimas décadas, vem sofrendo intensa degradação e fragmentação de suas florestas como resultado

do desenvolvimento e expansão da pecuária e da agricultura.

Desta forma, populações de espécies vegetais que antes mantinham níveis adequados de indivíduos, hoje, encontram-se drasticamente reduzidas, podendo levar à perda da variabilidade genética e ao declínio destas populações.

A compreensão dos padrões de variabilidade intrapopulacional e da distribuição da diversidade genética entre as populações de espécies florestais é de fundamental importância para a definição de estratégias de conservação e uso sustentável desses recursos (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A avaliação da variabilidade genética em um germoplasma depende da disponibilidade de marcadores polimórficos e neutros do ponto de vista do efeito ambiental. Já foram desenvolvidas diferentes técnicas que utilizam vários tipos de marcadores moleculares baseados na análise direta do DNA.

Em nosso estudo foi utilizado o marcador molecular ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (ZIETKIEWICZ et al., 1994). Na técnica utilizada para este tipo de marcador, é amplificada a região de DNA entre dois microssatélites que estejam proximamente espaçados e inversamente orientados, por meio de um único “primer”, composto de uma curta sequência microssatélite (tipicamente, 18-20 pares de bases) com um a quatro nucleotídeos degenerados ancorados na extremidade 5’ ou 3’ (ZIETKIEWICZ et al., 1994; MALTAGLIATI et al., 2006). Sua amplificação não requer informação prévia da sequência do genoma e leva a

um padrão multilocus e altamente polimórfico (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

Este estudo teve como objetivo verificar a variabilidade genética e o grau de diferenciação de 24 progênies em cinco populações naturais de *Pilocarpus pennatifolius* Lemaire, da Região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, utilizando marcadores moleculares ISSR, e assim gerar conhecimento para a espécie e subsídios para o estabelecimento de bancos de germoplasma e estratégias de conservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 24 progênies de cinco populações naturais de jaborandi da Região Noroeste do Rio Grande do Sul, dos municípios de Catuípe (1 e 3) (duas populações), Augusto Pestana (2), São Martinho (4) e Crissiumal (5) (Figura 1). Em cada população, sementes de polinização aberta foram coletadas de árvores identificadas como plantas-matriz.

As sementes foram germinadas no Viveiro Regional de Produção de Mudas Florestais do Instituto Regional de Desenvolvimento Rural (IRDeR), em Augusto Pestana, RS, para obtenção das plântulas. Quando as plântulas alcançaram 10 cm foram coletadas folhas de cinco indivíduos (progênie) de cinco plantas-matriz, para a maioria das populações, totalizando 118 indivíduos analisados. As folhas coletadas foram armazenadas em sacos plásticos com sílica gel para a desidratação e para posterior extração do DNA.

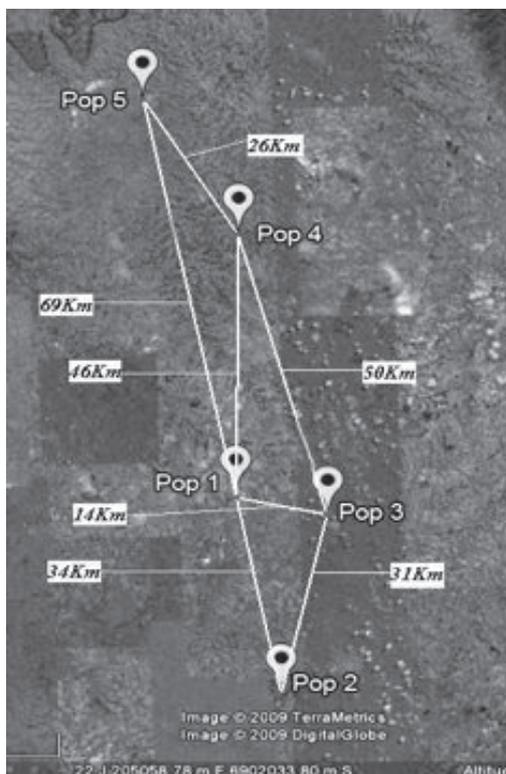


Figura 1 - Vista aérea das cinco populações analisadas. As distâncias geográficas foram calculadas em quilômetros. (Imagem Google EarthTM modificada).

Extração e Quantificação do DNA

A extração do DNA total foi baseada no método descrito por Doyle e Doyle (1987), com pequenas modificações necessárias para a obtenção de DNA com boa qualidade.

O DNA extraído foi quantificado através da comparação da intensidade da banda das amostras com a intensidade das bandas de DNA de fago- λ , com diferentes concentrações conhecidas.

As análises de quantificação foram feitas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídeo ($1 \mu\text{g/mL}$) e tampão TBE 1X (Tris-Borato, EDTA), sob corrente elétrica de 100 V por 10 minutos e mais 20 minutos a 80 V.

Amplificação ISSR

Foram testados 11 “primers” ancorados na extremidade 3’ (pertencentes ao set 9 da University of British, Columbia, Canadá), em três condições diferentes de reação e amplificação, conforme Lei et al. (2006), Rizza et al. (2007) e Yao et al. (2008) (Tabela 1).

Tabela 1 - Condições da reação em cadeia da polimerase e de amplificação conforme os autores Lei et al. (2006), Rizza et al. (2006) e Yao et al. (2008), utilizados na análise das cinco populações.

Lei et al. (2006)		Rizza et al. (2007)		Yao et al. (2008)	
Mix	Programa PCR	Mix	Programa PCR	Mix	Programa PCR
10 ng DNA	94°C - 5min	80 ng DNA	94°C - 7min	20 ng DNA	94°C - 5min
10 mM dNTPs	94°C - 1min	200 μM dNTPs	94°C - 30s	200 μM dNTPs	94°C - 1min
0.25 μM "Primer"	54.5°C - 1min	0.2 mM "Primer"	52°C - 45s	0.5 μM "Primer"	52°C - 45s
1 unidade Taq	72°C - 2min	1 unidade Taq	72°C - 1.5min	1 unidade Taq	72°C - 2min
1 X Tampão de reação	72°C - 7min	1 X Tampão de reação	72°C - 7min	1 X Tampão de reação	72°C - 7min

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%,

contendo brometo de etídeo ($1 \mu\text{g/mL}$) e tampão TBE 1X, a uma voltagem de 65 V, por três horas e

meia. O gel foi verificado e a imagem digitalizada sob fonte de luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado por comparação com o marcador de peso molecular “Ladder” de 100 pb (Invitrogen™ Brasil).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os fragmentos de DNA amplificados foram identificados para presença (1) ou ausência (0) de bandas de igual tamanho e uma matriz binária foi construída. Com base nesta matriz binária, foi calculado o Coeficiente de Similaridade de Jaccard, entre cada par de indivíduos. Os coeficientes de similaridade foram utilizados para construir um dendograma, através do método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages). Estas análises foram feitas usando o programa NTSYS-pc, versão 2.1 (ROHLF, 2001) e a análise de bootstrap (10.000 permutações) foi feita utilizando o programa Bood versão 3.01 (COELHO, 2000).

A porcentagem de locos polimórficos, a identidade genética de Nei e a distância genética de Nei (1978) foram calculadas com o programa TFPGA (Tools for Population Genetic Analyses) versão 1.3 (MILLER, 1997) assumindo que todos os locos eram dominantes e estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os valores da distância genética de Nei entre cada par de populações foram utilizados para construir um dendograma, pelo método de UPGMA. O teste de bootstrapping foi feito com 10.000 permutações.

Para o cálculo da variância molecular (AMOVA) e do Φ_{ST} foi utilizado o programa ARLEQUIN versão 3.11 (EXCOFFIER; SCHNEIDER, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 11 “primers” testados, oito mostraram polimorfismo, e destes, cinco foram selecionados para a análise, por apresentarem um bom padrão de amplificação.

Os cinco “primers” utilizados para a análise produziram várias bandas (fragmentos), das quais 136 foram analisadas por apresentarem boa resolução. Do total de bandas analisadas, 131 bandas (96,32%) foram polimórficas, com o tamanho variando de 120 a 2070 pares de bases (pb) (Tabela 2).

Tabela 2 - “Primers” ISSR: sua sequência, tamanhos dos fragmentos, número total de bandas e número de bandas polimórficas.

Primer	Sequência (5'-3') Y= (C,T)	Fragmentos [pb]	Total de bandas	Bandas polimórficas
UBC810	(GA)8T	420 – 1500	20	19
UBC811	(GA)8C	120 – 1800	41	41
UBC834	(AG)8YT	190 – 720	23	22
UBC855	(AC)8CYT	585 – 1900	23	22
UBC857	(AC)8CYG	360 - 2070	29	27
Total			136	131

Os coeficientes de similaridade genética entre os indivíduos analisados variaram de 0,37 a 0,73. O maior índice de similaridade ($S_j=0,73$) foi encontrado entre os indivíduos 61J e 73J pertencentes à mesma população (Crissiumal), porém provenientes de progênes diferentes. De uma maneira geral, o dendograma gerado com os coeficientes de similaridade mostrou que os indivíduos agruparam-se independentemente da sua progênie ou população de origem, ou seja, não houve a formação de agrupamentos preferenciais entre indivíduos de uma mesma população ou progênie, encontrando-se indivíduos das cinco populações distribuídos ao longo do dendograma. Esta situação somada aos baixos valores de “bootstrap” obtidos podem ser um indicativo da existência de uma alta variabilidade intrapopulacional, e que esta variabilidade estaria

distribuída entre os indivíduos das cinco populações estudadas.

A análise da porcentagem de locos polimórficos mostrou altos níveis de diversidade genética dentro das populações, com uma porcentagem média de locos polimórficos de 82% para as cinco populações. A população de Catuípe (3) foi a que apresentou a mais baixa porcentagem média de locos polimórficos (77%). Para as progênies, 50% dos locos analisados, em média, foram polimór-

ficos. As progênies de cada população tiveram uma porcentagem de locos polimórficos inferior à observada para a população como um todo, sugerindo que as progênies de uma população não compartilham todos os locos polimórficos, revelando assim uma pequena diferenciação genética entre as mesmas.

A identidade genética entre os indivíduos de uma mesma população e entre populações de jaborandi foi mensurada pela Identidade de Nei (1978) (Tabela 3).

Tabela 3 - Identidade de Nei (1978) intrapopulacional.

Populações	Catuípe – (1)	Augusto Pestana	Catuípe – (3)	São Martinho	Crissiumal
I_N	0,948	0,937	0,961	0,938	0,935
Limites	0,930 - 0,965	0,923 - 0,954	0,948 - 0,968	0,919 - 0,951	0,912 - 0,959
I_N geral	0,944				

Os coeficientes médios de identidade intrapopulacional obtidos para as cinco populações foram muito semelhantes e bastante altos, variando de $I_N=0,935$ (Crissiumal) a $I_N=0,961$ (Catuípe –3). O coeficiente de identidade intrapopulacional geral (médio) para a espécie foi $I_N=0,944$.

O coeficiente de identidade geral (médio) entre as cinco populações foi de $I_N=0,986$ (dados não mostrados). As médias de identidade de cada população com todas as demais variaram muito pouco, de $I_N=0,976$ (entre Catuípe-3 e São Martinho) a $I_N=0,994$ (entre Catuípe-1 e Crissiumal). Estes valores indicam que as populações analisadas são geneticamente igualmente próximas umas das outras.

A partir da matriz da distância genética de Nei (1978) entre as populações foi construído um dendrograma pelo método UPGMA (Figura 2). Com os valores obtidos de identidade genética e pela forma de agrupamento das populações foi possível observar que apesar da variabilidade genética detectada,

as populações mostraram-se bastante semelhantes geneticamente e esta semelhança ocorreu de forma independente da proximidade geográfica.

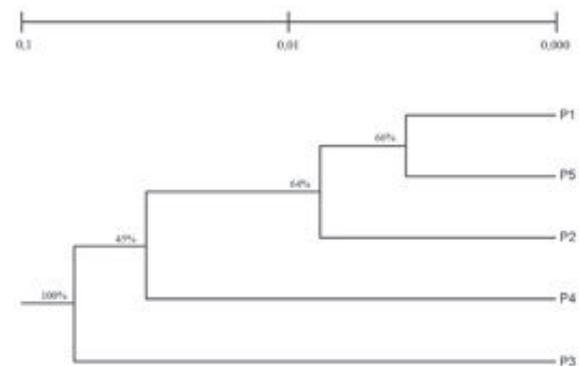


Figura 2 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA, baseado na distância genética de Nei (1978) entre as cinco populações em estudo. Distâncias genéticas são indicadas acima do dendrograma e valores de "bootstrap" são indicados nos nós. Legenda: 1 Catuípe – Mato dos Machado; 2 Augusto Pestana; 3 Catuípe – Mato do Erig; 4 São Martinho; 5 Crissiumal.

Para verificar a estruturação e a distribuição da variabilidade genética foi realizada a análise da variância molecular (AMOVA), sendo obtidas as variâncias entre as populações e as progênies e as variâncias dentro das mesmas. Os altos valores de identidade genética obtidos entre as populações (IN geral = 0,986) são corroborados pela análise de variância molecular, a qual mostrou que somente 2,82% ($\Phi_{ST}=0,0282$, $p < 0,001$), do total da variabilidade foi atribuída a diferenças entre as populações. O baixo valor de Φ_{ST} obtido sugere não existir uma estruturação entre as populações, ou seja, que existiria fluxo gênico entre as mesmas.

Alguns dados obtidos no presente trabalho sugerem que as progênies de cada população apresentem algumas diferenças genéticas entre elas. Como os indivíduos que compõem uma progênie são indivíduos-irmãos (as sementes foram coletadas da mesma planta-matriz) é esperado que mostrem maior identidade genética. Mesmo assim, foi possível observar a existência de uma grande identidade genética entre os indivíduos das diferentes progênies e também das diferentes populações estudadas, considerando os valores obtidos de identidade genética de Nei e pela forma como os indivíduos formaram os agrupamentos nos dendrogramas.

Esta alta identidade observada possivelmente seja remanescente do período onde a paisagem não se apresentava tão fragmentada e sugere-se que esta fragmentação da área em estudo seja recente, considerando o ciclo de vida da espécie. Assim, mesmo que as populações não formassem um contínuo na natureza, elas estavam menos distanciadas, e provavelmente com um maior número de indivíduos, permitindo que mesmo um vetor de polinização sem uma alta capacidade de dispersão pudesse manter o fluxo gênico entre elas. Os dados de Coelho (2000) indicam que o processo de redução da cobertura

florestal é anterior à década de 60. Portanto, a fragmentação já acontece há pelo menos 50 anos e no máximo há 100 anos (intensificação do processo de colonização da região). Desta forma, um possível isolamento das populações ocorreu entre 70 e 50 anos atrás. Considerando uma geração arbórea, para esta espécie perene, de cerca de 30 a 40 anos, haveria no máximo duas gerações de isolamento, o que pode ser considerado pouco tempo para que os processos de endogamia e a pequena capacidade de dispersão das sementes e do vetor de polinização sejam refletidos na distribuição da variabilidade genética da espécie, na região em estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que a maior parte da variabilidade genética está contida dentro das populações e que existe uma pequena diferenciação entre as progênies de cada população, sugere-se para a conservação *ex situ*, a coleta de sementes de diferentes progênies em várias populações, mantendo de forma representativa a variabilidade da espécie em bancos de germoplasma.

Para a conservação *in situ* devem ser aplicadas estratégias que envolvam a manutenção do fluxo gênico entre as populações. A manutenção de corredores de vegetação entre as populações de *P. pennotifolius* poderia ser uma estratégia eficiente para a manutenção da variabilidade genética entre as populações e para a preservação da espécie nos fragmentos remanescentes.

AGRADECIMENTOS

Auxílio: PROICT/ULBRA; PIBIC/CNPq.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, A.A.A. *Hortia brasiliana* Vand. (Rutaceae): polinização por aves Passeiriformes no cerrado do sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 2, p. 99-105, 1999.
- COELHO, A.S.G. **BOOD**: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Goiânia: UFG, 2000.
- COELHO, G.C. Recuperação de áreas degradadas no Noroeste do RS. **Caderno de Pesquisa**, Santa Cruz do Sul, v. 12, p. 85-89, 2000.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull**, v. 9, p. 11-15, 1987.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.
- FLORA BRASILIENSIS REVISITADA. Obra - Família Rutácea. Disponível em <<http://flora.cria.org.br/taxonCard?id=FBR3449>> Acesso em: 19 jun. 2008.
- LEI, Y. et al. Determination of genetic variation in *Rhodiola crenulata* from the Hengduan Mountains Region, China using inter-simple sequence repeats. **Genetic and Molecular Biology**, v. 29, p. 339-344, 2006.
- LOPES, S.B.; GONÇALVES, L. **Elementos para a aplicação prática das árvores nativas do sul do Brasil na conservação da Biodiversidade**. [Porto Alegre]: Fundação ZooBotânica, 2008. Disponível em: <http://www.fzb.rs.gov.br/jardimbotanico/downloads/paper_tabela_aplicacao_arvores_rs.pdf> Acesso em: 19 jun. 2008.
- LORENZI, H.; MATTOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. p. 424-425.
- MALTAGLIATI, F. et al. Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means o DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs). **Biochemical Systems of Ecology**, v. 34, p. 626-634, 2006.
- MILLER, M.P. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA), version 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. [S.l.]: do Autor, 1997. 1 CD-ROM.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.
- PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina: Planta, 2001. p. 327.
- REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Itajaí: Sellowia, 1988. p. 97-98.
- RIZZA, M.D. et al. Genetic diversity and DNA content of three South American and three *Eurasian Trifolium* species. **Genetic and Molecular Biology**, v. 30, p. 35-39, 2007.
- ROCHA, G.M.; ROCHA, M.E.N. Uso popular de plantas medicinais. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 1, p. 76-85, 2006.
- ROHLF, F.J. **NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**, version 2.1. New York: Exeter Software, Setauket, 2001. 1 CD-ROM.

SOUZA, A.; MOURÃO, K.S.; SOUZA, L.A. Morfologia e anatomia do fruto e da semente em desenvolvimento de *Pilocarpus pennatifolius* Lem. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 745-754, 2005.

YAO, H. et al. ISSR primer screening and preliminary evaluation of genetic diversity in wild

populations of *Glycyrrhiza uralensis*. **Biologia Plantarum**, v. 52, p. 117-120, 2008.

ZIETKIEWCZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-183, 1994.