

Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) por marcadores RAPD

Genetic structure of *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) populations by RAPD markers

Léo Zimback  
Edson Seizo Mori  
Paulo Yoshio Kageyama  
Renato Ferraz de Arruda Veiga  
José Roberto Silveira Mello Junior

---

**RESUMO:** A *Trichilia pallida* Swartz é uma Meliaceae clímax ombrófila da Mata Atlântica, tal como algumas árvores da família possui propriedades inseticidas para insetos mastigadores, o que a torna de interesse para uso silvicultural. Foram coletadas 40 plantas das populações da Fazenda Oito Pontas em Bofete, da Reserva de Santa Genebra em Campinas e da Reserva Ecológica de Caetetus em Gália, todas no Estado de São Paulo. Utilizaram-se 10 "primers" altamente polimórficos que produziram 72 marcadores dominantes, os quais foram utilizados para medir a diversidade gênica entre e dentro das populações. O polimorfismo dentro das populações variou de 90,3 a 97,2%, a média do número efetivo de alelos variou de  $1,46 \pm 0,33$  a  $1,57 \pm 0,33$ , enquanto que a diversidade gênica média variou de  $0,27 \pm 0,18$  a  $0,33 \pm 0,15$ . A heterozigosidade total ( $H_T$ ) foi de  $0,334 \pm 0,02$ , enquanto que a diversidade gênica média dentro ( $H_S$ ) foi de  $0,292 \pm 0,017$  e obteve-se o valor 0,125 de divergência genética entre populações ( $G_{ST}$ ). As populações de Bofete e Campinas têm a menor distância genética de Nei (0,049) e as suas distâncias com Gália foram de 0,118 e 0,107 respectivamente.

**PALAVRAS-CHAVE:** RAPD, Diversidade gênica, Distância genética

**ABSTRACT:** *Trichilia pallida* Swartz is an Atlantic Forest shady climax tree of Meliaceae family that presents insecticide properties against chewing insects like as some family trees, making it interesting for forestry uses. Forty plants of Oito Pontas Farm population were collected in Bofete County, Santa Genebra Ecological Station in Campinas County, and Caetetus Ecological Station in Gália County, all in the São Paulo State, Brazil. Leaf DNA analysis was used by RAPD method, that showed 10 highly polymorphic primers, with 72 dominant markers, used to estimate genetic diversity within and among populations. The polymorphism within populations varied from 90.3 to 97.2%, and the effective allele number varied from  $1.46 \pm 0.33$  to  $1.57 \pm 0.33$ , while the average of genetic differentiation of populations varied from  $0.27 \pm 0.18$  to  $0.33 \pm 0.15$ . The gene diversity in the total population ( $H_T$ ) was  $0.334 \pm 0.02$ , while the average gene diversity within populations ( $H_S$ ) was  $0.292 \pm 0.017$ , and the coefficient of gene differentiation ( $G_{ST}$ ) was 0.125. Bofete and Campinas populations had the smallest Nei's genetic distance (0.049) and the distances of both with Gália were 0.117 and 0.107, respectively.

**KEYWORDS:** RAPD, Genetic diversity, Genetic distance

## INTRODUÇÃO

Recentemente cresceu o interesse em recursos genéticos vegetais da biodiversidade brasileira pelo setor industrial, criando um debate sobre a apropriação e patenteamento destes recursos. Isto alertou a sociedade para a necessidade de estudá-los de modo mais extensivo e com maior profundidade. As espécies clímax são muito sensíveis à perturbação antrópica, já que este grupo ecológico surge sob o sombreamento do dossel, sendo as primeiras a sofrer o perigo de extinção porque possuem crescimento lento e são dependentes de fauna dispersora. Sendo assim, a diversidade genética natural de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae), uma espécie clímax com princípios inseticidas (Jacobson, 1975; Rodriguez, 1995; Roel, 1998 e Torrecillas, 1997), é um bom objeto de estudo para fins de manutenção de um banco genético que possa servir de fonte de material propagativo e de futuros trabalhos de melhoramento genético. Também é um importante passo para inferir sobre o estado atual e propor futuras medidas de manutenção do estado de conservação ou recuperação do potencial genético da espécie.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a diversidade genética de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) para uso potencial em um sistema de silvicultura sustentável para pequenos agricultores e preservar a espécie, utilizando os parâmetros de estrutura genética, visando atender o plantio de florestas mistas de proteção e produção.

## METODOLOGIA

Foram coletadas 40 plantas da Fazenda Oito Pontas em Bofete, na Reserva de Santa Genebra em Campinas e na Estação Ecológica de Caetetus em Gália totalizando 120 plantas, todas no Estado de São Paulo, Brasil. Observou-se que a espécie tem o hábito de formar agrupamentos distantes um dos outros com uma média de 10 indivíduos por grupo, com uma densidade média de seis indivíduos por hectare de mata ciliar. Em Bofete a mata tem 80 hectares, em Campinas a mata tem 250 hectares e em Gália, 2178 hectares, mas aproximadamente 500 ha são de mata ciliar, sendo o restante de mata estacional semidecídua onde a espécie estava ausente.

Cerca de 100 mg de folha foram trituradas e dissolvidas em 350  $\mu$ L de Plant DNAzol, adicionando-se 300  $\mu$ L de clorofórmio, agitando e descansando por cinco minutos. Centrifugando-se a 12.000 rpm por dez minutos, separou-se o sobrenadante, que foi precipitado com 250  $\mu$ L de etanol por cinco minutos. Este precipitado foi centrifugado a 5.000 rpm por cinco minutos e lavado com etanol a 70%. O pellet foi ressuspenso em 300  $\mu$ L de 0.1 TE com RNase a 100  $\mu$ g/ml e mantido em banho-maria a 37° C por uma hora, sendo depois centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e precipitado com 60  $\mu$ L de NaCl 5M e 600  $\mu$ L de etanol 95% por 30 minutos, sendo depois centrifugado a 5.000 rpm. O pellet obtido foi lavado com etanol 70% e seco ao ar, para depois ser dissolvido em 100  $\mu$ L de 0.1 TE e quantificado. Foram utilizados 8 ng de DNA por amostra, 11,3  $\mu$ L de água deionizada, 2,5  $\mu$ L de 10 x "buffer", 2,3  $\mu$ L de MgCl 50 mM, 5,7  $\mu$ L de DNTPs 0,5 mM, 1  $\mu$ L de "primer" 10  $\mu$ M e 0,18  $\mu$ L de Taq DNA polimerase 5 U/ $\mu$ L, no termociclador PTC-100, da MJ Research Inc. A desnaturação do DNA foi realizada a 94° C por dois minutos, seguida do ciclo: 94° C/1':00", 35° C/1':00" e 72° C/1':30", repetido 35 vezes, com incubação final a 72° C por seis minutos. Cerca de 15  $\mu$ L de amostra foi corada com 1  $\mu$ L de "loading buffer" e colocada para correr em gel de agarose a 1,5 % por três horas a 80 V e 400 mA, juntamente com 8  $\mu$ L de Ladder a cada 16 amostras. A leitura foi realizada com coloração por brometo de etídio e exposição a UV, fotografado com filme Polaroid 667 branco e preto.

A análise foi realizada com o auxílio do software Popgene 1.21 (1997), utilizando parâmetros para dados dominantes diplóides. Foi estimado o número de alelos observados ( $n_a$ ), número de alelos efetivos ( $n_e$ ), diversidade gênica de Nei (1973) ( $H_e$ ), porcentagem de locos polimórficos (P%), para cada população e para o conjunto das populações. Também foi realizado o teste de Ewens-Watson (Manly, 1985) para determinar a influência de mutações nos marcadores estudados.

Foi realizada também a análise de diversidade gênica em populações pelo método de Nei

(1978), estimando a heterozigosidade total ( $H_T$ ), diversidade gênica média dentro ( $H_S$ ), divergência genética entre populações ( $G_{ST}$ ) e fluxo gênico ( $Nm$ ).

As distâncias genéticas e coeficientes de similaridade entre populações foram estimados segundo Nei (1978) utilizando o método de UPGMA. A estrutura da população para cada marcador, também foi avaliada pelo teste de Chi-quadrado e pelo teste G.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos alelos observados esteve presente em todas as populações (Tabela 1), indicando que a distância entre populações não eliminou muitos alelos por deriva genética, proporção esta que se repete nos alelos efetivos, cujo valor mostra boa variabilidade genética nos três locais. O índice de diversidade gênica de Nei ( $\hat{H}_e$ ) confirma os dois parâmetros anteriores. O alto índice de locos polimórficos (90,3 a 97,3%) indica que não ocorreu ainda um grande isolamento entre populações. As poucas diferenças existentes entre elas provavelmente é fruto de deriva genética em cada local.

O teste de Ewens-Watson mostrou apenas um loco com indícios de mutação nos marcadores OPAJ10-2 e OPAJ15-1, na população de Bofete e OPAD11-7, OPAD05-3, OPAD05-4, OPAJ12-3 e OPAJ15-1, na população de Gália. Entretanto, como isto não ocorreu na população de Campinas, que apresentou maior variabilidade, é provável que a frequência destes alelos estejam diminuindo sob processo de deriva genética e não surgiram por mutação.

A heterozigosidade total ( $H_T$ ) estimada foi relativamente alta (Tabela 2), com pequeno desvio, indicando valor próximo da média (0,334) para a maioria dos locos, mostrando que a espécie apresenta razoável reserva de variabilidade genética. A distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações foi caracterizada pela divergência genética de Nei (1978). Os resultados mostraram que 12,5% da variabilidade genética estava entre populações ( $G_{st} = 0,125$ ) e 87,5% encontrava-se dentro de populações ( $H_s = 0,292$ ). Espécies arbóreas, em geral, mostram maior variação genética dentro populações. Estudos realizados com tais espécies, baseados em marcadores RAPD, têm detectado de 0,05 (Yun et al., 1998) a 0,34 (Aagard et al., 1998) de divergência genética entre populações. Resultados semelhantes têm sido observados em estudos baseados em locos isoenzimáticos (Aagard et al., 1998).

Estimativas de fluxo gênico não são de fácil interpretação. Segundo Wright (1931) valores de  $N_m$  menores do que 1 mostram um isolamento genético. A estimativa de fluxo gênico entre populações de *T. pallida* foi baixa (0,78). *Maytenus aquifólia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss, que são espécies clímax também, mostraram valores baixos (0,23) a moderados (6,22) (Perecin, 2000). Espécie de sucessão secundária inicial comum em fragmentos florestais, como a canafístula (*Peltophorum dubium*) mostra um fluxo gênico variando de 3,63 a 6,11 (Mori, 2000). O baixo valor obtido no presente trabalho mostra que já está ocorrendo um isolamento genético causado por deriva, indicando a necessidade de se iniciar o estabelecimento de estratégias de conservação da espécie.

**Tabela 1**

Parâmetros genéticos populacionais obtidos de 72 marcadores RAPD, para as populações de *T. pallida* Swartz de Bofete, Campinas e Gália.

(Population genetic parameters obtained from 72 RAPD markers, in *T. pallida* Swartz populations of Bofete, Campinas, and Gália, Brazil)

Populações	Bofete		Campinas		Gália		Total	
	Média	s	Média	s	Média	s	Média	s
na	1,90	0,30	1,97	0,17	1,90	0,29	2,00	0,00
ne	1,46	0,33	1,57	0,33	1,46	0,37	1,57	0,32
$\hat{H}_e$	0,28	0,16	0,33	0,15	0,27	0,18	0,33	0,14
P%	90,3	-	97,2	-	90,3	-	100	-

s: desvio padrão;

$\hat{H}_e$ : diversidade gênica de Nei;

na: número de alelos observados;

P%: porcentagem de locos polimórficos.

ne: número efetivo de alelos;

**Tabela 2**

Parâmetros genéticos populacionais das localidades de Bofete, Campinas e Gália.  
(Population genetic parameters obtained of Bofete, Campinas, and Gália County, Brazil)

	$H_T$	$H_S$	$G_{ST}$	$N_m$
Média	0,334	0,292	0,125	0,78
Amplitude	0,025-0,499	0,025-0,498	-	-
Desvio padrão	0,020	0,017	-	-

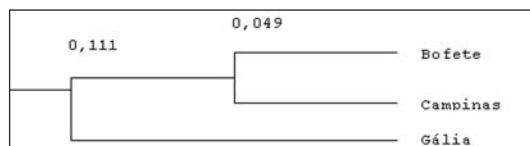
$H_T$ : heteroziguidade total;

$G_{ST}$ : divergência gênica entre populações;

$H_S$ : diversidade gênica média dentro;

$N_m$ : fluxo gênico.

As distâncias genéticas de Nei (1978) (Figura 1) foram pequenas entre as populações estudadas. A distância genética entre Bofete e Campinas foi de 0,049, enquanto que Gália apresentou uma distância genética com Campinas de 0,107 e com Bofete de 0,118, indicando baixa divergência entre as populações. A similaridade genética de Nei (1978) foi de 0,953 entre as populações de Bofete e Campinas, enquanto que Gália teve uma similaridade de 0,888 com Bofete e 0,898 com Campinas, mostrando valores menores, embora ainda com grande similaridade com as demais populações.



**Figura 1**

Dendrograma das distâncias genéticas de Nei (1978) pelo método do UPGMA.

(Dendrogram based on genetic distance of Nei's (1978) by UPGMA procedure)

As diferenças entre as frequências de alelos das populações na Tabela 3 foram testadas pelo teste  $\chi^2$  e G para os 72 marcadores. Destes, 33 marcadores não diferiram estatisticamente e 12 diferiram com baixa significância. Levando-se em conta, também, o baixo número de locos monomórficos, observa-se uma estrutura genética com muitos locos polimórficos comuns entre as populações, alguns com frequências alélicas muito próximas, e alta variabilidade dentro das populações.

## CONCLUSÕES

A *Trichilia pallida* Swartz apresenta ampla di-

versidade genética nas populações de Bofete, Campinas e Gália, sendo que entre populações a diversidade é média. A espécie não perdeu muita variabilidade, mas já apresenta isolamento genético e pode ser preservada nas condições atuais de reservas e fragmentos florestais, existindo a necessidade de iniciar coletas para preservação da espécie, embora o material seja adequado para coleta de sementes com a finalidade de regeneração florestal.

## AUTORES E AGRADECIMENTOS

LÉO ZIMBACK é pesquisador científico V da Floresta de Botucatu, Seção da Floresta de Avaré do Instituto Florestal. E-mail: lzimback@terra.com.br  
EDSON SEIZO MORI é Professor Adjunto do Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP - Caixa Postal 237 - Botucatu, SP - 18603-970 - E-mail: esmori@fca.unesp.br

PAULO YOSHIO KAGEYAMA é Professor Titular do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP - Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP - 13480-900 - E-mail: kageyama@esalq.usp.br

RENATO FERRAZ DE ARRUDA VEIGA é pesquisador científico VI do Centro de Recursos Genéticos Vegetais e Jardim Botânico do Instituto Agrônomo. E-mail: veiga@iac.sp.gov.br

JOSÉ ROBERTO SILVEIRA MELLO JUNIOR é graduando de Biologia, Estagiário do Laboratório de Melhoramento do Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP - Caixa Postal 237 - Botucatu, SP - 18603-970

Os autores agradecem à FAPESP o apoio através do projeto 2000/08416-1 e ao engenheiro agrônomo Wilson Contieri do Instituto Florestal pelo apoio ao trabalho.

**Tabela 3**

Número de genótipos das populações de *T. pallida* para ausência de banda (0), presença de banda (1) e os testes Chi-quadrado e G.

(Population genotypes number of *T. pallida* for band absence (0), band presence (1), Chi-square and G tests)

Marcadores	Bofete		Campinas		Gália		$\chi^2$	G
	0	1	0	1	0	1		
OPAD11-1	37	2	32	7	38	1	5,23ns	5,01ns
OPAD11-2	20	19	17	22	38	1	28,49**	35,76**
OPAD11-3	38	1	37	2	29	10	10,91**	10,41**
OPAD11-4	34	5	30	9	22	17	8,63*	8,52*
OPAD11-5	8	31	6	33	0	40	9,52*	14,03**
OPAD11-6	37	2	30	9	36	3	7,84*	7,46*
OPAD11-7	31	8	38	1	39	0	12,83**	12,42**
OPAD11-8	15	24	10	29	20	20	4,31ns	4,36ns
OPAE01-1	21	18	21	18	28	11	3,49ns	3,59ns
OPAE01-2	30	9	30	9	27	12	0,65ns	0,64ns
OPAE01-3	6	33	18	21	0	40	28,04**	33,34**
OPAE01-4	37	2	36	3	38	1	0,58ns	0,61ns
OPAE01-5	34	5	14	25	33	6	30,72**	30,36**
OPAE01-6	32	7	37	2	20	20	21,89**	22,21**
OPAE12-1	39	0	20	18	36	3	33,22**	35,93**
OPAE12-2	18	20	21	17	20	20	0,46ns	0,46ns
OPAE12-3	6	32	35	3	10	29	53,05**	59,35**
OPAE12-4	26	12	25	13	32	7	3,07ns	3,22ns
OPAJ05-1	35	4	36	3	37	1	1,32ns	1,46ns
OPAJ05-2	38	1	36	3	33	5	4,16ns	4,39ns
OPAJ05-3	31	8	36	3	38	0	8,75*	9,47*
OPAJ05-4	34	5	34	5	38	0	4,50ns	5,94ns
OPAJ05-5	27	12	30	9	29	9	0,94ns	0,92ns
OPAJ05-6	29	10	34	5	27	11	2,75ns	2,90ns
OPAJ05-7	35	4	29	10	27	11	4,90ns	5,34ns
OPAJ08-1	17	22	18	21	32	5	16,88**	18,49**
OPAJ08-2	25	14	20	20	16	21	3,34ns	3,37ns
OPAJ08-3	17	22	16	23	23	14	4,01ns	4,04ns
OPAJ08-4	34	5	18	21	15	22	19,10**	20,71**
OPAJ08-5	34	5	36	3	33	4	0,36ns	0,36ns
OPAJ08-6	35	4	34	5	36	1	2,09ns	2,33ns
OPAJ08-7	12	27	14	25	19	18	3,54ns	3,52ns
OPAJ08-8	10	29	16	23	6	31	6,30ns	6,40ns
OPAJ08-9	10	29	14	25	30	7	24,45**	25,60**
OPAJ08-10	34	5	20	20	16	21	16,77**	18,19**
OPAJ10-1	18	15	8	29	6	33	14,27**	13,88**
OPAJ10-2	33	0	30	7	20	19	21,62**	25,28**
OPAJ10-3	19	14	19	18	25	14	1,14ns	1,14ns
OPAJ10-4	21	12	23	14	16	23	3,91ns	3,91ns
OPAJ10-5	31	2	34	3	36	3	0,32ns	0,32ns
OPAJ10-6	10	23	15	22	17	22	1,79ns	1,81ns
OPAJ10-7	29	4	30	7	35	4	0,75ns	0,74ns
OPAJ12-1	31	8	34	5	0	39	71,76**	89,01**
OPAJ12-2	25	14	30	9	22	16	3,02ns	3,02ns
OPAJ12-3	35	4	32	7	38	0	6,05*	7,33**
OPAJ12-4	38	1	36	3	37	1	1,39ns	1,31ns
OPAJ12-5	16	23	15	24	21	17	2,51ns	2,51ns
OPAJ12-6	38	1	40	0	33	5	8,43*	9,58*
OPAJ15-1	38	0	35	4	37	0	5,28ns	5,02ns
OPAJ15-2	35	3	38	1	29	8	6,68*	6,68*
OPAJ15-3	39	0	35	4	36	1	6,63*	7,51*
OPAJ15-4	6	32	10	29	15	22	5,42*	5,23*
OPAJ15-5	0	39	10	29	23	14	36,50**	45,36**
OPAJ15-6	39	0	38	1	38	0	2,99ns	3,32ns
OPAJ15-7	12	26	21	18	31	6	20,15**	21,37**
OPAJ15-8	35	3	32	7	36	1	5,81ns	6,36**
OPAJ15-9	0	39	15	24	17	20	23,40**	33,24**
OPAJ15-10	31	7	35	4	38	0	8,31*	11,44**
OPAJ15-11	29	9	22	17	33	4	9,23**	9,44**
OPAJ15-12	0	39	0	40	30	7	86,99**	98,09**
OPAJ15-13	37	1	36	3	18	19	31,18**	30,54**
OPAJ15-14	22	16	26	13	31	6	5,85ns	6,16*
OPAK03-1	31	8	23	16	23	14	4,04ns	4,21ns
OPAK03-2	15	24	15	24	12	25	0,44ns	0,44ns
OPAK03-3	36	3	23	16	38	0	26,91**	29,64**
OPAK03-4	23	16	15	24	38	0	33,36**	44,72**
OPAK03-5	27	12	10	29	6	31	25,83**	26,33**
OPAK18-1	10	29	6	33	6	33	2,26ns	2,17ns
OPAK18-2	35	4	36	3	37	2	0,46ns	0,45ns
OPAK18-3	40	0	37	2	32	7	10,74**	12,37**
OPAK18-4	32	7	32	7	38	1	5,29ns	6,38*
OPAK18-5	31	8	20	19	10	29	21,44**	22,056**

n.s.: não significativo;

\*: significativo a 5% de probabilidade;

\*\*: significativo a 1% de probabilidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAGARD, J.E.; KRUTOVSKII, K.V.; STRAUSS, S.H. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. **Hereditiy**, v.81, p.69-78, 1998.
- JACOBSON, M. Meliaceae. In: USDA. **Insecticides from plants: a review of the literature, 1954-1971**. Washington: Agricultural Research Service, 1975. p.57-60. (Agriculture handbook, 461).
- MANLY, B.J.F. **The statistics of natural selection**. London: Chapman and Hall, 1985. 450p.
- MORI, E.S. **Estrutura genética e populações naturais de canafístula *Peltophorum dubium* (Spreng) Taub**. Botucatu, 2000. 145p. Tese (Livre-docência). Faculdade de Ciências Agrônomicas. Universidade Estadual Paulista
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.70, p.3321-3323, 1973.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.87, p.583-590, 1978.
- PERECIN, M.B. **Diversidade genética em populações naturais de espécies de espinheira-santa, *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex. Reiss. (Celastráceae)**. Piracicaba, 2000. 134p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo
- RODRIGUEZ, H.C. **Efeito de extratos aquosos de Meliaceae no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**. Piracicaba, 1995. 100p. Tese (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo
- ROEL, A.R. **Efeito de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) na sobrevivência e desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidadae)**. Piracicaba, 1998. 115p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo
- TORRECILLAS, S. **Efeito de extratos aquosos de *T. pallida*, Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidadae) criada em diferentes genótipos de milho**. Piracicaba, 1997. 141p. Tese (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v.16, p.97-159, 1931.
- YUN, R.; ZHONG, M.; WANG, H.X.; WEI, W.; HU, Z. A.; QIAN, Y.Q. **Acta-botanica-Sinica**, v.40, p.169-175, 1998.