

# ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *PSEUDOPIPTADENIA CONTORTA* COM MARCADORES CPSSR NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

**Aluno: Felipe Baumgarten Krebs Monteiro**  
**Orientador: Vítor Hugo dos Santos Gomes Maia**

## Introdução

A espécie *Pseudopiptadenia contorta* (DC.) G.P.Lewis & M.P.Lima, pertencente à família Leguminosae, tem distribuição muito ampla sendo encontrada em ambientes do domínio da Caatinga arbórea, em matas de Restinga e nas formações da Floresta Atlântica até os 900m [1]. O seu porte é variável, nas formações do domínio Florestal Atlântico são bem mais altas (20 a 30 m) que na restinga e na caatinga [2]. Em levantamentos florísticos e estruturais realizados em diferentes formações do domínio Florestal Atlântico, *P. contorta* é uma das 10 espécies com maior frequência relativa [3]. A espécie apresenta sistema de auto-incompatibilidade, os polinizadores são as abelhas de pequeno porte (*Partamona criptica* e *Apis melifera*) e as sementes são dispersas pelo vento [4]. O desmatamento de áreas fez com que se tornassem fragmentadas atingindo de forma negativa o tamanho populacional e na variabilidade genética, podendo levar à um processo de extinção.

Os efeitos genéticos associados à fragmentação das populações são primariamente uma consequência do fluxo gênico restrito, endogamia e deriva, e geralmente resultam em uma diminuição da diversidade genética dentro das populações impactadas. O conhecimento dos níveis e padrões de diversidade genética em populações fragmentadas é crucial para a compreensão dos efeitos da destruição do habitat e para a formulação de medidas mitigadoras apropriadas.

## Objetivos

O presente estudo tem por objetivo determinar a estrutura genética em populações naturais de *Pseudopiptadenia contorta* por meio da análise de locos microssatélite do genoma do cloroplasto e verificar se há diferença significativa na estrutura genética em populações no Estado do Rio de Janeiro.

## Metodologia

Foram amostradas três populações representativas das diferentes altitudes de ocorrência da espécie no estado do Rio de Janeiro. Foram coletados folhas ou amostras de câmbio de 30 indivíduos no Tinguá, 26 indivíduos do Parque da Cidade (Floresta da Tijuca) e 16 indivíduos do Parque Nacional do Itatiaia. Foram. As amostras foram armazenadas em sílica-gel e, depois de secas, foram submetidas à extração de DNA segundo o método de Doyle & Doyle (1987) [5]. A verificação da extração e quantificação do DNA foi feita em gel de agarose 1 % em TAE.

Foram amplificadas diferentes loci de microssatélites de cloroplasto, utilizando inicialmente os dez pares de iniciadores universais para angiospermas previamente desenvolvidos [6] para análise de cpSSR em tabaco. Todos os indicadores foram testados em reações de PCR com gradiente de temperatura (50-55°C), utilizando o DNA de um indivíduo

aleatoriamente selecionado, a fim de se obter a temperatura de anelamento ( $T_a$ ) ótima para cada par de iniciadores.

As reações de PCR foram feitas em volume final variável de 25  $\mu$ L, contendo 1  $\mu$ L de DNA diluído 20 vezes, GoTaq® Green Master Mix (Promega), seguindo as instruções do fabricante e 10 pmol de cada iniciador. O iniciador “Forward” de cada par foi marcado com um fluoróforo para posterior análise de tamanho dos fragmentos amplificados em sequenciador automático. Para as reações de amplificação, foi utilizado o seguinte ciclo: 95°C por 5 min, 31 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 51 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e uma extensão final de 72 °C por 7 min. Com o intuito de verificar a amplificação por PCR, 10  $\mu$ L de cada reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. Antes da amplificação, foram testados 10 primers, no qual 5 funcionaram para todas as amostras coletadas.

### Resultados e Conclusões

A extração de DNA se mostrou bem-sucedida para todas as amostras coletadas até o momento. Além disso, os primers utilizados na amplificação foram ccmp1, ccmp2, ccmp3, ccmp4 e ccmp7, entretanto, apenas o ccmp7 ainda não foi amplificado para análises de genotipagem das amostras. Ademais, até o momento, a amplificação dos locos cpSSR foi bem-sucedida para o restante dos primers com todas as amostras.

As próximas etapas do presente trabalho serão a coleta de indivíduos em uma população de restinga; a amplificação do primer ccmp7 em todas as amostras, incluindo a população a ser coletada; e, finalmente, a genotipagem das amostras para análises de diversidade genética.

### Referências

- 1 - MORIM, M.P. Leguminosae arbustivas e arbóreas da floresta atlântica do Parque Nacional do Itatiaia, sudeste do Brasil: padrão de distribuição. **Rodriguésia**. 57: 27–45. 2006
- 2 - LEWIS, G. P. & LIMA, M. P. *Pseudopiptadenia* Rauschert no Brasil. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 30: 43-67. 1989.
- 3 - GUEDES-BRUNI, R.; SILVA NETO, S.J. R.; MORIM, M. P., MANTOVANI, W.. Composição florística e estrutura de trecho de floresta ombrófila densa atlântica aluvial na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**. 57(3): 413- 428. 2006
- 4 - PIRES, J.P.A.; FREITAS, L. Reproductive biology of two tree species of Leguminosae in a Montane Rain Forest in southeastern Brazil. **Flora**. 203: 491- 498. 2008
- 5 - DOYLE, J.J.; DOYLE, J. L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin** 19: 11-15. 1987.
- 6 - WEISING K. & GARDNER R.C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome** 42:9–19. 1999