

EVIDÊNCIAS FILOGEOGRÁFICAS DE *T.aurea* (BIGNONEACEAE), UMA ESPÉCIE ARBÓREA DO CERRADO.

Suelen Gonçalves RABELO¹, Rosane Garcia COLLEVATTI¹.

¹Universidade Federal de Goiás, CP 131. Goiania, Goiás. Brasil. 4001-970.

Palavras chave: Cerrado, caraibeira, cpDNA.

rosanegc68@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil (Klink & Machado, 2005), ele ocupa 2,0 milhões de Km² o que representa 23% do território nacional. Este bioma é constituído de uma vegetação heterogênea compreendida por Floresta Estacional, Matas de Galeria e Ciliar, veredas, vegetações savânicas com arbustos, árvores de pequeno porte (cerrado *sensu stricto*) e campos (Furley & Ratter, 1988). A biodiversidade do Cerrado é tão elevada que esse bioma é considerado um dos *hotspots* mundiais da biodiversidade (Myers et al 2000), 44% das 7000 espécies de plantas são endêmicas isso significa 12% das espécies totais do Brasil, nesse sentido o Cerrado é a mais rica savana tropical do mundo (Klink & Machado, 2005). No entanto essa diversidade está negligenciada entre 1970 e 1975, o desmatamento médio no Cerrado foi de 40.000km² por ano – 1,8 vezes a taxa de desmatamento da Amazônia durante o período 1978–1988 (Klink & Moreira, 2002). Tendo em vista os dados supracitados podemos constatar que se faz necessários maiores esforços para a conservação do Cerrado e das espécies que nele habitam.

A família Bignoniaceae é uma das mais diversas nos neotrópicos apresentando cerca de 600 espécies. Dessa forma, pode ser considerada como um modelo apropriado para o estudo da evolução da diversificação que deu origem a incrível diversidade de espécies nas comunidades de plantas nos trópicos (Gentry, 1990). *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore (sin. *T. caraiba*), conhecida popularmente como paratudo ou caraibeira, é uma espécie de cerrado que possui distribuição geográfica ampla no arco nordeste-sudoeste, ocorrendo desde a Caatinga, Cerrado, Pantanal, até os limites do Chaco (Oliveira-Filho & Ratter, 1995). Em sua distribuição ocorre em solos bem drenados no cerrado *sensu stricto* e em solos mais úmidos periodicamente encharcados em cerrado parque, como por exemplo, no Pantanal mato-grossense, do Araguaia e de Flores no Rio Paranã. Devido a sua ampla distribuição essa espécie é apropriada para estudos

das mudanças climáticas ocorridas ao longo do tempo e as associações históricas e geográficas das espécies no Cerrado.

Sabe-se que oscilações do clima durante o terciário afetou a distribuições das espécies, levando a extinção de algumas populações locais e estimulando a evolução e especiação de alguns grupos (Comes and Kadereit, 1998). Estudos filogeográficos têm sido usados para investigar os efeitos das mudanças climáticas do passado sobre a estrutura genética em espécie de animais e plantas (e.g. Collevatti et al, 2003, 2009; Lorenz-Lemke et al, 2009; Taberlet et al, 1998). Pois, filogeografia é um campo de estudo que se preocupa com os princípios e processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas, a níveis intraespecíficos (Avice, 1987).

Dessa forma esse projeto tem como objetivo o estudo dos padrões filogeográficas de *T. aurea* e suas associações históricas e geográficas no Cerrado, como uma ferramenta para a conservação desse bioma, para tanto se fez necessário otimizar as temperaturas de anelamento dos *primers*, o protocolo da reação de PCR(reação em cadeia da polimerase) e da reação de seqüenciamento.

MATERIAL E METODOS

Para esse trabalho foram coletadas folhas expandidas de 420 indivíduos compreendidos em 20 populações, amostradas de forma a abranger distribuição geográfica da espécie. As populações são: Águas Emendas/DF, Pandeiros/MG, Grandes Sertões Veredas/MG, Serra do Cipó - Sumidouro/MG, Ibiá/MG, Sete Cidades/ PI, Santa Filomena/PI, Fazenda Araguaia/GO, Vila Boa/GO, Fátima/GO, Portelândia/GO, Serra Dourada – Goiás Velho/GO, Parque Nacional de Emas/GO, Santa Terezinha de Goiás/GO, Serra da Bodoquena/MS, Itacaíu/MT, Barra do Garça/MT, Chapada Guimarães/MT, Barreiras/BA. As populações 21 foram georreferenciamento para posterior construção de um mapa de distribuição das coletas.

O DNA das folhas foi extraído utilizando o método de CTAB 2% descrito por Doyle & Doyle (1987) e diluído a uma concentração de 3ng/μL para assim ser utilizado na triagem dos locos de cpDNA.

Primeiramente otimizamos a temperatura de anelamento e o protocolo da PCR dos *primers*, *trnS-trnG2S*; *psbA-trnH*; *ycf06-trnC*; *trnT-trnD*; *trnL-trnF*; *rpL16 F+R*; *rpS16 F+R*; *rpL12-rpS20*, *ITS 75/92*. Dentre essas regiões estão oito

marcadores de DNA cloroplastidial e uma região de nrDNA. Nessa etapa usamos quatro indivíduos amostrados aleatoriamente nas populações. A amplificação foi feita em termocicladores GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA), sob as seguintes condições: 94°C por 3min (1 ciclo), 94°C por 1min, X por 1 min (temperatura de anelamento do primer), 72 °C por 1 min 30 seg (35 ciclos), por 72°C por 10 min (1 ciclo). Assim verificamos quais os *primers* que não amplificariam.

Os produtos oriundos da otimização da PCR foram usados para posterior otimização da concentração de *primer* e DNA usados na reação de sequenciamento. Para verificar a otimização da reação de seqüenciamento os fragmentos amplificados foram sequenciados em sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, CA) utilizando o kit de sequenciamento DYEnamic™ ET terminator (GE, Sweden).

As regiões usadas nesse trabalho apresentam variação nas taxas de polimorfismo para diferentes espécies (Shaw, 2005). Por isso, foi necessário triar quais as regiões possuem polimorfismo que respondem as questões propostas nesse trabalho.

Nessa etapa a reações de PCR e sequenciamento otimizadas seis indivíduos amostrados aleatoriamente nas populações foram amplificados e sequenciados para que a triagem dos locos fosse feita. As seqüências foram analisadas e as fitas consenso montadas, editadas utilizando o *software* SeqScape 2.1 (Applied Biosystems, CA) e alinhadas utilizando o programa CLUTALW (Thompson et al., 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação de PCR foi otimizada para todos os nove *primers*, de acordo com o protocolo a seguir: 2 µL de Tampão 10x, 2 µL de dNTP 2,5mM, 2 µL de BSA 2,5mg/mL, 0,3 µL de Taq 5U, 5 µL de DNA 3ng/ µL, 1,5 µL de Primer F 1 µM, 1,5 de primer R 1,5 µM e 5,7 µL de H₂O contabilizando 20 µL de volume total, no entanto, o *primer* ITS 75/92 não amplificou com o uso de BSA, assim, este foi substituído por DMSO, na mesma quantidade do BSA. O DMSO é também usado para inibir estruturas secundárias na fita de DNA molde. A temperatura de amplificação dos *primers* variou de 50°C para *psbA-trnH* a 66°C para *trnT-trnD*, assim, somente a temperatura de anelamento do *primer* que variou.

Dos nove *primers* seqüenciados apenas três regiões não-codificantes, *psbA-trnH*, *trnS-trnG2S*, *ycf06-trnC* e a região nuclear, *ITS 75/92*, foram adequadas para acessar os padrões filogeográficos de *T. aurea*. As regiões não-codificantes apresentaram fragmentos de até 750 pb e para a região nrDNA o ITS 75/92600 pb. O polimorfismo nas regiões pode ser detectado com a análise do alinhamento das mesmas. O alinhamento das sequências da região intergênica *psbA-trnH* mostrou polimorfismo principalmente gerado por indels (inserção/deleção) entre.

COCLUSÃO

Das nove regiões testadas todas amplificaram satisfatoriamente. Destas, quatro apresentaram polimorfismo suficiente para acessar os padrões filogeográficos e as associações históricas e geográficas da distribuição de *T. aurea* no Cerrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** **18**, 489-522.
- Avice JC (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. **Jornal of Biogeography** **36**, 3-15.
- Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD (2003). Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology** **12**, 105-115.
- Collevatti RG, Rabelo SG, Vieira RF (2009). Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. **Annals of Botany** **104**, 655-664.
- Comes HP, Kadereit JW (1998). The effects of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. **Trends in Plant Science** **3**, 432-438.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** **12**, 13-15.
- Furley PA, Ratter JA (1988) Soil resource and plant communities of the central Brazilian cerrado and their development. **Journal of Biogeography** **15**, 97-108.
- Gentry AH (1990). Evolutionary patterns in Neotropical Bignoniaceae. **Memoirs of the New York Botanical Garden** **55**, 118-129.

- Klink CA, Machado RB (2005) Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, 19,707-713.
- Klink, C.A. & A.G. Moreira. 2002. **Past and current human occupation and land-use**. In: P.S. Oliveira & R.J. Marquis (eds.). The Cerrado of Brazil. Ecology and natural history of anetropical savanna. pp. 69-88. Columbia University Press, New York.
- Lonrenz-Lemke A P, Muschner VC, Bonatto AL, Cervi AC, Salzano MF, Freitas LB (2005). Phylogeographic Inferences Concerning Evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) Based on ITS (nrDNA) Variation. **Annas of Botany** **95**, 799-806
- Oliveira-Filho AT, Ratter JA (1995). A study of the origin of Central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. **Edinburgh Journal of Botany** **52**,141-194.
- Ramos ACS, Lemos-Filho JP, Ribeiro RA, Santos FR, Lovato MB (2007) Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of Quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. **Annals of Botany** **100**, 1219–1228.
- Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S (1997). The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany** **80**, 223-230.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB (2005). The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany** **92** (1), 142-166.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. **Molecular Ecology** **7**, 453-464.

Órgãos Financiadores: Capes, CNPq, UFG.