

Estudo de redes de haplótipos de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae) baseado em *psbA-trnH*

João Paulo de Freitas^{1,2}, Jéssika Horrana de Moraes², Lara Garcia da Silva², Mariana Fontes Magalhães², Sabrina do Couto de Miranda³, Plauto Simão de Carvalho^{3,4}

¹Aluno de Iniciação Científica da UEG (PBIC/UEG), ²Alunos do curso de Agronomia (UEG), ³Botânica, Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Palmeiras de Goiás, ⁴Professor orientador, plauto.decarvalho@gmail.com

Blepharocalyx salicifolius (Kunth) O. Berg, apresenta ampla distribuição latitudinal na América do Sul, principalmente em território brasileiro e ocorre tanto em Cerrado quanto em Floresta Atlântica. Estudos filogenéticos posicionaram esta espécie como grupo irmão de todas as mirtáceas neotropicais (Tribo Myrteae) e, mantendo-se esta posição filogenética pode ser considerada representante vivo de um clado basal de Myrtaceae Sul Americanas. Por este motivo, esta espécie pode trazer consigo informações importantes quanto à história biogeográfica da adaptação de grupos taxonômicos essencialmente florestais ao ambiente savânico. Para entender a distribuição geográfica e relações filogenéticas entre haplótipos, filogenias intra-específicas foram inferidas utilizando-se median-joining network analysis baseadas em critério de parcimônia. A análise mostrou a distribuição de haplótipos dos indivíduos analisados e estrutura que mantém a separação de grupos que ocorrem no Planalto Central e Florestas Estacionais. Este resultado sugere uma importante divergência entre as populações desta espécie, resultado que pode colaborar para entender a relação evolutiva entre a dinâmica de biomas e processos de diversificação para Myrtaceae.

Palavras-chave: rede de haplótipos, botânica, evolução.

Introdução

A espécie *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, objeto de estudo da proposta de pesquisa, apareceu como grupo irmão de todas as mirtáceas neotropicais (Lucas *et al.* 2007), correspondente à tribo Myrteae. Apesar da ampla distribuição latitudinal, não trata-se de uma espécie frequente nos ecossistemas onde ocorre (Landrum 1986). O reconhecimento de linhagens genealógicas por meio de construção de redes de haplótipos, com a seleção de marcadores corretos, podem evidenciar possíveis estrutura geográfica da distribuição de linhagens genealógicas em populações de *B. salicifolius*. É provável que os padrões de

distribuição e diversificação de linhagens de *B. salicifolius* pode fornecer informações importantes sobre a origem e diversificação da família Myrtaceae na região Neotropical.

O objetivo deste estudo foi trabalhar técnicas de construção de filogenias de linhagens genealógicas por meio da reconstrução de redes haplotípicas e o reconhecimento de possível estruturação geográfica na distribuição das linhagens obtidas por meio de sequências de DNA de regiões de *psbA-trnH* obtidas de indivíduos de diferentes populações de *B. salicifolius*.

Material e Métodos

Populações amostradas e extração de DNA – A partir do levantamento prévio das áreas de ocorrência de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae) foram realizadas coletas botânicas em 13 localidades. As amostras de folhas foram preservadas em sílica gel (Chase & Hills 1991) para estudos moleculares. Em cada uma destas populações 5 a 30 indivíduos foram aleatoriamente selecionados para coleta de folhas expandidas que foram estocadas a -80°C . A extração do DNA genômico seguiu protocolo padrão com CTAB (*hexadecyl trimethyl ammonium bromide*) (Doyle & Doyle, 1987). Estes dados foram obtidos durante o doutoramento do coordenador do projeto de pesquisa principais ao qual este plano de trabalho está inserido. No total 13 populações foram coletadas ao longo de sua distribuição geográfica e 32 representantes destas diferentes populações foram selecionados (Tabela 1).

Tabela 1: Códigos das amostras utilizadas de *Blepharocalyx salicifolius*.

Código amostra	Nome população	Estado	Código amostra	Nome população	Estado
ARA658	Araguari	MG	PIN552	João Pinheiro Alto	MG
ARA659	Araguari	MG	POU639	Paraíso/Pouso Alto	GO
CAX581	Caxias do Sul Centro	RS	POU640	Idem Santana da Boa Vista	GO
COU435	Olímpico/UnB Centro	DF	SAN558	Idem	RS
COU441	Olímpico/UnB	DF	SAN559	Idem	RS
CRI444	Cristalina	GO	URU605	Urubici	SC
CRI455	Cristalina	GO	URU607	Urubici	SC
JAQ569	Jaquirana	RS	URU615	Urubici	SC

JAQ573	Jaquirana	RS	URU616	Urubici	SC
LEN656	Lençóis	BA	URU620	Urubici	SC
LEN657	Lençóis	BA	VAC634	Vacaria	RS
LEN660	Lençóis	BA	VAC636	Vacaria	RS
				Mairana/La	
LEN661	Lençóis	BA	YUN665	Yunga	Bolívia
PAR531	Paracatú	MG	YUN666	Idem	Bolívia
PAR535	Paracatú	MG	YUN667	Idem	Bolívia
PIN545	João Pinheiro	MG	YUN669	Idem	Bolívia

Marcador molecular utilizado – Para as análises de redes de haplótipos foi utilizado o marcador cloroplastidial *psbA-trnH* (Tabela 2). As condições otimizadas de amplificação das regiões selecionadas neste estudo foram 4 min à 94°C; 30 ciclos de 1 min à 94°C, 1 min à 48°C, 2 min e 30 segundos à 72°C.

Tabela 2: Marcador e *primers* utilizados.

Marcador Molecular	Primer	Sequência de DNA 5' – 3'	Referência
<i>psbA-trnH</i>	psbA	CGAAGCTCCATCTACAAATGG	Hamilton
espaçador	trnH	ACTGCCTTGATCCACTTGGC	(1999)
intergênico	(GUG)		

Alinhamento das sequências e geração da rede de haplótipos – A rede de haplótipos foi construída com o auxílio dos programas DNAsp, para montagem da matriz haplotípica (Librado & Rozas 2009), e o programa Network 4.2.0.1 para construção da filogenia intra-específica via *medianjoining network analysis* baseadas em critério de parcimônia (Bandelt *et al.* 1999). Os haplótipos do grupo teste de *B. salicifolius* foram gerados a partir da região *psbA-trnH*. Este recurso foi utilizado para entender a distribuição geográfica e relações filogenéticas entre haplótipos de *B. salicifolius* com base em *psbA-trnH* e possibilitou reconhecer combinações únicas de estados alélicos na referida região.

Resultados e Discussão

A análise de Network mostrou a distribuição de haplótipos dos indivíduos analisados de *B. salicifolius*. Esta estrutura mantém a separação de grupos que ocorrem no Planalto Central e Florestas Estacionais (Figura 1). A topologia gerada mostra grupos populacionais consistentes, a citar populações de cerrado sentido restrito (Planalto Central – GO/MG) e populações de Floresta Estacional Semi-

Decidual de coletas em Lençóis (BA). Os indivíduos que pertencem a Florestas Estacionais Semi-Deciduais Mistas que ocorrem nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina ficaram agrupados em haplótipos relacionados.

Lençóis, população representante de Florestas Estacionais Semideciduais apresentou apenas um haplótipo. Populações de cerrado sentido restrito deve apresentar relações menos complexas com poucas bases respondendo pela formação de diferentes linhagens. Já coletas dos Yungas Bolivianos deve apresentar rede mais complexa de distribuição de haplótipos, uma vez que possuem indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo em manchas de Matas de Galeria sob matriz de floresta estacional semidecidual com araucárias (Figura 1).

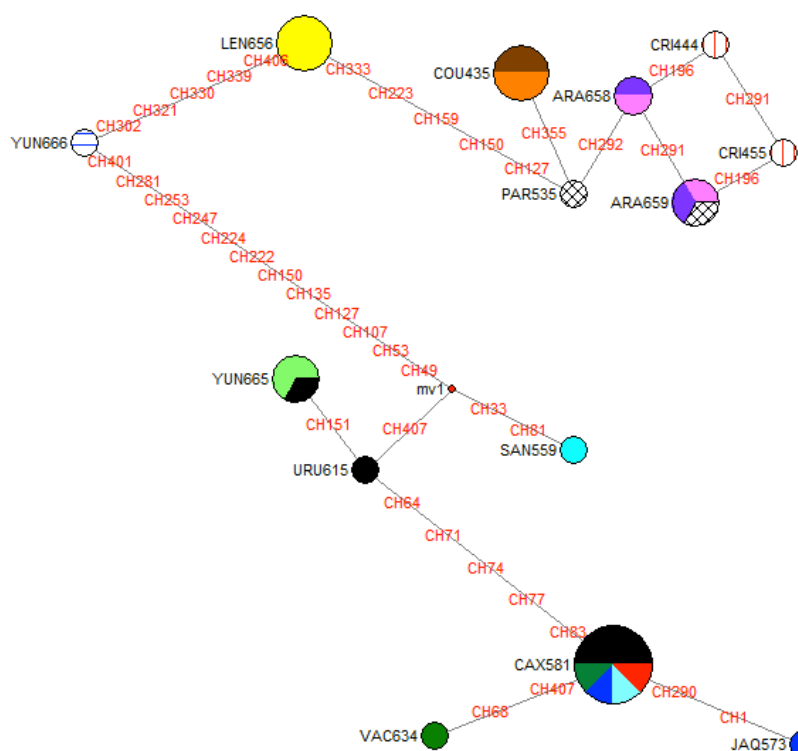


Figura 1: *Median-joining network* mostrando a distribuição de haplótipos baseados em sequência de *psbA-trnH* de 32 indivíduos de *B. salicifolius*. O tamanho da circunferência é proporcional a frequência do haplótipo. *Median vector*=mv.

Considerações Finais

Concluimos que *psbA-trnH* oferece indícios de estruturação geográfica entre as populações estudadas e fortalece a estrutura que separa populações da região do Planalto Central do bioma Cerrado com populações da região sul do Brasil e Bolívia

(Floresta Estacional). Os resultados encontrados nesta análise de redes de haplótipos permitiu interpretar compartilhamento de linhagens entre diferentes populações. Esta abordagem é útil no estudo de dados intraespecíficos, uma vez que podem apresentar relações filogenéticas mais difíceis de serem interpretadas por árvores filogenéticas convencionais.

Referências

- BANDELT, H. J., P. FORSTER, and A. RÖHL. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10331250> [Accessed December 4, 2012].
- CHASE, M. W., and H. H. HILLS. 1991. Silica Gel: An Ideal Material for Field Preservation of Leaf Samples for DNA Studies. *Taxon* 40: 215–220. Available at: <http://www.jstor.org/stable/10.2307/1222975> [Accessed January 26, 2013].
- DOYLE, J. J., and J. L. DOYLE. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus (Madison)*. 12: 13–15. Available at: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10003365693/> [Accessed August 20, 2011].
- HAMILTON, M. B. 1999. Primer Notes: Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Mol. Ecol.* 8: 513–525. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-294X.1999.00510.x> [Accessed January 16, 2013].
- LANDRUM, L. R. 1986. *Campomanesia*, *Pimenta*, *Blepharocalyx*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhinium*, and *Luma* (Myrtaceae). *Flora Neotrop.* 45: 1–178. Available at: <http://www.jstor.org/stable/4393795> [Accessed May 9, 2011].
- LIBRADO, P., and J. ROZAS. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- LUCAS, E. J., S. A. HARRIS, F. F. MAZINE, S. R. BELSHAM, E. M. NIC LUGHADHA, A. TELFORD, P. E. GASSON, and M. W. CHASE. 2007. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56: 1105–1128. Available at: <http://www.jstor.org/stable/10.2307/25065906?origin=crossref> [Accessed September 2, 2012].