

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
INSTITUTO DE BIOLOGIA/DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

Reprodução e variabilidade genética de populações de *Tibouchina hatschbachii*
(Melastomataceae), no Paraná e sul de São Paulo

Aluno: Fabiano Rodrigo da Maia

**Orientador: Prof. Dr. Renato Goldenberg (Departamento de Botânica-IB-
UNICAMP/UFPR)**

Abril/2013

INTRODUÇÃO

Os sistemas reprodutivos tem grande impacto sobre a estruturação e distribuição da variação genética dentro e entre populações de uma mesma espécie (Eckert *et al.* 2008; Kageyama 2009).

O gênero *Tibouchina* pertence à tribo Melastomeae, sendo o gênero neotropical de mais ampla distribuição e com maior número de espécies com fruto capsular dentro das Melastomatáceas (Renner 1993). No Brasil, estudos sobre a biologia reprodutiva e da polinização foram conduzidos nas espécies *T. pulchra* (Goldenberg & Varassin 2001; Couto-Pereira *et al.* 2011; Brito & Sazima 2012), *T. cerastifolia* (Goldenberg & Varassin

2001; Franco 2007), *T. frigidula* (Santos 2012), *T. clinopodifolia* e *T. gracilis* (Franco 2007), *T. heteromalla* (Santos 2012) e *T. semidecandra* (Goldenberg & Varassin 2001), *T. sellowiana* (Goldenberg & Varassin 2001; Couto-Pereira *et al.* 2011; Maia *et al.* 2013) e *T. stenocarpa* (Goldenberg & Shepherd 1998; Santos 2012), *T. papyrus* (Santos 2012), *T. trichopoda* (Pinheiro 1995), *T. vilosissima* (Santos 2012) e indicam que estas espécies são autocompatíveis, mas dependem dos polinizadores para sua reprodução. Inclusive um estudo recente realizado nos campos rupestres em Tibagi, no Paraná, mostra esse mesmo sistema reprodutivo para uma população de *T. hatschbachii* (Maia *et al.* 2013).

A variabilidade genética de populações de plantas que ocupam habitat descontínuos, semelhantes a ilhas oceânicas, em termos de isolamento espacial e restrição de fluxo gênico, são instrumentos importantes para promover o entendimento dos padrões de distribuição das espécies bem como para a análise dos processos evolutivos (Avice, 1994).

Tibouchina hatschbachii (Wurdack) (= *Tibouchina marumbiensis* Wurdack) é uma espécie endêmica no Brasil (Meyer 2010), e apresenta populações restritas a determinadas regiões, ocorrendo apenas no estado do Paraná e sul do estado de São Paulo em Refúgios Altomontanos associados à Floresta Ombrófila Densa, na Serra do Mar, e também em Estepe Gramíneo-Lenhosa, sobre afloramentos rochosos, nas regiões de Ponta Grossa, Tibagi, Jaguariaiva e Sengés (Meyer *et al.* 2009).

Objetivos

Tendo em vista o contexto apresentado, estudos de variabilidade genética entre as populações desta espécie podem ajudar a entender padrões de fluxo gênico (estimado pela taxa de migração) entre as populações. Desta forma, o objetivo deste projeto será utilizar marcadores ISSR para caracterizar a variabilidade genética das populações de *T. hatschbachii*, em campos de altitude, associado à Floresta Ombrófila Densa Alto Montana, e nos campos rupestres presente em Estepe Gramíneo-Lenhosa.

Assim, este projeto pretende ampliar o conhecimento da reprodução em ambientes rupestres em diferentes condições ambientais (refúgios altomontanos e estepe gramíneo-lenhosa), e genéticos sobre *Tibouchina hatschbachii* distribuída em campos rupestres e campos de altitude no Paraná, fornecendo informações importantes sobre a biologia reprodutiva, dinâmica do pólen, biologia da polinização, estruturação e variabilidade genética de populações desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem populacional dos dados reprodutivos

As três populações de *T. hatschbachii* que serão estudadas, encontram-se localizadas no estado do Paraná, sendo uma população localizada em Estepe Gramíneo-Lenhosa, na região de Tibagi, em uma área geograficamente central na distribuição da espécie; uma população localizada em áreas de Cerrado e Estepe Gramíneo-Lenhosa, no limite norte de distribuição geográfica da espécie, e outra população localizada em Refúgios Almontanos da Floresta Ombrófila Mista, na Serra do Mar, limite sul de distribuição geográfica da espécie.

Amostragem populacional dos dados genéticos

Sete populações de *T. hatschbachii*, localizadas no estado do Paraná e uma população no sul de São Paulo, serão selecionadas para estudos genéticos. Será amostrado entre 20-25 indivíduos por população, abrangendo a totalidade de distribuição geográfica da espécie. Após a coleta, as amostras de cada indivíduo serão mantidas em sílica gel até a extração do DNA.

Material botânico de todas as populações amostradas será depositados nos herbários UPCB, da Universidade Federal do Paraná, e UEC, da Universidade Estadual de Campinas.

Varição nos traços florais entre as populações

Procurando descrever parâmetros associados ao padrão floral de *T. hatschbachii*, serão considerados: (1) tipo da flor e localização no indivíduo, (2) o horário, processo e duração da antese serão determinados diretamente no campo.

A receptividade será estimada em campo em diferentes períodos do dia, utilizando peróxido de hidrogênio (Dafni 1992; n=5 flores em 5 indivíduos diferentes).

Viabilidade polínica

A avaliação da viabilidade polínica será realizada para cada espécie através da contagem de grãos coloridos em carmin-acético (Kearns & Inouye 1993). Não será feita distinção entre anteras (grandes e pequenas), pois conforme evidenciado por Hoffman & Varassin (2011), ao menos *Tibouchina*, não existe diferença na viabilidade dos grãos.

Serão confeccionadas laminas para cada botão, na qual foram contados, em microscópio óptico, cerca de 200 grãos de pólen, que serão classificados em viáveis (grãos corados) ou inviáveis (grãos não corados) (Kearns & Inouye 1993). Para verificar se existe diferença na viabilidade polínica entre os indivíduos será utilizado ANOVA (Zar 1996).

Crescimento dos tubos polínicos

A verificação da ocorrência de sítio de autoincompatibilidade será realizada por observações de crescimento de tubos polínicos pós-polinização. Esses ensaios reprodutivos serão acompanhados pela comparação do crescimento e tempo de germinação de tubos polínicos derivados de tratamentos de autopolinização manual e polinização cruzada e controle em microscopia de fluorescência (adaptado de Martin 1959). Flores serão ensacadas em pré-antese, sendo coletadas 24/48 e 72 horas após as polinizações. Para cada tratamento serão utilizadas duas flores por indivíduo, em dez indivíduos.

Sistemas reprodutivos

Para o estudo do sistema reprodutivo, serão realizados os seguintes experimentos de polinização manual, em flores previamente ensacadas com *voile* (Radford *et al.* 1974): apomixia – botões em pré-antese serão emasculados e ensacados; autopolinização espontânea – botões serão ensacados sem tratamento posterior; autopolinização manual - o pólen será depositado no estigma da própria flor; polinização cruzada- pólen proveniente de indivíduos diferentes, serão transferidos para o estigma de flores emasculadas; controle – o botão, sem ser submetido a tratamento, será marcado para verificar a formação de frutos sob condições naturais. Após a realização dos tratamentos as flores marcadas serão ensacadas novamente, com exceção do tratamento controle (polinização aberta), sendo acompanhados durante um mês até o amadurecimento dos frutos. Para cada um dos testes serão utilizadas no mínimo 80 flores por tratamento, sendo duas flores para cada tratamento em cada indivíduo, distribuídas em quarenta indivíduos por população. A partir do número de frutos que se desenvolveram até o amadurecimento será estabelecida a taxa de frutificação em cada tratamento.

Será calculado o índice de auto-incompatibilidade (ISI, sensu Zapata & Arroyo 1978), que é a razão entre a produção de frutos entre os

tratamentos de auto-polinização e polinização cruzada, sendo considerado que a razão de 0,25 é o limite superior para espécies auto-incompatíveis.

Germinação de sementes dos tratamentos de polinização

Serão coletados aleatoriamente todos os frutos maduros obtidos nos tratamentos de autopolinização manual, polinização cruzada e polinização natural, em ambas as populações, para comparar o número de sementes produzidas em cada caso. Em laboratório, será obtido o peso total das sementes de cada fruto e o número de sementes em cada fruto será estimado a partir dos valores de peso médio de sementes obtidas por fruto. Destas, quinhentas sementes de cada tratamento e por população serão colocadas para germinar em câmara de germinação em câmaras de germinação, dentro de caixas de gerbox sobre papel filtro umedecido com fotoperíodo de 12 horas e temperatura constante de 27°C, sendo a germinação e o desenvolvimento das plântulas acompanhadas, a cada dois dias, por um mês. Será estimado o tempo de germinação e a proporção de sementes que germinaram.

Amostragem dos polinizadores

O estudo dos visitantes florais será feito por meio de observações focais entre 06:00h às 17:00h, de hora em hora, perfazendo 10 horas/dia durante 5 dias em cada população, totalizando 50 horas de observação por população. Esses dados permitirão estimar a densidade de polinizadores por unidade de tempo (flutuação diária) e por unidade de área (população).

O comportamento, frequência e duração da visita e a forma de contato com as estruturas reprodutivas serão anotadas. Polinizadores que tocarem as estruturas reprodutivas serão considerados polinizadores, caso contrário pilhadores (Inouye 1980).

A coleta dos visitantes florais será feita com rede entomológica, e eles serão sacrificados em acetato de etila e posteriormente enviados para identificação por especialistas (ver agradecimentos) e depositados no Museu de Entomologia Pe. Jesus S. Moure do Departamento de Zoologia da UFPR.

Extração de DNA e amplificação

O DNA total de amostras conservadas em sílica gel das espécies será extraído (Doyle & Doyle 1987). Para investigar estrutura e divergência interpopulacional serão empregados marcadores dominantes do tipo ISSRs. Serão testados de 15 a 20 *primers* e

escolhidos aqueles 6 ou 7 com melhor resolução e polimorfismo. As amostras do DNA genômico serão usadas para amplificação através de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) seguindo o protocolo básico para um volume final de 20µl, contendo: tampão 1X, 2,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,5mM de *primer*, 1 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e cerca de 15 a 150ng de DNA genômico. Para a amplificação dos fragmentos serão padronizadas temperaturas e programas que incluem etapas de desnaturação inicial a 94°C por 1,5 min, seguido de 36 ciclos de amplificação a 94°C por 40 segundos a desnaturação, intervalos de 47° a 50°C por 45 segundos para o anelamento, 72°C por 1,5 minuto para a extensão, seguindo, após a etapa de ciclagem, uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Análise da variabilidade genética das populações

Os locos de ISSR serão codificados como presença (1) ou ausência (0) de uma banda para a construção de uma matriz de fenótipos. Serão consideradas homólogas todas as bandas de igual tamanho molecular em um mesmo *primer* (Williams et al., 1993; Thormann et al., 1994; Rieseberg, 1996). Serão avaliados parâmetros iniciais de variabilidade genética como porcentagem de locos polimórficos (*P*) e exclusivos e heterozigosidade média esperada (*H_e*) para as populações e para a espécie. A partir da matriz de fenótipos ISSR, será construída uma matriz de distância euclidiana quadrada e realizada uma análise de variância molecular (AMOVA), utilizando o programa GenAlEx 6.3b para Excel® (Peakall e Smouse, 2012). A AMOVA será utilizada para quantificar a proporção da diversidade genética intraespecífica atribuída à diferenciação interpopulacional. A análise da estrutura genética será feita através do Φ_{ST} (estatística *F* de Wright, 1921). A partir das distâncias de Nei par a par de todas as populações, calculadas pelo GenAlEx 6.3b, será construída uma árvore utilizando *neighbour-joining* através do programa PAUP (Swofford, 2003), e o dendrograma será visualizado através do TREEVIEW (Page, 1996).

Será conduzida análise Bayesiana a partir de simulações de Monte Carlo e Cadeia de Markov (MCMC) para avaliar a estrutura populacional, utilizando genótipos multilocus dos indivíduos amostrados, para detecção de grupos genéticos (*K*) prováveis, assumindo o modelo de populações mistas utilizando o programa STRUCTURE 2.2 (Falush et al., 2007) para marcadores dominantes.

Cronograma de execução das atividades

ATIVIDADES	2013		2014	
	1º	2º	3º	4º
Revisão bibliográfica	x	x	x	x
Seleção das populações	x			
Mapeamento das árvores	x	x		
Trabalho de campo (1º e 2º capítulo) *	x	x	x	x
Coleta de material genético **	x	x	x	
Extração do DNA das amostras	x		x	
Amplificação e eletroforese dos fragmentos de ISSR	x	x	x	x
Análise dos dados			x	x
Apresentação de resultados em congressos		x		x
Redação de artigos científicos				x

* Seguirá o comportamento fenológico de floração e frutificação da espécie em estudo

** Poderão ser acrescentadas mais populações de acordo com o andamento do trabalho

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Awise, J. C. (1994) **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Chapman & Hall, New York.

Brito, V. L. G.; Sazima M. (2012) *Tibouchina pulchra* (Melastomataceae): reproductive biology of a tree species at two sites of an elevational gradient in the Atlantic Rainforest in Brazil. **Plant Systematics and Evolution** **298**: 1271–1279

Couto-Pereira A., Silva J.B., Goldenberg R., Mello G.A.R., Varassin I.G. (2011) Flower color change accelerated by bee pollination in *Tibouchina* (Melastomataceae), **Flora** **206**: 491–497

Dafni A (1992) **Pollination ecology: a practical approach**. Oxford University Press, Oxford

Doyle, J.J.T., Doyle., E.J.L. (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** **12**:13-15

Eckert, C. G.; Samis, K. E.; Loughheed, S. C. (2008) Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. **Molecular Ecology** **17**: 1170–1188

Falush, D., Stephens, J.K., Pritchard (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, 5p. STRUCTURE v.2.2. Website <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html> [acessado em 14/01/2013]

Franco A.M., Goldenberg R., Varassin I.G. (2011) Pollinator guild organization and its consequences for reproduction in three synchronopatric species of *Tibouchina* (Melastomataceae). **Revista Brasileira de Entomologia** **55**:381–388

Goldenberg R, Varassin IG (2001) Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** **24**: 283-288

- Goldenberg, R.; Shepherd, G. J. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in “cerrado” vegetation. **Plant Systematics and Evolution**, v.211, p.13-29, 1998.
- Hoffmann GM, Varassin IG (2011) Variação da viabilidade polínica em *Tibouchina* (Melastomataceae). **Rodriguésia** **62**: 223-228
- Inouye, D. W. 1980. The terminology of floral lacerny. **Ecology** **61**: 1251-1253
- Kearns CA, Inouye D (1993) **Techniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University press of Colorado. 579p
- Maia, F. R. **Sistemas reprodutivos e visitantes florais em Melastomataceae dos campos rupestres no limite sul do Cerrado, Tibagi, Paraná**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2013
- Martin FN (1959) Staining and observation pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Tech** **34**: 125–128
- Meyer, F. S.; Guimarães, P. J. F.; Goldenberg, R. (2009) Uma nova espécie de *Tibouchina* Aubl. (Melastomataceae) e notas taxonômicas sobre o gênero no Estado do Paraná, Brasil. **Hoehnea** **36**: 139-147
- Meyer, F. S., Guimarães, P. J. F., Goldenberg, R. (2010) *Tibouchina* (Melastomataceae) do estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia** **64**: 615-638
- Page, R.D.M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computational and Applied Biosciences** **12**: 357–358
- Pinheiro MCB. 1995. **Biologia da reprodução de cinco espécies de Melastomataceae da restinga de Maricá-RJ**. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo
- Radford, AE (1974) **Vascular plant systematic**. Harper & Row Publishers, Inc., New York, p.891
- Renner, SS (1993) Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. **Nordic Journal of Botany** **13**: 519-540
- Rieseberg L.H., Blackman B.K. 2010. Speciation genes in plants. **Annals of Botany** **106**: 439–455
- Santos, P.M. S., Fracasso, C.M., Santos, M. L., Romero, R., Sazima, M., Oliveira, P. E. (2012) Reproductive biology and species geographical distribution in the Melastomataceae: a survey based on New World taxa. **Annals of Botany** **110**: 667-679
- Swofforf, D. L. (2003) **PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)**, Version 4. Software distribuído por Sinauer Associates, Sunderland

- Thormann, W., Molteni, S., Caslavská, J., Schumtz, A. (1994) Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis. **Electrophoresis** **15**: 3–12
- Zapata TR, Arroyo MTK (1978) Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. **Biotropica** **10**: 221-230
- Zar JH (1996) **Bioestatistical analysis**. Prentice-Hall, New Jersey
- Williams, J. G. K.; Hanafey, M. K.; Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology** **218**: 704-740
- Wright, S. (1921) Systems of Mating II. The effects of Inbreeding on the Genetic Composition of a Population. **Genetics** **6**: 124-143