

## DIVERSIDADE GENÉTICA DA ORQUÍDEA ENDÊMICA E AMEAÇADA *Cattleya granulosa* Lindley NA MATA ATLÂNTICA

Cristiane Gouvea Fajardo<sup>1</sup>  
Fábio de Almeida Vieira<sup>2</sup>

### RESUMO

*Cattleya granulosa* é uma orquídea endêmica da Floresta Atlântica do litoral do Nordeste brasileiro. Atualmente, encontra-se ameaçada de extinção. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de *Cattleya granulosa*, a fim de subsidiar a implantação de planos de conservação da espécie. Foram amostrados 52 indivíduos em três populações, inseridos no bioma Mata Atlântica no Litoral Norte do RN, Nordeste do Brasil. Foram utilizados seis marcadores ISSR, e visualizados 88 locos, todos polimórficos. O valor de PIC para cada iniciador variou entre 0,29 e 0,48. A diversidade genética ( $h$ ) variou entre 0,24 e 0,30 e o índice de Shannon ( $J$ ) variou entre 0,36 e 0,45. A menor distância genética de Nei foi detectada entre as populações Rio do Fogo (RIO) e Maracajaú (MAR) (0,09) e a maior distância genética foi entre as populações de Pititinga (PIT) e Maracajaú (MAR) (0,14). A análise de variância molecular mostrou maior diversidade genética dentro das populações (72%) do que entre as populações (28%). Por meio do dendrograma (método UPGMA), utilizando os valores da identidade genética de Nei, observou-se que há maior semelhança genotípica entre as populações RIO e MAR (0,91). Os padrões de diversidade alélica sugerem que apenas a população PIT sofreu redução no tamanho efetivo populacional. Os resultados obtidos no estudo mostram que apesar da alta variação genética observada nas três populações de *C. granulosa*, a coleta predatória e a expansão imobiliária colocam em risco a integridade da espécie, justificando a necessidade de implantar estratégias de conservação urgentes.

**Palavras-chave:** variabilidade, Marcador ISSR, espécie vulnerável, nordeste brasileiro.

### INTRODUÇÃO

Orchidaceae é uma família que apresenta elevado grau de especialização, e é reconhecida não apenas pelo elevado número de espécies de hábitos epifíticos, mas também pelas inúmeras adaptações à polinização que é predominantemente realizada por insetos (TREMBLAY et al., 2004). Apesar da família apresentar uma distribuição cosmopolita, a distribuição espacial da mesma não é uniforme, uma vez que a maioria das espécies ocorrem predominantemente nos Neotrópicos (PRIDGEON, 1995). As espécies com hábitos epifíticos distribuem-se majoritariamente em regiões tropicais e subtropicais (GIVNISH et al., 2015). Orchidaceae engloba 25.000 espécies (GIVNISH et al., 2015), e é entre as monocotiledôneas a família mais rica em número de espécies. Mesmo sendo abundante, Orchidaceae apresenta

<sup>1</sup> Doutora em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, genegoista00@gmail.com;

<sup>2</sup> Professor orientador: Doutor da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, vieirafa@gmail.com;

elevado número de representantes em vias de extinção, apresentando cerca de 6% das espécies ameaçadas (HOPPER; BROWN, 2007). Assim, torna-se imprescindível investimento em pesquisas que possam auxiliar no controle da minimização de ameaças de tais espécies de orquídeas.

O gênero *Cattleya* possui cerca de 111 espécies, sendo 104 endêmicas do Brasil (FLORA DO BRASIL, 2019). É um dos gêneros da família Orchidaceae que é encontrado exclusivamente em regiões Neotropicais (SOUZA; LORENZI, 2008; VAN DEN BERG et al., 2014), além de ser um dos mais importantes da família por seu alto valor ornamental (PINHEIRO et al., 2012). Devido às coletas predatórias, do crescimento urbano e fragmentação do Bioma Mata Atlântica ao qual o gênero *Cattleya* está inserido, muitas espécies estão ameaçadas de extinção (CÂMARA-NETO et al., 2007; RAMALHO; PIMENTA, 2010; FAJARDO et al., 2017).

A *Cattleya granulosa* é uma epífita, que também pode apresentar hábitos terrestres (FAJARDO et al., 2015). Seu caule possui altura média entre 40 e 60 cm e cresce horizontalmente, ou seja, tem caule rizomatoso com pseudobulbos, ereto e cilíndrico (COSTA, 2010). A espécie *Cattleya granulosa* ocorre na região do litoral brasileiro, é encontrada normalmente em áreas que estão entre 2 a 20 Km da orla marítima, e sua distribuição é restrita ao Bioma Mata Atlântica (CRUZ; BORBA; VAN DEN BERG, 2003). Devido ao estresse provocado por ações antrópicas ao longo dos anos a *Cattleya granulosa* encontra-se na Lista Vermelha da Flora do Brasil. Além disso, a espécie já consta nas listas oficiais de espécies ameaçadas pela CITES (Convenção Internacional sobre o Comércio de Espécies da Flora e Fauna Selvagem em Perigo de Extinção). Segundo a *International Union for Conservation of Nature*, IUCN, a espécie está incluída na categoria de “Vulnerável” (VU) (MARTINELLI; MORAES, 2013; MMA, 2008).

O conhecimento da variação e da estrutura genética têm sido utilizados para subsidiar programas de conservação e mostrar populações prioritárias para a preservação da espécie. Além disso, práticas conservacionistas devem ser feitas a partir de dados demográficos das populações (MARTINELLI; MORAES, 2013). Ramalho e Pimenta (2010) notaram que a destruição do habitat tem sido a maior ameaça para a perpetuação das populações naturais de *Cattleya granulosa*.

Dentre as populações da espécie alvo deste estudo, algumas estão sob ameaça direta de extinção, principalmente em função do isolamento das populações e redução do número de indivíduos, acarretado pelo extrativismo descontrolado e expansão imobiliária. A *Cattleya*

*granulosa* passa por um declínio populacional drástico resultado do alto grau de fragmentação da Floresta Atlântica, em virtude de ações antrópicas (MARTINELLI; MORAES, 2013).

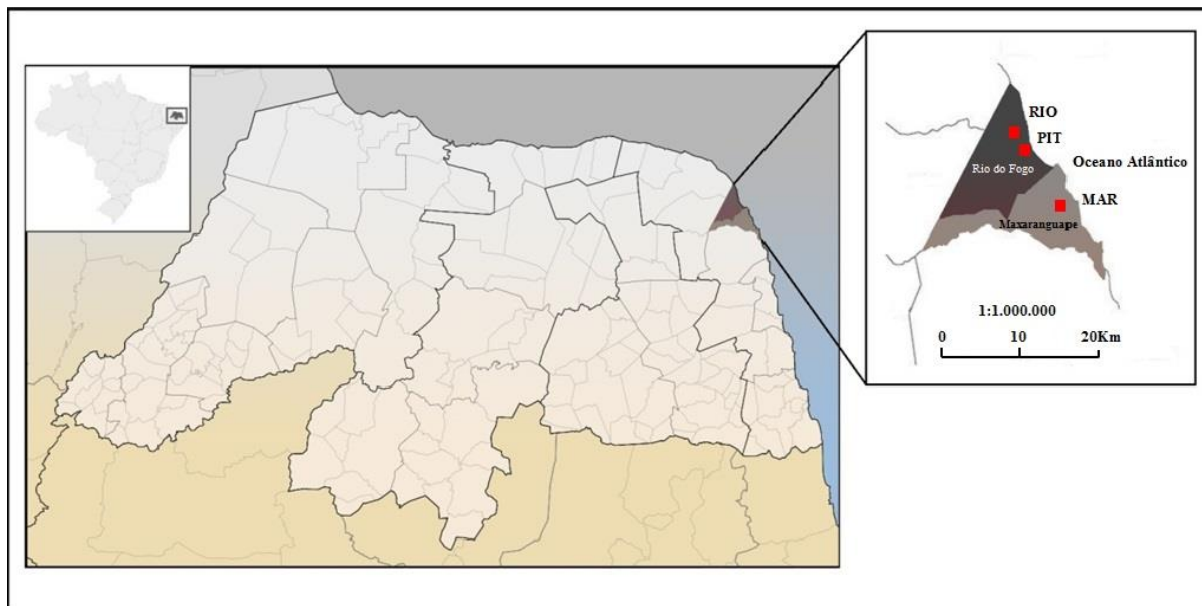
A diversidade genética pode ser determinada através da variedade de alelos e genótipos encontrados dentro de uma população. Essa variabilidade se reflete em características fisiológicas e morfológicas, sendo a base do potencial evolutivo das espécies em resposta às perturbações humanas (MIMURA et al., 2017). Neste sentido, os marcadores moleculares baseados em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) são ferramentas importantes na detecção de polimorfismo entre indivíduos, detectando inúmeras variações a níveis cromossômicos (ADHIKARI et al., 2017). Apesar da existência de estudos relacionados com a quantificação da diversidade genética para *Cattleya granulosa* (FAJARDO; VIEIRA, MOLINA, 2014; FAJARDO et al., 2017), esses ainda são incipientes, considerando a importância de mapear o maior número possível de populações de uma espécie ameaçada. Há necessidade de mais investigações para que se tenha uma visão mais ampla do status de conservação da espécie. Com isso, será possível a elaboração de estratégias preservacionistas, no sentido de assegurar a manutenção das populações remanescentes a longo prazo.

Para verificar a diversidade genética da *Cattleya granulosa* foi utilizado o marcador molecular ISSR (Inter Sequências Simples Repetitivas) que consiste em um método simplificado de caracterização de genótipos. Quando comparado a outros marcadores de DNA, o ISSR confere agilidade na obtenção de níveis elevados de polimorfismo a um menor custo, mantendo a repetibilidade e segurança na visualização do padrão de bandas (ADHIKARI et al., 2017). O objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade genética dentro e entre populações naturais da *Cattleya granulosa* no litoral Norte do Rio Grande do Norte, a fim de subsidiar e manter planos de conservação genética.

## **METODOLOGIA**

### **Área de estudo e amostragem**

O estudo foi realizado em três populações no litoral Norte do Rio Grande do Norte: Pititinga (PIT), Rio do Fogo (RIO) e Maracajaú (MAR) (Figura 1) inseridas em áreas de Floresta Estacional Semidecidual e Floresta de Restingas, pertencentes ao domínio Mata Atlântica (VELOSO; RANGEL-FILHO; LIMA et al., 1991). PIT e RIO estão localizadas no município de Rio do Fogo e MAR está situada no município de Maxaranguape.



**Figura 1.** Localização geográfica das populações naturais da orquídea *Cattleya granulosa*, no Litoral Norte do Estado do Rio Grande do Norte. Populações: Pititinga (PIT), Rio do Fogo (RIO) e Maracajá (MAR).

Foram amostrados 52 indivíduos, sendo 18 pertencentes à população de PIT, 18 à RIO e 16 pertencentes à MAR (Tabela 1).

**Tabela 1.** Municípios, coordenadas geográficas e tamanho amostral das 3 populações de *Cattleya granulosa* no Estado do Rio Grande do Norte.

População	Município	Latitude/Longitude	<i>n</i>
Pititinga	Rio do Fogo-RN	5°22' S / 35°21' O	18
Rio do Fogo	Rio do Fogo-RN	5°21' S / 35°22' O	18
Maracajá	Maxaranguape-RN	5°25' S / 35°19' O	16
<b>Total</b>			<b>52</b>

Como critério, amostraram-se os indivíduos que melhor representassem cada população, conforme a metodologia adotada para outras espécies da família Orchidaceae (CHUNG, 2009), onde não são coletados tecidos foliares de indivíduos menores que 20 centímetros, nem aqueles próximos espacialmente que possam ser propágulos vegetativos do mesmo indivíduo (clone). O acesso ao patrimônio genético pesquisado está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) e identificados pelos números A38EF05.

### Coleta, extração do DNA e PCR

Foram coletadas amostras de folhas jovens e saudáveis, acondicionadas em tubos de 2 mL contendo 10% de CTAB. As amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Genética e Melhoramento Florestal (LABGEM, [www.labgem.com.br](http://www.labgem.com.br)), até o momento da extração do DNA.

O processo de extração de DNA utilizado foi o método descrito por Doyle e Doyle (1987), com algumas adaptações, onde se utilizou: 100 mM de Tris pH 8,0; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA pH 8,0; 2% (p/v) CTAB; 1% (p/v) PVP-40 e 0,2% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol pré-aquecido a  $60^{\circ}\text{C}$  em banho-maria. Após a extração, o DNA foi diluído em TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA mM pH 8,0) com concentração final para o uso de  $50\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ .

A PCR foi realizada usando iniciadores moleculares ISSR da Universidade de British Columbia (UBC primer/iniciador set #9, Vancouver, Canadá). A temperatura de anelamento aplicada foi de  $47^{\circ}\text{C}$  e o mix de PCR foi composto de tampão (10 x), BSA ( $1,0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), dNTP (2,5 mM), iniciador (2  $\mu\text{M}$ ), Taq polimerase ( $5,0\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), DNA e água ultrapura. O volume final da reação foi de 12  $\mu\text{L}$ . As PCRs foram processadas em Termociclador Veriti™, o programa de amplificação das amostras foi a  $94^{\circ}\text{C}$  (5 min), seguidas por 37 ciclos de amplificação, tendo cada ciclo submetido às amostras a  $94^{\circ}\text{C}$  (15 s) em seguida a  $47^{\circ}\text{C}$  (30 s) e, por fim, a  $72^{\circ}\text{C}$  (1 min). Após os ciclos, o processo encerrou-se a  $72^{\circ}\text{C}$  (7 min) e resfriamento a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% (p/v), em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) e corados com GelRed™. Foi utilizado o marcador de peso molecular (Ladder) de 1 kb e os géis foram fotografados sobre fonte de luz ultravioleta com auxílio do equipamento E-Box™ VX2. Foram selecionados os iniciadores com melhor resolução e maior número de fragmentos, excluindo os que apresentaram bandas com fraca intensidade ou pouca definição.

## **Análise dos dados**

### **Valor de PIC**

Os locos contidos nos géis foram genotipados e mediante os dados foi construída uma matriz binária de presença (1) e ausência (0) dos locos. Calculou-se o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) para medir a eficiência dos iniciadores utilizados em mostrar o polimorfismo entre indivíduos, tendo como critério a ausência ou presença de locos. Para calcular o PIC utilizou-se a fórmula proposta por Anderson et al. (1993):  $\text{PIC}_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$ , onde  $P_{ij}$  é a frequência do alelo "j" no marcador "i".

Os parâmetros de variação genética foram avaliados através do software POPGENE versão 1.3 (YEH et al., 1997). Neste software foram calculados: a porcentagem de locos polimórficos (P), o número de alelos observados ( $N_a$ ), número de alelos efetivos ( $N_e$ ), diversidade genética de Nei ( $h$ ) e Índice de Shanon ( $I$ ), para cada população.

### **Estrutura genética populacional**

O software ARLEQUIN 3.5.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) foi utilizado para obter a Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre as três populações de *Cattleya granulosa*. Esta análise estima a diferenciação populacional com base nos dados moleculares e testes de hipóteses sobre tal diferenciação.

Para construção do dendrograma de similaridade genética, foi utilizado o software NTSYS (ROHLF, 1998), pelo método de agrupamento UPGMA (agrupamento não-ponderado aos pares utilizando médias aritméticas), correlacionando as três populações em relação à identidade genética de Nei (1978).

O teste de Mantel foi utilizado no software PC-Ord 4.14 (MCCUNE; MEFFORD, 1997), pelo método de Monte Carlo (1.000 permutações) para verificar a existência de correlação entre a distância genética de Nei e distância geográfica.

### **Detecção de gargalos genéticos**

Para analisar se houve redução populacional nas populações do estudo, foi utilizado o software Bottleneck versão 1.2.02 (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999). Os testes detecção do gargalo genético consideraram dois modelos, o IAM (Modelo de Alelos Infinitos) e o modelo SMM (Modelo de Passos de Mutação). Nesta análise, são obtidas as heterozigosidades esperadas dos locos nos respectivos modelos. A partir da frequência dos alelos foi utilizado o teste do sinal ( $\alpha = 0,05$ ) para indicar gargalos genéticos recentes significativos (CORNUET; LUIKART, 1996).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Polimorfismo genético e Valor de PIC**

Para os 52 indivíduos de *Cattleya granulosa* (Figura 2) oriundos das três populações foram selecionados seis iniciadores de ISSR por apresentarem melhor amplificação para esta espécie (Tabela 2).



**Figura 2.** Espécimes de *Cattleya granulosa* Lindl. (a, b) (Foto: Edson Mattos)

A quantidade de locos por iniciador variou de 11 a 18, e o número total de locos observados foi de 88, todos eles polimórficos. Com este resultado de 100% de polimorfismo nas três populações naturais de *Cattleya granulosa* é possível afirmar que os iniciadores selecionados possuem alta eficiência para detecção de polimorfismo para esta espécie.

**Tabela 2.** Iniciadores ISSR selecionados, sequência de nucleotídeos dos iniciadores, número de locos e o valor de PIC para cada iniciador.

Iniciador ISSR	Sequência (5' – 3')	Locos	PIC
UBC 808 (AG)8-C	AGA GAG AGA GAG AGA GC	11	0,48
UBC 842 (GA)8-YG	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	16	0,47
UBC 857 (AC)8-YG	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	15	0,36
UBC 859 (TG)8-RC	TGT GTG TGT GTG TGT GRC	13	0,29
UBC 880 (GGAGA)3	GGA GAG GAG AGG AGA	15	0,48
UBC 898 (CA)6-RY	CAC ACA CAC ACA RY	18	0,35
<b>Média</b>		<b>15</b>	<b>0,40</b>

R = purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T)

Para duas outras espécies da família Orchidaceae, *Cattleya coccinea* e *Cattleya mantiqueirae*, Rodrigues et al. (2010) utilizaram 13 iniciadores ISSR e obtiveram o total de 295 locos, sendo 253 (86%) considerados polimórficos. Fajardo et al. (2017) avaliaram a diversidade genética da *Cattleya granulosa* e utilizaram 6 iniciadores ISSR, onde o número de locos por cada iniciador variou entre 11 a 18, detectando um total de 91 locos, todos polimórficos.

Os dados obtidos reforçam a afirmativa de Fajardo et al. (2017) sobre o alto nível de polimorfismo genético apresentado em populações naturais de *Cattleya granulosa*, e também sobre as espécies do gênero *Cattleya* apresentarem altas porcentagens de caracteres polimórficos (FAJARDO et al., 2014).

O valor de PIC define o grau de eficiência que o marcador molecular possui em relação à detecção de caracteres polimórficos entre indivíduos (PINHEIRO et al., 2017; FAJARDO et al., 2018). Para este estudo o valor de PIC foi calculado para cada iniciador e os valores variaram entre 0,29 e 0,48 (Tabela 2), dados que classificam os iniciadores como “mediamente informativos” para a espécie *Cattleya granulosa*.

### Diversidade genética

Os índices de variabilidade genética das três populações de *Cattleya granulosa* são observados na Tabela 3, onde são expressos o tamanho amostral, o número de fragmentos polimórficos, a porcentagem destes fragmentos, o número de alelos observados, o número de alelos efetivos, o índice de diversidade de Nei (1973) e o índice de Shannon.

**Tabela 3.** Medidas de diversidade genética para populações naturais de *Cattleya granulosa*.

	<b>n</b>	<b>L/%P</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>h</b>	<b>I</b>
<b>PIT</b>	18	77 / 88 %	1,88±0,33	1,52±0,35	0,30±0,175	0,45±0,24
<b>RIO</b>	18	63 / 72 %	1,72±0,45	1,40±0,37	0,24±0,19	0,36±0,27
<b>MAR</b>	16	65 / 74 %	1,74±0,44	1,47±0,39	0,27±0,20	0,39±0,28
<b>Todos</b>	52	88 / 100 %	2±0,00	1,56±0,319	0,33±0,15	0,50±0,19

Tamanho da amostra (**n**), locos polimórficos (**L**), porcentagem de locos polimórficos (**%P**), Número de alelos observados (**Na**), Número de alelos efetivos (**Ne**), Índice de Nei (**h**), Índice de Shannon (**I**). Os valores representam a média ± desvio padrão.

Entre as três populações em estudo, a que apresentou o maior índice de diversidade genética foi a PIT com 0,30 (**h**). A população PIT também apresentou a maior porcentagem de locos polimórficos de 88%. O menor índice de Nei foi observado na população RIO, com 0,24 (**h**), a menor porcentagem de locos polimórficos também foi detectada nesta população, 72%.

O índice de diversidade genética de Shannon mede o grau de proximidade genética entre os indivíduos, com variação entre 0 e 1. Quanto menor o valor encontrado através deste índice, menor será a variabilidade genética. Para o índice de Shannon a população que apresentou o menor valor de **I** foi RIO (**I** = 0,36), indicando menor diversidade genética nesta população. A população PIT se mostrou mais diversa, inclusive em relação ao número superior de alelos



observados ( $N_a$ ) e no número de alelos efetivos ( $N_e$ ), com 1,88 e 1,52, respectivamente. Portanto, a população com maior grau de diversidade genética é PIT, seguida por MAR e RIO, esta com menor variação genética.

Rodrigues et al. (2010), ao estudarem a diversidade genética das espécies *Cattleya coccinea* e *Cattleya mantiqueirae*, encontraram para o índice de Shannon e o índice de Nei, valores muito baixos e similares entre as oito populações em análise. O índice de Nei variou entre 0,06 e 0,12 ( $h$ ) e o índice de Shannon variou de 0,09 a 0,18 ( $I$ ), demonstrando baixa variabilidade genética entre indivíduos de uma mesma população, para as duas espécies do referente estudo.

Para a espécie *Cattleya elongata* foi encontrado índice de diversidade genética de Nei de 0,18 ( $h$ ) (Cruz et al., 2011). Segundo Pinheiro et al. (2012), a *C. labiata* apresentou índices de Nei e de Shannon, respectivamente, de 0,17 ( $h$ ) e 0,25 ( $I$ ).

Em várias espécies do gênero *Cattleya*: *C. gaskelliana*, *C. lawrenceana*, *C. wallissi*, *C. warneri*, *C. warscewiczii*, *C. lueddemanniana*, *C. maxima*, *C. percivaliana*, *C. schroeder*, *C. trianae*, analisadas conjuntamente, identificaram-se os seguintes índices de Nei e Shannon, respectivamente: 0,22 ( $h$ ) e 0,36 ( $I$ ) (Pinheiro et al., 2012).

Em 2017, Fajardo e colaboradores encontraram valores de  $h = 0,34$  e  $I = 0,52$ , para 12 populações de *Cattleya granulosa*, resultados esses próximos aos obtidos no presente estudo. Estes valores indicam que a maior parte das populações remanescentes da espécie *C. granulosa* possuem alto grau de diversidade genética.

Para a análise da distância genética entre as populações foi utilizado o método de distância genética de Nei (1978). Conforme Tabela 4, a menor distância genética detectada foi entre as populações RIO e MAR (0,09), e a maior distância genética encontrada foi entre as populações PIT e MAR (0,14).

**Tabela 4.** Estimativas de distâncias genéticas de Nei (1978), abaixo da diagonal, e distância geográfica (Km), acima da diagonal, entre as populações de *Cattleya granulosa*.

	PIT	RIO	MAR
PIT	0	2,5	7,9
RIO	0,13	0	10,4
MAR	0,14	0,09	0

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4, as populações PIT e MAR possuem maior divergência entre os genótipos, pois à medida que os valores da distância genética de Nei (1978) aumentam, maior é a distinção genotípica entre as populações.

Nei (1978) classificou a distância genética em três tipos, “Baixa” quando for menor que 0,05, “Média” entre 0,05 e 0,15 e “Alta” quando for maior que 0,15. O valor médio para as três populações de *Cattleya granulosa* foi 0,12, que classifica como média a variabilidade genética entre as populações. Fajardo et al. (2017) encontraram para a mesma espécie, valor médio de distância genética de 0,18, classificada como alta variação genética, mas a amplitude amostral foi maior, incluindo populações dos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco. Para a espécie *Zeuxine strateumatica* que é uma orquídea com hábitos terrestres e de distribuição restrita, Sun e Wong (2001) obtiveram o valor médio da distância genética de 0,92, identificando alta diversidade genética.

Hamrick e Godt (1996) aferiram para a família Orchidaceae um valor da distância genética média próximo a 0,09. No entanto, o valor obtido neste trabalho para a espécie *C. granulosa* foi de 0,12, superando o estimado para a família. Observou-se maior semelhança genética entre as populações RIO e MAR, sugerindo maior troca histórica de material genético entre elas. No entanto RIO e MAR possuem a maior distância geográfica (quando comparadas a PIT), sendo esperado menor troca de materiais genéticos entre estas duas populações. A distância genética de classificação “média” (Hamrick e Godt, 1996) entre as três populações do estudo, possivelmente está relacionada à distância geográfica, relativamente pequena, que há entre elas.

### **Estrutura genética**

A AMOVA mostrou maior diversidade genética dentro das populações (72%) do que entre as populações (28%), conforme a Tabela 5. Este resultado indica alta variabilidade genética entre indivíduos de uma mesma população ( $F_{st} = 0,28$ ).

Gomes et al. (2017), ao estudarem a diversidade genética da orquídea epífita *Cattleya lobata* observaram que a maior parte da diversidade genética encontrada está concentrada dentro das populações (93%) e não entre as populações (7%).

**Tabela 5.** Análise de variância molecular (AMOVA) entre populações e entre indivíduos dentro das populações de *Cattleya granulosa*.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre populações	02	194,52	4,89	28
Dentro das populações	49	621,37	12,68	72
Total	51	815,89	17,57	
Índice de fixação <i>F<sub>st</sub></i> :	0,28			

GL: grau de liberdade, SQ: soma dos quadrados dos desvios.

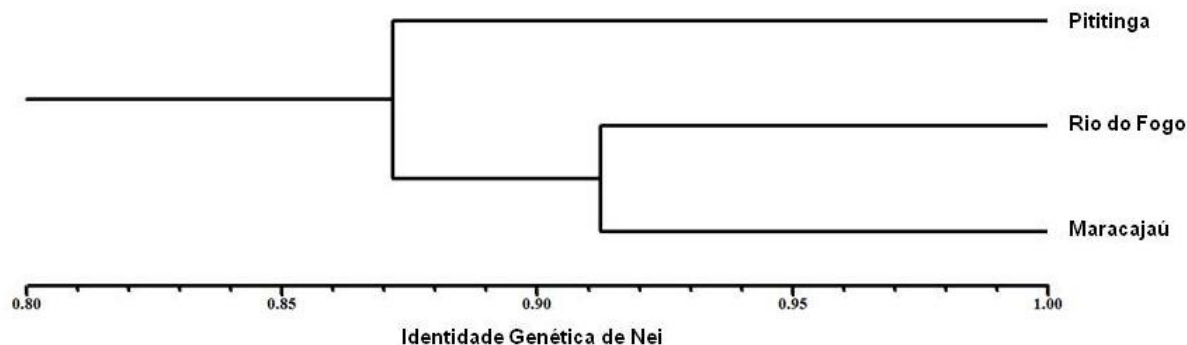
De acordo com os resultados analisados no presente estudo, é possível afirmar que as populações naturais da espécie *Cattleya granulosa* possuem alta variabilidade genética, tanto entre, como dentro das populações.

A variabilidade genética da *C. granulosa* encontrada em estudos anteriores (Fajardo et al., 2017) também demonstraram uma maior proporção da variação genética ocorrendo dentro das populações (61%) do que a proporção detectada entre as populações (39%). Tais resultados indicam alta diferenciação genética entre e dentro das populações estudadas.

Em relação à análise de isolamento das populações, pode-se usar a correlação de matrizes por meio do teste de Mantel. Este teste é usado para constatar a presença de um padrão de isolamento por distância genética e geográfica entre as populações (DUARTE; CARVALHO; VIEIRA, 2015). O resultado inferido por meio do teste de Mantel revelou a presença de correlação negativa, porém não significativa ( $r = -0,43$ ;  $P > 0,05$ ) entre as distâncias genéticas e geográficas das populações. Apesar do isolamento espacial das populações nos fragmentos de floresta, a espécie alvo não apresentou segregação espacial de genótipos. Cruz et al. (2011) também verificaram correlação negativa e não significativa ( $r = -0,07$ ;  $P = 0,49$ ) para a espécie *Cattleya elongata*.

Resultados estes que diferem de Fajardo et al. (2017) que identificaram correlação positiva e significativa para *Cattleya granulosa* ( $r = 0,79$ ;  $P = 0,02$ ), e Pinheiro et al. (2012) que também observaram correlação positiva ( $r = 0,56$ ;  $P = 0,00$ ) para a orquídea *Cattleya labiata*. Ambos estudos possuíam o número superior de populações em relação ao presente trabalho. Portanto, sugere-se para futuros estudos sobre a diversidade genética de espécie florestais que seja ampliado a amostragem populacional, de forma a compreender melhor a distribuição espacial dos genótipos na paisagem.

A partir dos valores de identidade genética (NEI, 1978), foi feito um dendrograma pelo método UPGMA (Figura 3). Por meio dele é possível visualizar as populações com maior índice de similaridade genética, que são: Rio do Fogo e Maracajá, com valor de 0,91. A população de Pititinga apresentou maior distinção se comparada com as populações Rio do Fogo e Maracajá.



**Figura 3.** Dendrograma de UPGMA utilizando as identidades genéticas de Nei, entre três populações de *Cattleya granulosa*.

### Testes de Gargalo Genético (Bottleneck)

Na Tabela 6 estão apresentados os valores para os testes de gargalo genético, em dois modelos IAM e SMM. Apesar de PIT ser a população mais diversificada geneticamente, se mostrou como a única população que sofre redução no tamanho efetivo populacional, conforme modelo IAM. Para o modelo SMM, as populações não apresentaram decréscimo populacional.

**Tabela 6.** Testes de equilíbrio entre mutação e deriva genética para as populações de *Cattleya granulosa* sobre os modelos IAM e SMM.

Populações	IAM			SMM		
	n	He	P	n	He	P
PIT	44,36	53	0,04*	44,10	50	0,12
RIO	44,69	41	0,25	44,34	39	0,15
MAR	42,67	49	0,11	42,16	46	0,24

**n** = número esperado de locos com excesso de heterozigiosidade sob o respectivo modelo; **He** = número de locos com excesso de heterozigiosidade; **P** = probabilidade; \* = significativo a 5% de probabilidade.

Fajardo et al. (2017) ao estudarem doze populações da *Cattleya granulosa* observaram ocorrência de gargalos populacionais recentes para oito populações, utilizando os modelos IAM

e SMM. Contudo, apenas para duas das populações, localizadas no Estado de Pernambuco, o teste do sinal mostrou déficit de heterozigosidade altamente significativo.

A divergência dos resultados encontrados no presente estudo quando comparados aos aferidos por Fajardo et al. (2017) para mesma espécie deve-se, provavelmente, ao fato das populações se encontrarem em diferentes localidades, isto é, ao sul do presente trabalho. PIT, RIO e MAR são populações distribuídas no litoral Norte do RN, em faixa de maior conservação de habitat, e menor grau de perturbação, enquanto que as populações do estudo realizado pelos autores referenciados estão distribuídas no litoral Sul do RN, Estado da Paraíba e Pernambuco, com graus elevados de antropização. O déficit de heterozigosidade altamente significativo observado por Fajardo et al. (2017), em duas populações alocadas no Estado de Pernambuco, pode estar relacionado ao grau de perturbações ambientais presentes nesta região de amostragem.

Através dos trabalhos com a *Cattleya granulosa* realizados pela nossa equipe do Laboratório de Genética e Melhoramento Florestal/UFRN e colaboração com a Associação Orquíófila do Rio Grande do Norte (SORN) foi possível a elaboração da lei nº 10.508, de 16 de maio de 2019 que transformou a orquídea em flor símbolo do Estado do Rio Grande do Norte. Além disso, a nova lei estadual também institui a semana estadual de conservação, valorização e preservação da orquídea. No entanto, novas leis para a preservação e sobre educação ambiental necessitam ainda ser elaboradas com o intuito de valorizar e preservar os fragmentos florestais de Mata Atlântica, assim como demais espécies ameaçadas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre as três populações naturais de *Cattleya granulosa* a que possui maior variação genética é PIT.

A maior variação genotípica para *Cattleya granulosa* é observada dentro das populações.

Através dos testes de gargalo genético (*bottleneck*) foi verificado que apenas PIT sofreu redução do tamanho efetivo populacional, possivelmente em razão da conservação do habitat no qual as populações foram encontradas.

## REFERÊNCIAS

ADHIKARI, Sinchan et al. Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. **The Nucleus**, v. 60, n. 3, p. 283–297, 2017.

ANDERSON, 6J A. et al. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**, v. 36, p. 181-186, 1993.

CÂMARA-NETO, Clementino et al. Rescuing *Cattleya granulosa* Lindley in the wild. **Lankesteriana**, v. 7, n. 2, p. 243-246, 2007.

CHUNG, Mi Yoon. Lack of allozyme diversity in populations of the rare, endangered terrestrial orchids *Tipularia japonica* and *Epipactis papillosa* in Korea. **Plant Systematics and Evolution**, v. 278, p. 203–209, 2009.

CORNUET, Jean Marie; LUIKART, Gordon. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014, 1996.

COSTA, Rosaly de Araújo. **Biologia floral e sistema reprodutivo de *Cattleya granulosa* Lindl., uma Orchidaceae ameaçada e endêmica do Nordeste do Brasil**, Dissertação de Mestrado da Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, Recife, 64 p. 2010.

CRUZ, D. T.; BORBA, E. L.; VAN DEN BERG, C. O gênero *Cattleya* no estado da Bahia. **Sitientibus**, v. 3, p. 28-36, 2003.

CRUZ, Daiane Trabuco et al. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. **Plant System Evolution**, v. 294, p. 87–98, 2011.

DOYLE, Jeff J.; DOYLE, Jane L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1987.

DUARTE, Jaqueline Fidelis; CARVALHO, Dulcinéia; VIEIRA, Fábio de Almeida. Genetic conservation of *Ficus bonijesulapensis* R. M. Castro in a dry forest on limestone outcrops. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 54-62, 2015.

EXCOFFIER, Laurent; LISCHER, Heidi EL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567, 2010.

FAJARDO, Cristiane Gouvea et al. Negligence in the Atlantic forest, northern Brazil: a case study of an endangered orchid. **Biodiversity and Conservation**, v. 26, n. 5, p. 1047-1063, 2017.

FAJARDO, Cristiane Gouvea et al. Distribuição Espacial de *Cattleya granulosa* Lindl.: Uma Orquídea Ameaçada de Extinção. **Floresta e Ambiente**, v. 22, n. 2, p. 164-170, 2015.

FAJARDO, Cristiane Gouvea et al. Genetic diversity in natural populations of *Hancornia speciosa* Gomes: Implications for conservation of genetic resources. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 6, p. 623-630, 2018.

FAJARDO, Cristiane Gouvea; VIEIRA, Fábio de ALMEIDA; MOLINA, Wagner Franco Interspecific genetic analysis of orchids in Brazil using molecular markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 8, p. 1825-1832, 2014.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB11329>. Acesso em: 21 outubro 2019.

GIVNISH, Thomas J. et al. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1814, p. 20151553, 2015.

GOMES, Patrícia Cristina Lemos et al. High genetic variability is preserved in relict populations of *Cattleya lobata* (Orchidaceae) in the Atlantic Rainforests inselbergs. **Brazilian Journal of Botany**, v. 41, n. 1, p. 185-195, 2017.

HAMRICK, J. L<sup>†</sup>; GODT, MJ W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series, Biological Sciences*, v. 351, p. 1291–1298, 1996.

HOPPER, Stephen D.; BROWN, Andrew P. A revision of Australia's hammer orchids (*Drakaea*: Orchidaceae), with some field data on species-specific sexually deceived wasp pollinators. *Australian Systematic Botany*, v. 20, p. 252–285, 2007.

MARTINELLI, Gustavo; MORAES, Miguel Avila. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. 1. ed. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro; 2013.

MCCUNE, Bruce; MEFFORD, M. J. *Multivariate Analysis of Ecological Data*. Version 3.0. **MjM Software**, Gleneden Beach, Oregon, USA, 1997.

MIMURA, Makiko et al. Understanding and monitoring the consequences of human impacts on intraspecific variation. *Evolutionary applications*, v. 10, n. 2, p. 121-139, 2017.

MMA, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Instrução Normativa nº 6 de 23 de setembro de 2008. **Diário Oficial da União**, v. 185, n. Seção 1, 2008.

NEI, Masatoshi. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 70, n. 12, p. 3321–3323, 1973.

NEI, Masatoshi. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, v. 89, p. 583–590, 1978.

PINHEIRO, L. G. et al. Anthropization as a determinant factor in the genetic structure of *Copernicia prunifera* (Arecaceae). *Genetics and Molecular Research*, v. 16, p. 1-14, 2017.

PINHEIRO, Lucas Rezende et al. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*, v. 298, p. 1-11, 2012.



PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of heredity**, v. 90, p. 502-503, 1999.

PRIDGEON, Alec M. **The illustrated encyclopaedia of orchids**. Timber Press, Portland, 1995.

RAMALHO, Adriana; PIMENTA, Handson. Valoração econômica aplicada à extração ilegal da orquídea *Cattleya granulosa* no Parque Natural Dom Nivaldo Monte de Natal/RN. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, v. 7, n. 1, p. 181-194, 2010.

RODRIGUES, Jucelene F. et al. Species delimitation of *Cattleya coccinea* and *Cattleya mantiqueirae* (Orchidaceae): insights from phylogenetic and population genetics analyses. **Plant systematics and evolution**, v. 301, n. 5, p. 1345-1359, 2015.

ROHLF, F. J. NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. **Applied Biostatistics**. Inc, New York, NY, 1998.

SOUZA, V. C.; LORENZI, Harri. **Botânica sistemática: guia ilustrativo para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

SUN, M.; WONG, K. C. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 2180-2188, 2001.

TREMBLAY, Raymond L. et al. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 84, n. 1, p. 1-54, 2004.

VAN DEN BERG, Cássio. Reaching a compromise between conflicting nuclear and plastid phylogenetic trees: a new classification for the genus *Cattleya* (Epidendreae; Epidendroideae; Orchidaceae). **Phytotaxa**, v. 186, n. 2, p. 075-086, 2014.

VELOSO, Henrique Pimenta; RANGEL-FILHO, Antonio Lourenço Rosa; LIMA, Jorge Carlos Alves. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. IBGE, 1991. p. 124.

YEH, Francis C. et al. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. **Molecular biology and biotechnology centre**, University of Alberta, Canadá, v. 10, p. 295-301, 1997.