



VARIABILIDADE GENÉTICA DE *EUGENIA UNIFLORA* L. EM ÁREAS CONSERVADAS E EM REGENERAÇÃO

L. B. Slaviero¹

¹S. P. Miotto¹; G. B. Kubiak¹; R. V. de Aguiar¹; C. A. Zanella¹; C. M. Golunski¹; F. Zboralski¹; L. A. Lerin¹; J. C. Budke¹; A. J. Mossi¹; R. L. Cansian¹

1Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI-Campus de Erechim, Departamento de Ciências Biológicas, Avenida Sete de Setembro, nº 1621, 99700 - 000, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil. Telefone número: 54 3520 9000-paula_bio_rv@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A conservação dos recursos genéticos tem se tornado cada vez mais premente, pois a forte pressão antrópica em ambientes florestais tem ocasionado a fragmentação dos mesmos, levando conseqüentemente à perda de diversidade. A fragmentação de um hábitat pode precipitar a extinção e o declínio das populações ali existentes, ao dividir as mesmas em duas ou mais subpopulações, cada uma em área restrita¹³. Como conseqüências da fragmentação ocorre o decréscimo da variabilidade genética devido ao endocruzamento¹³.

O processo de regeneração natural promove a estabilidade e a continuidade da comunidade em determinado local, no qual depende inicialmente da dispersão das sementes que devem apresentar viabilidade, escaparem de predadores e encontrar condições adequadas à germinação¹⁰. Posteriormente, a sobrevivência e o desenvolvimento dos indivíduos da regeneração dependem de fatores fenológicos, genéticos e ambientais⁸. Todos esses fatores produzem dinâmicas nas condições de crescimento e interferem na estrutura da comunidade, favorecendo diferentes espécies ao longo do tempo¹¹.

A *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira) é uma Myrtaceae frutífera com grande potencial para exploração econômica, originária da região que se estende desde o Brasil Central até o norte da Argentina, sendo que sua distribuição se fez ao longo de quase todo o território brasileiro, bem como em várias partes do mundo³. A grande variedade de características dos frutos (tamanho, cor, número e tamanho das sementes) apresentada pelas espécies de Myrtaceae, está associada a um grupo diversificado de dispersores de sementes. Para o gênero *Eugenia* no Brasil, foram identificados dispersores de sementes para 35 espécies. A dispersão de sementes de *Eugenia uniflora* é realizada por aves, mamíferos carnívoros e primatas, e eventualmente por lagartos.

Recentemente avanços nas técnicas de biologia molecular abriram novas perspectivas para os estudos populacionais,

pois as espécies podem ser analisadas ao nível do DNA⁹. Dentro desse contexto, os marcadores RAPD (random amplified polymorphic DNA) possuem baixo custo inicial e operacional, podem ser utilizados para qualquer espécie, independentemente de conhecimento prévio de seu genoma, sendo mais simples e rápido⁴. Entre as suas aplicações se incluem obtenções de “fingerprints” genômicos (impressões digitais) de indivíduos, variedades e populações; análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; estabelecimento de relações filogenéticas entre diferentes espécies; construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e a localização de genes de interesse agrônomo⁹. Além disso, um grande número de sítios de DNA pode ser avaliado quanto ao seu polimorfismo⁵.

OBJETIVOS

Para a conservação e uso sustentável das espécies, estudos genéticos são imprescindíveis. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo investigar e comparar a variabilidade genética de populações de *Eugenia uniflora* em uma área de regeneração, com indivíduos de fragmento próximo de área conservada em estágio avançado de sucessão, visando determinar o grau de endogamia em áreas degradadas abandonadas. Cabe ressaltar que até o momento existem poucos estudos genéticos utilizando espécies nativas, buscando comparar a variabilidade genética em áreas de regeneração com áreas conservadas.

MATERIAL E MÉTODOS

O material foi coletado em um remanescente florestal de aproximadamente 462 ha, localizado no município de Gaurama, próxima a divisa com o município de Três Arroios,

ambos no Estado do Rio Grande do Sul, na localidade denominada Linha Cinco (Seção Dourado). O fragmento apresenta um mosaico de trechos em diferentes estádios de sucessão, formado por uma transição entre as formações florestais Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Decidual, apresentado elevada riqueza específica. A distância entre os indivíduos coletados foi superior a 10 m, sendo que foi coletada material de 30 indivíduos em área de vegetação nativa e 30 em área de regeneração.

Para o isolamento de DNA total de cada planta foi utilizado o método descrito por Doyle e Doyle⁶, modificado para uso em *Eugenia uniflora*. O processo básico consiste em: maceração de aproximadamente 150 mg de folhas em nitrogênio líquido; adição de 860 μ l de tampão de extração (2% CTAB, 1% PVP, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris, 1,7 μ L de 2-mercaptoetanol); manutenção em banho-maria por 45 min. à 65°C; duas desproteíntizações com 1 volume clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) até limpeza total do DNA; precipitação com 2/3 volume de isopropanol e duas lavagens com 1000 μ l etanol 70%; ressuspensão em 150 μ l de TE (Tris:EDTA - 10:1); quantificação em espectrofotômetro UV a 260 nm e confirmação da integridade e pureza em espectrofotômetro UV a 280 nm e em gel de agarose 0,8%.

Para a amplificação de RAPD foi utilizada a reação descrita por Williams *et al.*, (1991), com algumas modificações. Em um volume total de 25 μ l: tampão de reação (50 mM Tris - HCl pH 9,0; 50 mM KCl), dNTPs (200 mM de cada), 0,2 mM de primer, 3 mM de MgCl₂, 0,25 mM de Triton - X - 100, 1,5 U de Taq DNA polimerase Gibco BRL e aproximadamente 40 ng de DNA.

O processo de amplificação seguiu o seguinte procedimento: 3 min a 92°C, 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C. Após, 3 min a 72°C e resfriamento a 4°C até a retirada das amostras. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,4% em tampão TBE (trisma 0,089M, ácido bórico 0,089M e EDTA 0,008M) em cuba de eletroforese horizontal. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA de fago Lambda clivado com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI. Os fragmentos foram visualizados com brometo de etídio sob luz ultravioleta e os géis fotografados digitalmente.

Para aperfeiçoar os trabalhos de amplificação por RAPD foi realizada uma seleção de primers pertencentes a sete kits da Operon Technologies, sendo estes analisados em duplicata e observando intensidade e reprodutibilidade de bandas.

RESULTADOS

Levando em consideração dos 60 indivíduos estudados foi identificado um total de 111 loci, sendo que destes, 92 (82,9%) mostraram-se polimórficos. Nos 30 representantes de cada população, considerados para fins de análise, foram considerados 101 loci para a população coletada na área em estágio avançado de sucessão e 103 para população coletada na área em regeneração. O número de loci utilizados para análise foi bastante superior aos utilizados por Trindade e Chaves¹⁵ e Zucchi *et al.*,¹⁷ em populações de *Eugenia dysentericae* que utilizaram 42 e 74 loci, respectivamente.

O polimorfismo encontrado nas populações estudadas foi de 80 (79%) loci para a área em estágio avançado de sucessão e 72 (70%) para a área em regeneração. Também neste caso os valores são semelhantes aos encontrados na análise por RAPD em *Eugenia dysenterica* realizadas por Trindade e Chaves¹⁵ e Zucchi *et al.*,¹⁷ que obtiveram 83% e 73% de loci polimórficos. Mossi *et al.*¹² obteve 71,5% em *Maytenus ilicifolia*.

O coeficiente de similaridade de Jaccard variou de 0,55 a 0,86 entre as plantas da regeneração e de 0,45 a 0,68 na população da área em estágio avançado de sucessão. A similaridade encontrada entre as plantas da população da segunda área é menor que a da área em regeneração e semelhante à encontrada por Zucchi *et al.*,¹⁷ em *Eugenia dysenterica* que o índice de Jaccard variou entre 0,455 e 0,653. Observa-se ainda uma maior amplitude de variabilidade genética na população de área em regeneração quando comparada à área em estágio avançado de sucessão, ainda que a similaridade entre as plantas seja menor na segunda área. Com a Análise dos Componentes Principais (PCA), isto fica representado com maior clareza, pois se pode observar um maior agrupamento da população nativa em relação à regeneração. Avaliando a diversidade de loci nas populações pelo índice de Shannon (log₁₀), obtiveram-se valores de 1,14 ($\pm 0,31$) para população da área em estágio avançado de sucessão e 1,18 ($\pm 0,36$) para área em regeneração. Os resultados demonstram uma semelhança entre a diversidade genética dentro das duas populações.

Alguns autores, como Sebbenn e Ettore¹⁴, citam que a redução das populações naturais tem levado a uma perda de genes adaptados a ambientes específicos de ocorrência das espécies arbóreas, que a redução contínua no tamanho das populações as submete a perdas de variabilidade genética por deriva genética. A deriva pode causar a depressão por endogamia e conseqüentemente, reduzir a capacidade adaptativa, fertilidade, vigor, porte e produtividade, entre outras coisas¹. Por conseqüência, esperava-se que a variabilidade se mostrasse maior na população nativa ou mais antiga, porém isto não foi observado.

Uma hipótese que explica tais resultados seria a de que fragmentos vegetais próximos, além da área em estágio avançado de sucessão, de onde foram coletadas as plantas, estão contribuindo geneticamente para a formação da área em regeneração.

Quando comparado o coeficiente de similaridade de Jaccard interpopulacional, o coeficiente variou de 0,54 a 0,78 entre as plantas das duas populações. Observa-se também que não ocorre uma separação clara das populações, mostrando que elas estão próximas geneticamente. Estes resultados são um indicativo de que a área em estágio avançado de sucessão serviu como fonte de sementes e conseqüentemente, material genético para a área em regeneração.

CONCLUSÃO

A análise da variabilidade intrapopulacional, mostrou que tanto o coeficiente de similaridade de Jaccard quanto o índice de diversidade de Shannon indicaram uma variabilidade genética alta e semelhante dentro de ambas as popu-

ulações, indicando que a área em regeneração poderá manter a variabilidade genética da espécie em estudo.

Na análise da variabilidade interpopulacional, o coeficiente de similaridade de Jaccard mostrou uma proximidade genética muito grande entre as populações, indicando que a área em estágio avançado de sucessão, que se localiza próxima à área em regeneração, foi quem forneceu as sementes (material genético) para a área em regeneração. Já a análise de coordenadas principais (PCO) usando distâncias euclidianas mostrou uma tendência de separação entre as duas populações, indicando que pode haver entrada de semente (material genético) de outras populações mais distantes, possivelmente de outros locais, mas pertencentes ao mesmo fragmento, porém que não foram considerados nesse estudo.

Com esses dados pode ser considerado que até o momento, as plantas encontradas na área em regeneração, estão mantendo a variabilidade genética da área em estágio avançado de sucessão, ou seja, a área original. Dessa forma os resultados indicam não haver necessidade de interferência no processo de regeneração para *Eugenia uniflora* no local do estudo.

Os autores agradecem a FAPERGS, CNPq, SC&T - RS e URI - Campus de Erechim pelo apoio financeiro. <p/ >

REFERÊNCIAS

- 1 - Allard, R.W. (Ed). *Princípios do melhoramento genético das plantas*. São Paulo: Edgard Blücher, 1971, 381p.
- 2 - Bergamin, R.S.; Mondin, C.A.A. A composição florística e relações fitogeográficas do componente arbóreo de um fragmento florestal no município de Barra do Ribeiro, RS-Brasil. *Pesquisas Botânica*, 57: 217 - 230, 2006.
- 3 - Bezerra, J. E. F.; Silva Junior, J. F.; Lederman, I. E. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.). Jaboticabal, SP: FUNEP, 2000. 30p. (Série Frutas Nativas, 1).
- 4 - Cansian, R. L. Análise de RAPD aplicada à identificação de cultivares e avaliação da variabilidade genética em *Brassica*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Instituto de Biotecnologia UCS, Caxias do Sul - RS, 1999, 91p.
- 5 - Cavers, S. *et al.*, Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. *Heredity*, 95:281-289. 2005.
- 6 - Doyle, J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13 - 15. 1987.
- 7 - Donadio, L.C.; MÔro, F.V.; Servidone, A.A. *Frutas Brasileiras*. Jaboticabal: Ed. Novos Talentos, 2002, 288p.
- 8 - Felfili, J.M. Diameter and height distributions of a gallery forest community and some of its main species in central Brazil over a six - year period (1985 - 1991). *Revista Brasileira de Botânica*, 20: 155 - 162, 1997.
- 9 - Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2 ed. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN. 220p. 1995.
- 10 - Gómez - Pompa, A.; Vasquez - Yanez, C. Successional studies of a rain forest in México. In: West, D.C.; Shugart, H.H.; Botkin, D.B. (Ed.). *Forest succession: concepts and application*. New York: Springer - Verlag Press, p.247 - 266, 1981.
- 11 - Medeiros M.M.; Felfini, J.M.; Andréia M.L. Compactação florístico - estrutural dos estratos de regeneração e adulto em Cerrado sensu stricto no Brasil Central. *Revista Cerne*, 13(3): 291 - 298 2007.
- 12 - Mossi, A. J. *et al.*, Intra and inter populational genetic variability in *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. 1861, through RAPD markers. *Braz. J. Biol.* , 67(4): 957 - 961, 2007.
- 13 - Primack, R.B.; Rodrigues, E. *Biologia da conservação*. Londrina: Ed. Vida, 2001, 328p.
- 14 - Sebbenn, A.M.; Ettore, L.C. Conservação genética *ex situ* de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltophorum dubium* em teste de progênies misto. *Revista do Instituto Florestal*, São Paulo,13(22): 201 - 211, 2001.
- 15 - Trindade, M. G.; Lázaro, J. C. Genetic structure of natural *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) populations in northeastern Goiás, Brazil, accessed by morphological traits and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 28(3): 407 - 413, 2005.
- 16 - Williams, J.G.K. *et al.*, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531 - 6535, 1991.
- 17 - Zucchi, M. I. *et al.*, Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations. *Pesq. agropec. bras.* , Brasília, 40(10):.975 - 980, 2005.