



DIVERSIDADE GENÉTICA DE TRÊS ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE *EREMANTHUS* SPP

D.A.A. Arriel¹

F. de A. Vieira¹; D. de Carvalho¹

1 - Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. daniarriel@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Dentre as Asteraceae, o gênero *Eremanthus*, pertencente à tribo Vernoniae, compreende 27 espécies de árvores e arbustos distribuídos nos domínios dos cerrados brasileiros, principalmente em Minas Gerais, Goiás e Bahia (Robinson, 1999). Estas espécies conhecidas popularmente como candeias, pertencem ao grupo ecológico das pioneiras consideradas precursoras na invasão de campos (Carvalho, 1994), desenvolvendo - se rapidamente em campos abertos, formando povoamentos quase puros. Ocorrem também dentro da floresta quando há alguma perturbação, pois são espécies heliófilas e a entrada de luz beneficia seu crescimento. As espécies de candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, *E. incanus* (Less) Less. e *E. glomerulatus* Less. são consideradas simpátricas, ou seja, que coabitam o mesmo ambiente e compartilham o mesmo nicho. Devido ao alto valor econômico agregado, principalmente nas espécies *E. erythropappus* e *E. incanus*, estas árvores vem sendo intensamente exploradas, muitas vezes sem um plano de manejo adequado. Esta exploração de forma não adequada pode ter conseqüências na ecologia e na genética de suas populações naturais, principalmente na diminuição da diversidade genética, podendo no longo prazo comprometer o seu potencial evolutivo.

As análises da diversidade genética intrapopulacional permitem quantificar os níveis de diversidade genética entre grupos de indivíduos e fazer inferências sobre o potencial das populações para a conservação, melhoramento e manejo. Marcadores genéticos do tipo ISSR (inter - simple sequence repeat) (Zietkiewicz *et al.*, 1994) são utilizados em estudos de diversidade genética por não necessitar de informação prévia da sequência de DNA, ter baixos custos de desenvolvimento e os procedimentos laboratoriais podem ser utilizados para várias espécies de plantas (Nybom 2004).

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade genética,

por meio de marcadores ISSR, de três espécies simpátricas de *Eremanthus*, presentes no Parque Ecológico Quedas do Rio Bonito, MG, para verificar a existência ou não de diferenças genéticas entre estas, de modo que as propostas de conservação destas sejam diferenciadas.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Local de estudo e coleta do material

A coleta das folhas foi realizada no Parque Ecológico Quedas do Rio Bonito (PEQRB), localizado a aproximadamente 13 km do município de Lavras, MG, nas coordenadas de 21°19' S e 44°59' W, em uma altitude variando entre 950 e 1200m. O clima do local, segundo a classificação de Köppen, é uma transição entre Cwb e Cwa, ou seja, temperado com invernos secos, com precipitação média anual de 1529,7mm e temperatura média anual de 19,4°C. O PEQRB constitui uma valiosa amostra da vegetação primitiva da região do Alto Rio Grande, pois seus cinco tipos fisionômicos principais-floresta, cerrado, campo rupestre, campo de altitude e candeal-encontram - se bem representados e razoavelmente preservados (Oliveira - Filho & Fluminham - Filho, 1999).

Para a caracterização da diversidade genética das três espécies de *Eremanthus* foram amostrados e georreferenciados 60 indivíduos de cada espécie, ao longo de seis parcelas contínuas de 10x10m. O material foi acondicionado em recipientes contendo sílica gel, levado para o Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas da UFLA e armazenado em freezer a - 80o C, até o momento da extração do DNA.

2.2 - Extração do DNA

O método de extração utilizado foi o Moog & Bond (2003), onde se utilizou 50mg de material foliar, que foi macerado em 600 µL de tampão de extração, areia lavada e PVP (polivinilpirrolidona), em um almofariz. O tampão extração constituiu de 100 mM de Tris pH 8,0; 50mM de EDTA 0,5M pH 8,0; 500mM de NaCl 5M; 0,7% de SDS 7%; 50 µg/mL de Proteinase K (10mg/mL) e 50 µg/mL de RNase

(10mg/mL). O material macerado foi colocado em tubos de 1,5mL, incubados em estufa a uma temperatura de 37°C e deixados por aproximadamente 12 horas. Em seguida, os tubos foram retirados da estufa, adicionou - se 320 µL de NaCl 5M. Após serem agitados (vortex), centrifugou - se por 5 minutos a 12000 rpm e pipetou - se a fase superior (aquosa) para um novo tubo. Para precipitação do DNA, adicionou - se 800 µL de isopropanol e as amostras foram deixadas a - 20°C por 3 horas. Foi feita uma centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C. A este material acrescentou - se 500 µL de etanol 70% e centrifugou - se a 4000 rpm por 10 minutos, sendo que este procedimento foi realizado por duas vezes. Fez - se então uma última lavagem, utilizando - se 500 µL de etanol 100%.O pellet foi deixado em temperatura ambiente para secar e, finalmente, os ácidos nucleicos foram solubilizados em tampão TE (200 µL) (1mM de Tris e 0,1mM EDTA).

2.3 - Reações ISSR

O DNA obtido foi amplificado pelo método ISSR, onde foram utilizados 12 primers para a espécie *E. erythropappus*, 13 para *E. glomerulatus* e *E. incanus*.

As reações foram preparadas em microplacas para PCR (PCR - 96 - Axygen Scientific) sendo aplicado em cada poço uma alíquota de 2 µL do DNA diluído (1:40). Às amostras de DNA foram acrescentadas 10 µL de coquetel de reação contendo: 1,2 µL de tampão PCR 10X (constituído de 500mM de Tris - HCl pH 8,0; 200mM de KCl; 2,5mg/mL de BSA; 200mM de Tartazine e 1% de Ficol), 1,04 µL de dNTP + MgCl₂ (dNTP a 2,5mM; MgCl₂ a 25mM), 0,96 µL de diluente da enzima *Taq polimerase*, 0,3 µL de *Taq polimerase* (5U/ µL) e 2 µL de primer (2 µM) e completado o volume final com água ultra - pura.

As reações de PCR foram feitas em termociclador GeneAmp PCR System 9700, no qual as amostras inicialmente sofreram desnaturação a 94°C por 2 minutos e, em seguida a 37 ciclos de amplificação sendo que cada ciclo submeteu a amostras a 94°C por 20 segundos, em seguida a 47°C por 20 segundos e a 72°C por 20 segundos. Após os ciclos, o processo foi finalizado a 72°C por 7 minutos e em seguida resfriado a 4°C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese, em cuba horizontal (Bio - Rad Sub - Cell®), modelo 192), em gel de agarose 1,5% (p/v), contendo brometo de etídio (0,003% v/v a 5ng/mL), em tampão TBE 1X (Tris - Borato EDTA), a uma voltagem de 120V por duas horas e meia. Decorrido o tempo de corrida de eletroforese, o gel foi retirado da cuba e levado para aparelho de fotodocumentação. Os géis foram fotografados sobre fonte de luz ultravioleta, revelando os fragmentos de DNA corados com brometo de etídio.

2.4 - Análise dos Dados e Estimativas dos Parâmetros de Diversidade Genética.

A partir dos fragmentos de ISSR foi construída uma matriz binária com a presença (1) ou ausência (0) destes. Para análise da diversidade genética intrapopulacional usou - se o programa PopGene, versão 1.32 (YEH *et al.*, 1997), uma vez que os locos de ISSR segregam como marcadores dominantes, assumindo - se que as populações estão em Equilíbrio de Hardy - Weinberg (EHW). Os parâmetros estimados foram: porcentagem de locos polimórficos (*P*),

heterozigosidade esperada (*He*) (Nei,1987) e índice de diversidade genética de Shannon (*I*).

A estimativa de similaridade genética entre cada par de árvores para cada espécie, foi efetuada pelo coeficiente de Jaccard e a análise de agrupamento das similaridades foi feita pelo método da média das similaridades (UPGMA - Unweighted Pair - Group Method, Arithmetic Average), gerando um dendrograma, com o auxílio do programa NTSYS - PC 2.1 (Rohlf, 1992).

RESULTADOS

Os primers MANNY, UBC841, UBC901, UBC807, UBC808, UBC809, UBC827, UBC834, UBC835, UBC857, UBC864, UBC889 usados para a caracterização da diversidade genética de *E. erythropappus* geraram um total de 123 locos, sendo 116 destes polimórficos (94,31%). Em relação à espécie *E. glomerulatus*, os primers BACKY, JHON, MANNY, OMAR, UBC810, UBC827, UBC834, UBC835, UBC841, UBC842, UBC855, UBC898, UBC902, resultaram em 122 locos, dos quais 116 foram polimórficos (95,08%). Para *E. incanus*, os primers MANNY, OMAR, UBC807, UBC808, UBC809, UBC827, UBC834, UBC835, UBC842, UBC855, UBC857, UBC860, UBC901, geraram um total de 119 locos, sendo 102 polimórficos (85,01%). A média de locos polimórficos por primer para *E. erythropappus*, *E. glomerulatus* e *E. incanus* foi de 10,25; 9,38 e 9,15 respectivamente. Os valores de locos polimórficos encontrados para as espécies aqui estudadas apresentaram - se bastante expressivos, comparados a outros trabalhos citados na literatura (Estopa *et al.*, 2006; Brandão, 2008).

O índice de Shannon (*I*) foi de 0,532 para *E. erythropappus*, 0,574 para *E. glomerulatus* e 0,492 para *E. incanus*, portanto, a espécie *E. glomerulatus* apresentou maior diversidade genética na área amostrada, de acordo com este índice. Estes valores de diversidade genética estão próximos aos observados em outros estudos com espécies arbóreas utilizando marcadores ISSR (Brandão, 2008; Fernandes, 2008) e também com marcadores RAPD com *E. erythropappus* (Estopa *et al.*, 2006).

A diversidade genética de Nei (*He*) foi 0,359 de para *E. erythropappus*, 0,396 para *E. glomerulatus* e 0,335 para *E. incanus*. Os valores encontrados foram maiores que o relatado por Estopa *et al.*, (2006) para *E. erythropappus*, cujo (*He*) variou de 0,31 a 0,33, por meio de marcadores RAPD. A maior similaridade genética das árvores de *E. erythropappus* foi de 0,97 e a menor de 0,65 *E. glomerulatus* apresentou similaridade genética de 0,93 e também com 0,45 sendo esta a menor similaridade entre as árvores. A similaridade genética entre as árvores de *E. incanus* variou de 0,96 a 0,54. Nota - se que os valores de diversidade genética são próximos entre as espécies, sendo que *E. glomerulatus* apresentou um valor mais elevado em relação a suas espécies simpátricas. Os valores de diversidade genética encontrados para as espécies estudadas não são considerados altos e estão próximos aos valores descritos na literatura em vários estudos com espécies arbóreas, em locais com as mesmas características de vegetação.

Embora as espécies de *Eremanthus*, aqui estudadas, estejam inseridas em uma área de proteção, os valores de diversi-

dade genética relativamente baixos encontrados para as três espécies simpátricas são preocupantes para a manutenção das espécies no longo prazo. Esperava-se que devido às características das espécies como alta densidade populacional e ocorrência em ambientes extremos (locais montanhosos, terrenos rochosos e solos de baixa qualidade) fossem encontrados valores mais altos de diversidade genética. Populações com grande número de indivíduos e de ocorrência em ambientes extremos têm maior probabilidade de incorporarem novos alelos por mutação do que populações pequenas e em ambientes homogêneos. Estudos deverão ser realizados para monitorar a diversidade genética ao longo das gerações, para que seja possível propor medidas de conservação genética para as espécies.

CONCLUSÃO

E. glomerulatus foi a espécie que apresentou valores superiores para os índices de diversidade genética em relação à *E. incanus* e *E. erythropappus*.

As espécies de *Eremanthus* estudadas apresentam baixa diversidade genética no local amostrado, o que pode comprometer sua perpetuação na área, caso as medidas como o plantio de indivíduos vindos de áreas próximas não seja realizado, principalmente para *E. incanus* e *E. erythropappus*.

Os autores agradecem ao CNPq a Bolsa de Iniciação Científica concedida a primeira autora e ao PEQRB pela oportunidade de realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

Brandão, M.M. 2008. Diversidade Genética de *Myrcia splendens* (SW) DC. (Myrtaceae) por marcadores moleculares ISSR, em sistema corredores - fragmentos semidecíduais no Sul de Minas Gerais. 80 p. Dissertação de mestrado em Engenharia Florestal. Universidade Federal de Lavras - MG

Carvalho, P.E.R. 1994. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da Madeira. Brasília: EMBRAPA - CNPF, 640 p

Estopa, R.A.; Souza, A.M.; Moura, M.C.O.; Botrel, M.C; Carvalho, D; Mendonça, E.G. 2006. Diversidade genética em populações naturais de candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. Scientia Forestalis (IPEF), Piracicaba - SP, n. 70.

Fernandes, R.C.2008. Diversidade e Estrutura Genética em Populações Naturais de Pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) no norte de Minas Gerais. 73 p. Dissertação de mestrado em Engenharia Florestal. Universidade Federal de Lavras - MG

Moog, R.J & Bond, J.M (2003) . A cheap, reliable and rapid method of extracting high - quality DNA from plants. Molecular Ecology Notes 3, 666 - 668

NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.70, p. 3321 - 3323.

Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Molecular Ecology, v. 13, p. 1143 - 1155

Oliveira Filho, A.T. & Fluminhan Filho, M. 1999. Ecologia da vegetação do Parque Florestal Quedas do Rio Bonito. Cerne 5(2): 51 - 64.12: 71 - 84

Robinson, H. 1999. Generic and subtribal classification of American Vernonieae. Smithsonian Contributions to Botany 89 p.

Rohlf, F.J.1992. Numerical taxonomy and multivariate analysis system (version 1.70). New York: Exeter Publishers, 470p

Yeh, F.C.; Yang, R.C.; Boyle, T.B.J.; YE, Z.H.; Mao, J.X., 1997. Popgene, the User - friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada. Available at: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>

Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. 1994. Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, SanDiego, v.20, p.176 - 183