



DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM *OCOTEA ODORIFERA* (LAURACEAE) NA REGIÃO SUL DO BRASIL

G. B. Kubiak

C. M. Golunski; L. B. Slaviero; C. A. Zanella; F. Zboralski; L. R. Borges; S. P. Miotto; L. A. Lerin; J. C. Budke; A. J. Mossi; R. L. Cansian

1Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Departamento de Ciências Biológicas - Programa de Pós - Graduação em Ecologia. Avenida Sete de Setembro, nº 1621. Fone: 54 3520 9000-gabrielakubiak@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

As formações florestais do Rio Grande do Sul são consideradas de alta diversidade, porém, são constituídas por várias espécies que se encontram vulneráveis à extinção. Dentre elas tem - se *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rhower que se encontra na Lista Oficial Brasileira de extinção¹. Além disso, é uma espécie de alto valor comercial, pela qualidade de sua madeira e, principalmente, pela presença de princípios ativos como o safrol². A velocidade com que este importante recurso natural foi e vem sendo dilapidada, faz com que informações sobre a ecologia e o crescimento de essências nativas sejam de fundamental importância para o reflorestamento e o manejo racional, evitando - se os erros cometidos no passado.

A redução de áreas ocupadas por vegetação nativa tem levado às taxas alarmantes de perda de biodiversidade e ao empobrecimento dos recursos genéticos⁸. Para Kawaguici, *et al.*,⁷ são raros os casos de espécies estudadas do ponto de vista genético, sendo estes indispensáveis à exploração racional, à recuperação e principalmente, à conservação dos recursos da floresta tropical. Estes estudos são importantes para que não ocorra a perda de sua diversidade genética natural.

Uma das principais ferramentas desses estudos consiste no estudo da estrutura genética das espécies, que são fundamentais para o estabelecimento de critérios adequados de amostragem das populações para serem utilizados na recomposição dessas matas, objetivando a manutenção de sua diversidade⁵.

Informações de ecologia e genética em populações naturais de espécies arbóreas tropicais são incipientes na literatura, em função da alta diversidade e complexidade de espécies, trazendo dificuldades na amostragem e nas metodologias apropriadas para seu estudo. Esse conhecimento é essencial para o entendimento da estrutura genética das populações e, portanto, para o delineamento de estratégias de conservação, melhoramento e manejo sustentado (definição de tamanho de reservas, manejo adequado das espécies, re-

cuperação de áreas degradadas, coleta de sementes para plantios com espécies nativas)⁶.

Assim, neste trabalho estudou - se a diversidade e estrutura genética de diferentes populações dentro de uma Unidade de Conservação em diferentes estágios de desenvolvimento, e em um fragmento com diferentes condições edáficas e climáticas comparando - as entre e dentro das populações. O trabalho teve como “espécie modelo”, um táxon da família Lauraceae que vem sendo apontada como uma das mais ameaçadas de risco de extinção, e que se encontra presente na uma Unidade de Conservação municipal localizada no Município de Marcelino Ramos / RS, verificando como o processo de fragmentação pode ter influenciado na sua variabilidade genética. Espera - se que esse estudo pode ser também de grande importância no estabelecimento de estratégias de conservação dessas comunidades, assim como inferir corretamente sobre os métodos de manejo a serem aplicados para a conservação da mata.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é estudar a diversidade e estrutura genética de populações, em uma espécie arbórea nativa da Família das Lauráceas (*Ocotea odorifera*) utilizando - se marcadores moleculares, de modo a fornecer informações importantes para programas de conservação e melhoramento genético da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados um total de 112 indivíduos aleatoriamente da planta a ser estudada, conforme a disponibilidade de indivíduos no local selecionado. As amostras foram compostas de 28 indivíduos adultos identificados como A1, 28 indivíduos jovens dentro de uma mesma área preservada (A2) e 28 indivíduos jovens em uma área mais perturbada que se encontra em regeneração (B), dentro da Unidade de

Conservação do Parque Natural Municipal Teixeira Soares de Marcelino Ramos/RS. Coletou - se ainda, 28 indivíduos jovens em um fragmento florestal de uma propriedade particular no município de Dom Pedro de Alcântara /RS, distante 450Km da UC e próximo ao litoral (T), para possível comparação de resultados em diferentes locais de coleta. As amostras coletadas foram folhas jovens, acondicionadas e conservadas em nitrogênio líquido e encaminhadas ao laboratório de Biotecnologia da URI, sendo que, a coleta, o transporte e o armazenamento foram feitos de modo a manter ao máximo a integridade e a turgescência dos tecidos. O material coletado foi conservado em freezer - 80°C até o processamento da extração⁴.

O isolamento de DNA total de cada planta foi baseado no método descrito por Doyle & Doyle³. O processo básico consiste em: maceração de quantidades iguais de folhas em nitrogênio líquido; adição de tampão de extração à base de CTAB; desproteinização com clorofórmio - álcool isoamílico (24:1); precipitação com isopropanol e lavagem com etanol; tratamento com RNase; ressuspensão em TE (trisma - EDTA); quantificação em espectrofotômetro UV a 260 nm e confirmação da integridade em gel de agarose 0,8%.

Na reação de amplificação de RAPD foi utilizada a seguinte reação: Tampão de reação (50 mM Tris - HCl pH 9,0; 50 mM KCl; 0,5% Triton - X 100), dNTPs (200mM de cada), 0,2 mM de primer, 3mM de MgCl₂, 80ng de DNA e 1,5 U de Taq DNA polimerase. Foram utilizados vários kits de primers da Operon Technologies, entre eles os kits OPH, OPW, OPB, OPA e OPY, com 20 primers cada um, visando identificar os que apresentam os melhores resultados nas plantas em estudo, avaliando - se a quantidade de bandas produzidas, a intensidade destas e o polimorfismo gerado pelas mesmas. O trabalho foi desenvolvido utilizando - se os primers selecionados. A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research INC. O processo de amplificação seguiu a seguinte sequência: 3 min a 92°C, 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 35°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, ácido bórico e EDTA) em cuba de eletroforese horizontal. A corrida foi efetuada com voltagem constante de 90 Volts. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA de fago Lambda clivado com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI. A visualização dos fragmentos foi realizada com brometo de etídio e a observação feita sob luz ultravioleta. Os géis foram fotografados com sistema de aquisição de imagens GEL - pro. Os dendogramas de similaridade foram construídos pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), utilizando - se o coeficiente de Jaccard para cálculo de similaridade, com auxílio do programa MVSP.

RESULTADOS

Foram testados 20 primers, destes foram selecionados 8 que são: OPA 2, OPA 9, OPA 12, OPA 17, OPA 19, OPA 20, OPW 4 e OPB 1 onde, os mesmos geraram um total de 75 bandas. O índice de similaridade entre todos os indivíduos amostrados variou entre 0,58 e 0,94. Entretanto, considerou

- se a formação de agrupamentos, indivíduos com similaridade superior a 0,75.

A análise de agrupamentos UPGMA, com coeficiente de Jaccard, apresentou formação de 3 grupos com tendência de separação das diferentes populações. A população denominada A1 formou um agrupamento com 58% do total dos indivíduos. Já a população A2 apresentou 75% do total de indivíduos num mesmo agrupamento. Este agrupamento de A2 apresentou ainda um subgrupo com 100% de indivíduos A2, mostrando uma alta similaridade entre os mesmos. Observou - se ainda que os agrupamentos A1 e A2 encontram - se próximos entre si, o que já era esperado porque os indivíduos são da mesma população (A1 são os adultos e os A2 jovens). Já os indivíduos T, que são distantes geograficamente, formaram um outro grupo mais distinto com 66% dos indivíduos dentro do mesmo agrupamento. Essa mesma tendência é confirmada na análise de PCO (Análise de Coordenadas Principais) com formação dos mesmos agrupamentos.

Entretanto, alguns indivíduos das diferentes populações amostradas, não formaram nenhum agrupamento, indicando haver indivíduos com alta variabilidade genética em todas as populações amostradas.

Quanto ao índice de diversidade de Shannon (\log_{10}) observou - se que os indivíduos adultos A1 apresentaram uma menor diversidade (1,721), mas, com índice bem próximo dos indivíduos jovens A2 e B coletados na mesma Unidade de Conservação (1,734 e 1,744, respectivamente). Já os indivíduos jovens (T) coletados em uma outra área mais distante foram os que apresentaram maior diversidade (1,751).

CONCLUSÃO

Foi possível separar as populações em três diferentes grupos, observando - se uma tendência de relação entre distância geográfica e genética. Os resultados indicam uma menor diversidade de *Ocotea odorifera* nas populações da Unidade de Conservação de Marcelino Ramos - RS, a qual se encontra em uma Floresta Ombrófila Mista, que apesar de apresentar ocorrências desta espécie, não é a região preferencial de sua ocorrência, uma vez que a mesma tem preferência por climas mais quentes (regiões litorâneas).

Ainda assim, os índices obtidos permitem concluir que a *Ocotea odorifera* apresenta uma diversidade genética considerável, possibilitando sua regeneração natural *in situ* mantendo suas características originais.

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

REFERÊNCIAS

- 1 - Brasil. Portaria n. 006/92 - N, de 15 de janeiro de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, v.130, n.16, p.870 - 872, 23 jan., 1992. Seção 1.
- 2 - Carvalho, P. E. R. Espécies Arbóreas Brasileiras. Volume 1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 1039p.

- 3 - Doyle, J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13 - 15, 1987.
- 4 - Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Brasília: Embrapa - Cenargen, 1998, p.220.
- 5 - Kageyama, P.Y. Castro C. F. A.; Carpanezzi, A.A. Implantação de matas ciliares: estratégias para auxiliar a sucessão secundária. In: Simpósio sobre mata ciliar, Campinas, 1989. Anais. Campinas: Fundação Cargill, p.130 - 143, 1989.
- 6 - Kageyama, P. Y. *et al.*, Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorífera* (Lauraceae). *Scientia Forestalis*, 64: 108 - 119, 2003.
- 7 - Kawaguici, C. B.; Kageyama, P.Y. Diversidade genética de três grupos de indivíduos (adultos, jovens e plântulas) de *Calophyllum brasiliense* em uma população de mata de galeria. *Scientia Forestalis*, 59: 131 - 143, 2001.
- 8 - Myers, N; Mittermeier, C. G; Fonseca, G.A.B; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403:853 - 858, 2000.