



COMPARAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE A POPULAÇÃO ADULTA E JUVENIL DE *ILEX PARAGUARIENSIS* ST. HIL. DE UMA ÁREA DE FLORESTA URBANA GENETICAMENTE ISOLADA.

Cátia Marcia Golunski

G. B. Kubiak¹; L. B. Slaviero¹; C. A. Zanella¹; F. R. Zboralski¹; L. R. Borges¹; S. P. Miotto¹; L. A. Lerin¹; J. C. Budke¹; A. J. Mossi¹; R. L. Cansian¹

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-catialab@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A espécie *Ilex paraguariensis*, mais conhecida como erva - mate, pertence à família Aquifoliaceae, sendo uma das 68 espécies conhecidas do gênero *Ilex* no Brasil⁵. É uma planta endêmica do Continente Americano e se situa entre as latitudes de 21^o e 30^oS e longitude entre 48^o38' e 56^o10'W⁷.

Entre suas qualidades medicinais e nutricionais (em especial, por seu alto conteúdo em vitamina A), apresenta efeito diurético, estimulante, sendo muito útil em tratamentos de dieta e desintoxicação do organismo. Ainda que seu principal consumo seja como bebida tônica, começou - se a utilizá - la também, para outros fins, como a produção de desodorantes e corantes⁶.

O extrativismo, ainda praticado em alta frequência no caso da erva - mate, associado a técnicas errôneas de poda e manejo, a redução de áreas naturais como consequência do aumento das fronteiras agrícolas, principalmente no Brasil, e a pressão para a ocupação de áreas muitas vezes consideradas "improdutivas", tornam urgente a implantação de programas de conservação de recursos genéticos e esta constitui - se espécie - chave para a sobrevivência de vários animais e para a economia da região. A Convenção sobre a Diversidade Biológica, assinada durante a reunião mundial sobre meio ambiente e desenvolvimento, realizada em 1992 (Eco92), enfatizou a importância da criação simultânea de bancos de germoplasma in situ e ex situ das espécies de interesse econômico².

O Parque Municipal Longines Malinowski, com um espaço total de 248.453 m², é uma área de referência especial que contribui na caracterização urbana de Erechim pela sua singularidade. O mesmo está inserido no centro da cidade, estando isolado de outros fragmentos naturais pela área urbana.

De acordo com a sua lei de criação, constitui - se em um

parque de preservação e de recreação.

Representa área de qualidade paisagística por ser um elemento de valor estético e cultural, incorporado ao patrimônio da cidade, e de qualidade ambiental, por ser um fator determinante de conforto ao atuar como ilha de frescor nas imediações do bairro - centro e, por apresentar potencial para alternativas mais democráticas de lazer⁸.

Por meio da análise de polimorfismo de DNA utilizando marcadores RAPD, pode - se avaliar a variabilidade genética em populações de *Ilex paraguariensis* St. Hil. e dessa forma formular estratégias de conservação da mesma em áreas isoladas.

O aumento do uso de marcadores RAPD deve estar ligado ao baixo custo inicial e operacional, e também ao fato de ser acessível a qualquer espécie, independentemente de conhecimento prévio de seu genoma, sendo mais simples e rápido¹.

Entretanto, conservar e utilizar racionalmente o potencial oferecido pela natureza é um desafio científico - tecnológico atual. Machado⁵ alerta para o perigo das posições extremas em relação às estratégias de conservação. Por um lado há os que defendem a idéia de que a preservação deva ser do tipo "intocável", e no extremo oposto, estão os que argumentam que apenas as características agronômicas de interesse devam ser mantidas, devendo as demais, serem descartadas. Conforme o referido autor, o melhoramento moderno sofre as consequências de uma visão imediatista sujeita às frequentes mudanças nas exigências do mercado consumidor.

A conservação de áreas protegidas isoladas, principalmente dentro de perímetros urbanos, também é foco deste tipo de discussão. Pode - se optar por mantê - la com a menor ação antrópica possível ou transformá - la em parques antropizados com reposição de indivíduos para a sua manutenção ao longo do tempo.

Sobre este assunto existe uma grande lacuna na liter-

atura, pois praticamente inexistem trabalhos enfocando a manutenção da variabilidade genética de áreas isoladas como parques urbanos, como forma de manutenção da flora com o passar do tempo.

Neste sentido, o presente trabalho visa comparar a variabilidade genética de uma população adulta, formada anteriormente à urbanização, com possibilidade de fluxo gênico, em relação a uma população de plantas da mesma espécie, mas sem a possibilidade de fluxo gênico externo à área (plantas de pequeno porte). A hipótese a ser testada é a capacidade de manutenção da variabilidade genética nos indivíduos germinados após o isolamento desta área.

OBJETIVOS

- Objetivo Geral

Investigar a variabilidade genética de *Ilex paraguariensis* St. Hil., comparando indivíduos adultos, formados antes do isolamento e indivíduos juvenis, formados após o isolamento, em um parque de floresta urbana, visando determinar a capacidade de manutenção da variabilidade genética desta população em formação.

- Objetivos específicos

- Coletar e extrair DNA das duas populações de *Ilex paraguariensis* (adulta e juvenil) ocorrentes no parque urbano;
- Analisar através de marcadores moleculares RAPD os materiais genéticos obtidos;
- Verificar estatisticamente se há diferenças e diversidade genética entre a população de indivíduos adultos e juvenis, e discutir ecologicamente os resultados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 24 plantas adultas e 24 plantas juvenis, ambas no Parque Longines Malinowski de Erechim, visando determinar o grau de endogamia das plantas juvenis, em relação às plantas adultas.

2.1 Extração de DNA

Para o isolamento de DNA total de cada planta, foi utilizado o método descrito por Doyle; Doyle (1987) modificado, a fim de otimizar o processo. O processo básico consiste na maceração de quantidades iguais de folhas de cada planta em nitrogênio líquido; adição de tampão de extração; desproteinização com clorofil (clorofórmio - álcool isoamílico); precipitação com isopropanol e lavagem com etanol; tratamento com RNase; ressuspensão em TE (trisma - EDTA); quantificação em espectrofotômetro UV à 260 nm e confirmação da integridade em gel de agarose 0,8%.

2.2 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, 40ng de DNA e 1,5 U de Taq DNA polimerase.

2.3 Primers de RAPD

Foram utilizados vários kits de primers da Operon Technologies, entre eles os kits OPH, OPB, OPA, OW e OPY, com 20 primers cada um, visando identificar os que apresentam os melhores resultados nestas espécies, 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.

2.4 Amplificação de RAPD

A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research INC. O processo de amplificação seguiu a 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.

2.5 Análise eletroforética dos fragmentos amplificados

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 80Volts. 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 digitalmente através de captor de imagens Gel - Pro Imager, utilizando - se filtro laranja.

Na determinação da variabilidade genética, os dados obtidos através da determinação da presença ou ausência de bandas formaram uma matriz que foi analisada com auxílio do programa computacional MVSP. Os dendrogramas de similaridade serão construídos pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), utilizando - se o coeficiente de Jaccard para cálculo de similaridade. A análise de coordenadas principais e índice de Shannon foram efetuadas no mesmo programa.

RESULTADOS

As amostras apresentaram uma similaridade (coeficiente de Jaccard) que variou entre 0,52 a 0,90 entre indivíduos jovens e adultos considerando - se um valor significativamente alto quando comparado com outras populações nativas já estudadas onde as populações de *I. paraguariensis* apresentaram valores de similaridade entre 0,76 a 0,98.

De acordo com a análise de coordenadas principais (PCO) usando distâncias euclidianas podemos perceber que não houve uma separação definida, os indivíduos permaneceram juntos mostrando não haver formação de agrupamentos.

Os indivíduos jovens apresentaram índice de Shannon de 1,91, já os indivíduos adultos apresentaram um valor de 1,94, corroborando dessa maneira com o resultado do dendrograma, sendo que ambas as amostras (plantas adultas e plantas jovens) apresentaram alta variabilidade genética, mostrando que mesmo isolado, o fragmento constituído pelo parque urbano possui área suficiente para a manutenção da variabilidade genética desta espécie.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados foi possível concluir que a variabilidade genética esta se mantendo nos indivíduos jovens (formados após o isolamento da área pela urbanização) da mesma maneira que nos indivíduos adultos (formados por plantas adultas anteriores ao isolamento da área). Isso indica que esta área (248.453 m²), a qual tem *Ilex paraguariensis* como uma das espécies mais abundantes, se mostra suficiente para manter a variabilidade genética da espécie em estudo.

Agradecimentos

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

REFERÊNCIAS

- 1 - Cansian, R.L. Análise de RAPD aplicada a identificação de cultivares e avaliação da variabilidade genética em *Brassica*. 91 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Instituto de Biotecnologia UCS, Caxias do Sul - RS, 1999.
- 2 - Cansian, R. L. Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi - voláteis em populações nativas de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) do Brasil, visando a conservação da espécie. 95p. Tese (Doutorado Ciências) Programa de Pós - Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro

de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, 2003.

- 3 - Doyle, J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13 - 15, 1987.

- 4 - Machado, J.A. Recursos genéticos vegetais e a empresa de sementes. Simpósio Nacional de Recursos Genéticos Vegetais. IAC/EMBRAPA - CENARGEN. Campinas, p.13, 1995.

- 5 - Gilberti, G. C. *Ilex* em Sudamérica: florística, sistemática y potencialidades com relación a um banco de germoplasma para la yerba mate. In: Erva - mate: Biología e Cultura no Cone Sul. Ed.Universidade/UFRGS Porto Alegre, RS, Brasil, 303 - 312, 1995.

- 6 - Vidor, M. A., Ruiz, C. P., Moreno, S. V; Floss, P. A. Variabilidade genética em um ensaio de progênies de Erva - mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.). *Ciência Rural*, 32(4):.583 - 587, 2002.

- 7 - Vidor, M. A., Ruiz, C. P., Moreno, S. V., Floss, P. A. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de Erva - mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.): o sabor. *Ciência Rural*, 32(3): 415 - 420, 2002.

- 8 - Zanin, E.M., Santos, J. E., e Rosset, F. Florística e Fitosociologia do componente arbóreo do Parque Municipal Longines Malinowski, Erechim - RS. In: 51^o Congresso Nacional de Botânica. Brasília. 2000. Anais. Brasília - DF, 2000.