

COMPARAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE PLANTAS ADULTAS E JOVENS DE *ILEX PARAGUARIENSIS* ST. HIL. DE UMA ÁREA DE FLORESTA URBANA GENETICAMENTE ISOLADA

Comparison of the genetic variability between adult and young plants of *Ilex paraguariensis* St. Hil. of an area of genetically isolated urban forest

KUBIAK, G. B.; SLAVIERO, L. B.
GOLUNSKI, C. M.; MOSSI, A. J.
TONIAZZO, G.; CANSIAN, R. L.

Recebimento: 06/08/2009 – Aceite: 14/10/2009

RESUMO: A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) é uma planta endêmica do Continente Americano, com importante papel socioeconômico e principal uso no chimarrão e tererê. O Parque Municipal Longines Malinowski é uma área urbana de Erechim constituindo-se de um parque de preservação e de recreação. A redução de áreas naturais afeta diretamente essa espécie-chave; desse modo, para a conservação e uso sustentável, estudos genéticos são indispensáveis. Assim, o objetivo do trabalho foi investigar a variabilidade genética, usando-se marcadores RAPD, de *I. paraguariensis*, comparando-se plantas adultas, formadas antes do isolamento, e plantas jovens, formadas após o isolamento, em um parque de floresta urbana. Coletaram-se amostras de 96 indivíduos que foram analisados em dois diferentes géis de RAPD (A e B). Em cada gel, utilizaram-se 48 amostras (24 jovens e 24 adultas). Para determinação da variabilidade genética, foram utilizados os índices de Jaccard e Shannon, com auxílio do programa MVSP. As amostras do gel A apresentaram uma similaridade média de 0,79 entre indivíduos jovens e adultos; já no gel B, a similaridade média foi de 0,74. Tanto a análise de similaridade como a análise de coordenadas principais demonstraram não haver formação de agrupamentos capazes de separar plantas jovens de adultas. Os indivíduos jovens no gel A apresentaram índice de Shannon de 1,91; já os indivíduos adultos apresentaram um valor de 1,93; no gel B, os indivíduos

jovens e adultos apresentaram o mesmo valor de 1,88. Foi possível concluir que a variabilidade genética está 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 a área do parque (equivalente a 248.453 m²), se mostra suficiente para manter a variabilidade genética da espécie em estudo.

Palavras-chave: RAPD. *Ilex paraguariensis*. Parque florestal urbano. Conservação genética.

ABSTRACT: Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) is an endemic plant from the American Continent with an important social and economic role, which has mainly been used as raw material for *chimarrão* and *tererê*. The Municipal Park Longines Malinowski, is an urban area belonging to Erechim city, consisting of a recreation and preservation area. The reduction of such natural areas can directly affect this key species. Thus, for conservation and sustainable use, genetic studies are indispensable. Based on these aspects, the aim of this work was to investigate the genetic variability, using RAPD markers, of *I. paraguariensis*, comparing adult plants formed before the isolation, and young plants formed after the isolation, in a park of a urban forest. Samples of 96 individuals were collected and analyzed in two different agarose gel of RAPD (A and B). In each gel, 48 samples were used (24 young and 24 adults). To determine the genetic variability, the index of Jaccard and Shannon and the software MVSP were used. Samples of gel A presented an average similarity of 0.79 between adult and young individuals, and gel B presented an average similarity of 0.74. Neither the analysis of similarity nor the main coordination demonstrated to have formation of grouping able to separate young from adult plants. Young individuals in gel A presented Shannon index of 1.91, since the adult individuals presented a value of 1.93. In gel B adult and young individuals presented the same value of 1.88. It was possible to conclude that the genetic variability is been kept both in young (formed after the isolation of the area for the urbanization) and adult (formed for previous adult plants to the isolation of the area) individuals. This indicates that the park area (248,453m²) is enough to keep the genetic variability of the species in study.

Key words: RAPD. *Ilex paraguariensis*. Urban forest park. Genetic conservation.

Introdução

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. Constituinto-se de um fragmento florestal, representado pela formação vegetal classificada como Floresta com Araucária, localizado no município de Erechim, situado na Região Alto Uruguai do Estado do Rio Grande do Sul. De acordo com a sua lei de criação (Lei Municipal nº

3.110/98), 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 lazer (ZANIN et al., 2000).

Entretanto, conservar e utilizar racionalmente o potencial oferecido pela natureza é um desafio científico-tecnológico atual. Machado (1995) alerta para o perigo das posições extremas em relação às estratégias de conservação. Por um lado, há os que defendem a ideia de que a preservação deva ser do tipo “intocável” e, no extremo oposto, estão os que argumentam que apenas as características agrônômicas de interesse devam ser mantidas, devendo, as demais, ser 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 desse tipo de discussão (MORAES, 2008). 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.

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 restrita. Como consequência da fragmentação ocorre o decréscimo da variabilidade genética devido ao endocruzamento (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

O processo de regeneração natural que promove a estabilidade e a continuidade da

comunidade em determinado local, depende inicialmente da dispersão das sementes que devem apresentar viabilidade, fugindo de predadores e encontrando condições adequadas à germinação (GÓMEZ-POMPA; VASQUEZ-YANEZ, 1981). Posteriormente, a sobrevivência e o desenvolvimento dos indivíduos da regeneração dependem de fatores fenológicos, genéticos e ambientais (FELFILI, 1997). Todos esses fatores produzem dinâmicas nas condições de crescimento e interferem na estrutura da comunidade, favorecendo diferentes espécies ao longo do tempo (MEDEIROS et al., 2007).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) possui mais de 80% de sua área de ocorrência no território brasileiro (WINGE et al., 1995) cabendo ao Brasil a maior responsabilidade no estudo e manutenção da mesma.

Pesquisas sobre variabilidade em erva-mate no Brasil têm sido feitas esporadicamente por diferentes grupos de pesquisa, limitando-se a materiais coletados em regiões específicas de populações nativas no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, ou em ensaios de progênies (WINGE et al., 1995; GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000; VIDOR et al., 2002a; VIDOR et al., 2002b; CANSIAN et al., 2008). Nos diferentes trabalhos com plantas adultas, os resultados mostram uma maior variabilidade intrapopulacional em relação à variabilidade interpopulacional. Entretanto, a escassez de dados sobre a variabilidade genética de populações, isoladas geneticamente, limita a possibilidade de planejamento da manutenção da variabilidade genética, seja esta *in situ* ou *ex situ*. Sobre esse assunto, existe uma grande lacuna na literatura, 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.

Nesse sentido, o presente trabalho visa a comparar a variabilidade genética de indivi-

duos adultos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), formados anteriormente à urbanização, e com possibilidade de fluxo gênico, em relação a indivíduos 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 dessa área.

Material e Métodos

O material foi coletado em um parque florestal urbano, Parque Longines Malinowski, localizado entre as coordenadas 27°35'54" S e 52°16'52" W. Foram coletadas folhas de 48 plantas adultas (diâmetro à altura do peito - DAP maior que 15 cm) e 48 plantas juvenis (DAP inferior a 5 cm), visando a determinar o grau de endogamia das plantas juvenis em relação às plantas adultas. A distância entre os indivíduos coletados foi superior a 10 m. O material recém-coletado foi transportado em caixa de isopor com gelo e armazenado em freezer a -80 °C, a fim de evitar o murchamento e a oxidação do DNA.

Para o isolamento de DNA total de cada planta, foi utilizado o método descrito por Doyle; Doyle (1988) modificado para uso em *I. paraguariensis*. O processo básico consistiu na maceração de quantidades iguais de folhas de cada planta em nitrogênio líquido; adição de tampão de extração (2% CTAB, 1,4 mM NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris, 1% PVP, pH 8,0); desproteínização com clorofil (clorofórmio e álcool isoamílico 24:1); precipitação com isopropanol e lavagem com etanol; ressuspensão em TE (10 mM trisma e 1 mM EDTA).

A quantificação do DNA extraído foi realizada em espectrofotômetro UV, a 260nm, e confirmação da integridade do mesmo em gel de agarose 0,8% em cuba de eletroforese horizontal. Para a reação de amplificação de RAPD, foi utilizada a reação descrita por

Williams et al. (1991). Foram utilizados os primers OPA 10, OPA 18, OPB 06, OPF 04, OPF 12, OPW 06, OPY 04, OPY 07, OPY 08, OPY 10, OPY 11, OPY 14 e OPY 15 da Operon Technologies. A amplificação foi realizada em termociclador (modelo PTC 100, MJ Research INC., Watertown, MA) utilizando-se a Taq DNA Polimerase (2 Unidades por reação). O processo de amplificação foi baseado na 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 dos fragmentos foi realizada por eletroforese, em gel de agarose 1,4%, em tampão TBE 1X (0,089M Trisma, 0,089M Ácido bórico e 0,008M EDTA). Para a corrida em gel de agarose, foi utilizada 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 pelo sistema fotográfico digital GEL-PRO Imager, utilizando-se filtro laranja (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). As análises eletroforéticas foram realizadas em dois diferentes géis (gel A e B). Em cada gel foram utilizadas 48 amostras (24 jovens e 24 adultas), perfazendo um total de 96 plantas amostradas.

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 foram 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 e Discussão

As amostras do gel A apresentaram uma similaridade (coeficiente de Jaccard) que variou entre 0,53 a 0,89, com média de 0,79 entre indivíduos jovens e adultos. No gel B, a similaridade variou entre 0,54 a 0,98, com média de 0,74 (Figura 1). Comparando os resultados com Cansian (2003) que estudou a variabilidade de populações nativas de *I. paraguariensis* e encontrou valores de similaridade entre 0,76 a 0,98, pode-se considerar significativamente alta a variabilidade da população estudada.

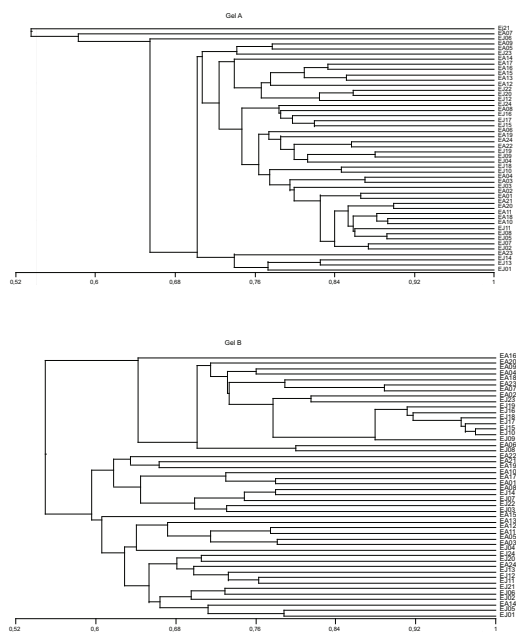


Figura 1 - Dendrogramas obtidos por marcadores RAPD (coeficiente de Jaccard) de diferentes matrizes de Erva-mate (EJ: erva-mate jovem e EA: erva-mate adulta) representando o Gel A e o Gel B.

De acordo com a análise de coordenadas principais (PCA), usando-se distâncias euclidianas, observa-se que não houve uma separação definida das plantas jovens em relação às adultas, tanto no gel A quanto no gel B, onde os indivíduos permaneceram juntos, mostrando não haver formação de agrupa-

mentos (Figura 2). Além disso, a maior parte das bandas foi comum a todas as populações, e as bandas específicas ocorreram em baixas frequências. Gauer; Cavalli-Molina (2000), estudando quatro populações naturais distintas de erva-mate, também obtiveram baixa diversidade genética entre populações.

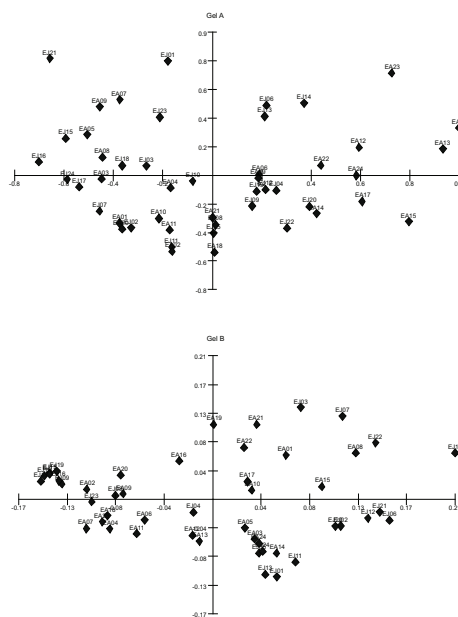


Figura 3 - Gráfico PCA, representando a disposição da população do Gel A e do Gel B.

Os indivíduos jovens no gel A apresentaram índice de Shannon de 1,91; já os indivíduos adultos apresentaram um valor de 1,93. No gel B, os indivíduos jovens e adultos apresentaram o mesmo valor de 1,88. Corroborando dessa maneira com o resultado do dendrograma, sendo que ambas as amostras (plantas jovens e adultas) apresentaram alta variabilidade genética, mostrando que, mesmo isolado, o fragmento constituído pelo parque urbano possui área suficiente para a manutenção da variabilidade genética dessa espécie.

Alguns autores, como Sebbenn; Etti (2001), 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 coisas (ALLARD, 1971). Por conseqüência, esperava-se que a variabilidade se mostrasse maior na população nativa ou mais antiga; porém isso não foi observado.

Segundo Colli et al. (2003), muitos efeitos da fragmentação só se manifestam com o passar do tempo. Assim sendo, ao se analisarem os efeitos da fragmentação sobre a biodiversidade, é mister considerar o tempo decorrido desde a fragmentação e outras perturbações, naturais ou não, que tenham ocorrido ao longo do tempo. Análises limitadas a fragmentos recém-isolados possuem baixo poder preditivo e podem até indicar pouca ou nenhuma alteração na biota. O Parque Municipal Longines Malinowski teve a sua área doada ao município de Erechim pelo governo estadual, em 1947, quando o Município ainda apresentava um pequeno crescimento urbano, uma vez que Erechim foi emancipado em 1918 (Decreto nº 2343, de 30 de abril de 1918). Nesse sentido, o isolamento do mesmo pode ser considerado recente, principalmente considerando a longevidade de *Ilex paraguariensis*, a qual pode chegar a 100 anos (MAZUCHOWSKI, 1989; CARVALHO, 2003).

Portanto, a preservação de fragmentos, onde a deriva genética e a endogamia ainda não são pronunciadas, pode ser crítica para a manutenção da diversidade genética e viabilidade das populações numa determinada região. Ainda, devido ao longo tempo

de isolamento, fragmentos naturais podem abrigar espécies endêmicas, devendo ser considerados como de alta prioridade para a conservação.

A persistência de populações em paisagens fragmentadas é criticamente dependente da manutenção da conectividade entre fragmentos, que, por sua vez, impede o isolamento das populações. Uma maior conectividade pode ser obtida pela criação de habitats mais semelhantes ao original no entorno dos fragmentos, pela criação de corredores ecológicos e pela diminuição da distância entre fragmentos. Nesse sentido, até mesmo árvores isoladas podem contribuir para o fluxo de indivíduos e genes entre os fragmentos.

Considerações Finais

Com base nos resultados, foi possível concluir que a variabilidade genética está 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 essa área (248.453 m²), a qual tem *Ilex paraguariensis* como uma das espécies mais abundantes, mostra-se suficiente para manter a variabilidade genética da espécie em estudo. Entretanto, devido ao pequeno tempo transcorrido desde o isolamento (aproximadamente 60 anos) e a longevidade dessa espécie (100 anos), esse resultado pode vir a ser alterado no futuro. Nesse sentido, outros trabalhos devem ser conduzidos como forma de monitoramento, ou com espécies de ciclo mais curto a fim de investigar as conseqüências do isolamento do parque sobre a variabilidade genética das espécies presentes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FAPERGS, Secretaria de Ciência e Tecnologia, RS (SC&T-PIT Norte) e URI-Campus de Erechim, pelo apoio financeiro.

AUTORES

Gabriela Busnello Kubiak - Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas (Licenciatura) da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-Campus de Erechim. E-mail: gabrielakubiak@yahoo.com.br

Laura Benetti Slaviero - Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado) da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-Campus de Erechim. E-mail: laurabslaviero@yahoo.com.br

Cátia Marcia Gonlunski - Mestranda do Programa de Mestrado em Ecologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-Campus de Erechim. E-mail: catialab@yahoo.com.br

Altemir José Mossi - Professor/Pesquisador do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-Campus de Erechim. E-mail: amossi@uricer.edu.br

Geciane Toniazzo - Professor/Pesquisador do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-Campus de Erechim. E-mail: gtoniazzo@uricer.edu.br

Rogério Luis Cansian - Professor/Pesquisador do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-Campus de Erechim. E-mail: cansian@uricer.edu.br

REFERÊNCIAS

ALLARD, R.W. (Ed). **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971, 381p.

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.

CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.J.; MOSELE, S.H.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; PAROUL, H.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic conservation and medicinal properties of mate (*Ilex paraguariensis* St Hil.). **Pharmacognosy Reviews**. v. 2, n.4, p. 326-338, 2008.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. 1. Brasília: Embrapa/Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p.

COLLI, G. R., ACCACIO, G. M., ANTONINI, Y., CONSTANTINO, R., FRANCESCHINELLI, E. V., LAPS, R. R., SCARIOT, A., VIEIRA, M. V. E WIEDERHECKER, H. C. A Fragmentação dos Ecossistemas e a Biodiversidade Brasileira: Uma Síntese. In: Fragmentação de Ecossistemas: Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas, RAMBALDI, D. M.; OLIVEIRA, D. A. S. (eds.). **Ministério do Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas**, Brasília. p. 317-324, 2003.

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

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**, v. 20, p. 155-162, 1997.

GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, S. Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* St.Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. **Heredity**. v. 84, p. 647-656, 2000.

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.

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

MAZUCHOWSKI, J. Z. **A cultura da erva-mate**. Curitiba: EMATER, 1989. 36 p.

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**, v. 13, n. 3, p. 291-298, 2007.

MORAES, H. M. As áreas de preservação permanente nas zonas urbanas. 2008. http://www.jurisway.org.br/v2/dhall.asp?id_dh=560. Acesso em setembro de 2009.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Ed. Vida, 2001, 328p.

SEBBENN, A.M.; ETTORI, L.C. Conservação genética *ex situ* de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltophorum dubium* em teste de progênes misto. **Revista do Instituto Florestal**, v. 13, n. 22, p. 201-211, 2001.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V.; FLOSS, P. A. Variabilidade genética em um ensaio de progênes de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.). **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 583-587, 2002a.

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**, v. 32, n. 3, p.4 15-420, 2002b.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. v. 18, p.6531-6535, 1991.

WINGE, H.; WOLLHEIM, C.; CAVALLI-MOLINA, S.; ASSMANN, E. M.; BASSANI, K. L. L.; AMARAL, M. B.; COELHO, G. C.; FREITAS-SACCHET, A. M. O.; BUTZKE, A.; VALDUGA, A.

T.; MARIATH, J. E. A. Variabilidade genética em populações nativas de erva-mate e a implantação de bancos de germoplasma, In: **Erva-mate: Biologia e Cultura no Cone Sul**. Ed. Universidade/UFRGS Porto Alegre, RS, Brazil p. 323-345, 1995.

ZANIN, E.M.; SANTOS, J. E.; ROSSET, F; **Florística e Fitossociologia do componente arbóreo do Parque Municipal Longines Malinowski, Erechim - RS**. 51º Congresso Nacional de Botânica. Brasília, 2000. *Anais*. Brasília/DF, 2000.