

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM *OCOTEA ODORIFERA* (VELL.) ROHWER (LAURACEAE) NO SUL DO BRASIL

Diversity and genetic structure in *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer
(Lauraceae) from southern Brazil

Cátia Marcia Golunski¹; Shana Paula Segala Miotto²; Cláudio Valério Junior¹;
Thiely Corazza¹; Albanin Aparecida Mielniczki-Pereira¹; Altemir José Mossi³;
Jean Carlos Budke¹; Rogério Luís Cansian¹

¹ Universidade Regional Integrada do Ato Uruguai e das Missões - URI Erechim, e-mail: jean@uricer.edu.br

² Instituto Federal do Rio Grande do Sul - IFRS, Bento Gonçalves, RS

³ Universidade Federal Fronteira Sul - UFFS, Erechim, RS

Data do recebimento: 28/10/2014 - Data do aceite: 20/01/2015

RESUMO: Neste trabalho, analisamos a diversidade e estrutura genética de diferentes populações de *Ocotea odorifera* em remanescentes florestais com diferentes condições edafoclimáticas, utilizando-se o marcador molecular RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e marcador isoenzimático, visando fornecer informações para programas de conservação da espécie. Os marcadores RAPD geraram 168 bandas, com 87,5% de polimorfismo entre as quatro populações estudadas. O polimorfismo intra-populacional variou de 52,98 a 65,48%. Uma análise de escalonamento multidimensional não-métrico – NMDS mostrou pouca separação entre as populações estudadas e, uma análise de similaridade – ANOSIM mostrou maior variabilidade intrapopulacional em relação à variabilidade interpopulacional ($p < 0,01$). Os resultados obtidos por marcadores isoenzimáticos indicaram alta variabilidade genética para a espécie, com heterozigosidade observada ($H_o = 0,52$) superior à heterozigosidade esperada ($H_e = 0,30$). A análise da estrutura genética confirmou a maior variabilidade intrapopulacional ($\Theta_p = 0,23$), também demonstrada pelo marcador RAPD. Verificou-se baixa endogamia dentro ($f = -0,68$) e para o conjunto das populações ($F = -0,30$), indicando boa estrutura genética. O fluxo gênico estimado foi baixo, com $Nm = 0,82$. Os resultados permitem concluir que as populações de *Ocotea odorifera* avaliadas apresentam alta diversidade genética, possibilitando sua regeneração natural *in situ*, mantendo suas características originais.

Palavras-chave: Diversidade Genética. Fragmentos Florestais. Isoenzimas. Mata Atlântica Subtropical. RAPD.

ABSTRACT: The aim of this study was to analyze the diversity and genetic structure of different populations of *Ocotea odorifera* from forest remnants with distinct edaphic-climatic conditions, by using the molecular marker RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and isoenzymatic markers in order to provide information for conservation programs. The RAPD markers generated 168 bands, with 87.5% of polymorphism among four studied populations. The intrapopulation polymorphism ranged from 52.98 to 65.48%. A non-metric multidimensional scaling – NMDS showed little separation among populations. A similarity analysis – ANOSIM showed higher intrapopulation in relation to interpopulation variability ($p < 0.01$). The isoenzymatic results indicated high genetic variability for this species with observed heterozygosity ($H_o = 0.52$), higher than the heterozygosity expected ($H_e = 0.30$). The analysis of the genetic structure confirmed greater intrapopulation variability ($\Theta_p = 0.23$), also demonstrated by RAPD marker. There was low inbreeding within ($f = -0.68$) and for all populations ($F = -0.30$), indicating a good genetic structure. The estimated gene flow was low, with $Nm = 0.82$. The results indicate that the assessed populations of *O. odorifera* show high genetic diversity, allowing its natural regeneration *in situ*, keeping its original characteristics.

Keywords: Forest remnants. Genetic Diversity. Isoenzymes. RAPD. Subtropical Atlantic Forest.

Introdução

As formações florestais do Rio Grande do Sul são consideradas de alta diversidade, porém, são constituídas, atualmente, por várias espécies ameaçadas de extinção. Dentre elas, a *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer se encontra na Lista da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção (Instrução Normativa nº 6 de 2008) por ser uma espécie de alto valor comercial, pela qualidade de sua madeira e, principalmente, pela presença de princípios ativos como o safrol (LIMA et al., 2014).

Um fator importante que influencia a estruturação genética de uma espécie nativa é a fragmentação florestal, com consequente redução populacional. Dentre seus principais efeitos, destacam-se a per-

da de diversidade genética, semelhança na estrutura populacional e aumento nas taxas de endogamia. A ação antrópica sobre a variabilidade genética, seja pela fragmentação de florestas ou pela eliminação dos indivíduos de valor econômico, causa maior diferenciação genética entre populações pelos prejuízos acarretados ao fluxo gênico (RATNAM; BOYLE, 2000). Segundo Fuchs e Hamrick (2010), a fragmentação provoca diminuição ou interrupção do fluxo gênico pela diminuição das taxas de visita de insetos polinizadores e animais, podendo alterar a estrutura genética populacional. Assim, o conhecimento da estrutura genética das populações é importante para que sejam estabelecidas estratégias de conservação e manejo (FALK et al., 2001; BOTREL et al., 2006; VALLE et al., 2013).

O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade e estrutura genética de populações de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae), utilizando-se dois marcadores moleculares distintos, bem como, estudar a variabilidade entre e dentro das populações, de modo a fornecer informações importantes para programas de conservação e melhoramento genético da espécie.

Material e Métodos

A área de estudo 01 foi o Parque Natural Municipal – PNM Mata do rio Uruguai Teixeira Soares (Marcelino Ramos, RS), uma Unidade de Conservação com aproximadamente 430 hectares abrangida pela Floresta Estacional Semidecídua (OLIVEIRA-FILHO et al. 2014). Encontra-se próximo à foz do rio Teixeira Soares, afluente do Rio Uruguai, entre as coordenadas 27°28'17" e 27°30'58" S, 51°55'15" e 51°57'42" W com altitude média de 400 m (SOCIOAMBIENTAL, 2001).

A segunda área de estudo 02 está localizada no município de Dom Pedro de Alcântara, na região fisiográfica do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, em um fragmento de Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas de cerca de 15 ha, com uma altitude de 30 m e ponto central nas coordenadas 27°20'19" S e 49°40'28" W, distando cerca de 450 km da área de estudo 01.

Na área de estudo 01, foram coletadas folhas jovens de 120 indivíduos aleatoriamente amostrados, sendo compostas por: a) 30 indivíduos adultos em área em estágio avançado de sucessão (POP 1); b) 30 indivíduos jovens (POP 2) em área em estágio avançado de sucessão e; c) 30 indivíduos jovens em local em estágio intermediário de sucessão, apresentando sinais de distúrbio e localizado dentro da Unidade de Conservação (POP 3). As populações foram coletadas entre

470m a 532m de altitude (POP 1, POP 2 e POP 3 respectivamente). Na área de estudo 02, foram coletadas folhas de 30 indivíduos em regeneração (POP 4).

As amostras foram acondicionadas e conservadas em nitrogênio líquido até o processamento da extração. A diversidade e estrutura genética foram avaliadas usando-se marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e isoenzimas.

Análises com Marcador RAPD

Para a análise de RAPD, o DNA genômico total foi extraído utilizando-se o protocolo de Doyle e Doyle (1987) modificado. Os tecidos foliares foram macerados em nitrogênio líquido, com adição de tampão de extração (CTAB 2%); incubação em 65°C por 30 minutos, seguindo-se a desproteínização com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), precipitação com etanol absoluto; lavagem com etanol (70%). O *pellet* de DNA obtido foi ressuspensionado em TE (Trisma-EDTA).

A quantificação e avaliação da qualidade do DNA extraído foram feitas por espectrofotometria (260/280 nm) e a integridade do DNA foi confirmada pela visualização em gel de agarose (0,8%) em cuba de eletroforese horizontal.

Na reação de amplificação RAPD foram utilizados 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, 1,5 U de Taq DNA polimerase Gibco BRL (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e aproximadamente 40 ng de DNA, com volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador (modelo PTC 100, MJ Research INC., Watertown, MA). O processo de amplificação foi baseado na seguinte

seqüência: 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.

Foram testados kits de primers OPH, OPW, OPB, OPA e OPY da Operon Technologies, com 20 primers cada, selecionando-se os que apresentaram os melhores resultados nas plantas em estudo, avaliando-se a quantidade de bandas produzidas, a intensidade destas e o polimorfismo gerado pelas mesmas.

Após a amplificação, o DNA foi submetido a eletroforese para a separação dos fragmentos em gel de agarose 1,4% contendo 0,5 mg.mL⁻¹ de brometo de etídio, em tampão TBE 1X (0,089M Trisma, 0,089M ácido bórico e 0,008M EDTA) em sistema de eletroforese horizontal, com tensão constante de 90 Volts durante 240 minutos. As amostras receberam 3,5 µL de TA (0,4g.mL⁻¹ de sacarose + 0,0025g.mL⁻¹ de azul de bromofenol) e, a visualização dos fragmentos foi realizada em transiluminador ultravioleta e os géis foram fotografados pelo sistema fotográfico digital GEL-PRO Imager (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Na determinação da variabilidade genética, os dados obtidos por meio da determinação da presença ou ausência de bandas formaram uma matriz binária. A porcentagem de polimorfismos obtida nos géis com as amplificações foi calculada dividindo-se o número de bandas polimórficas pelo número total de bandas de cada primer.

Uma análise de Escalonamento Multidimensional Não-métrico – NMDS foi utilizada para avaliar a similaridade e dispersão entre indivíduos amostrados. Esta técnica foi escolhida devido à sua vantagem por manter uma distância inicial proporcional entre unidades de amostragem, por conseguinte, a distância original entre indivíduos. Pos-

teriormente, uma análise de similaridade de matrizes (ANOSIM) foi aplicada para verificar se haveria tendência de separação genética entre áreas geograficamente distantes e em altitudes distintas, sendo cada população considerada uma amostra distinta. As análises foram conduzidas no programa PAST 2.0 (HAMMER; HARPER, 2009). Para estimar a diversidade entre e dentro das populações, limites de confiança para agrupamentos foram calculados por amostras de 9999 iterações, por meio do programa Multiv 2.4.2 (PILLAR, 2006).

Marcador Isoenzimático

Para a análise de isoenzimas foram utilizados 15 dos 30 indivíduos coletados de cada população, amostrados de forma aleatória. A extração das enzimas foi feita utilizando-se cerca de 1 g de tecido foliar. mL⁻¹ da solução de extração n° 1 de Alfenas (1998), adicionando-se aproximadamente 150 mg de PVP-40 durante a trituração, para remoção de compostos fenólicos e aumento da estabilidade das mesmas.

Para a eletroforese foi utilizada cuba vertical dupla onde aplicou-se 50 µL de amostra mais 3,5 µL de TA (0,4g.mL⁻¹ de sacarose + 0,0025g.mL⁻¹ de azul de bromofenol). As enzimas foram separadas em gel de poliácridamida a 12% (ALFENAS, 1998) associado a Tris-HCl 1,5M como solução-tampão, sendo o pH 8,8 para o gel de corrida e pH 6,8 para o gel empilhador, o tampão utilizado no tanque e nos eletrodos foi Tris-Glicina (14g.L⁻¹ de glicina + 3g.L⁻¹ de trisma base) pH 8,9, diluído 10 vezes. A corrente elétrica para a corrida eletroforética foi de 220 V e 40 mA até a marca do corante aproximar-se do final do gel. Foram testados 20 sistemas enzimáticos, porém, apenas oito se mostraram ativos para a espécie (Tabela I).

Tabela I - Sistemas enzimáticos utilizados para análise de estrutura e diversidade genética de quatro populações de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer do sul do Brasil.

ENZIMA	SIGLA	CÓDIGO*
Diaforase	DIA	E.C 1.8.1.4
Isocitrato Desidrogenase	IDH	E.C. 1.1.1.42
Sorbitol Desidrogenase	SDH	E.C. 1.1.1.14
Malato Desidrogenase	MDH	E.C. 1.1.1.37
Fosfatase Alcalina	ALP	E.C. 3.1.3.1
Superóxido Dismutase	SOD	E.C. 1.15.1.1
Esterase	EST	E.C. 3.1.1.1
Peroxidase	PO	E.C. 1.11.1.7

* Enzyme Comission

Fonte: IUBMB (1992)

O preparo das soluções e os procedimentos de coloração e revelação utilizados seguiram a metodologia de Alfenas (1998). A interpretação dos resultados baseou-se na presença, nitidez, número e localização das bandas.

Com o auxílio do programa GenAlEx 6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2009) foram calculadas as frequências alélicas, os índices de diversidade genética (percentagem de *loci* polimórficos, número aparente e efetivo de alelos por população, índice de Shannon e heterozigosidades observada e esperada, estatísticas F de Wright, fluxo gênico e distância genética de Nei.

Resultados e Discussão

Análises de RAPD

Os 17 primers selecionados (Tabela II) geraram um total de 168 bandas, sendo que 147 foram polimórficas (87,5%) e 21 foram monomórficas (12,5%).

Foi observado alto nível de polimorfismo dentro e entre todas as populações, resultado

esperado, em se tratando de espécies alógamas ou de sistema misto com predomínio de cruzamentos. Este alto nível de polimorfismo também foi observado em outras espécies arbóreas tropicais, 84,4% em *Maytenus ilicifolia* (BITTENCOURT, 2000), 75 a 83% em diferentes populações de *Aniba rosaeodora* (SANTOS et al., 2008), 63% em *Psidium* spp. (SOUZA et al., 2014) e em diferentes espécies de *Ocotea* com marcadores microsátelite (MARTINS et al., 2014).

As divergências de polimorfismo total (87,5%) foram maiores que a divergência interpopulacional onde a população POP 1 apresentou 62,5%, POP 2 52,98%, POP 3 56,55% e POP 4 65,48%. Os indivíduos da população adulta do PNM Mata do rio Uruguai Teixeira Soares (POP 1) apresentaram maior polimorfismo em relação às populações regenerantes da mesma UC, com índice semelhante ao encontrado na população próxima ao litoral (POP 4) (Tabela II).

O Escalonamento Multidimensional Não-métrico – NMDS ($stress = 0,31$) mostrou pouca tendência de separação entre as populações estudadas, mesmo para a população POP 4 (Dom Pedro da Alcântara) onde se esperava maior separação devido às condições edáficas e climáticas serem diferentes dos indivíduos coletados na Unidade de Conservação (Figura 1). A análise de similaridade ANOSIM ($R = 0,02$, $p < 0,01$) mostrou que a maior diferença é encontrada dentro das populações do que entre populações.

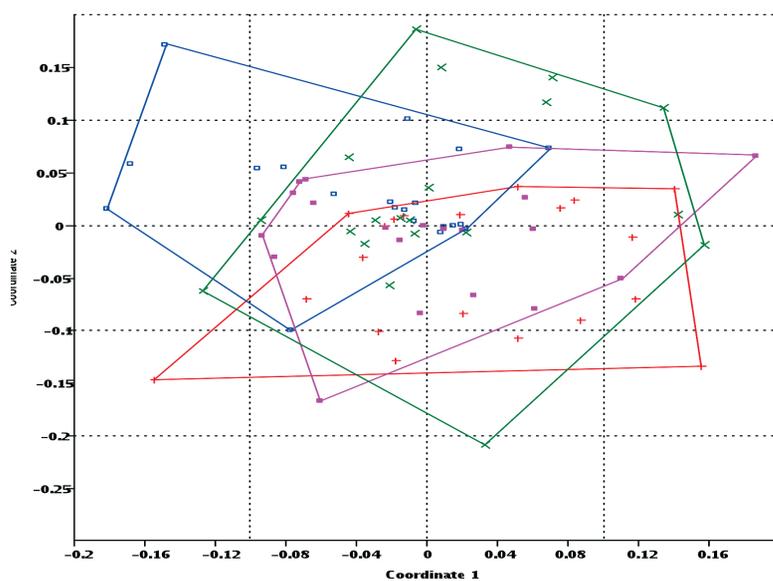
Os resultados indicaram que a distribuição geográfica e as condições ambientais não influenciaram significativamente na diversidade genética de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, comprovando que as populações são próximas geneticamente, o que vem contribuir na justificativa da mesma se encontrar na lista de espécies em extinção, exigindo atenção e estudos mais detalhados para contribuir na conservação da espécie.

Tabela II - Relação de primers utilizados, sua seqüência, nº de locos obtidos e nº de locos polimórficos na análise de RAPD.

Primers	Seqüência 5' – 3'	Nº de locos	Nº de locos polimórficos			
			POP 1	POP 2	POP 3	POP 4
OPA - 5	TGCGCCCTTC	9	5	3	9	8
OPA - 7	GAAACGGGTG	9	8	5	6	5
OPA - 4	GGACTGGAGT	8	3	3	5	7
OPF - 16	GGAGTACTGG	14	10	7	3	9
OPB - 10	CTGCTGGGAC	8	3	5	4	2
OPA - 6	CCCGTCAGCA	10	4	5	3	6
OPB - 8	GTCCACACGG	12	12	7	10	7
OPB - 2	TGATCCCTGG	13	11	4	2	10
OPA - 18	AGGTGACCGT	9	6	2	9	7
OPB - 1	GTTTCGCTCC	9	5	4	4	5
OPW - 4	CAGAAGCGGA	11	5	8	6	6
OPA - 20	GTTGCGATCC	8	4	5	5	8
OPA - 19	CAAACGTCGG	9	7	9	9	8
OPA - 17	GACCGCTTGT	10	5	7	3	2
OPA - 12	TCGGCGATAG	11	8	8	8	9
OPA - 9	GGGTAACGCC	9	5	6	5	7
OPA - 2	GTTTCCGCTCC	9	3	1	4	4
Total		168	104	89	95	110
Polimorfismo			62,5%	52,98%	56,55%	65,48%

POP 1 = adultas, POP 2 = jovens, POP 3 = jovens, POP 4 = jovens

Figura 1 - Escalonamento Multidimensional Não-métrico – NMDS de quatro populações de *Ocotea odorifera* amostradas no sul do Brasil. Onde: + = POP 1, □ = POP 2, ■ = POP 3 e x = POP 4.



Análises de Isoenzimas

Foram utilizados oito sistemas isoenzimáticos, sendo identificados 14 locos e destes 11 foram polimórficos. Na literatura sugerem um mínimo de 10 locos polimórficos para os estudos de diversidade e estrutura genética por isoenzimas. Assim, o número de locos polimórficos obtidos para as árvores adultas e para as jovens neste estudo foi considerado suficiente para a avaliação e a caracterização da variabilidade genética, da estrutura e do fluxo gênico da espécie.

As populações de *Ocotea odorifera* amostradas apresentaram 71,43% de polimorfismo para os indivíduos da POP 1 e POP 2, 64,29% para a POP 3 e 57,14% para a população POP 4, apresentando uma média de 66,07% para as quatro populações (Tabela III).

O número médio de alelos por loco foi 1,59, próximo ao valor encontrado para outras espécies arbóreas, utilizando marcadores isoenzimáticos (2,0 para *Calophyllum brasiliense* (BOTREL; CARVALHO, 2004); 2,0 para *Protium spruceanum* (CASIVA et al., 2004); 2,3 para *Eschweilera ovata* (GUSSON

et al., 2005) e 2,0 para *Ocotea odorifera* (KAGEYAMA et al., 2003).

As heterozigosidades observada (\hat{H}_o) e esperada (\hat{H}_e) apresentaram altos valores nas quatro populações estudadas, sendo de 0,573 e 0,342 (POP 1), 0,507 e 0,295 (POP 2), 0,486 e 0,281 (POP 3) e 0,506 e 0,272 (POP 4), respectivamente. As heterozigosidades observadas (\hat{H}_o) foram maiores que as heterozigosidades esperadas (\hat{H}_e) em todas as populações, evidenciando uma tendência de excesso de heterozigotos em relação ao equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW). O índice de fixação foi baixo (-0,66, -0,52, -0,67, -0,84 nas populações 1 a 4, respectivamente) e diferente de zero, indicando excesso de heterozigotos (Tabela III).

Botrel e Carvalho (2004) obtiveram resultados semelhantes para em estudos realizados com *Machaerium villosum*, onde, as três populações analisadas obtiveram \hat{H}_o (0,50, 0,58 e 0,69) e \hat{H}_e (0,47, 0,45 e 0,54), respectivamente. Diferente do presente estudo, Kageyama et al. (2003) encontraram heterozigosidades esperadas e observadas semelhantes entre si (0,36 e 0,36, respectivamente), em plantas adultas de duas populações de *Ocotea odorifera* coletadas em São Paulo, Brasil.

Tabela III - Variabilidade genética de quatro populações de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer amostradas no sul do Brasil.

ÍNDICE DE DIVERSIDADE	POP 1	POP 2	POP 3	POP 4
Porcentagem de locos polimórficos (P)	71,43 %	71,43 %	64,29 %	57,14 %
Número médio de alelos por loco (A)	1,643	1,571	1,571	1,571
Heterozigosidade Observada (\hat{H}_o)	0,573	0,507	0,486	0,506
Heterozigosidade Esperada (\hat{H}_e)	0,342	0,295	0,281	0,272
Índice de fixação (f^*)	- 0,66	- 0,52	- 0,67	- 0,84
Tamanho da amostra (n)	15	15	15	15

POP 1 = adultas, POP 2 = jovens, POP 3 = jovens, POP 4 = jovens.

Os índices de diversidade genética analisados com os marcadores isoenzimáticos (Tabela III) mostraram alta diversidade para as populações, quando comparadas a outras espécies. Esta alta diversidade genética observada em *Ocotea odorifera* pode ser consequência da ampla distribuição geográfica das populações coletadas (30 m de altitude – Dom Pedro de Alcântara, RS a 532 m de altitude em Marcelino Ramos, RS) e uma distância de 80 m entre POP 1 e POP 2, que se encontram no mesmo fragmento; as populações POP 2 e POP 3 distanciam-se em média 850 m e as populações POP 2 e POP 3 distanciam-se em 290 Km da POP 4. Da mesma forma, estas espécies devem apresentar alto fluxo gênico, contribuindo para a elevada diversidade genética.

Esta alta heterozigosidade é relevante, dado ao grande número de novas recombinações genotípicas possíveis de ocorrer nas próximas gerações, favorecendo a adaptação e colonização da espécie a novos ambientes, ou seja, é de grande valor para a evolução da espécie. A distância genética de Nei entre as populações variou de 0,058 a 0,154, sendo a menor distância entre POP 3 e POP 4 (0,058) e a maior distância entre as populações da Unidade de Conservação POP 2 e da população POP 4 (0,154), mais distante geograficamente (Tabela IV).

Tabela IV - Estimativas da distância genética de Nei entre quatro populações de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer no sul do Brasil.

	POP 1	POP 2	POP 3	POP 4
POP 1	0,000			
POP 2	0,123	0,000		
POP 3	0,061	0,086	0,000	
POP 4	0,120	0,154	0,058	0,000

POP 1 = adultas, POP 2 = jovens, POP 3 = jovens, POP 4 = jovens.

Zucchi (2002), avaliando a diversidade genética de *Eugenia dysenterica*, observou que as distâncias genéticas de Nei entre as populações variaram de 0,005 a 0,229, formando agrupamento que pode ter sido causado pela deriva genética e ausência de fluxo gênico, devido a antropização e isolamento das populações.

A distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações de *Ocotea odorifera* foi avaliada pelas estatísticas de F (Tabela V), usando o método de Weir e Cockerham (1984). Essas estatísticas F fornecem os índices de fixação de alelos ao nível de média de populações (f) e total das populações (F) e o coeficiente de coancestria (Θ_p) ou, a probabilidade de amostrarem-se dois alelos ao acaso em dois indivíduos dentro das populações e ambos serem idênticos por descendência (SEBBENN, 1997). Essa estatística também faz referência à aderência das populações ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg - EHW. Valores de F iguais a zero indicam genótipos em EHW, valores positivos indicam excesso de homozigotos e valores negativos indicam excesso de heterozigotos (WRIGHT, 1965). Segundo Botrel e Carvalho (2004), estes parâmetros são correspondentes às estimativas Fis, Fit e Fst de Wright (1951).

Tabela V - Estimativas das estatísticas F para quatro populações de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer amostradas no sul do Brasil.

Amostra	f	F	Θ_p	Nm
<i>O. odorifera</i>	-0,679	-0,305	0,235	0,816

Índice de fixação médio dentro das populações (f), índice de fixação para o conjunto das populações (F), divergência genética entre as populações (Θ_p) e fluxo gênico (Nm).

As estimativas de divergência genética entre as populações ($\Theta_p = 0,235$) foram baixas e significativamente diferentes de zero, indicando que a variabilidade genética

é maior dentro das populações do que entre populações. Porém, quando comparada com um estudo realizado da mesma espécie por Kageyama et al. (2003), a divergência genética encontrada foi de $\Theta p = 0,028$.

Segundo Cavallari Neto (2004), a divergência genética entre populações, quando medida por marcadores genéticos neutros, como são as isoenzimas, é causada pelo efeito da deriva genética e pelo isolamento das populações. O índice de fixação médio dentro das populações (f) foi negativo (-0,679) e significativamente diferente de zero, indicando excesso de heterozigotos nas populações estudadas, refletindo em pouca endogamia. O índice de fixação para o conjunto das populações (F) também foi negativo e significativamente diferente de zero (-0,305).

Os índices de fixação (f) médio dentro das populações é função do sistema de reprodução da população. Já o índice de fixação para o conjunto das populações (F) é função dos efeitos da deriva genética, do isolamento das populações, combinado com o sistema de reprodução dentro das populações. A divergência genética entre populações (Θp), medida com base em dados de marcadores neutros é função somente da deriva genética. Assim, observando os valores de ambos os índices de fixação (f e F) e da medida de divergência genética entre as populações (Θp), é possível concluir que o excesso de heterozigotos observados seja devido aos efeitos da deriva genética e isolamento das populações combinado com o sistema de reprodução dentro das populações.

Para Ribas e Kageyama (2004), isto indica que a maior parte da diversidade genética encontra-se distribuída dentro das populações. Esse é um padrão de distribuição normalmente observado na maioria das espécies arbóreas, como é esperado em espécies alógamas ou de sistema de cruzamento, com

predomínio de alogamia. Valores de fluxo gênico Nm menores que 1 são considerados baixos, indicando determinado grau de isolamento genético (WRIGHT, 1931; FALK et al., 2001). A estimativa do fluxo gênico para o conjunto de populações foi próxima a 1, ou seja, 0,816 migrantes por geração, o que pode ser um indicativo de isolamento genético entre essas populações, com baixa taxa de migrantes entre as populações (Tabela 5).

Zucchi (2002) encontrou um Nm de 0,68 para *Eugenia dysenterica* e concluiu que este valor pode ser considerado como indicio de que as populações encontram-se em um processo de diferenciação e com possível comprometimento de sua estrutura metapopulacional. Foram encontrados dados com outras espécies arbóreas tropicais como 0,55 para *Cryptocarya moschata* (MORAES; DERBYSHIRE, 2004), 0,024 em *M. aquifolia* (PERECIN; KAGEYAMA, 2002) onde, quanto mais baixo for o valor de fluxo gênico maior é a probabilidade de risco de extinção da espécie. Por outro lado, Kageyama et al. (2003) encontraram Nm médio de 2,14 em duas populações de *O. odorifera* e concluíram que este fluxo gênico é alto entre as populações, indicando que elas não estão isoladas.

Várias ações podem ser consideradas prioritárias em relação ao aspecto genético dos fragmentos da Floresta Atlântica, visando garantir a sustentabilidade das populações das espécies, assim como aumentar a eficiência dos mesmos quanto ao seu papel de conservação de populações de espécies ameaçadas de extinção e com potencial de uso econômico. Implantando corredores de fluxo gênico, possibilitando a conectividade gênica entre fragmentos e incentivando o estudo de reintrodução de espécies da fauna (aves, morcegos, roedores e insetos) que tenham como função a dispersão de sementes destas espécies.

Conclusão

As populações estudadas apresentaram baixos níveis de divergência genética entre populações, tendo uma variação genética intrapopulacional maior que a interpopulacional, como esperado em espécies alógamas ou de sistema misto com predomínio de cruzamentos.

A taxa de heterozigosidade observada nas populações foi superior à esperada sob as condições de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, sugerindo que a espécie está bem adaptada aos ambientes alterados. A elevada heterozigo-

gosidade e o baixo coeficiente de endogamia intrapopulacional observados indicam que a espécie pode manter sua diversidade genética em seu hábitat.

Não foi possível separar as populações em diferentes grupos, entretanto, o fluxo gênico foi considerado baixo devido basicamente à separação geográfica da população litorânea em relação às populações da Unidade de Conservação.

Com os índices obtidos, podemos concluir que a *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer apresenta uma diversidade genética elevada, importante para estratégias de conservação, possibilitando sua regeneração natural *in situ* e mantendo suas características originais.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- BITTENCOURT, J. V. M. **Variabilidade genética em populações de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD.** 58 p. Tese (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2000.
- BOTREL, M. C. G.; CARVALHO, D. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 4, p. 621-627, 2004.
- BOTREL, M. C.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D.; PINTO, S. I. Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. em duas populações de mata ciliar. **Revista Árvore**, v. 30, p. 821-827, 2006.
- 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, Seção 1.v.130, n.16, p.870-872, 23 jan., 1992.
- CASIVA, P. V.; VILARDI, J. C. CIALDELLA, A. M.; SAIDMAN, B. Mating system and population structure of *Acacia aroma* and *A. macracantha* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 91, n. 1, p.58-64, 2004.
- CAVALLARI NETO, M. **Efeito do manejo na diversidade genética de populações naturais de *Tabebuia cassinoides* Lam (DC), por marcadores isoenzimáticos.** Piracicaba, 67 p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/ SP. 2004.
- DOYLE, J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.
- FALK, D. A.; KNAPP, E. E.; GUERRANT, E. O. **An introduction to restoration genetics.** Society

- for Ecological Restoration and Plant Conservation Alliance. 2001. 30p. Disponível em: <<http://www.nps.gov/plants/restore/pubs/restgene/restgene.pdf>>. Acesso em: out. 2014.
- FUCHS, E. J.; HAMRICK, J. L. Genetic Diversity in the Endangered Tropical Tree, *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae). **Journal of Heredity**, v. 3, p. 284–291, 2010.
- GUSSON, E.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. **Scientia Forestalis**, n. 67, p. 123-135, 2005.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T. **PAST version 2.00**. 2009.
- HUSBAND, B. C.; BARRETT, S. C. H. Estimates of gene flow in *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae): effects of range substructure. **Heredity**, v.75, p. 549-560, 1995.
- IBAMA. Portaria Nº. 37-N, de 3 de abril de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. 1992.
- KAGEYAMA, P. Y.; CUNHA, G. C.; BARRETO, K. D.; GANDARA, F. B.; CAMARGO, F. R. A.; SEBBENN, A. M. Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Scientia Forestalis**. n. 64, p. 108-119, 2003.
- KONO, Y.; CHUNG, K. F.; CHEN, C. H.; HOSHI, Y.; SETOGUCHI, H.; CHOU, C. H.; OGINUMA, K.; PENG, C. I. Intraspecific karyotypic polymorphism is highly concordant with allozyme variation in *Lysimachia mauritiana* (Primulaceae: Myrsinoideae) in Taiwan: implications for the colonization history and dispersal patterns of coastal plants. **Annals of Botany**, p. 1-17, 2012.
- LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; CARVALHO, S. M. MELO, B. A.; VIEIRA, S. S. Composição química e toxicidade de óleos essenciais para o pulgão-verde *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 22-29, 2014.
- MARTINS, E. M.; LAMONT, R. W.; MARTINELLI, G.; LIRA-MEDEIROS, C. F.; QUINET, A.; SHAPCOTT, A. Genetic diversity and population genetic structure in three threatened *Ocotea* species (Lauraceae) from Brazil's Atlantic Rainforest and implications for their conservation. **Conservation Genetics**, in press, 2014.
- MORAES, P. L. R.; DERBYSHIRE, M. T. V. C. Genetic structure of natural populations of *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) from southeastern brazilian atlantic rain forest. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 1, BN0040401, 2004.
- OLIVEIRA-FILHO, A. T.; BUDKE, J. C.; JARENKOW, J. A. ; EISENLOHR, P. V. ; NEVES, D. R. M. Delving into the variations in tree species composition and richness across South American subtropical Atlantic and Pampean forests. **Journal of Plant Ecology**, v. 6, p. 1-23, 2014.
- PERECIN, M. B.; KAGEYAMA, P. Y. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de espinheira-santa *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. e suas implicações para o manejo da conservação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 2, p. 80-90, 2002.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6.4: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295, 2009.
- PILLAR, V. D. **Multivariate Exploratory Analysis, Randomization Testing and Bootstrap Resampling, version 2.3.2**. Porto Alegre: UFRGS, 2006.
- Plano de manejo do Parque Natural Municipal Teixeira Soares/RS. Socioambiental- Consultores associados. Florianópolis, 2001.
- RIBAS, L. A.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética em populações naturais de *Trema micrantha* Trec. **Scientia Forestalis**, n. 66, p. 1-20, 2004.

- RATNAM, W.; BOYLE, T. J. Effects of logging and other forms of harvesting humid tropical forests. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Ed). **Forest conservation genetics, principles and practice**. Melbourne: CSIRO, p. 115-122, 2000.
- SANTOS, R. P.; ÂNGELO, P. C. S.; SAMPAIO, P. T. B.; QUISEN, R. C.; LEITE, A. M. C.; OLIVEIRA, C. L. Geographic pattern of genetic diversity in natural populations of Rosewood (*Aniba rosaeodora*), in the Central Amazonia. **Acta Amazônica**, v. 38, n. 3, p. 459-466, 2008.
- SEBBENN, A. M. **Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiáceas) a partir de isoenzimas**. 107p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP. 1997.
- SOUZA, A. G.; RESENDE, L. V.; LIMA, I. P.; SANTOS, R. M.; CHALFUN, N. N. J. Variabilidade genética de acessos de araçazeiro e goiabeira suscetíveis e resistentes a *Meloidogyne enterolobii*. **Ciência Rural**, v.44, n.5, p. 822-829, 2014.
- VALLE, J. S.; FONSECA, B. K. D.; NAKAMURA, S. S.; LINDE, G. A.; MATTANA, R. S.; MING, L. C.; COLAUTO, N. B. Diversidade genética de populações naturais de pariparoba (*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.) por RAPD. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 47-53, 2013.
- WEIR B. S., COCKERHAM C. C. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358–1370, 1984.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p. 97-159, 1931.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15. p 395-420, 1951.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by *F*- statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, p. 395-420, 1965.
- ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 130p. Tese (doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.