

A IMPORTÂNCIA DO CONHECIMENTO SOBRE A DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES E SUA UTILIDADE PARA A CONSERVAÇÃO E MANEJO DE ESPÉCIES VEGETAIS

Maria Imaculada Zucchi

Bióloga, Dr., PqC do Pólo Regional Centro Sul/APTA

mizucchi@apta.sp.gov.br

Marcelo Mattos Cavallari

Eng. Agr., Dr., Pesquisador da EMBRAPA COCAIS

mmcavall@gmail.com

Marcos Vinícius Bohrer Monteiro Siqueira

Eng. Biotecnólogo, Dr., Pós-Doutorando no Pólo Regional Centro Sul/APTA

marcos.morruga@gmail.com

Tanto animais como plantas são organizados por identidades genéticas individuais, chamadas de genótipos, que se estruturam no tempo e no espaço. Em outras palavras, os organismos vivos podem se agrupar criando simples formações até grupos complexos. Essas formações podem ser identificadas e caracterizadas entre e dentro de si próprias, inferindo-se assim sobre uma possível ou não estrutura organizacional numa espécie ou entre espécies.

Desde os primórdios que o homem procura entender e explicar a variabilidade dos seres vivos, como evoluíram e de que forma sua diversidade pode ser mensurada. Neste sentido, pesquisadores do mundo todo utilizam marcadores (morfológicos ou moleculares) para compreender a diversidade e estrutura genética de populações.

Os marcadores moleculares de fato abriram muitas perspectivas de estudos genéticos que, anteriormente, só podiam ser realizados com a observação de parentais em cruzamentos

controlados ou com base em marcadores morfológicos (cor, formato ou tamanho de uma pétala, por exemplo), em grande parte influenciados pelo ambiente.

Atualmente existe uma gama de ferramentas que permitem o acesso direto ao DNA de muitos indivíduos de uma ou várias populações, permitindo não apenas a verificação daquilo previsto em trabalhos teóricos, mas também o avanço do conhecimento em Genética de Populações e Evolução ao serviço do homem, tanto para planos de melhoramento como para projetos de conservação.

A realidade dos laboratórios que estudam Genética de Populações e Evolução, até recentemente, estava limitada aos marcadores isoenzimáticos (baseado na expressão proteica) pelo fato de serem marcadores codominantes e de fácil implementação da técnica. Os marcadores codominantes (RFLP, SSR e isoenzimáticos) têm vantagens sobre os dominantes (RAPD, AFLP, VNTR, entre outros) uma vez que os primeiros conseguem distinguir o genótipo heterozigótico do homozigótico dominante. Desta forma, os marcadores codominantes são mais informativos.

Os marcadores microsatélites (SSR) são marcadores moleculares considerados ideais para a estimação de parâmetros genéticos de populações e para a compreensão de padrões de fluxo gênico e parentesco. Estes marcadores são abundantes e uniformemente distribuídos pelo genoma de plantas, além de serem codominantes, multialélicos e com alta heterozigosidade. Sua aplicação tornou-se um marcador de excelência na última década (KALIA et al., 2011).

Tradicionalmente, a estrutura genética de populações tem sido estudada através da abordagem frequentista de Wright (1921, 1931 e 1951) ou seus derivados. Populações são determinadas *a priori*, e a frequência dos alelos e genótipos em cada uma destas populações é analisada (MANK; AVISE, 2004). Normalmente é feito um levantamento da diversidade genética em várias populações da espécie através do uso de um conjunto particular de marcadores moleculares. Verifica-se, então, como esta variabilidade está distribuída entre as populações, permitindo fazer inferências quanto aos padrões de cruzamentos e dispersão, fluxo gênico e histórico biogeográfico da espécie (SCHNABEL et al., 1998).

Os principais parâmetros utilizados em genética de populações são as frequências gênicas e genotípicas, a heterozigosidade observada e a heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, e os desvios em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Em nosso grupo de pesquisa são estudados diversos aspectos da estrutura populacional de espécies nativas normalmente de interesse farmacológico ou industrial. Também contribuímos com a caracterização da diversidade genética em bancos de germoplasma de espécies medicinais.

Os marcadores utilizados (SSR nucleares e cloroplastidiais, ISSRs, AFLP, entre outros) bem como o sequenciamento de genes ou regiões nucleares ou organelares como ITS, matK, ou ainda o sequenciamento de genes que participam da via metabólica de compostos de interesse, são práticas da nossa equipe. Com relação aos marcadores SSR, nosso grupo têm desenvolvido *primers* específicos para diversas espécies.

A seguir, apresentamos algumas das pesquisas finalizadas e em andamento em nosso laboratório.

A guaçatonga (*Casearia sylvestris*) apresenta diversas propriedades medicinais. Os diterpenos clerodânicos produzidos por esta espécie têm despertado o interesse da indústria farmacêutica, e alguns deles (denominados casearinas) foram patenteados por pesquisadores japoneses como agentes antitumorais. Duas variedades são tradicionalmente reconhecidas para *C. sylvestris*, uma ocorrendo na Mata Atlântica (var. *sylvestris*) e outra no Cerrado (var. *lingua*), mas a distinção entre as variedades é difícil e muitos indivíduos com morfologia intermediária podem ser encontrados, especialmente em formações de transição entre a Mata Atlântica e o Cerrado. Resultados obtidos através de marcadores microsatélites, em pesquisa anterior indicam que os dois táxons são geneticamente distintos (CAVALLARI et al., 2010).

Este estudo conta ainda com observações de campo em uma zona de contato entre as duas variedades, onde híbridos são observados. O objetivo é observar a fenologia das duas variedades, verificando se há sincronia de florescimento. Em um estudo paralelo, feito em parceria com pesquisadores do IAC/APTA, estão sendo estudadas características de viabilidade de pólen, citogenética e biologia reprodutiva desta espécie. Este estudo multidisciplinar já apresenta resultados preliminares, sugerindo que a variedade *lingua* participa majoritariamente como o parental feminino na formação dos híbridos.

Outra espécie estudada pelo nosso grupo é o bambu *Aulonemia aristulata*, uma espécie endêmica do Brasil e considerada vulnerável à extinção na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção no estado de São Paulo. Apresenta propriedades antioxidantes que poderiam agir na prevenção de doenças como câncer, inflamações, cardiopatias, artrite e

disfunção cerebral. Nosso estudo visa descrever a variabilidade genética desta espécie nativa, ameaçada de extinção e com interesse econômico, a fim de fornecer subsídios para a conservação e manejo da mesma. Para isso, serão usados marcadores SSR nucleares e cloroplastidiais.

Além disso, após a etapa de identificação de bioprodutos da espécie em um estudo paralelo, serão estudados genes associados à via metabólica destes compostos em busca de polimorfismos de base única associados a diferentes perfis fitoquímicos.

Em outro projeto, estamos avaliando, através de marcadores SSR, a diversidade e estrutura genética da espécie arbórea pioneira *Croton floribundus* em duas classes de tamanho sucessivas e entre populações de uma floresta primária e uma floresta secundária em estágio inicial de sucessão. Uma análise detalhada da estrutura genética em diferentes fases da vida ou classes de tamanho, entre clareiras e entre florestas com diferentes níveis de perturbação, pode elucidar os fatores determinantes dos padrões de diversidade e estrutura genética de espécies pioneiras.

Tais informações podem contribuir para o conhecimento do processo sucessional bem como dos efeitos dos distúrbios antrópicos nas florestas tropicais. Serão analisados os fatores ecológicos e genéticos que influenciam os padrões encontrados. Compreender os efeitos destes fatores sobre a diversidade e estrutura genética das populações é importante para a definição de estratégias de conservação e restauração florestal de forma a garantir a manutenção de suas dinâmicas evolutivas e ecológicas o mais semelhante possível das condições naturais.

Com o objetivo de estudar a viabilidade genética em restaurações florestais, escolhemos duas espécies arbóreas com dispersão de sementes realizada pelo vento: Araribá (*Centrolobium tomentosum*) e Cabreúva (*Myroxylon peruiferum*). Ambas são nativas da floresta estacional semidecidual e possuem potencial fitoterápico. A casca do araribá possui terpenos e flavonóides com atividade antiinflamatória e antialérgica, além de ser utilizada no tratamento de disenteria infantil. A cabreúva é utilizada na indústria cosmética e de perfumaria, como analgésico para infecções do trato urinário e bronquite.

Embora os projetos mais modernos de restauração florestal se preocupem em reconstruir uma estrutura ecológica semelhante à original, utilizando uma alta diversidade de espécies nativas da região do entorno de onde serão implantados, tem-se dado pouca atenção à reconstrução de um equilíbrio genético destas populações. Esse equilíbrio deve evitar

problemas como efeito fundador, endogamia e invasões crípticas, permitindo ao mesmo tempo a adaptação da população reintroduzida ao novo ambiente florestal que, embora reconstituído, será diferente do original.

Para tanto, foram identificados locus de SSR em cada uma das espécies, através dos quais estão sendo genotipadas duas populações de restaurações florestais separadas por 32 Km de uma matriz formada por amplas áreas de agricultura, rodovias e áreas urbanas. Uma das restaurações, no município de Itacemópolis, possui 21 anos; e a outra, com idade de 52 anos, localiza-se em Cosmópolis (SP).

Em cada um dos municípios estão sendo estudadas também populações destas espécies em dois fragmentos de remanescentes naturais de floresta estacional semidecidual a fim de acessar sua diversidade e estruturação genética em condições naturais.

Além disso, estas seis populações serão genotipadas para os 10 locos de microssatélites cloroplastidiais propostos por Weising; Gardner (1999) a fim de se avaliar a contribuição da dispersão de sementes para o fluxo gênico destas populações. Este estudo fornecerá informações que permitirão entender melhor a dinâmica das populações arbóreas anemocóricas em reflorestamentos e embasar programas de manejo para estas áreas e futuros projetos de restauração florestal em outras localidades.

Outra espécie alvo de nossos estudos foi uma nativa dos campos rupestres brasileiros, *Lychnophora pinaster*, conhecida popularmente por arnica. Possui folhas e flores aromáticas, amplamente utilizadas na medicina popular na forma de extrato alcoólico, como anti-inflamatório, anestésico e cicatrizante. No estudo realizamos a caracterização da diversidade genética e da estrutura populacional de *Lychnophora pinaster* de populações nativas do Estado de Minas Gerais usando o marcador SSR (HABER et al., 2009).

Trabalhamos, também, em parceria com outros grupos para a caracterização da diversidade genética molecular e química presente em suas coleções de espécies medicinais. Dentre as espécies contempladas, podemos citar: guaco (*Mikania glomerata*), erva-cidreira (*Lippia alba*), erva-baleeira (*Cordia verbenacea*), o açafrão (*Curcuma longa*), ginseng brasileiro (*Hebanthe eriantha*), vassourinha do campo (*Baccharis dracunculifolia*), cajuru (*Arrabidaea chica*), arnica-da-serra (*Lychnophora ericoides*), salsaparrilha (*Smilax brazilienses*), mulungu (*Erythrina mulungu*) e patchouli (*Pogostemon cablin*). A finalidade destes estudos é a estimativa de parâmetros populacionais visando subsidiar o pré-melhoramento destas espécies.

Referências

Cavallari MM, Gimenes MA, Billot C, Torres RB, Cavalheiro AJ, Bouvet JM (2010). Population genetic relationships between *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) varieties occurring sympatrically and allopatrically in different ecosystems of south-east Brazil. **Annals of Botany** 106, 627-636.

Haber L, Marques MOM, Cavallari MM, Gimenes MA, Zucchi MI (2009) Development and characterization of microsatellites markers for *Lychnophora pinaster*: a study for conservation of a native medicinal plant. **Molecular Ecology Notes** 8, 802-804.

Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica** 177, 309–334.

Mank JE, Avise JC. (2004) Individual organisms as units of analysis: Bayesian-clustering alternatives in population genetics. **Genet. Res., Camb.** 84, 135–143.

Schnabel A, Beerli P, Estoup A. et al. (1998) A guide to software packages for data analysis in molecular ecology. In Carvalho G, eds. **Advances in Molecular Ecology**. Amsterdam: IOS Press. 1998. pp 291-303.

Weising K, Gardner, RC. (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome** 42, 9–19.

Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. **Genetics** 16, 97-159.

Wright S (1951) The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics** 15, 395-420.

Wright S (1921). Systems of mating. **Genetics** 6, 111–178.