

Polimorfismo Molecular em Populações de *Inga spp* (Mimosaceae), *Eugenia spp* (Myrtaceae) e *Lonchocarpus Guilleminianus* (Tul.) Malme (Fabaceae) em Floresta Ripária do Alto Rio Paraná

PANARARI¹, Renata S.; PERIOTO¹, Paula S.; CARLOS¹, Vivian A.; PRIOLI^{1,2*}, Alberto J.; PRIOLI^{1,2}, Sônia M. A. P.; PRIOLI^{1,3}, Laudimir M.; SOUZA^{1,3}, Maria Conceição de; ROMAGNOLO¹, Marisa B.

¹Nupélia – Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura; ²Depto. Biol. Celular e Genética;

³Depto. Biologia – Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR, Brazil.

*Autor para correspondência (Fone: (44) 261-4750 / Fax: (44) 263-1424; e-mail: ajprioli@nupelia.uem.br)

RESUMO

A importância que as áreas ripárias têm na vida do homem moderno tem sido extensivamente discutida por diversos autores. Sua relação com o equilíbrio do ecossistema aquático tem sofrido maior impacto com a destruição das florestas, pois tratam-se, dentre outras, de questões relacionadas à qualidade da água para consumo humano. O presente trabalho, realizado em áreas ripárias da planície de inundação do alto rio Paraná, teve como objetivo verificar a variabilidade genética de populações do gênero *Inga* e *Eugenia*, assim como avaliar a estratégia de ocupação de *Lonchocarpus guilleminianus* em uma área desflorestada em regeneração. Marcadores moleculares de RAPD e SPAR foram utilizados. Algumas espécies dentro dos gêneros *Inga* e *Eugenia* possuem características taxonômicas, vegetativas e reprodutivas semelhantes. Os resultados indicam que as populações de *Inga vera* da planície de inundação do alto rio Paraná não estão geneticamente diferenciadas e pertencem à mesma espécie, apesar das diferenças morfológicas entre os indivíduos. Os estudos dentro do gênero *Eugenia* estão em progresso, sendo que os resultados são ainda inconclusivos para determinar se *E. moraviana* e *E. florida* constituem espécies diferentes ou sinonímias. Foi demonstrado que a população de *L. Guilleminianus* na área ripária em regeneração foi gerada por reprodução sexuada, que seria, portanto, a principal estratégia de ocupação para a área estudada.

Palavras-chave: planície de inundação, RAPD, SPAR.

INTRODUÇÃO

Na região noroeste do estado do Paraná encontra-se um importante trecho do rio Paraná, com leito ainda não represado, onde diversos estudos vêm sendo desenvolvidos (Vazzoler *et al.*, 1997). Entre eles, levantamento de flora, dinâmica na restauração natural das florestas, identificação molecular de populações naturais, fitossociologia dos remanescentes florestais e outros. A flora fanerógama das áreas ripárias do sistema rio Paraná, está representada por árvores de grande, médio e pequeno porte; por arbustos; herbáceas; lianas; sendo baixa ocorrência de epífitas. Alguns representantes desta flora possuem inconsistências taxonômicas, como as do gênero *Inga* e *Eugenia*.

Dentro da família Mimosaceae (Leguminosae – Mimosoideae), encontra-se a espécie *Inga vera* Willd, que, de acordo com Pennington (1997), tem como sinonímias *Inga affinis* DC. e *Inga uruguensis* Hook. & Arn. Essa espécie é de ocorrência comum na floresta ripária do rio Paraná (Souza *et al.*, 1997). A identificação dessa espécie sempre apresentou certa dificuldade por ocorrerem três espécies muito semelhantes entre si que eram *Inga affinis* DC, *Inga uruguensis*

Hook & Arn e *Inga vera* Willd. Com o trabalho de Pennington (1997), entretanto, sinonimizando dois desses nomes, essa dificuldade foi amenizada. Apesar disso observa-se que na floresta ripária do alto rio Paraná, essa espécie possui características morfológicas diferentes entre si, como por exemplo a forma e o tamanho do fruto, tornando interessante a obtenção de informações adicionais, através de técnicas de biologia molecular, em especial RAPD e SPAR, para o esclarecimento dessa questão. Com isso poderão ou não ser detectadas diferenças relacionadas à morfologia e que durante muito tempo foram consideradas suficientes para separar três espécies diferentes.

Dentro da família Myrtaceae o gênero *Eugenia* é o que apresenta maior número de espécies na planície de inundação do alto rio Paraná. Alguns representantes deste gênero, no entanto possuem características taxonômicas, vegetativas e reprodutivas semelhantes, o que torna difícil a identificação botânica dos mesmos. Na área do presente trabalho está sendo conduzida investigação da família Myrtaceae pelas pesquisadoras M.C. Souza e M.B. Romagnolo, da Universidade Estadual de Maringá. As informações já disponíveis demonstram que *Eugenia moraviana* assemelha-se à *Eugenia florida* DC., sendo ponto de discussão entre alguns autores (Legrand & Klein, 1969; Rotman, 1995). No material examinado *E. moraviana* se diferencia por apresentar folhas menores, nervura central com pêlos ferrugíneos esparsamente distribuídos abaxialmente, estes caracteres não são suficientes para separar as espécies, pois os mesmos, sofrem variações de acordo com o ambiente em que se encontram. Mesmo entre os especialistas não há consenso se estas duas populações representam espécies distintas ou sinonímias, isto é, da mesma espécie. Desta forma, faz-se necessária a obtenção de informações adicionais para o esclarecimento dessa questão.

Outra abordagem envolve a identificação da estratégia reprodutiva de *Lonchocarpus guillemianus*, que está associada à regeneração natural de áreas desflorestadas da região. Vários estudos têm demonstrado a importância das áreas ripárias na vida do homem moderno (Souza, 1998; Mantovani, 1989). Entre eles está o estudo fitossociológico desenvolvido por Souza (1998), que revelou a importância de *Lonchocarpus guillemianus* (Tul.) Malme, uma espécie heliófita que ocorre em remanescentes florestais da margem esquerda do rio Paraná, no município de Porto Rico (PR). Esta espécie é também conhecida como feijão-cru ou imbira, é arbórea e pode atingir até 24 metros de altura. Em áreas desflorestadas dessa região, ela é a mais abundante no processo de revegetação natural.

Aparentemente, a espécie *L. guillemianus* apresenta a reprodução sexuada como principal estratégia reprodutiva em ambientes florestais com pouca ou nenhuma alteração na cobertura original (Souza, 1998). No entanto, esta autora encontrou indícios de que um mecanismo de propagação vegetativa poderia ser uma alternativa atuante nas fases iniciais de ocupação em áreas de queimada. Na colonização da área devastada pelo fogo formam-se aglomerados de plantas jovens que poderiam derivar de propagação vegetativa, por um brotamento de raízes. As plantas que tiverem sucesso formariam agrupamentos adultos em florestas regeneradas. O remanescente florestal de Porto Rico, mencionado anteriormente, possui agrupamentos de *L. guillemianus* que poderiam ser originários de brotamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho faz parte de uma coletânea de estudos com três populações diferentes, tendo como objetivos: avaliar a variabilidade genética de populações de *Eugenia* e *Inga* e, verificar a ocorrência de reprodução clonal em *L. guillemianus* através da utilização de marcadores moleculares.

Foram coletadas folhas jovens de *Inga* e de espécimes identificados como *Eugenia moraviana*, *Eugenia florida* e indivíduos com características morfológicas intermediárias entre *E. moraviana* e *E. florida*. A mesma coleta foi realizada na população de *L. guillemianus*, onde cinco agrupamentos foram amostrados. Em seguida, as amostras foram imediatamente

congeladas em nitrogênio líquido e estocadas no laboratório em freezer $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ até que fosse possível o processamento. A extração de DNA foi efetuada com protocolo baseado em CTAB (Ferreira e Grattapaglia, 1996). A quantificação das amostras, para inferir a concentração de DNA presente em cada espécime, foi feita através da comparação com o DNA do fago λ de concentração conhecida, por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Após a quantificação do DNA total de todas as amostras, foram realizadas as amplificações pelas técnicas RAPD (Williams *et al.*, 1990) e SPAR (Gupta *et al.*, 1994). Para tanto, foram selecionados os *primers* dos kits OPA, OPX e OPW e *primers* com seqüências repetitivas tetranucleotídicas do tipo SPAR, que apresentaram perfis de bandas polimórficos. As amostras amplificadas foram fracionadas em gel de agarose 1,4% com brometo de etídio, em campo elétrico de $5\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$. Os géis foram expostos à luz UV para registro fotográfico dos fragmentos amplificados. A variável utilizada na análise genética foi a presença e ausência de bandas.

As populações de *Eugenia* foram comparadas entre si pelos padrões de bandas produzidos. Com relação aos indivíduos com características morfológicas intermediárias, constatou-se que três produziram um perfil eletroforético diferenciado, o que sugere tratar-se de uma espécie ainda não identificada. Entretanto, os demais espécimes estudados, produziram perfis de bandas diferenciados de acordo com o *primer* utilizado, promovendo com isso, resultados diferentes. Por exemplo: com o *primer* OPX-06 e OPW-04 verificou-se que *Eugenia moraviana*, *Eugenia florida* e os demais intermediários apresentaram o mesmo perfil eletroforético, o que sugere tratar-se de espécies sinónimas. Com os demais *primers* testados observou-se que *E. florida* e *E. moraviana* apresentaram padrões de bandas distintos. Dos indivíduos com características intermediárias, 10 apresentaram o mesmo perfil eletroforético de *E. moraviana*, sugerindo que *E. florida* e *E. moraviana* não constituem sinónimas e que os 10 espécimes intermediários e *E. moraviana* são a mesma espécie. Através da utilização de marcadores moleculares SPAR, identificou-se bandas espécie-específicas e padrões eletroforéticos, para as espécies de *Eugenia* citadas neste trabalho. O *primer* (AAGC)₄ produziu bandas espécie-específicas para *Eugenia moraviana* e *Eugenia florida*. Os *primers* (GGAC)₃T e (GGAC)₃C, por outro lado, não produziram marcadores específicos diferenciados das espécies *E. moraviana* e *E. florida*. Como os resultados obtidos diferiram entre os vários *primers*, não podem ser considerados conclusivos para a caracterização e identificação das espécies de *Eugenia* estudadas. As comparações das populações de *Inga* mostraram resultados preliminares evidenciando que os dois grupos produziram perfis eletroforéticos semelhantes. Portanto, até o momento não foram encontradas evidências da ocorrência de mais de uma espécie do gênero *Inga* na planície de inundação do alto rio Paraná. Entretanto, para maior segurança nas conclusões, novas coletas serão realizadas e serão ampliados o número de marcadores moleculares empregados nas análises. Isto deverá ser realizado para as populações de *Inga* e *Eugenia*. Para o estudo da população de *L. guilleminianus*, a técnica RAPD foi a que apresentou maior polimorfismo, pois detectou diferenças entre a quase totalidade dos indivíduos, descartando a possibilidade de clones. Estes resultados demonstram que a população de *L. guilleminianus* foi gerada por reprodução sexuada, que seria, portanto, a principal estratégia de ocupação para a área estudada. A investigação de representantes da vegetação de florestas ripárias da planície de inundação do alto rio Paraná contribui para um melhor conhecimento destas áreas. A análise da diferenciação genética destas populações, bem como a verificação de suas estratégias de ocupação fornecem subsídios acerca da distribuição das espécies nos diversos ambientes, retratando sua importância para regeneração natural de áreas perturbadas, podendo fornecer modelos de revegetação para locais impactados por ação antrópica.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Nupélia e ao PEA pelo apoio e ao CNPq-PELD e CAPES pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1996. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2^a ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 p.
- GUPTA, M.; CHYI, Y-S; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J.L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of single-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89: 998-1006.
- LEGRAND, C.D & KLEIN, R.M. 1996. Mirtáceas. In: Reitz, P.R. (Ed.). *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 216p.
- MANTOVANI, W. 1989. Conceituação e fatores condicionantes. In: Barbosa, L.M. (Ed.). *Anais do Simpósio sobre Mata Ciliar* realizado em São Paulo, SP. Campinas: Fundação Cargill. p. 11-19
- PENNINGTON, T. D. 1997. The genus *Inga*. Botany. The Royal Botanic Garden, Kew.
- ROTMAN, A. D. 1995. Las Especies Argentinas del Genero *Eugenia* (Myrtaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 31 (1-2):69-93.
- SOUZA, M.C.; CILINSKI, J.; ROMAGNOLO, M.B. 1997. Levantamento florístico. In: Vazzoler *et al.* (Eds.). *A Planície de Inundação do Alto Rio Paraná: Aspectos Físicos, biológicos e Socioeconômicos*. Maringá: EDUEM/NUPELIA.
- SOUZA, M.C. 1998. *Estrutura e composição florística da vegetação de um remanescente florestal da margem esquerda do rio Paraná (Mata do Araldo, Município de Porto Rico, PR)*. Rio Claro: UNESP. 172 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências.
- VAZZOLER, A.E.A.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (Eds.). 1997. *A Planície de Inundação do Alto Rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá. EDUEM: Nupelia, 1997. 460 p.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIC, AR.; IIVAK, J.; RAFALSKI, J.A; TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.