

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA
BIODIVERSIDADE**

Diversidade genética e parentesco em populações plantadas de jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* Mart. O. Kuntze - Lecythidaceae) e sua relação com o melhoramento e a restauração florestal

Orientador/e-mail: Fernanda Amato Gaiotto / gaiotto@uesc.br

Nome do Candidato/e-mail: Alan Oliveira dos Santos / alan.oliveira@ifba.edu.br

Nível/Ano de ingresso: Doutorado / 2019

Ilhéus 30/09/2019

RESUMO

A redução de populações arbóreas naturais pode levar a consequências ambientais negativas como, por exemplo, alterações climáticas, qualidade da água e redução na quantidade de polinizadores. Assim, a restauração florestal pode ser uma alternativa para reverter o quadro de redução florestal na Mata Atlântica. A implantação de bancos ativos de germoplasma (BAG) é uma alternativa para conservação *ex situ* de espécies sob ameaça e possibilita o desenvolvimento de vários tipos de pesquisas. Este trabalho objetiva avaliar genotipicamente os indivíduos de *Cariniana legalis*, que compõem o BAG da empresa Symbiosis, bem como alguns indivíduos selecionados fenotipicamente dentro dos talhões comerciais, a fim de buscar parentescos e recomendar cruzamentos entre acessos com diversidade genética mais contrastante. Além disso, analisar geneticamente sementes e mudas desta espécie em viveiros na região com vistas a compreender a qualidade genética em populações de restauração florestal. A amostragem de material vegetal para obtenção da genotipagem e caracterização do grau de parentesco entre os indivíduos dentro dos talhões comerciais e do BAG serão folhas novas dos indivíduos selecionados fenotipicamente dentro dos talhões comerciais e de toda a população do Banco de Germoplasma da empresa. Também, serão feitas análises genéticas em sementes e mudas desta espécie em viveiros na região com vistas a compreender a qualidade genética em populações de restauração florestal. A amplificação dos marcadores será realizada com 11 locos microsatélites. A diversidade genética será inferida com base no número de alelos por locus (N_A), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E), riqueza alélica para cada locus e parentesco entre pares de indivíduos amostrados.

INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é considerada um dos hotspots em biodiversidade, abrigando um elevado número de espécies endêmicas (MYERS, *et al.*, 2000), apesar da riqueza e importância biológica deste bioma, a maior parte de sua cobertura original já foi destruída e os fragmentos remanescentes continuam sendo ilegalmente devastados (RODRIGUES, *et al.*, 2012). A redução de populações arbóreas naturais pode levar a consequências ambientais como por exemplo, alterações climáticas, qualidade da água e redução na quantidade de polinizadores. Assim, a restauração florestal pode ser uma alternativa para reverter o quadro de redução florestal na Mata Atlântica.

O banco ativo de germoplasma (BAG) tem por finalidade principal reunir em um local parte da variabilidade genética, visando evitar a perda de genes ou de combinações gênicas (erosão genética), para, dessa forma, assegurar uma ampla base genética para programas de melhoramento (FUKUDA, 1996).

Portanto, a implantação de um BAG é uma alternativa para conservação *ex situ* de espécies sob ameaça, e possibilita o desenvolvimento de pesquisas como avaliações da distribuição da variabilidade genética entre e dentro das procedências e progênes, estudos do comportamento silvicultural da espécie no local de experimentação, quantificação do potencial evolutivo da população a partir de caracteres quantitativos (altura e forma do fuste, diâmetro a altura do peito, entre outras), avaliação e seleção de genótipos para compor um pomar de sementes. Em relação às espécies arbóreas da Mata Atlântica, um BAG pode ser útil tanto para o melhoramento florestal com vistas ao potencial madeireiro,

quanto para a produção de mudas de melhor qualidade genética para uso em restauração florestal.

Para o presente trabalho, escolhemos *Cariniana legalis* Mart. O. Kuntze (Lecythidaceae), uma espécie endêmica da Mata Atlântica (LORENZI, 2002), que distribui-se naturalmente em oito Estados do Brasil (CARVALHO, 2005), e é conhecida popularmente como jequitibá rosa.

A avaliação do BAG de jequitibá rosa é relevante no contexto atual, pois, além da espécie apresentar baixa densidade populacional na floresta Atlântica no Sul da Bahia e no Norte do Espírito Santo, onde foram observados 0,6 a 0,8 árvores/ha (RIZZINI, 1971), ainda se encontra em risco de extinção na categoria vulnerável de acordo com critérios adotados na classificação da lista vermelha da IUCN publicada no Americas Regional Workshop (1996), devido à ampla utilização madeireira e perda de habitat.

As pesquisas conduzidas no BAG se justificam diante do fato de que para a efetivação de qualquer programa de conservação e melhoramento genético de uma espécie, é fundamental que se tenha conhecimento acerca dos níveis e da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de suas populações (SEBBENN *et al.*, 2000).

Além disso, a importância do BAG se traduz no fato de que a partir do material genético ali conservado é possível recuperar áreas degradadas, reflorestar Reservas Legais e Áreas de Preservação Permanente, contribuindo tanto para a preservação da biodiversidade em ecossistemas florestais, quanto para a conservação do próprio jequitibá rosa. Outro uso potencial do BAG é a produção comercial de madeira, a partir da seleção de materiais genéticos superiores para esse fim, haja vista o potencial de crescimento da espécie e da qualidade de madeira que serão observados, ao longo dos anos, em estudos realizados a partir de características silviculturais.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar genotipicamente os indivíduos de *Cariniana legalis*, que compõem o BAG da empresa Symbiosis Investimentos e Participações S.A. a fim de buscar parentescos e recomendar cruzamentos entre acessos com diversidade genética mais contrastante. Além disso, analisar geneticamente sementes e mudas desta espécie em viveiros na região com vistas a compreender a qualidade genética em populações de restauração florestal.

Objetivos Específicos

- Avaliar genotipicamente todos os indivíduos de *Cariniana legalis*, que compõem o Banco Ativo de Germoplasma da empresa Symbiosis;
- Determinar o grau de parentesco entre os indivíduos superiores de *Cariniana legalis*, selecionados a partir do fenótipo, dos talhões comerciais e dentro do Banco Ativo de Germoplasma da empresa Symbiosis;

- Selecionar matrizes com melhores características dendrológicas para serem utilizadas na indústria moveleira e serrarias, utilizando critérios genotípicos e fenotípicos, para um possível fornecimento de sementes geneticamente selecionadas para pesquisadores, silvicultores e empresas interessadas na implantação de programas de conservação, melhoramento genético e reflorestamento;
- Avaliar o genótipo e grau de parentesco das sementes ou mudas de *Cariniana legalis* produzidas nos principais viveiros do Sul da Bahia.

METODOLOGIA

Amostragem e extração de DNA

Serão coletadas amostras de todos os indivíduos de *C. legalis*, que compõem o Banco Ativo de Germoplasma da empresa Symbiosis Investimentos e Participações S.A., localizada na Rodovia BA 987, Estrada para Trancoso Coqueiro Alto, Porto Seguro – BA.

A amostragem de material vegetal para obtenção da genotipagem e caracterização do grau de parentesco entre os indivíduos dentro dos talhões comerciais e do Banco de Germoplasma serão folhas novas dos indivíduos selecionados fenotipicamente dentro dos talhões comerciais e de toda a população do Banco de Germoplasma da empresa.

Também serão coletadas sementes e mudas desta espécie em viveiros na região com vistas a compreender a qualidade genética em populações produzidas com a finalidade da restauração florestal.

As amostras de material vegetal do BAG de jequitibá rosa já foram coletadas nos dias 17, 18 e 19 de junho de 2019. A coleta do material vegetal dos talhões comerciais tem data prevista para o início de dezembro de 2019. E a coleta das sementes e mudas de *C. legalis* em viveiros da região será realizada durante os anos de 2020 e 2021, sendo uma coleta a cada quatro meses em cada viveiro amostrado.

Serão realizadas a Extração e Quantificação de DNA de acordo com o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1998).

Serão utilizados primers específicos de marcadores microssatélites (SSR – Simple Sequence Repeats) desenvolvidos por Leal, *et al.* (2013) e por Guidugli *et al.* (2009), já disponíveis no laboratório de Marcadores Moleculares do Centro de Biotecnologia e Genética da UESC;

Amplificação de marcadores microssatélites

A amplificação dos marcadores microssatélites será realizadas com 11 locos microssatélites, sendo nove locos transferidos de *Cariniana estrellensis* (GUIDUGLI *et al.*, 2009) a *C. legalis* e dois locos que foram desenvolvidos especificamente para *C. legalis*. por Leal, *et al.* (2013). Serão adicionadas caudas contendo uma porção do plasmídeo M13 aos iniciadores diretos (CACGACGTTGTAAAACGACC) para detecção de amplicons por fluorescência, conforme Oetting *et al.*, (1995). O volume final de cada reação em cadeia da polimerase (PCR) será de 13 mL, contendo 7,5 ng de modelo de DNA, 1X (NH₄)₂SO₄ de tampão (Fermentas), 3 mM de MgCl₂ (Fermentas), 0,25 mg / mL de albumina sérica

bovina (Sigma), dNTP 0,25 mM (Fermentas), *Primers Forward e Reverse* a 0,49 mM, e um oligo contendo sequencia complementar a cauda M13 de cada *primer* a 0,49 mM marcado com as fluorescências HEX, 6-FAM, e NED, e 1 U Taq DNA polimerase (LEAL, *et al.* 2014). As amplificações serão realizadas em um termociclador Cyler GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). As condições para amplificação serão de 96°C por 2 minutos, seguidas de 35 ciclos de 94°C por 60 segundos, pois, são temperaturas específicas para anelamento do *primer* (GUIDUGLI *et al.*, 2009), e uma extensão a 72°C por 60 segundos. Após 35 ciclos, será realizada uma etapa final de extensão a 72°C por 7 minutos, conforme metodologia descrita por Leal, *et al.* (2014). Os produtos de PCR serão separados por eletroforese usando um analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems) e filtro D, a genotipagem será realizada com o auxílio de GeneScan e Genotyper (Applied Biosystems versão 3.1.2). Um padrão de DNA interno de tamanho conhecido marcado com fluorescência LIS será utilizado para fins de genotipagem.

ANÁLISE DOS DADOS

A diversidade genética será inferida com base no número de alelos por locus (N_A), heterozigiosidade observada (H_O), heterozigiosidade esperada (H_E) e riqueza alélica para cada loco usando o software FSTAT v.2.9.3.2 (GOUDET, 2002). Será observado a ocorrência de alelos raros na população (com frequência alélica menor que 0,05).

Os níveis de endogamia das amostras por loco serão verificadas pelo índice de fixação (F_{IS}) usando o software FSTAT v.2.9.3.2 (GOUDET, 2002). O coeficiente de parentesco médio (F_{ij}) será calculado segundo metodologia descrita por Loiselle *et al.* (1995), $F_{ij} = (Q_{ij} - Q_m) / (1 - Q_m)$, onde Q_{ij} é a probabilidade de identidade por estado para cópias aleatórias de genes dos indivíduos i e j , e Q_m é a probabilidade média por estado, para cópias de genes provenientes de indivíduos amostrados aleatoriamente (BORGES, 2018). O software SPAGeDi 1.3 (HARDY & VEKEMANS, 2002) será usado para calcular o parentesco.

IMPACTOS DO ESTUDO PARA A CONSERVAÇÃO

A redução das populações naturais do jequitibá rosa pode acarretar a perda de genes adaptados a ambientes específicos de colonização dessas espécies. Além disso, a redução contínua no tamanho de muitas populações submete as espécies a perdas de variabilidade, por deriva genética, sujeitando-as ao risco de extinção, uma vez que tais perdas acometem o potencial evolutivo das espécies (SEBBENN *et al.*, 2000).

Dessa forma, a conservação genética *ex situ*, via BAG, é uma das principais estratégias para conter a perda de valiosas populações naturais de espécies arbóreas nativas.

A produção e o fornecimento de sementes com alta variabilidade genética produzidas no BAG podem ser utilizadas para produção de mudas direcionadas para as ações e políticas públicas que fomentem a recuperação de ambientes degradados, por meio da restauração florestal com o objetivo de conservação dos recursos hídricos e demais atributos ecológicos de suma importância à preservação da biodiversidade.

Os Bancos Ativos de Germoplasma são eficientes na estratégia multipopulacional de conservação *ex situ*, pois, o BAG preserva populações geneticamente diferentes, combinada com alta variabilidade.

A metodologia aplica nesta pesquisa pode ser extrapolada para as diversas espécies arbóreas, subsidiando a tomada de decisão para produção de mudas com alta variabilidade genética.

REFERÊNCIAS

Americas Regional Workshop (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica, November 1996) 1998. *Cariniana legalis*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 1998:

e.T34747A9887065. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T34747A9887065.en>. Downloaded on 06 October 2019.

BORGES, D.B. **Consequências genéticas da fragmentação atual e pretérita da Floresta Atlântica sobre populações de *Melanoxylon braúna***. Capítulo 1 – **Changes in fine-scale spatial genetic structure related to protection status in Atlantic Rain Forest fragments**. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, BA, 2018.

CARVALHO, P.E.R. Jequitibá-rosa. **Circular Técnica**. Embrapa Florestas. Colombo, PR. n 107, 10 p., 2005.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FUKUDA, W. M. G. **Banco de Germoplasma de mandioca: manejo, conservação e caracterização**. Cruz das Almas: EMBRAPA – CNPMF, 1996. 103 P.

GOUDET, J. FSTAT (Versão 2.9.3.2.): um programa de computador para calcular estatísticas F. **Journal of Heredity**. v. 86, p. 485-486, 2002.

GUIDUGLI MC, CAMPOS T, SOUSA ACB, FERES JM, et al. Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. **Conservation Genetics**. v. 10: p. 1001-1004, 2009.

HARDY, O. J., VEKEMANS, X.. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**. v. 2, n.4, p. 618-620, 2002.

LEAL, J.B. **Diversidade, estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de jequitibá-rosa [*Cariniana legalis* Mart. O. Kuntze Lecythidaceae] associado ao sistema agroflorestal cabruca**. Capítulo 1 - **Development and characterization of microsatellite markers of genus *Cariniana***. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, BA, 2013.

LEAL, J.B.; SANTOS, R.P.; GAIOTTO, F.A.. Effect of selective logging on genetic diversity and gene flow in *Cariniana legalis* sampled from a cacao agroforestry system. **Genetics and Molecular Research**. v.13, n. 1, p. 626-635, 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J; GRAHAM, C.. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, Columbus. v. 82, p.1420-1425, 1995.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A. MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B. & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.

OETTING WS, LEE HK, FLANDERS DJ, WIESNER GL, *et al.*. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. **Genomics**. v. 30, p. 450-458, 1995.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: E. Blucher, 1971, 294 p.

RODRIGUES, B.P.; SILVA, A.G.; MAURI, R.; OLIVEIRA, J.T.S. *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze (Lecythidaceae): Descrição dendrológica e anatômica . **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 419-427, 2012.

SEBBENN, A.M.; SIQUEIRA, A.C.F.M.; GARRIDO, L.M.G.; ANGERAMI, E.M. Variabilidade genética e interação genótipo x locais em Jaquitibá-Rosa - *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze. **Revista do Instituto Florestal**, v.12, n.1, p. 13-23, 2000.