

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

Perecin¹, M. B.; Kageyama², P. Y.

¹Instituto Agronômico (IAC) C.P. 28, CEP 13.020-902 Campinas SP; ²Departamento de Ciências Florestais, ESALQ/USP, C.P. 9 CEP 13400-000 Piracicaba SP.

RESUMO: As espécies arbóreas medicinais nativas do Brasil são um grupo bastante heterogêneo e muito pouco estudado, especialmente em relação à sua diversidade genética. O interesse por essas espécies tem crescido, juntamente com as perspectivas de implementação de cultivo e manejo sustentável. As espécies de espinheira-santa, *Maytenus aquifolia* Mart e *M. ilicifolia* Mart ex Reiss, são utilizadas tradicionalmente no Brasil e têm princípios ativos comprovadamente eficazes. Nessas espécies, a maioria da matéria prima vegetal é ainda obtida através de coleta em áreas silvestres. Estudos ecológicos e genéticos são necessários para que a sua utilização possa ser realizada de maneira compatível com a conservação das populações remanescentes. Neste trabalho, foram investigados alguns índices de diversidade genética em cinco populações naturais de *M. aquifolia* e uma de *M. ilicifolia*. Para a obtenção das estimativas dos parâmetros genéticos foram selecionados e otimizados protocolos de dez locos isoenzimáticos, dos quais oito (Pgi2, Prx1, 6-Pgdh2, Mdh1, Mdh2, Acp1, Lap1 e Est1) foram polimórficos em pelo menos uma das populações. Foram encontrados 32 alelos no total, dos quais 31 ocorreram nas populações de *M. aquifolia* e 22 na de *M. ilicifolia*. O polimorfismo (P) variou de 40 a 70 %, enquanto o número médio de alelos por loco (A) esteve entre 1,60 e 2,70 em Caetetus e Saibadela, respectivamente, as duas populações mais extremas em relação a quase todos os índices de diversidade, ficando as outras populações com valores intermediários. A heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,10 a 0,21 e a diversidade gênica (H_g) entre 0,20 e 0,33. Estes valores são de elevada magnitude, comparáveis aos de espécies consideradas de alta diversidade genética relatadas na literatura. A população de *M. ilicifolia* parece ser muito próxima filogeneticamente a *M. aquifolia*, uma vez que a maioria dos alelos são comuns às duas espécies. A maioria das populações diferem significativamente em termos de frequências alélicas, tendo sido detectados diversos alelos privados às populações. Por causa dessa alta divergência, sugere-se que pode ser necessário privilegiar a conservação de um maior número de populações do que de indivíduos dentro das populações, de maneira que a diversidade genética nessas espécies possa ser mantida sem prejuízo para suas gerações futuras.

Palavras-chave: plantas medicinais, variação (genética), árvores, detecção de heterozigoto, isoenzimas

ABSTRACT: Isozymic variability in natural populations of *M. aquifolia* Mart. and *M. ilicifolia* Mart ex Reiss.: Implications for conservation management. Brazilian medicinal plant species form a very heterogeneous group, which has been very little studied, especially concerning its genetic diversity. There is a growing interest in those species, due to the perspectives of their exploration through cultivation or sustainable management. Two tree species, called 'espinheira-santa' *Maytenus aquifolia* Mart. and *M. ilicifolia* Mart ex Reiss are traditionally used in Brazil and contain active principles the efficacy of which has been proved. Most of the leaf material obtained from those species is still collected from wilderness areas. There is a need to understand its ecological and genetic features in order to establish sound measures of conservation and management of their habitats. In this paper the isozymic diversity of five natural populations of *Maytenus aquifolia* and one of *M. ilicifolia* are investigated. Some of the genetic diversity indices and the variation in allele frequencies were obtained. Ten isozymic loci were assayed, while eight were polymorphic for at least one population (Pgi1, Pgi2, Prx1, 6-Pgdh2, Mdh1, Mdh2, Acp1, Lap1, α Est1). A total of 32 alleles was found, 31 of which occurred in the populations of *M. aquifolia* while 22 occurred in the *M. ilicifolia* population. Polymorphism was from 40% to 70%, and the number of alleles per locus varied between 1.60 to 2.70 in Caetetus and Saibadela, respectively, both extreme populations in terms of the amount of variability. The observed heterozygosity varied between 0.10 to 0.21 in Caetetus and Saibadela, the gene diversity (H_g) varying between 0.20 and 0.33 in the same conditions. *M. ilicifolia* population seemed to be phylogenetically very close to *M. aquifolia*, since they share the majority of the alleles. Populations appear to differ significantly in their allele frequencies, there being detected several alleles peculiar to a single population. Because of that, it is suggested that it would be more advisable to conserve a larger number of populations instead of more individuals coming from a smaller number of populations, in order to conserve the genetic diversity for future generations of those species.

Key words: medicinal plants, variation (genetics), trees, heterozygote detection, isoenzymes

INTRODUÇÃO

A conservação dos recursos genéticos de plantas medicinais nativas do Brasil tem sido alvo de preocupação crescente. A grande maioria dessas espécies ainda não teve suas propriedades farmacológicas estudadas em profundidade, mas ainda assim, a flora brasileira já forneceu à farmacopéia mundial uma diversidade de vegetais de importância inestimável como, por exemplo, o jaborandi e a ipeca. Considerando a alta diversidade da flora tropical, estima-se que ainda muitas outras espécies possam vir a ser usadas como fontes de medicamentos no futuro.

Todo esse interesse pelas propriedades químicas da flora nativa tem gerado uma corrida crescente aos recursos naturais, o que tem causado sérios danos à diversidade genética de algumas espécies, erodindo seus recursos genéticos e colocando em risco de extinção várias delas (Frankel *et al.*, 1995).

Por outro lado, pode vir a ser vantajosa a utilização econômica dos recursos naturais pelas populações tradicionais que vivem da floresta (Kageyama & Gandara, 1993). Essas populações, ao utilizarem esses recursos, podem ajudar a promover a sua conservação ao mesmo tempo em que se beneficiam deles. Esse cenário é possível desde que estudos genéticos, ecológicos e sócio-econômicos venham esclarecer diversos aspectos importantes para a manutenção dessas espécies em seus habitats, dando suporte a uma atividade que seja sustentável em seus diversos aspectos (Kageyama & Gandara, 1993; Cotton, 1996; Ratnan & Boyle, 2000).

Nesse sentido, são imprescindíveis estudos sobre a magnitude da variabilidade genética disponível nas espécies, observando a maneira como elas se distribuem dentro e entre as populações que ocorrem ao longo da sua distribuição geográfica. A quantidade e a forma de distribuição da variabilidade genética nas populações de uma espécie determina a sua capacidade de se adaptar a desafios bióticos e abióticos, permitindo a continuidade de seu processo evolutivo na natureza. Ademais, a variabilidade genética presente nas populações é um recurso imprescindível para o estabelecimento de programas de melhoramento genético, ampliando as possibilidades de uso através da exploração agrônômica da espécie.

Neste trabalho, são apresentadas estimativas obtidas para alguns índices de diversidade genética em populações naturais de "espinha-santa", assim chamadas as espécies *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. Essas espécies arbóreas ocorrem no sub-

bosque de matas primárias e secundárias nos Estados do Sul e Sudeste do Brasil. Elas foram analisadas farmacologicamente e recomendadas para uso contra gastrite e úlcera (Carlini & Braz, 1988), apresentando alto potencial para manejo sustentável e cultivo, pelo seu uso popular e grande interesse na comercialização.

O objetivo principal foi caracterizar a variação genética presente em *M. aquifolia*, através do uso de marcadores genéticos. Foram utilizadas isoenzimas, marcadores de uso consagrado para estudos genéticos por suas características de co-dominância e relativamente baixo custo.

MATERIAL E MÉTODO

Coleta das populações

A espécie *M. aquifolia* ocorre em florestas primárias e secundárias, nas florestas ombrófilas densas e nas florestas semidecíduas do planalto da região sudeste e sul do Brasil. Visando amostrar populações localizadas ao longo de sua distribuição geográfica, foram coletadas quatro populações no Estado de São Paulo (Saibadela, Caetetus, Japi e Santa Genebra) e uma no Estado do Paraná, em Arapoti (Figura 1).

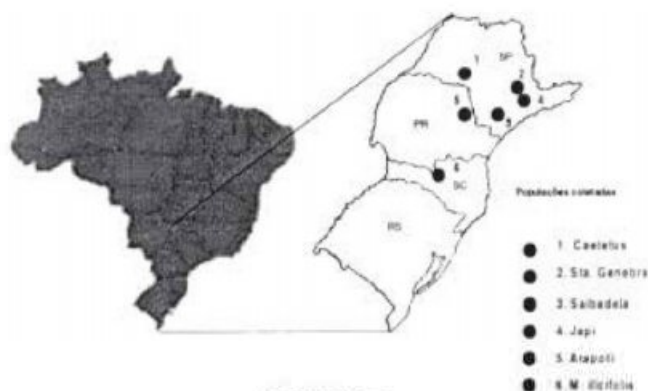


FIGURA 1

M. ilicifolia, que ocorre predominantemente nos estados da Região Sul, foi representada por apenas uma população, coletada em área secundária no entorno de Mata de Araucária (Floresta Ombrófila Mista), na Reserva Genética da EMPASC (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina) em Caçador, Estado de Santa Catarina.

As características gerais de cada população, bem como o número de indivíduos adultos coletados estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1. Características gerais dos locais onde foram coletadas as seis populações naturais de *Maytenus* para obtenção de marcadores isoenzimáticos, com o número de indivíduos adultos coletados por população (n), estado de conservação da área e tipo de formação florestal a que pertence.

Nome da População	n	Localidade	Conservação	Formação Florestal
<i>M. aquifolia</i>				
1. Caetetus	35	Estação Ecológica de Caetetus, em Gália, SP	Primária	Estacional Semidecidual
2. Arapoti	55	Reserva do Matão, Fazenda da Inpacel, em Arapoti (PR)	Secundária	Estacional Semidecidual
3. Saibadela	39	Parque Estadual Intervales, Base Saibadela, Sete Barras SP	Primária	Floresta Ombrófila Densa
4. Genebra	28	Mata de Santa Genebra, em Campinas, SP	Secundária	Estacional Semidecidual
5. Japi	37	Mata da Serra do Japi, no município de Jundiá, SP	Secundária	Estacional Semidecidual
Total	194			
<i>M. ilicifolia</i>				
6. Caçador	31	Reserva Genética de Caçador, município de Caçador, SC	Secundária	Floresta Ombrófila Mista

Metodologia de eletroforese

As folhas coletadas foram mantidas refrigeradas até a extração. Utilizou-se a metodologia geral para eletroforese de isoenzimas horizontal em gel de amido (1/3) e penetrose (2/3) a 13%, descrita em Alfenas (1991), Alfenas (1998) e Kephart (1990). Foram testadas algumas soluções de extração e o tampão de Alfenas (1998), do qual foi excluído o mercaptoethanol, foi o escolhido, por produzir melhor definição das bandas. Foram testados 22 sistemas isoenzimáticos, dos quais foram escolhidos os que apresentaram resolução e revelação constantes nas populações.

Dentre os sistemas testados, observou-se presença de bandas regulares em 13 deles. Foram feitas então várias tentativas de otimização dos protocolos, como alteração da concentração do substrato, do pH do tampão de revelação, da concentração do corante e da sequência de revelação, de forma a conseguir melhor qualidade das bandas. Finalmente, chegou-se a sete sistemas isoenzimáticos que apresentaram bandas com boa resolução nos géis após as modificações, e para os quais foi possível uma interpretação genética: PGI, ACP, LAP, PRX, MDH, α EST e 6-PGDH.

Após a seleção dos sistemas, procurou-se otimizar o tempo e as condições de corrida. Para isso foram testados os seguintes tampões de cuba e de confecção do gel: Citrato de Morfolina (Clayton & Tretiak, 1972), Histidina (Brown *et al.*, 1975), Tris-Citrato e Tris-Citrato-Borato (Soltis *et al.*, 1983). Para os sistemas Mdh, Prx, 6Pgdh, α Est, os melhores resultados foram obtidos com os tampões Histidina (H) ou Citrato

de Morfolina (CM). Para os sistemas Pgi, Acp e Lap os melhores foram Tris Citrato Borato (TCB) e Tris Citrato (TC). Nas corridas de rotina, foram utilizados os tampões H para os sistemas Mdh, Prx, 6Pgdh e α Est e para os sistemas Pgi, Acp e Lap, foi utilizado o TCB. As condições de corrida foram de aproximadamente 6 a 8 horas (protocolos mais detalhados podem ser solicitados diretamente aos autores).

Foram detectados diversos locos, porém nem todos tiveram revelação regular nas diferentes populações. Os locos utilizados para interpretação genética foram os que apresentaram resolução em todas as populações. No total das populações de adultos de *Maytenus aquifolia* e *M. ilicifolia*, foram encontrados 10 locos revelados com regularidade, dois dos quais (Pgi1 e 6Pgdh1) foram totalmente monomórficos (em *M. ilicifolia*, três locos foram totalmente monomórficos: Pgi1, 6Pgdh1 e 2). Após realização das corridas eletroforéticas para cada população coletada, os géis foram documentados com fotografias e/ou transparentização.

Análise dos dados

A caracterização da variação genética das populações foi feita através das estimativas das frequências alélicas e da obtenção de alguns índices de diversidade usuais. As frequências alélicas foram estimadas com o emprego do programas BIOSYS-2 (Swofford & Selander, 1997), utilizando a seguinte expressão: $p_i = n_i / n$, sendo que: p_i = estimativa da frequência do alelo i na população j ; n_i = número de ocorrências do alelo i na amostra da população j ; n_j = número total de alelos encontrados na amostra da

população j . A porcentagem de locos polimórficos (P) foi obtida considerando-se polimórficos os locos que apresentaram a frequência máxima de 95% do alelo mais frequente. O número médio de alelos por loco e por loco polimórfico (A e A_p , respectivamente) foi estimado obtendo-se as médias do número de alelos encontrados em cada loco e em cada loco polimórfico, respectivamente. A heterozigosidade observada (H_o) foi obtida pela média do número de genótipos heterozigotos em relação ao total de genótipos em cada loco e para as médias dos locos. A Heterozigosidade esperada ou mais apropriadamente, a diversidade gênica (H_e), foi estimada pela média das H_e nos locos obtida de acordo com a seguinte expressão, segundo Nei (1978):

$$\hat{H}_e = 2n(1 - \sum p_i^2) / (2n - 1)$$

onde n = número de indivíduos, e p_i = frequência do i ésimo alelo. As estimativas dos índices de fixação f_s de cada população foram obtidos por:

$$\hat{f}_s = (\hat{H}_e - H_o) / \hat{H}_e$$

Foram realizados testes estatísticos para verificar a existência de diferenças significativas entre as populações em termos de frequências alélicas. As análises foram realizadas através do TFGPA (Tools for Population Genetic Analysis), disponibilizado por Miller, 1997. A hipótese testada é se a distribuição das frequências dos alelos é idêntica nas populações. O programa utiliza a metodologia descrita por Raymond & Rousset (1995), que emprega reamostragem numérica do tipo Cadeias de Markov. Segundo os autores, esse procedimento dá uma excelente aproximação da probabilidade exata das diferenças observadas nas frequências alélicas. O procedimento analisa loco a loco, além de utilizar um teste global, o Teste de Probabilidade combinado de Fisher (Miller, 1997), que detecta a significância global sobre todos os locos. Esse procedimento assume que os dados provenientes de cada loco são independentes entre si. Foram utilizadas 10 baterias de testes, com 2.000 permutações por bateria, com 1.000 passos de desmemorização. Foram feitas todas as comparações possíveis entre as populações duas a duas, e também entre grupos de populações.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Caracterização da Variação Genética

No total, foram analisados 194 indivíduos adultos de *M. aquifolia* e 31 de *M. ilicifolia*, conforme já mostrado na Tabela 1. O número total de alelos foi de 32, considerando-se as duas espécies e todas as populações. Foram encontra-

dos 31 alelos em *M. aquifolia* e 22 em *M. ilicifolia*. Com exceção de um, todos os alelos de *M. ilicifolia* foram encontrados em *M. aquifolia*, mas o contrário não foi verdadeiro, isto é, *M. aquifolia* apresentou alelos que não ocorreram em *M. ilicifolia*.

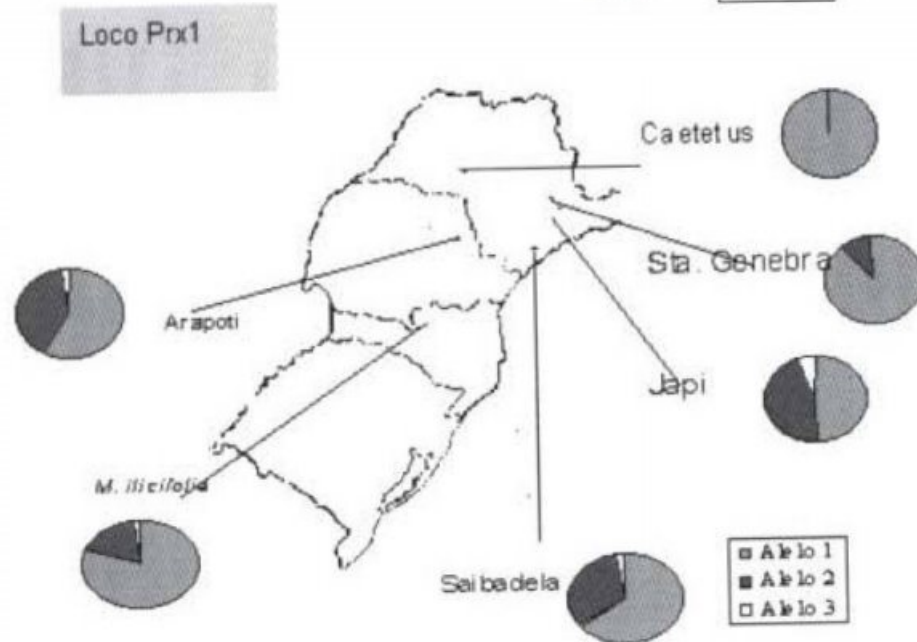
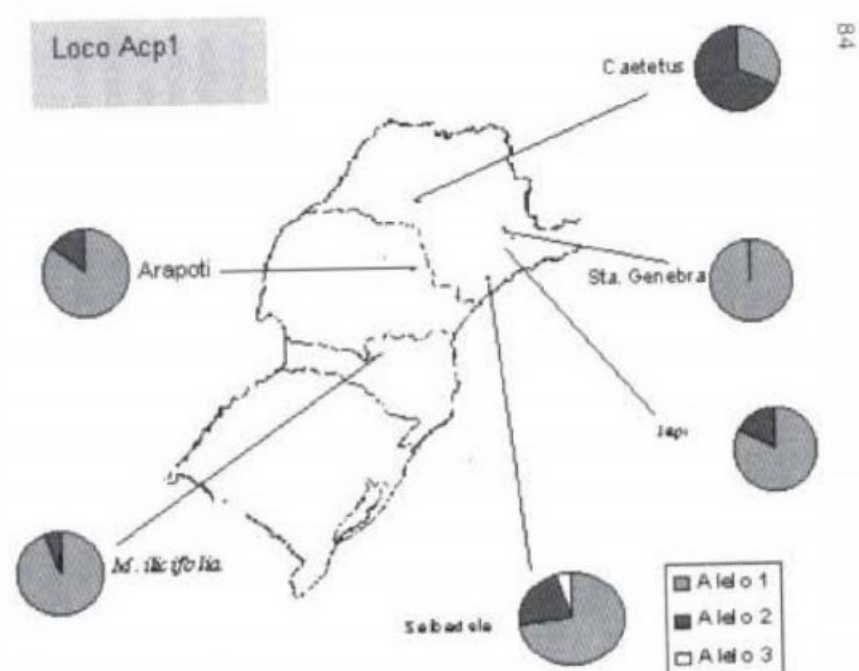
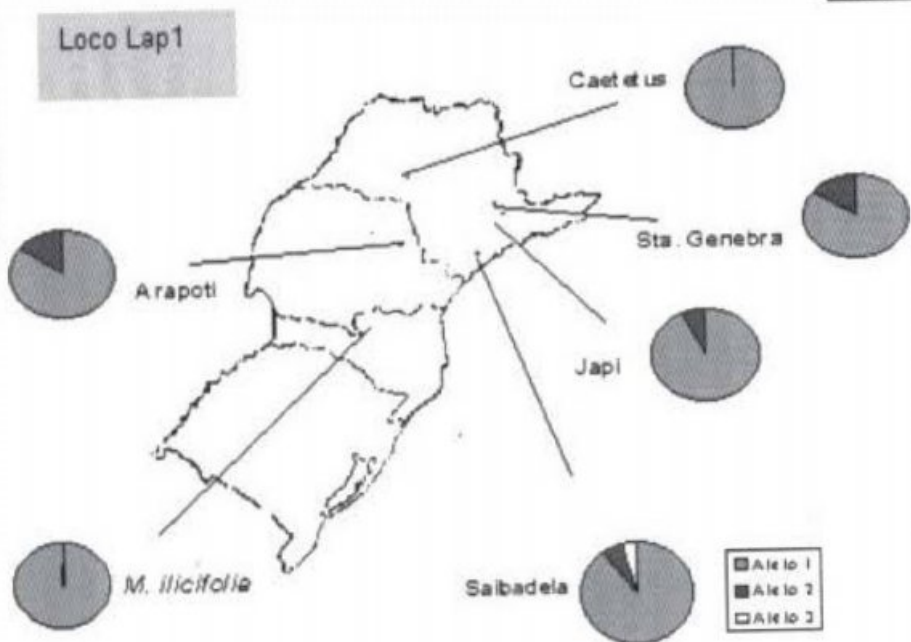
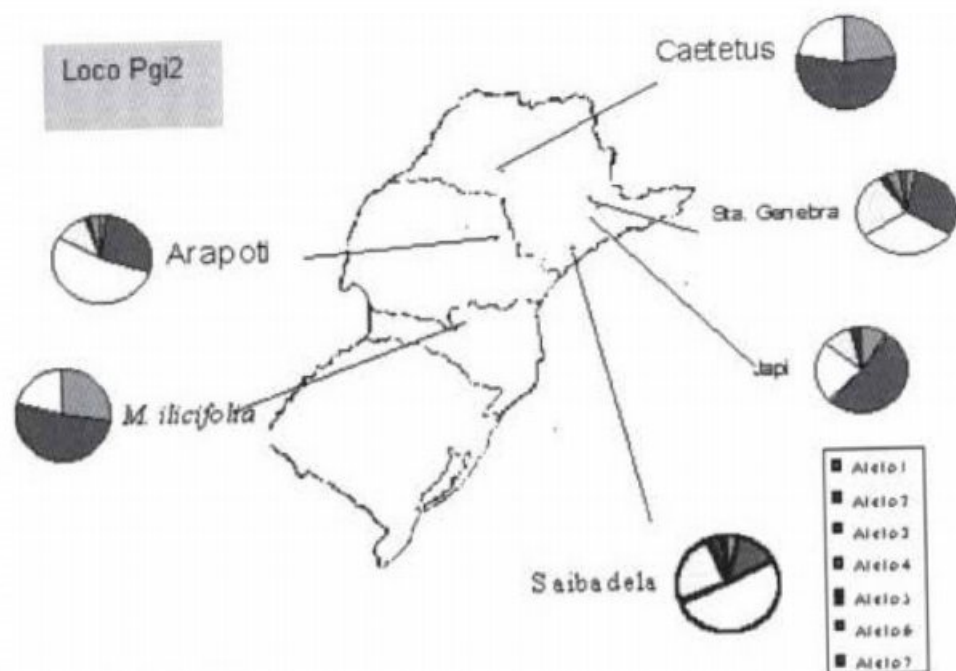
Pelos dados aqui obtidos, pode-se supor que a espécie *M. aquifolia* possui mais riqueza alélica que *M. ilicifolia*, conforme conceito proposto por Frankel *et al.* (1995). No entanto, o número de indivíduos e populações amostrados nas espécies para este trabalho é muito superior em *M. aquifolia* do que em *M. ilicifolia*. Portanto, muito provavelmente estes resultados não seriam os mesmos à medida que ampliássemos a amostragem na espécie *M. ilicifolia*. Esse argumento recebe uma evidência quando observamos a riqueza alélica em populações isoladas de *M. aquifolia*. Este índice variou de 16 até 27 alelos por população de adultos, ficando a média por volta de 22 alelos por população, índice muito próximo ao encontrado na única população de *M. ilicifolia*. Isso mostra a necessidade de amostragens futuras mais amplas na espécie de *M. ilicifolia*, especialmente aumentando o número de populações amostradas.

Frequências Alélicas

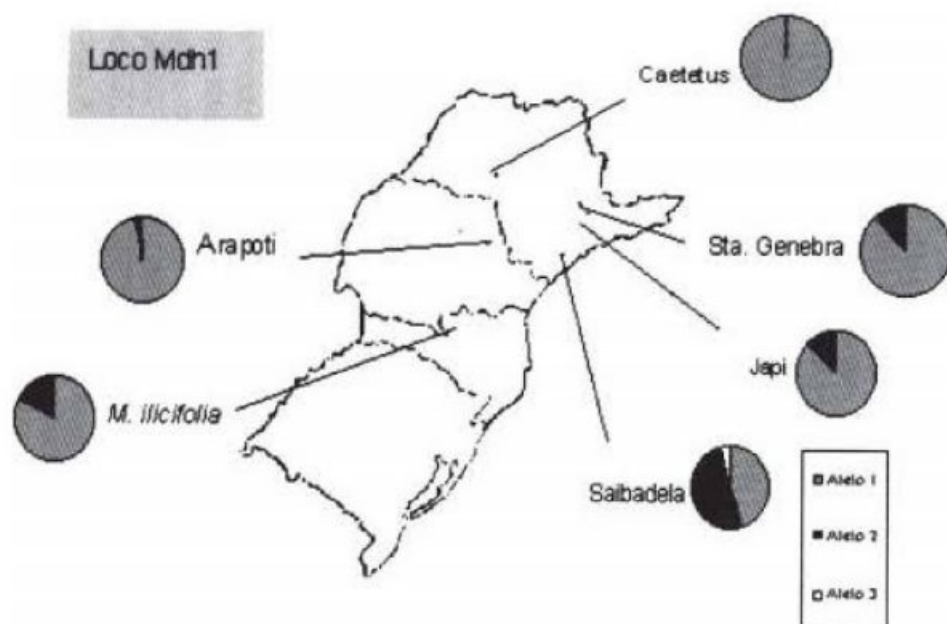
Dos dez locos analisados, dois foram monomórficos para todas as populações de adultos de *M. aquifolia*, conforme já mencionado. As frequências alélicas dos oito locos polimórficos nas populações estão representadas graficamente nas Figuras 2 e 3. A observação visual dessas figuras sugere que há uma variação aparente na distribuição da abundância dos alelos dos diferentes locos estudados, nas diferentes populações.

Através da aplicação dos testes de diferenciação de frequências alélicas, a observação visual ganha consistência estatística. Os testes mostraram que, considerando os locos em conjunto, todas as populações diferem entre si em termos de variação alélica (Tabela 2). Esse resultado tem implicações óbvias nas tomadas de decisão para conservação genética da espécie, na coleta de germoplasma ou na definição de áreas para conservação *in situ*. Sendo as populações diferentes entre si, cada uma delas tem seu valor em termos de conservação do conjunto da variabilidade genética da espécie.

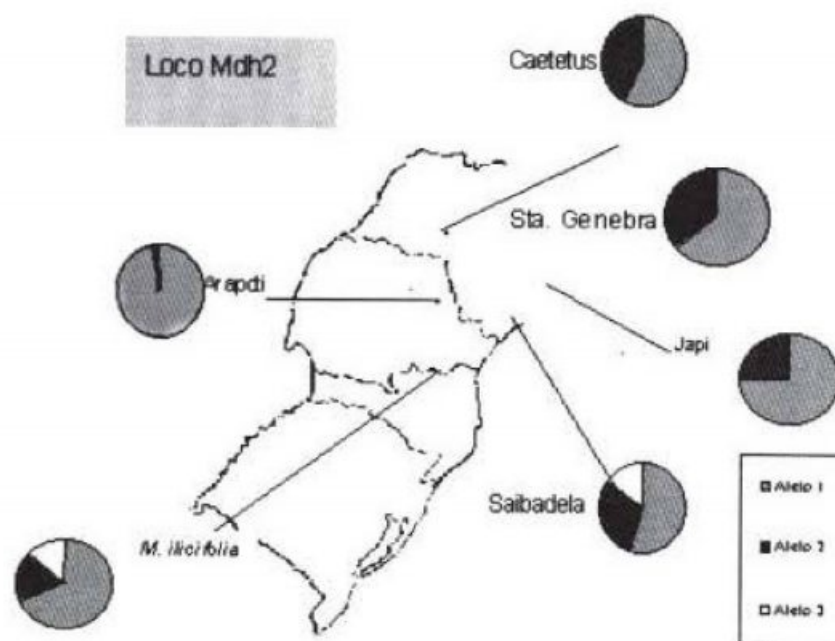
Apesar dessa tendência geral de diferenciação, quando foram analisados alguns locos isoladamente, observou-se a ocorrência de algumas diferenças não significativas. Um caso previsível é o do loco 6Pg2, que é monomórfico para todas as populações de *M. aquifolia* com exceção de Santa Genebra, onde aparece um segundo alelo (Figura 3). É bastante óbvio que, nesse loco, as outras populações que têm o alelo fixado não difiram entre si (Tabela 2).



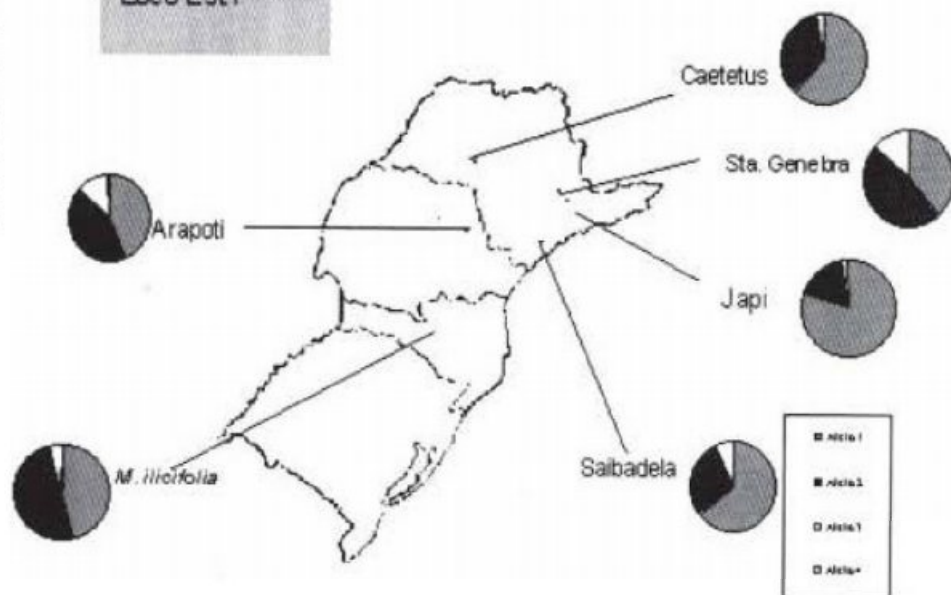
Loco Mdh1



Loco Mdh2



Loco Est1



Loco 6Pg2

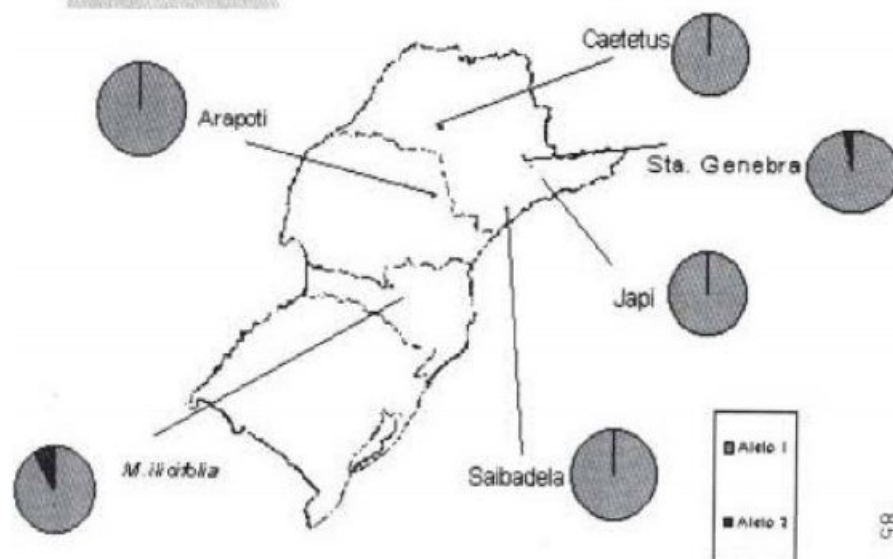


TABELA 2. Probabilidades (p) e erro padrão (S.E.) da diferenciação das frequências alélicas estimadas entre populações de *Maytenus aquifolia*, através do uso de testes exatos para diferenciação de frequências alélicas, segundo Miller, 1997. Os graus de liberdade do χ^2 estão entre parênteses e o nível de significância adotado foi 5%.

Loco	P	S.E.	P	S.E.	P	S.E.
Caetetus vs. Arapoti			Caetetus vs. Saibadela		Caetetus vs. Sta. Genebra	
Pgi2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Acp1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Lap1	0,0007	0,0003	0,0133	0,0010	0,0014	0,0005
Prx1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0057	0,0004
Mdh1	0,2891	0,0049	0,0000	0,0000	0,0046	0,0010
Mdh2	0,0000	0,0000	0,0001	0,0001	0,5672	0,0114
Est1	0,0132	0,0024	0,5036	0,0138	0,0038	0,0008
6Pg2	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,2041	0,0062
$\chi^2 = 104,9014$ (16) $p = 0,0000$			$\chi^2 = 107,6605$ (16) $p = 0,0000$		$\chi^2 = 89,3851$ (16) $p = 0,0000$	
Caetetus vs. Japi			Arapoti vs. Saibadela		Arapoti vs. Genebra	
Pgi2	0,0023	0,0012	0,0049	0,0026	0,0250	0,0030
Acp1	0,0000	0,0000	0,0233	0,0023	0,0006	0,0002
Lap1	0,0567	0,0021	0,0122	0,0019	1,0000	0,0000
Prx1	0,0000	0,0000	0,8045	0,0074	0,0006	0,0006
Mdh1	0,0019	0,0007	0,0000	0,0000	0,0284	0,0035
Mdh2	0,0303	0,0039	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Est1	0,0472	0,0048	0,0255	0,0039	0,8235	0,0107
6Pg2	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,1104	0,0030
$\chi^2 = 83,2344$ (16) $p = 0,0000$			$\chi^2 = 74,3848$ (16) $p = 0,0000$		$\chi^2 = 68,7785$ (16) $p = 0,0000$	
Arapoti vs. Japi			Saibadela vs. Genebra		Saibadela vs. Japi	
Pgi2	0,0000	0,0000	0,0415	0,0075	0,0000	0,0000
Acp1	0,6783	0,0068	0,0000	0,0000	0,1465	0,0073
Lap1	0,1552	0,0082	0,0740	0,0041	0,3572	0,0082
Prx1	0,4640	0,0144	0,0046	0,0016	0,1796	0,0124
Mdh1	0,0053	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Mdh2	0,0000	0,0000	0,0066	0,0015	0,0009	0,0007
Est1	0,0000	0,0000	0,0160	0,0038	0,1344	0,0104
6Pg2	1,0000	0,0000	0,1746	0,0055	1,0000	0,0000
$\chi^2 = 75,9588$ (16) $p = 0,0000$			$\chi^2 = 83,7805$ (16) $p = 0,0000$		$\chi^2 = 66,9898$ (16) $p = 0,0000$	
Caetetus vs. <i>M. ilicifolia</i>			Arapoti vs. <i>M. ilicifolia</i>		Saibadela vs. <i>M. ilicifolia</i>	
Pgi2	0,8405	0,0073	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Acp1	0,0000	0,0000	0,0809	0,0057	0,0027	0,0014
Lap1	1,0000	0,0000	0,0023	0,0010	0,0277	0,0022
Prx1	0,0000	0,0000	0,0032	0,0012	0,0848	0,0072
Mdh1	0,0000	0,0000	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Mdh2	0,0001	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Est1	0,1678	0,0086	0,0974	0,0111	0,0589	0,0051
6Pg2	0,0213	0,0023	0,0011	0,0003	0,0166	0,0018
$\chi^2 = 90,8435$ (18) $p = 0,0000$			$\chi^2 = 105,0782$ (18) $p = 0,0000$		$\chi^2 = 97,2216$ (18) $p = 0,0000$	
Genebra vs. <i>M. ilicifolia</i>			Japi vs. <i>M. ilicifolia</i>		Todas as populações	
Pgi2	0,0000	0,0000	0,0001	0,0001	0,0000	0,0000
Acp1	0,1159	0,0044	0,0943	0,0055	0,0000	0,0000
Lap1	0,0011	0,0004	0,0307	0,0030	0,0000	0,0000
Prx1	0,4258	0,0124	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Mdh1	0,4364	0,0079	0,6665	0,0039	0,0000	0,0000
Mdh2	0,0043	0,0013	0,0003	0,0002	0,0000	0,0000
Est1	0,2603	0,0110	0,0005	0,0005	0,0000	0,0000
6Pg2	0,4433	0,0055	0,0045	0,0007	0,0002	0,0001
$\chi^2 = 56,4421$ (18) $p = 0,0000$			$\chi^2 = 94,8001$ (18) $p = 0,0000$		$\chi^2 = 158,9321$ (18) $p = 0,0000$	

Outros casos de diferenças não significativas entre locos nas populações ocorreram esporadicamente, como nas comparações envolvendo Saibadela e Japi, Arapoti e/ou Santa Genebra *versus* Japi (quatro e três locos não significativos, respectivamente) e alguns casos de dois e um loco não significativo. É interessante notar que, na maioria dos casos em que os locos não diferiram, não houve predominância de um determinado loco, isto é, diferentes locos mostraram-se não significativos em cada situação. A explicação para esse fato é fonte de controvérsia, mas é provável que possa ser imputada ao acaso. Se o contrário estivesse ocorrendo, isto é, se os mesmos locos fossem sempre os responsáveis nas populações por padrões de diferenciação, poderíamos imaginar que forças evolutivas como a seleção, pudessem estar sendo responsáveis pelo fenômeno, para o que não temos evidências.

Apesar desses casos acima relatados mostrarem algumas diferenças não significativas entre as populações, a tendência geral foi de diferenciação entre elas, como já mencionado. Algumas dessas diferenças são analisadas em maior detalhe a seguir.

O loco Pgi2, cuja frequência diferiu significativamente em todas as populações (com exceção de Caetetus *versus* *M. ilicifolia*), foi o que mais apresentou alelos (ver Figura 2), variando de um mínimo de três na população menos polimórfica (Caetetus) e um máximo de sete na população mais polimórfica (Sta. Genebra). Ainda nesse loco, o alelo mais frequente variou de população para população. Nas populações de Caetetus e Japi, o mais frequente foi o alelo 2, com aproximadamente 50% de ocorrência, e nas populações de Arapoti e Saibadela, o mais frequente foi o alelo 3, também por volta de 50% em cada uma. Na população de Sta. Genebra, a frequência desses dois alelos, mais a de um outro alelo (alelo 4) foram bem equilibradas (entre 26 a 30 % para cada alelo). Este último alelo é menos frequente (aproximadamente 10 %) em Arapoti e Japi, e está ausente em Caetetus.

Na população de Caetetus, o alelo 1 que ocorre a frequências sempre baixas em outras populações (1,8 a 9,5 %), aparece com frequência relativamente alta de quase 25%. Nessa população, não ocorrem os alelos 4 a 7, que aparecem com frequências médias a muito baixas em outras populações. A esse propósito, sabe-se que alelos raros são frequentemente perdidos ao longo das gerações devido ao efeito de deriva genética, mas também um outro fenômeno pode ter ocorrido: o efeito de fundador. Nesse último caso, a colonização de uma área nova com uma amostra de genes que contivesse maior frequência do alelo raro que a população que lhe deu origem, pode gerar uma outra população em

que esse alelo torne-se comum. No caso em questão, teríamos que ter mais dados, como o histórico dessas populações nas áreas amostradas, para afirmar qual dos dois fenômenos poderia ter sido responsável pela maior frequência desse alelo raro na população Caetetus.

Além do Pgi2, outros três locos também variaram em relação ao alelo mais frequente; estes foram Acp1, Mdh1 e a Est1, mas em outros três locos, Lap1, Prx1 e Mdh2, o alelo mais frequente coincide nas cinco populações de *M. aquifolia*.

No loco Acp1 (Figura 2), quatro populações apresentaram frequência maior que 70 % para o alelo 1, estando este inclusive fixado para a população de Sta. Genebra. Essa tendência não se repetiu em apenas uma das populações estudadas, a de Caetetus, cujo alelo mais frequente nesse loco foi o 2, com 69 % e na qual o alelo 1 aparece com frequência de 31 %.

Na Figura 3 podemos observar que, no loco Mdh1, o alelo 1 aparece em quatro populações como o mais frequente, com mais de 87 % de ocorrência, porém está fixado para a população de Caetetus. A única população que mostrou equilíbrio nas frequências gênicas entre os alelos 1 e 2 foi a de Saibadela, ambos próximos a 50 % de ocorrência.

No loco Est1 o alelo 1 é o mais frequente em três das cinco populações (entre 64 e 79 %); na população de Sta. Genebra ele é menos frequente que o alelo 2 (38 contra 48 % respectivamente) e, na população de Arapoti, ambos alelos tem frequências próximas de 43 % (ver Figura 3).

Nos outros locos polimórficos (Lap1, Prx1 e Mdh2), o alelo mais frequente coincide nas cinco populações de *M. aquifolia* (Figuras 2 e 3). No entanto, ocorrem situações em que há grande divergência nas frequências alélicas como, por exemplo, no loco Prx1 em que há quase um equilíbrio entre as frequências dos alelos 1 e 2 na população do Japi mas na população de Caetetus o alelo 1 está totalmente fixado. Situação semelhante ocorre no loco Mdh2, com o alelo 1 fixado na população de Caetetus e, na população de Saibadela, os alelos 1 e 2 ocorrem próximos de 50 %.

Em *Maytenus ilicifolia*, sete locos polimórficos foram submetidos aos testes de diferenciação de populações com base nas frequências gênicas. Em todas as comparações feitas, os testes mostraram que as diferenças entre essa população da espécie e as populações de *M. aquifolia* amostradas são bastante significativas (Tabela 2).

Em apenas alguns casos, as frequências alélicas em *M. ilicifolia* são próximas às de *M. aquifolia*. No loco Pgi2, o alelo 2 ocorre com frequência de 50%, valor próximo do encontrado

na população de Caetetus de *M. aquifolia*. Nos testes de diferenciação de frequências alélicas, apesar de as comparações como um todo terem mostrado que as diferenças são significativas, ocorrem casos isolados como esse para alguns locos: a população de *M. ilicifolia* não diferiu de Caetetus nos locos Pgi2, Lap1 e Est1 e, de Arapoti, não diferiu nos locos Acp1 e Est1.

Assim, pode-se dizer que, de modo geral, *M. ilicifolia* difere das populações de *M. aquifolia* em termos de frequências gênicas. No entanto, considerando-se a significativa diferenciação que também ocorre entre as populações desta última, não há indícios de que a magnitude das diferenças possa ser maior entre espécies do que dentro de espécies. Resguardadas as proporções de amostragem, isto é, amostrar apenas uma população não é obviamente suficiente para caracterizar a variação em uma espécie, *M. ilicifolia* foi usada aqui da maneira como os estudos de filogenia (cladística) costumam usar o que eles chamam de 'outgroup', servindo de comparação para a magnitude das diferenças entre e dentro de espécies.

Por outro lado, sabemos que isoenzimas não costumam ser bons marcadores para diferenciação entre espécies; dessa forma, diferenças dentro de espécies podem ter a mesma magnitude ou mesmo serem maiores que as diferenças apresentadas entre espécies próximas. Crawford, 1990 (apud Moraes, 1997), lembra que a divergência genética revelada em locos isoenzimáticos frequentemente não está correlacionada com a especiação. Isto é, "a especiação pode ocorrer, mas a divergência entre as espécies não é maior que a encontrada entre populações de um único taxon e, alternativamente, a divergência enzimática pode ocorrer entre populações na ausência de especiação" (Crawford, 1990, apud Moraes, 1997).

Apesar dessas observações, os resultados deste estudo sugerem que pode existir uma grande proximidade filogenética entre as duas espécies aqui estudadas. A existência de vários alelos comuns a ambas levanta a possibilidade de que elas podem ter sofrido especiação recente. É possível que essas espécies ainda não tenham desenvolvido mecanismos capazes de as isolar reprodutivamente. Estas hipóteses poderão ser testadas em estudos específicos de hibridação interespecífica, delineados para observar e identificar a presença de diferentes tipos de barreiras reprodutivas entre as espécies.

Índices de Diversidade

Os índices de diversidade genética variaram nas populações e espécies (Tabela 3). A porcentagem de locos polimórficos (critério de 95 % de frequência para o alelo mais comum) foi

em geral bastante alta, e as diferenças entre as populações muito expressivas. A população de Caetetus apresentou o mais baixo nível de polimorfismo (40%), seguida de Arapoti com 50%, Sta. Genebra com 60% e finalmente Japi e Saibadela, ambas com 70%. Esses índices são bastante altos, quando comparados aos encontrados para populações de plantas superiores em geral, com polimorfismo em aproximadamente 34% de seus locos, ou mesmo para o conjunto de populações de uma espécie, que apresentam em média 50% de seus locos polimórficos (Hamrick & Godt, 1989).

As populações também mostraram ter alta riqueza alélica (A). Este índice variou (incluindo os locos monomórficos) de 1,60 para a população de Caetetus até 2,7 em Saibadela, uma diferença de quase 70% de uma população para outra (Tabela 3). As demais populações apresentaram índices intermediários, todos acima de 2,2 alelos por loco. No número de alelos por loco polimórfico (A_p), Saibadela novamente se destaca, ficando próxima a Arapoti, com mais de três alelos por loco polimórfico, valores que estão próximos aos encontrados por Reis (1996) em palmitero (3,1 a 3,9 alelos por loco polimórfico dentro das populações), espécie considerada de alta diversidade genética.

A heterozigosidade média observada (H_o) em *M. aquifolia* foi baixa quando comparada ao nível de heterozigosidade média esperada (H_e), um reflexo do alto índice de fixação (Tabela 3). A heterozigosidade esperada, ou utilizando o termo mais apropriado proposto por Nei, (1973), a diversidade gênica, foi bastante alta (0,26) para *M. aquifolia*. Da mesma forma, na única população de *M. ilicifolia* a diversidade gênica foi mais que o dobro da heterozigosidade observada, ficando um pouco abaixo da média das populações de *M. aquifolia*, mas acima da população de Caetetus.

Os índices de fixação encontrados (f_{is}) foram bastante altos, variando de 0,29 na população de Santa Genebra a 0,48 na de Caetetus e 0,56 em *M. ilicifolia*. Estes dados mostram que estas populações estão sofrendo desvios de panmixia. Os mecanismos envolvidos nestes altos índices de fixação podem estar relacionados a fatores como cruzamento entre aparentados, devido ao pequeno número de indivíduos nas populações, ou mesmo como consequência de seu sistema reprodutivo, que pode incluir alguma taxa de endocruzamento. Para esclarecer essas hipóteses, serão necessários estudos com progênies provenientes de diferentes matrizes nas duas espécies.

Frankel *et al.* (1995) e Hamrick & Godt (1989), apresentaram dados de riqueza alélica e outros índices de diversidade para um conjunto de centenas de espécies de plantas, cujos estudos de marcadores isoenzimáticos estavam

disponíveis na literatura. Os maiores índices de riqueza alélica ficaram para as espécies de polinização cruzada, polinizadas pelo vento, de ampla distribuição geográfica e com modo de dispersão de sementes realizado por animais ($A = 2,40, 2,29$ e $2,96$, respectivamente). Para o estágio sucessional, espécies de estágios avançados, como as espécies climáticas aqui estudadas, foram mais variáveis que as pertencentes a estágios iniciais ou intermediários. *M. aquifolia* e *M. ilicifolia*, por suas flores pequenas e inconspícuas, têm polinização provável por insetos pequenos (a contribuição da polinização

pelo vento deve ser insignificante nessas espécies que vivem no sub-dossel das florestas tropicais). A dispersão de sementes também é zoocórica, muito provavelmente por pássaros, e podemos considerá-las de relativamente ampla distribuição geográfica, pelas dimensões da sua região de ocorrência nos estados do Sul e Sudeste do Brasil. Por estes critérios, as espécies aqui estudadas podem ser enquadradas nas categorias apontadas por aqueles autores como possuidoras de ampla diversidade.

TABELA 3. Índices de diversidade genética encontrados em dez locos isoenzimáticos nas cinco populações de adultos de *Maytenus aquifolia* e uma de *M. ilicifolia*. Tamanho da amostra média (n), número médio de alelos por loco (A), número médio de alelos por loco polimórfico (A_p), percentagem de locos polimórficos (P) pelo critério de 95%, heterozigosidades médias observadas (H_o), esperadas (H_e) e Índice de fixação (f_{is}) por população, cujos Intervalos de Confiança a 95 % de probabilidade estão entre parênteses.

	n	P	A	A_p	H_e	H_o	f_{is} (I.C. 95%)
Caetetus	35,00	40	1,60	2,50	0,20	0,11	0,49 (0,11 a 0,89)
Arapoti	55,00	70	2,50	3,14	0,24	0,12	0,48 (0,36 a 0,57)
Saibadela	38,5	70	2,70	3,42	0,34	0,22	0,36 (0,27 a 0,46)
Genebra	26,50	70	2,30	2,86	0,26	0,18	0,30 (0,03 a 0,6)
Japi	36,70	70	2,20	2,27	0,26	0,17	0,32 (0,48 a 0,20)
Médias	38,34	58	2,57	3,00	0,26	0,16	0,38
<i>M. ilicifolia</i>	31,00	70	2,10		0,25	0,11	0,56 (0,32 a 0,78)

Pode-se afirmar portanto, pelos resultados aqui encontrados, que a variabilidade genética em *Maytenus aquifolia* e *M. ilicifolia* ainda está, pelo menos nas populações estudadas, num patamar que pode ser considerado satisfatório, quando comparadas com outras espécies com características similares.

Apesar de estes dados serem animadores, um fenômeno verificado nas populações amostradas é a ocorrência de alelos raros, isto é, que ocorrem em muito baixas frequências, e que às vezes são exclusivos de algumas populações (Figuras 2 e 3). Essa característica pode estar sugerindo uma perda iminente de alelos, pelo fato de que alelos raros estão muito mais vulneráveis à deriva que alelos mais frequentes.

A esse respeito, Frankel *et al* (1995) mostram que uma menor variabilidade nas frequências alélicas maximiza a medida da

diversidade gênica (H_e). Dessa maneira, uma maior uniformidade nas frequências alélicas tornaria essas populações mais protegidas da deriva que outras que, mesmo tendo um maior número de alelos, têm um ou poucos alelos com alta frequência e os outros em baixa frequência (alelos raros e exclusivos), como é o caso das populações aqui amostradas. Assim sendo, se as frequências alélicas fossem menos divergentes em *M. aquifolia* e *M. ilicifolia*, o índice H_e tenderia a crescer nessas populações, o que conferiria a elas uma menor susceptibilidade à fixação e perda de alelos quando fossem submetidas a perturbações e gargalos.

Uma outra conclusão deste trabalho é em relação a tomada de decisões quanto a coleta de germoplasma das espécies em estudo. A esse respeito, temos que considerar que é muito frequente que hajam recursos físicos e

econômicos limitados, tanto os destinados às expedições de coleta em si, como para a posterior manutenção e caracterização dos acessos coletados. Nesse caso, deve-se levar em conta a alta divergência entre as populações aqui encontrada, e considerar que será mais apropriado amostrar o máximo possível de populações do que sacrificar o número de populações coletadas em função do número de indivíduos de cada uma delas. Em resumo, deve-se privilegiar o número de populações ao invés do número de indivíduos por população.

Convém lembrar também que essas espécies medicinais vem sendo muito procuradas para comercialização. Nelas, as folhas são os órgãos de interesse da planta. Tanto para a utilização dessas duas espécies de *Maytenus* através do estabelecimento de plantios ou, numa abordagem alternativa, para realização de manejo em áreas de ocorrência natural, os dados aqui mostrados são necessários para que essas atividades sejam implementadas de maneira sustentável. Além disso, pode ser interessante associar, através de uma possível hibridação inter específica entre *M. aquifolia* e *M. ilicifolia*, a maior capacidade de ramificação basal de uma espécie com o desenvolvimento vegetativo mais vigoroso da outra em futuros programas de melhoramento genético. Isso será possível se for verificada, em estudos posteriores, a possibilidade de intercruzamento entre elas, através de hibridação natural ou por outras tecnologias disponíveis. Isso poderá vir a ser viável à medida que seja elucidada a sua biologia reprodutiva, sejam realizadas coletas de germoplasma e programas de melhoramento genético clássico sejam estabelecidos para essas espécies.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALFENAS, A. C., PETERS, I., BRUNE, W., et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 242p.
- ALFENAS, A. C. (Editor) **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 574p.
- BROWN, A. D. H.; MATHESON, A. C.; ELDRIDGE, K. G. Estimation of the mating system of *Eucalyptus oblique* L. Hérít by using allozyme polymorphisms. **Australian Journal of Botany** v.23, p.931-49, 1975.
- CARLINI, E. A.; BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abatado de *Maytenus* sp. (espinheira-santa) contra a úlcera gástrica experimental em ratos. In: CARLINI, E. A., ed., **Estudo da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras**. Brasília: Central de Medicamentos, CEME/AFIP, 1988. 128 p.
- CLAYTON, J. W.; TRETIAK, D. N. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **Journal of the Fishery Research Board of Canada**, v. 29, 1169-72, 1972.
- COTTON, C. M. Applied ethnobotany: commercialisation and conservation. In: _____. **Ethnobotany: principles and applications**. New York: Wiley, 1994. p.313-46.
- CRAWFORD, D. J. Generation and analysis of data from enzyme electrophoresis. In: **Plant molecular systematics**. New York: John Wiley & Sons, 1990. p. 80-93.
- FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D.; BURDON, J. J. **The Conservation of plant biodiversity**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 299 p.
- HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. (Eds.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Massachusetts: Sinauer, 1990. p.43-63.
- KKAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e conservação. In: SIMPÓSIO DE ECOSISTEMAS DA COSTA BRASILEIRA, 3., 1993, Águas de Lindóia. **Anais...** São Paulo: ACIESP, 1993. vol.2, p.1-9.
- KEPHART, S. R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**, v.77, n.5, p.693-712, 1990.
- MILLER, M. P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA)**. 1.3. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data (Computer software distributed by the author), 1997.
- MORAES, P. L. R. **Estrutura Genética de Populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae)**. Rio Claro: Instituto de Biociências, UNESP, Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), 1997. 197p.
- NEI, M. The theory and estimation of genetic distance. In: MORTON, N. E. (editor) **Genetic Structure of Populations**. Honolulu: University Press of Hawaii, 1973. p.45-51.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** 89:583-90, 1978.
- RATNAN, W. & BOYLE, T. J. Effects of logging and other forms of harvesting on genetic diversity in humid tropical forests. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D. BOYLE, T. (Editors). **Forest Conservation Genetics, principles and practice**. Australia:CSIRO, 2000. p.115-1222.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): Population Genetics Software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, 86:248-249, 1995. Updated version 3.1, March 1999.
- SOLTIS, D. E.; HAUFLE, C. H.; DARROW, D. C.; GASTONY, G. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers and staining schedules. **American Fern Journal**, 73:9-27, 1983.
- SWOFFORD, D. L.; SELANDER, R. B. BIOSYS-2. A Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Genetics. June, 1997.