

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS
DE ESPÉCIES DE ESPINHEIRA-SANTA, *Maytenus aquifolia*
Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae)**

MARIA BEATRIZ PERECIN
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. PAULO YOSHIO KAGEYAMA

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz",
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo
Fevereiro 2000

ERRATA

Pág.	Onde se lê	Leia-se
1	vi	... estruturação espacial espacial ...
2	7	Furlan 1985
3	27	Slatkin, 1985
4	28	Barton & Slatkin, 1985
5	37	A Estação Ecológica dos Caetetus
6	44	Figura com as áreas de coleta
7	49	Miller (1992)
8	60	... locos selecionados ...
9	65, 74, 78, 80, 102	Frankel et al. (1996)
10	83	... teste ξ^2
11	88	... Gandara (1995)
12	96	... (Figura 7)
13	96	... (Figura 8)
14	98	... Tabela x
15	109	Os correlogramas ... estão na figura x e y ...
16	122	Referências bibliográficas

... estruturação espacial ...

Furlan, 1984

Slatkin, 1985b

Barton & Slatkin, 1986

A Estação Ecológica dos Caetetus, bem como as outras áreas de coleta estão localizadas esquematicamente no mapa da Figura 1. A Estação está situada ...

Figura 1. Localização esquemática das áreas de coleta das 6 populações de espinheira santa em três estados do sul e sudeste do Brasil.

Miller (1997)

... locos selecionados (exemplificados na figura 2)

Frankel et al. (1995)

teste χ^2

Gandara (1996)

... (Figura 6)

... (Figura 7)

... Tabela 14

Os correlogramas estão na figura 8.

Lista completa das referências bibliográficas com as correções devem ser solicitadas à autora (IAC Cx. Postal 28, Campinas SP ou pelo e-mail beatriz@cec.iac.br)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Perecin, Maria Beatriz

Diversidade genética em populações naturais de espécies de espinheira-santa, *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae) / Maria Beatriz Perecin. - - Piracicaba, 2000.

134 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Diversidade genética 2. Espinheira santa 3. Planta medicinal 4. Polimorfismo 5. Variabilidade genética I. Título

CDD 633.88

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor."

Serei eternamente grata a todos,

que das mais diferentes maneiras,

estiveram comigo nessa caminhada.

Obrigada.

Aos meus filhos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. <i>Maytenus aquifolia</i> e <i>M. ilicifolia</i>	5
2.1.1. Importância e características	5
2.1.2 Densidade e Distribuição Populacional	9
2.1.3. Fenologia, Padrões de Floração, Frutificação e Dispersão de sementes	12
2.2. Variação Genética em Populações Naturais	15
2.2.1 Variação e Índices de Diversidade	15
2.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e de Endogamia de Wright	19
2.4. Estrutura Genética de Populações	21
2.5. Fluxo Gênico	24
2.6. Tamanho Efetivo Populacional	30
2.7. Marcadores Isoenzimáticos	31
2.8. Autocorrelação Espacial	32
3. MATERIAL e MÉTODOS	37
3.1. Descrição das Áreas de Estudo	37
3.2. Processamento das amostras e eletroforese	45
3.3. Análises dos dados	45
Variação Genética	45
Equilíbrio de Hardy-Weinberg e de Endogamia de Wright	47
Estrutura Genética	50
Fluxo Genico	52
Tamanho Efetivo Populacional	53
Autocorrelacao Espacial	54
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO	57
4.1. Obtenção de marcadores isoenzimáticos	57
4.2. Caracterização da Variação Genética	65
Riqueza Alélica	65
Frequências Alélicas	67
Índices de Diversidade	77
4.3. Equilíbrio de Hardy-Weinber e de Endogamia de Wright	82
4.4 Estrutura Genética	90
4.5. Fluxo Gênico	96
4.6. Tamanho Efetivo Populacional	107
4.7 Autocorrelação Espacial	109
5. CONCLUSÕES	119
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
7. ANEXOS	128

Diversidade Genética em Populações Naturais de Espinheira-Santa *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart ex Reiss (Celastraceae).

Autora: MARIA BEATRIZ PERECIN

Orientador: Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama

RESUMO

As espécies arbóreas medicinais nativas do Brasil são um grupo bastante heterogêneo e muito pouco estudado, especialmente em relação à sua constituição genética. As espécies de espinheira-santa aqui estudadas são utilizadas pelas populações tradicionais e tem princípios ativos eficazes. Essas espécies tem sido exploradas em remanescentes da Mata Atlântica onde tem se tornado escassas, o que leva a preocupações em relação ao seu nível de conservação genética. Este trabalho teve o objetivo de estudar os parâmetros de diversidade genética em cinco populações naturais de *M. aquifolia* e uma de *M. ilicifolia*, espécies climáticas de pequeno a médio porte, adaptadas às condições de sub-bosque da Floresta Tropical Atlântica. Para a obtenção das estimativas dos parâmetros genéticos foram selecionados e otimizados os protocolos de dez locos isoenzimáticos, dos quais nove (Pgi1, Pgi2, Prx1, 6-Pgdh2, Mdh1, Mdh2, Acp1, Lap1, α Est1) foram polimórficos em pelo menos uma das populações. Foram encontrados no total 32 alelos, dos quais 31 ocorreram nas populações de *M. aquifolia* e 22 ocorreram na população de *M. ilicifolia*. O polimorfismo foi de 40% a 70%, e o número médio de alelos por loco variou entre 1,60 a 2,70 em Caetetus e Saibadela, respectivamente, as duas populações mais extremas, ficando as outras populações nos

níveis intermediários. A heterozigiosidade observada variou de 0,10 em Caetetus a 0,21 em Saibadela, a diversidade gênica variou entre 0,20 e 0,33 nas mesmas populações. As populações diferiram significativamente em termos de frequências alélicas, tendo sido detectados diversos alelos privados às populações. A maioria dos locos desviaram significativamente das proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O coeficiente de endogamia f foi significativamente positivo para a grande maioria dos locos, e a média das populações ficou em 0,39. O coeficiente de coancestralidade entre as populações θ_p foi bastante alto, 0,147, mostrando que as populações divergem entre si em magnitude considerável. Não foram detectados padrões de divergência adicionais devido a regiões geográficas ou ao tipo de formação florestal a que as espécies pertencem. O fluxo gênico indireto foi estimado por dois métodos, utilizando o coeficiente de coancestralidade θ_p e a metodologia dos alelos privados. O fluxo gênico entre populações de *M. aquifolia* variou de fraco a moderado, sugerindo que em alguns casos, essas populações tem estado isoladas e em outros, tem trocado genes a níveis historicamente baixos. As populações analisadas quanto à estruturação espacial, apresentaram índices significativos de autocorrelação espacial dos alelos em Saibadela, mas a tendência não foi tão evidente em Santa Genebra. Houve heterogeneidade dos alelos em relação à presença de autocorrelação espacial, o que sugere que podem estar havendo forças seletivas, ainda que fracas, interferindo no processo. Os resultados obtidos irão subsidiar práticas de manejo sustentável e possibilitarão propor medidas de conservação dos remanescentes da espécie.

**Genetic Diversity in Natural Populations of Espinheira-Santa,
Maytenus aquifolia Mart. and *M. ilicifolia* Mart ex Reiss (Celastraceae).**

SUMMARY

Brazilian medicinal plant species are a very heterogeneous group, which have been very poorly studied, specially concerning its genetic constitution. This group needs to be evaluated in relation to its genetic diversity and further potential for conservation, breeding and sustainable management. There is a growing interest in these species, due to its pharmaceutical properties. They are currently used by traditional people and bear active principles which efficacy has been proved. For the implementation of sustainable management of these species in its natural habitats, there is a need to first understand its ecological and genetic features. These would allow to establish sound measures of management in a way it becomes compatible with the genetic conservation of these species and the habitats where they live. It were collected six populations over a wide geographical area, and the genetic parameters were evaluated. Ten isozymic loci were assayed, while nine were polymorphic for at least one population (Pgi1, Pgi2, Prx1, 6-Pgdh2, Mdh1, Mdh2, Acp1, Lap1, α Est1). It was found a total of 32 alleles, 31 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 heterozigosity varied between 0,10 to 0,21 in Caetetus and Saibadela; the gene diversity were between 0,20 and 0,33 in the same conditions. Populations appear to differ significantly in their allele frequencies, being detected several alleles private to a single population. *M. ilicifolia* population seemed to be phylogenetically very close to *M. aquifolia*,

once they share the majority of the alleles occurring. Populations seem to differ in high degree, as seen with the estimates of Cockerham's coefficient of coancestry $\theta_p = 0,147$. Gene flow was estimated by private alleles and θ_p . It seems gene flow have occurred historically at low rates between populations of *M. aquifolia*. This species and *M. ilicifolia* seem not to be isolated, as the estimates of gene flow between them sometimes was higher than within *M. aquifolia*. Two populations were analysed to detect spatial autocorrelation and the results show a moderate pattern of structuring in these populations, probably due to the species reproductive and ecological features related to pollen and seed dispersal. Several recommendations can be advanced to help establish germplasm collection, in situ conservation and sustainable management for these species.

1. INTRODUÇÃO

Os recursos genéticos vegetais nativos têm sido estudados atualmente em muito maior extensão e profundidade do que a apenas alguns anos atrás. O debate sobre a apropriação de recursos genéticos nativos pelo setor industrial, cuja intenção é o patenteamento e uso privado desses recursos, tem alertado a sociedade para a importância de se estudar esses recursos de maneira mais profunda e sistemática. As Universidades e Instituições de Pesquisa e Fomento têm procurado corresponder a essa preocupação social, dando mais ênfase e recursos para a pesquisa de nossos recursos genéticos nativos.

Neste trabalho pretende-se estudar a variabilidade genética e suas implicações para a conservação e manejo de espécies representantes de um dos mais negligenciados grupos de plantas, as espécies arbóreas nativas medicinais. Considerações sobre a conservação da espécie, *in situ* e *ex situ*, a coleta de germoplasma, o estabelecimento de programas de melhoramento genético e de manejo sustentado serão feitas à luz dos resultados obtidos.

A maioria das espécies arbóreas tropicais ainda não foi estudada quimicamente, mas ainda assim, várias espécies, como o jaborandi por exemplo, continuam sendo fontes de importantes princípios ativos farmacológicos. A flora brasileira já forneceu à farmacopéia mundial espécies vegetais de importância inestimável e, a perda desses recursos por erosão genética seria desastrosa. 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.

A possibilidade de exploração das propriedades químicas da flora tropical tem gerado uma corrida crescente aos recursos naturais. Diversas espécies estão atualmente em extinção devido à exploração predatória no passado, e atualmente é provável que muitos outros casos de danos à diversidade genética estejam ocorrendo, assim como a perda de variabilidade e erosão genética.

Por outro lado, a utilização de produtos não madeireiros é uma opção econômica para populações tradicionais que vivem dos recursos da floresta. Essa opção poderia ser implementada simultaneamente com medidas conservacionistas, desde que a exploração seja baseada em princípios e conhecimentos científicos fundamentados, que preservem a variabilidade genética a ponto de poder manter o potencial evolutivo da espécie.

Para que o uso sustentável e geneticamente adequado de espécies medicinais seja viabilizado, são imprescindíveis estudos sobre o nível de variabilidade mantido na espécie, assim como as estratégias de organização da diversidade nas populações, a forma de acasalamento, a amplitude do fluxo gênico, além da existência de estruturação familiar nas populações. Esses estudos devem ser preliminares à formulação de políticas para a implementação de práticas de manejo sustentável de longo prazo, para que não ocorram riscos à sobrevivência da espécie e para que não haja comprometimentos genéticos decorrentes do uso a longo prazo.

As espécies conhecidas como ‘espinheira-santa’, *Maytenus aquifolia* e *M. ilicifolia* estão entre as poucas espécies medicinais brasileiras estudadas quimicamente.

Elas tiveram sua atividade farmacológica comprovada, sendo recomendadas contra gastrite e úlcera (Carlini & Braz, 1988). Essas espécies tem importância econômica e social, relacionada ao seu uso popular e farmacêutico e um alto potencial para manejo sustentável. No entanto, as áreas remanescentes da Floresta Tropical Atlântica, onde habitam essas espécies, continuam desaparecendo, apesar dos esforços em manter os estimados 7% que restam atualmente; assim, essas espécies precisam ser conhecidas geneticamente para que um plano de conservação seja estabelecido. As informações geradas por este trabalho podem contribuir para subsidiar políticas que permitam práticas de manejo econômica, social e ambientalmente sustentáveis, além de fundamentar medidas de conservação e ajudar no estabelecimento de futuros programas de melhoramento genético.

Os objetivos principais deste trabalho são:

1. estudar a estrutura genética de populações naturais da espécie *M. aquifolia* em florestas primárias e secundárias, em dois tipos de formação florestal, a floresta ombrófila densa e as florestas semidecíduas do planalto, visando detectar padrões diferenciados de estrutura;
2. quantificar a variabilidade genética em populações de *M. aquifolia* ao longo de sua distribuição geográfica, para estabelecer hipóteses sobre as características microevolutivas da espécie e possivelmente inferir sobre a localização de suas possíveis regiões de origem e/ou centros de dispersão;

3. verificar a ocorrência de alterações nos níveis de variabilidade e endogamia em populações que ocorrem em áreas perturbadas, quando comparadas a populações em áreas primárias;
4. observar a variabilidade contida em uma população de *M. ilicifolia* e comparar com as populações de *M. aquifolia* amostradas;
5. investigar ocorrência de estruturação genética espacial em duas das populações amostradas, para estabelecer hipóteses sobre a distribuição genética a nível local visando inferir possíveis medidas de manejo em áreas de ocorrência da espécie;
6. estabelecer protocolos para obtenção de marcadores isoenzimáticos nas espécies de *Maytenus* coletadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Maytenus aquifolia* e *M. ilicifolia*

2.1.1. Importância e características

O gênero *Maytenus* é um dos maiores da família Celastraceae, e conta com aproximadamente 225 espécies tropicais, das quais 77 são citadas para a flora brasileira, incluindo espécies arbóreas, arbustivas e semi-arbustivas.

As espécies objeto deste estudo, *Maytenus aquifolia* e *M. ilicifolia*, pertencem à seção *Oxyphylla*, que é restrita à América do Sul, principalmente ao Brasil, onde ocorrem a maioria das espécies. Carvalho-Okano (1992), fez uma revisão do gênero para as espécies que ocorrem no Brasil, com exceção das espécies amazônicas. A autora identificou a Região Sudeste como o centro primário de diversidade específica, por abrigar um maior número de espécies. Em seu trabalho, a autora descreve *M. ilicifolia*:

“Subarbusto ou árvore, ramificado desde a base, medindo cerca de 5,0 m de altura. Ramos novos glabros angulosos, tetra ou multicarenados. Folhas congestas, coriáceas, glabras, com pecíolo com 0,2-0,5 cm de comprimento; estípulas inconspícuas; limbo com 2,2-8,9 cm de comprimento e 1,1-3,0 cm de largura; nervuras proeminentes na face abaxial; forma elíptica ou estreitamente elíptica; base aguda a obtusa; ápice agudo a obtuso, mucronado ou aristado; margem inteira ou com espinhos em número de 1 a vários, distribuídos regular ou irregularmente no bordo, geralmente concentrados na metade apical de um ou de ambos os semilimbos. Inflorescências em fascículos multifloros. Pedicelos florais com 0,2-0,5 cm de comprimento. Sépalas semicirculares, ciliadas, com cerca de 0,1cm de comprimento. Pétalas ovais, inteiras, com cerca de 0,22cm de comprimento e 0,2cm de largura. Estames com filetes achatados na base. Estigma capitado, séssil ou com estilete distinto; ovário saliente ou

totalmente imerso no disco carnosos. Fruto válvula bivalvar, orbicular; pericarpo maduro de coloração vermelho-alaranjada”

M. ilicifolia é facilmente distinguida de outras espécies da seção, pela forma dos ramos. Nenhuma outra espécie do grupo mostra, como esta espécie, ramos angulosos tetra ou multicarenados e frutos orbiculares de coloração vermelho alaranjada. Outra característica da espécie é a grande variação apresentada pelas folhas, tanto em relação ao tamanho do pecíolo e limbo, como na presença de espinhos. Os espinhos podem variar muito inclusive dentro da mesma planta, que pode apresentar folhas com bordos com um ou nenhum espinho até bordos com muitos espinhos.

A distribuição geográfica da espécie é primordialmente nos estados do sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), habita preferencialmente o sub-bosque das florestas de Araucária ou as margens de rios. Em nenhuma das publicações de levantamentos florísticos e fitossociológicos realizados no Estado de São Paulo a espécie foi mencionada. Carvalho-Okano (1992) relata ter examinado material de herbário de *M. ilicifolia* coletados até a década de 50 no estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul. No entanto, a autora menciona que, se esta espécie ainda ocorrer nesses estados, ela é provavelmente bastante rara.

A espécie *Maytenus aquifolia* tem sua distribuição mais ampla que a *de M. ilicifolia*. Ela é encontrada em toda Região Sudeste e Sul, predominantemente no sub-bosque das matas do interior dos estados, entre 100 e 1.000 m de altitude. Sua descrição botânica foi dada por Carvalho-Okano (1992):

“Arbusto ou árvore medindo de 1,5-12m altura. Ramos novos glabros, cilíndrico-achatados.

Folhas cartáceas, glabras; pecíolo com 0,5-19,0cm de comprimento; estípulas inconspícuas;

limbo com 6,0-19,0cm de comprimento e 2,0-6,0cm de largura; nervura primária proeminente em ambas as faces; nervuras secundárias sub-salientes; forma elíptica ou mais comumente oblongo-elíptica; base aguda a obtusa; ápice agudo a obtuso com mucron; margem com muitos espinhos, serrada. Inflorescências em fascículos multifloros. Pedicelos florais com 0,4-0,7cm de comprimento. Sépalas ovais, subciliadas com cerca de 0,45cm de comprimento. Pétalas ovais com cerca de 0,4cm de comprimento e 0,3cm de largura. Estames com filetes achatados na base. Estigma sésil ou com estilete distinto; ovário saliente ou imerso totalmente no disco carnoso. Fruto cápsula bivalvar, orbicular; pericarpo maduro de coloração castanho-amarelada”.

As folhas de *M. ilicifolia* e *M. aquifolia* são muito parecidas, mas ambas são facilmente separadas principalmente pela forma dos ramos, que são angulosos em *M. ilicifolia* e cilíndrico-achatados em *M. aquifolia*, conforme descrição. Por causa dos espinhos presentes em suas folhas, a espécie é frequentemente confundida com espécies de outras famílias, como por exemplo a *Sorocea bomplandii* (Moraceae).

Espécies do gênero *Maytenus* são amplamente citadas em levantamentos de espécies medicinais utilizadas pela população tradicional de muitos países. Muitas destas espécies tem tido sua eficiência comprovada para os mais diversos usos como antibiótico (Gonzalez et al, 1996; Herrera et al, 1996), anti-cancerígenas (Sekar et al, 1996; Shirota et al, 1995); anti-reumáticas (Shirota et al, 1995) e anti-maláricas (Gakunju et al 1995), dentre outros. Das espécies brasileiras, diversas têm sido investigadas em maior ou menor detalhe para suas propriedades químicas e farmacológicas (Shirota et al 1996; Pereira et al, 1993, 1995; Furlan 1985). As espécies *Maytenus ilicifolia* e *M. aquifolia*

foram consideradas prioridade para estudos farmacológicos pela Central de Medicamentos do Ministério da Saúde (CEME). Seus estudos realizados pelos pesquisadores da Escola Paulista de Medicina foram financiados pela citada entidade, tendo sido confirmada a validade medicinal da espécie (Oliveira et al, 1991; Souza-Formigoni et al, 1991).

M. aquifolia e *M. ilicifolia* são espécies que habitam o sub-bosque em áreas da Floresta Tropical Atlântica, formação florestal da qual resta aproximadamente apenas 7 % da cobertura original, como já citado. Devido a esse fator e, pelo aumento do seu uso tradicional por ter havido maior divulgação após a confirmação de suas propriedades por estudos científicos, a intensidade de coleta tem aumentado continuamente, o que pode estar trazendo riscos à conservação dessas espécies.

Essa afirmativa encontra confirmação nos trabalhos de Vilegas et al. (1994) que mostraram que apenas 40 % das amostras comercializadas como espinheira-santa realmente pertenciam a espécies de *Maytenus*. A maior parte das 60 % das amostras restantes pertenciam à já citada espécie *Sorocea bomplandi*, cujas folhas se assemelham bastante às de *Maytenus*, mas sem suas propriedades medicinais. A falsificação nas amostras no comércio de plantas medicinais pode ser considerada um dos sintomas de que a disponibilidade de indivíduos das espécies verdadeiras é pouco abundante. Independentemente do fato de serem essas espécies naturalmente pouco abundantes ou se a sua ocorrência foi diminuída devido a coleta indiscriminada, a investigação das características genéticas da espécie como proposto neste trabalho coloca-se como

importante passo no sentido de inferir o estado atual e propor futuras medidas de manutenção do estado de conservação ou recuperação do potencial genético da espécie.

2.1.2. Densidade e Distribuição Populacional

São bastante conhecidas as dificuldades de se fazer levantamentos demográficos abrangentes de espécies florestais tropicais. Levando em conta a alta incidência de espécies raras, as amostragens necessitariam ser dimensionadas de modo a amostrar adequadamente essas espécies, cuja distribuição é bastante heterogênea. Por dificuldades logísticas, esses trabalhos são freqüentemente baseados em parcelas pequenas, que por vezes não conseguem amostrar adequadamente as áreas sob estudo. Desta forma, as estimativas de densidade populacional da espécie *M. aquifolia* baseadas em estudos fitossociológicos devem ser consideradas com cautela. Ainda assim, é importante verificar o padrão de ocorrência da espécie onde ela foi amostrada; esses dados podem ser úteis na interpretação dos dados genéticos obtidos para a espécie.

Siqueira (1994) selecionou na literatura 63 levantamentos do componente arbóreo da Mata Atlântica, abrangendo desde os fragmentos que ocorrem em alguns estados do Nordeste até o Rio Grande do Sul. Diversas espécies de *Maytenus* são relatadas; *M. ilicifolia* não foi relatada em nenhum desses trabalhos, enquanto que *M. aquifolia* ocorreu em dois casos, ambos para o estado de São Paulo.

A mesma autora mostra que o estado está dividido floristicamente em dois blocos, um que abrange as matas próximas ao litoral e outro que compreende as matas de interior. *Maytenus aquifolia* parece não ser exclusiva de nenhum desses dois blocos

florísticos, ocorrendo tanto próxima ao litoral como no interior. Uma lista dos estudos florísticos e fitossociológicos onde foi relatada está na Tabela 1.

Tabela 1. Ocorrência de *M. aquifolia* Mart. em várias formações florestais no estado de São Paulo, de acordo com levantamentos florísticos e fitossociológicos.

Local	Tipo de mata	Total Indiv.	Área da amostra ¹	Indiv/ha área ²	Indiv/ha Parcela ³	Referência
Brotas SP	Ciliar - Rio Jacaré Pepira	5	3.000 m ² *	16,7	s.d.	Salis, 1990
Tarumã SP Faz. Berrante	Ciliar - Rio Paranapanema	2	3.000 m ² *	6,8	2,2	Durigan, 1994
Sete Barras SP	Floresta Umbrófila Densa	s.d.	30.000 m ² *	4,0 a 20,0	s.d.	Negreiros, 1982
Marília SP	Ciliar - Rio Aguapeí	1	3.000 m ² *	3,3	1,1	Durigan, 1994
Tarumã SP Faz. S. Luis	Ciliar - Rio Paranapanema	1	3.000 m ² *	3,3	1,1	Durigan, 1994
Jundiaí SP	Serra do Japi	1	4.200 m ² *	2,4	2,38	Rodrigues et al. 1989
Itirapina SP	Mesófila Semi Decídua	1	12.850 m ² **	0,8	s.d.	Kotchetkof-Henriques, 1989
Angatuba SP	Mesófila Semi Decídua	mín. 1	5.000 m ² *	s.d.	s.d.	Torres, 1989
Campinas SP Faz. São Vicente	Mesófila Semi Decídua	mín. 1	4.328 m ² *	s.d.	s.d.	Bernacci & Leitão-Filho, 1996
Atibaia SP	Mesófila Semi-Decídua de Altitude	mín. 1	s.d.**	s.d.	s.d.	Meira Neto et al. 1989

* Método de parcelas (30 ou 50 parcelas de 100 m²) ou ** caminhada. ¹Área total amostrada, somando-se todas as parcelas, ou ²considerando-se a área total ³Considerando-se cada parcela. s.d. sem dados disponíveis.

De maneira geral, os estudos botânicos tem mostrado que *M. aquifolia* é espécie pouco frequente, apresentando baixos valores em todos os índices fitossociológicos como Frequência Relativa, Dominância Relativa e Índice de Valor de Importância, sendo por vezes superada nesses índices por espécies raras como o cedro por exemplo (Rodrigues et al., 1989; Durigan, 1994).

No trabalho de Negreiros (1982), em 12 parcelas de 2500 m² amostradas no Parque Estadual Intervales da Fundação Florestal, a espécie foi detectada em apenas quatro delas. Nessas quatro parcelas em que ocorreu, a densidade local variou entre quatro a 20 indivíduos por hectare (Tabela 1). Esses resultados indicam uma distribuição demográfica irregular para a espécie, não mantendo uniformidade nas áreas em que ocorre.

Em outro estudo, na Área de Proteção Ambiental da Serra do Japi, Rodrigues et al., (1989) amostraram 42 parcelas de 100 m² numa área a 870 m de altitude, na qual foram considerados todos os indivíduos com diâmetro à altura do peito acima de 5 cm. Nesse trabalho, apenas um indivíduo foi encontrado, o que representa menos de dois indivíduos por hectare. Nessa mesma área, em parcelas a 1.170 m, classificada como floresta de altitude, nenhum indivíduo da espécie foi encontrado (Rodrigues e Shepperd, 1992). Um único trabalho relatou a sua presença em floresta de altitude (Meira Neto et al., 1989) o que sugere uma possível preferência por áreas mais baixas.

A espécie também é encontrada em pequenos fragmentos ou áreas antrópicas, onde por vezes torna-se abundante, mas com mais frequência ela está associada a áreas

de floresta primária com boa disponibilidade de água, em matas ciliares e fundos de vale (obs. pessoal; Salis, 1990; Durigan, 1994).

De maneira geral, o que se depreende desses estudos botânicos é que a observada heterogeneidade de ocorrência de *M. aquifolia* em diferentes formações florestais, mostrando-se ora presente, ora ausente, repete-se também demograficamente, podendo vir a ser considerada rara em alguns locais e relativamente comum em outros.

2.1.3. Fenologia, Padrões de Floração, Frutificação e Dispersão de sementes

No gênero *Maytenus*, as flores são sempre pequenas e inconspícuas, com comprimento e coloração branco-esverdeada, aparentemente hermafroditas (monoclinas), conforme relata Carvalho-Okano (1992). No entanto, em *M. ilicifolia*, *M. aquifolia* e *M. evonymoidis*, dentre outras do gênero, embora estejam presentes ambos o androceu e o gineceu, há evidências de que muitas de suas flores sejam funcionalmente diclinas, por aborto de um dos verticilos. Foram observadas nessas espécies, flores com estames praticamente sésseis, adpressos na parede ovariana. Provavelmente esses estames sejam estéreis, sendo essas flores funcionalmente pistiladas. A autora relata ter observado que apesar de estas espécies produzirem um elevado número de flores por inflorescência, produzem relativamente poucos frutos. Em *M. aquifolia*, a autora relata ainda ter observado que indivíduos floridos no campo não frutificaram ou a frutificação foi mínima.

Mediante essas observações, a autora sugere que, pela redução dos órgãos reprodutivos, ora do androceu, ora do gineceu, possa estar havendo uma tendência de

transição da bissexualidade para a unissexualidade das flores, e até mesmo dos indivíduos nessas espécies.

Os padrões de frutificação e dispersão de sementes são características de grande importância ecológica e genética. As espécies vegetais desenvolveram mecanismos variados para esses fenômenos, que afetam de maneira importante os padrões evolutivos das espécies, uma vez que determinam o fluxo gênico e interferem na ação da deriva genética, forças que alternativamente produzem uniformidade ou heterogeneidade entre as populações.

Em florestas tropicais, apesar de serem encontradas espécies florescendo e frutificando o ano todo, há diferenças, ao longo dos meses e das estações, no número de espécies produzindo flores e frutos. Essas flutuações são frequentemente relacionadas com fatores ambientais, principalmente disponibilidade de água, embora outros fatores como abundância e hábito de animais dispersores e predadores sejam também fatores seletivos importantes na determinação dos padrões de frutificação das plantas.

Em *Maytenus*, o desenvolvimento vegetativo é praticamente nulo na estação seca; as árvores reiniciam o desenvolvimento dos ramos no início da estação chuvosa, mas apenas as partes maduras dos ramos, desenvolvidas no ano anterior, chegam a florescer.

Essa característica tem sérias implicações para o manejo da espécie *in situ*, uma vez que a retirada de ramos recém brotados certamente impedirá a floração e conseqüentemente a frutificação das árvores no ano seguinte. Com sua capacidade de reprodução diminuída, a espécie poderá vir a sofrer um gargalo demográfico, com conseqüências genéticas importantes para a população local.

Carvalho-Okano (1992) cita que no gênero *Maytenus*, o pico de floração é entre os meses de setembro a outubro, sendo que as espécies *M. ilicifolia*, *M. robusta*, *M. aquifolia*, *M. salicifolia* e *M. gonoclada*, prolongam o período de floração até dezembro. A autora menciona que essa amplitude de período de florescimento pode estar relacionada ao fato de essas serem espécies com distribuição ampla e relativamente baixas preferências ecológicas, ocorrendo em vários tipos de habitats e portanto, sujeitas a condições ambientais diversas de pluviosidade, temperatura e fotoperíodo. Baseando-se em espécimens de herbário, a autora mostra que a espécie *M. aquifolia* é encontrada frutificando desde outubro até março, dependendo da região, e *M. ilicifolia*, de outubro a fevereiro.

Morellato & Leitão-Filho (1992), analisando os padrões de frutificação e dispersão na Serra do Japi, relataram que *M. aquifolia* floresceu freqüentemente no mês de outubro, mas em nenhum ano apresentou frutificação nos cinco anos de observação (de 1984 a 1989).

Os mesmos autores verificaram a síndrome de dispersão de 100 espécies que ocorriam na floresta de altitude e 107 espécies da floresta mesófila. Encontraram que as espécies desses dois tipos de floresta apresentam na sua maioria (69 a 70 %) a síndrome de dispersão por zoocoria. Dentre as espécies de sub-bosque, cerca de 90 % são zoocóricas, o que inclui *M. aquifolia*, cujas sementes são dispersas especialmente por pássaros.

2.2. Variação Genética em Populações Naturais

2.2.1. Variação e Índices de Diversidade

Segundo Stebbins (1950), a evolução dos seres vivos pode ser considerada em três níveis; o primeiro compreende a variação individual dentro de uma população, o segundo é o da distribuição e frequência dos indivíduos variantes nas diferentes populações dentro da espécie e o terceiro é a divergência ou especiação progressiva das populações como consequência do somatório de mecanismos de isolamento. Em outras palavras, esses três níveis poderiam ser chamados de variação individual, microevolução e macroevolução.

É sobre essa matriz de diversidade existente nos indivíduos e populações que os processos evolutivos atuam. Assim, torna-se importante caracterizar a extensão e as possíveis causas dessa variação genética (Weir, 1990).

Após algumas décadas de estudos em genética de populações de plantas, uma das conclusões mais claras que emergiram desses estudos foi que as espécies diferem muito em seus níveis de variação genética. Ainda assim, Hamrick & Godt (1989) conseguiram detectar algumas tendências gerais de variação genética relacionadas a algumas características da história de vida das espécies, mas como veremos adiante, exceções aos padrões detectados são muito frequentes. Algumas espécies, apesar de pertencerem a grupos considerados de baixa variabilidade, possuem grande quantidade de variação genética, enquanto outras, mostram-se pobres em variação genética, ainda que pertencentes a grupos onde se poderia esperar grande diversidade.

A grande variabilidade, em termos de magnitude e distribuição da variação genética entre e dentro das populações das espécies, mostra a necessidade de se gerar estudos individuais para cada espécie a ser conservada, manejada ou domesticada.

Para o estudo da variação genética dos organismos, é importante considerar as duas noções de diversidade citadas por Frankel et al. (1996), que são a riqueza de genótipos e a equitabilidade na frequência dos diferentes alelos presentes na população. Usando o mesmo exemplo daqueles autores, uma população com três diferentes cor de flor teria obviamente mais diversidade que uma outra que possua flores com apenas duas cores diferentes, desconsiderando-se a frequência com que essas cores aparecem nas populações. De acordo com a noção de equitabilidade, uma população com duas cores de flor igualmente frequentes teria mais diversidade que uma outra que possuísse três cores de flor, se as frequências com que as cores aparecem é muito desigual (como por exemplo 0,90, 0,05 e 0,05).

Os autores consideram que a riqueza alélica pode ser medida pelo número total de alelos presentes na população ou amostra (A), e a equitabilidade pelo coeficiente de diversidade gênica (H_e) de Nei (1973), estimado por:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

$$= 1 - \text{var}(p_i) - 1/A$$

sendo

p_i = frequência do alelo i

$\text{var}(p_i)$ = variância da frequência do alelo i

A = número de alelos na população

Portanto, essa estatística h fica alta quando o número de alelos A é grande, mas ainda maior quando há uma uniformidade ou baixa variância em suas frequências (Frankel et al., 1996). Weir (1990) menciona a importância da medida diversidade gênica (também freqüentemente chamada de heterozigosidade esperada) na caracterização da variabilidade de espécies autógamas, em que a variação é o resultado da presença de genótipos homozigotos para diferentes alelos.

Outros índices são também utilizados, como a heterozigosidade observada (H_o), que mede como estão arranjos os alelos dentro dos genótipos, revelando a variação veiculada pelos heterozigotos; o índice de polimorfismo, que mede a quantidade de locos polimórficos encontrados; e o índice de fixação de Wright (f), que mede o grau de desvio das frequências genótípicas das frequências esperadas de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Outras medidas como o F_{st} de Wright ou o G_{st} de Nei que revelam a divergência entre as populações, são também muito esclarecedoras dos padrões de organização da variação genética.

O acúmulo de informações sobre a variabilidade genética de populações naturais permitiu que algumas conclusões gerais tenham emergido desses estudos. Em seu clássico trabalho de revisão, Hamrick & Godt (1989) compilaram dados publicados de uma grande quantidade de espécies de plantas a partir de dados de isoenzimas. Em média, as espécies apresentam 50 % de seus locos polimórficos (P), aproximadamente dois alelos por loco e diversidade genética (h) de 0,15. Dentro de uma população média, por volta de um terço de seus locos são polimórficos, ocorrem 1,5 alelos por loco e a

diversidade genética é de aproximadamente 0,11. A divergência média entre as populações, medida pelo G_{ST} , é de 20 %.

No entanto, sob estas médias gerais encontradas, ocorre uma ampla gama de condições diferenciadas nas espécies, conforme já mencionado. Os mesmos autores classificaram as espécies em função de alguns de seus atributos, quais sejam, status taxonômico, forma de vida, distribuição geográfica, distribuição latitudinal, sistema de acasalamento, tipo de dispersão de sementes e estágio sucessional. Dos atributos considerados, a distribuição geográfica foi a que respondeu pelo maior efeito sobre a variação ao nível de espécies. A diversidade gênica média nas espécies de ampla distribuição geográfica foi de 0,20, quase o dobro daquelas que tinham distribuição restrita ou endêmicas.

As mesmas tendências ocorreram para a variação dentro de uma população média, mas nesse nível o sistema de acasalamento teve mais influência que a distribuição geográfica. Populações de espécies autopolinizadas apresentaram metade do polimorfismo das espécies de fecundação cruzada ou mista. Populações de espécies endogâmicas foram muito mais divergentes entre si que espécies de fecundação cruzada; gimnospermas foram mais variáveis que monocotiledôneas e estas mais variáveis que dicotiledôneas. Em termos de distribuição latitudinal, espécies da região boreal foram muito mais variáveis que espécies temperadas ou tropicais.

Para o estágio na sucessão, as espécies de estágios mais avançados, nos quais se enquadram as *Maytenus*, foram mais variáveis do que espécies de estágios

intermediários ou iniciais, mas a divergência populacional medida pelo G_{st} foi mais acentuada para as espécies de estágios sucessionais iniciais que tardios.

Considerações mais aprofundadas, além de listas de trabalhos recentes da literatura com estudos genéticos em espécies arbóreas tropicais, podem ser encontrados em Gandara (1995), Reis (1996), Moraes (1997) e Del Giudice (1999).

2.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e de Endogamia de Wright

Em genética de populações, uma vez que as frequências genotípicas e alélicas foram estimadas e os índices de diversidade obtidos, uma das primeiras preocupações é a verificação da aderência dos dados às proporções de Hardy-Weinberg, que em última análise verifica a presença de associações entre os alelos dentro dos indivíduos (Weir, 1996).

O estabelecimento do princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi a pedra fundamental da genética de populações e continua norteando toda a teoria desenvolvida após o seu estabelecimento. O modelo descreve uma população idealmente grande, perfeitamente panmítica e estática no sentido de que as forças evolutivas não estão agindo. Nessa população 'ideal', as frequências gênicas e genotípicas permanecem constantes de geração em geração.

Torna-se então fundamental verificar se os dados das populações em estudo aderem às proporções de equilíbrio. Os dados ajustando-se às proporções do EHW, significa que não há associação entre os alelos dentro dos indivíduos, e o resultado dessa independência entre os alelos é que as frequências genotípicas nessa população ficam sendo o produto da frequência dos alelos, ou, segundo Weir, (1996):

$$P_{uu} = p_u^2 \quad \text{para os homozigotos } A_u A_u$$

$$P_{uv} = 2 p_u p_v \quad \text{para os heterozigotos } A_u A_v$$

É possível que uma grande parte das populações reais não esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg, uma vez que as forças evolutivas e do acaso são universais e devem estar agindo em todas as populações. Além disso, muito provavelmente, nenhuma das populações de seres vivos do planeta deve deixar de sofrer contínuas perturbações, tanto naturais como provocadas pelo homem. Nesse contexto, a verificação da presença ou ausência das proporções do EHW nas populações, serve como ponto inicial, a partir do qual passa-se a buscar respostas sobre a natureza das forças evolutivas agindo sobre a variação genética e de sua contribuição na estruturação das populações dos seres vivos.

Wright (1951), estabeleceu um segundo caso de equilíbrio nas proporções genotípicas e gênicas, onde as populações podem ter um nível de endogamia estável, inerente ao sistema reprodutivo da espécie. Assim, Wright define o coeficiente F como uma medida do desvio do equilíbrio de panmixia nas populações. Uma população muito grande, praticando de maneira estável um certo nível de endogamia, na ausência das forças microevolutivas, diz-se estar em Equilíbrio de Endogamia de Wright.

Quando nas populações reais que se afastam do modelo de Hardy-Weinberg, introduz-se o índice de fixação f , as frequências genotípicas em cada loco passam a ser escritas como:

$$P_{uu} = p_u^2 + p_u(1 - p_u)f \quad \text{para os homozigotos } A_u A_u$$

$$P_{uv} = 2 p_u p_v (1 - f) \quad \text{para os heterozigotos } A_u A_v$$

Assim, fica claro que as populações que não praticam exclusivamente exocruzamento, podem ter um coeficiente de endocruzamento constante para a espécie, e neste caso também podem manter suas frequências gênicas e genotípicas estáveis ao longo das gerações.

2.4. Estrutura Genética de Populações

É amplamente conhecido que as espécies e populações apresentam o que se define como estrutura genética, que corresponde à distribuição heterogênea, isto é, não aleatória de alelos e genótipos no espaço e no tempo, como resultado da ação de forças evolutivas como mutação, migração, seleção e deriva que operam dentro dos contextos de cada espécie e população (Hamrick, 1982; Loveless & Hamrick, 1984).

Estudar a estrutura genética das populações de uma espécie implica em se caracterizar como é distribuída a variação entre e dentro das populações, ou entre subdivisões dentro da mesma população.

Para isso, são necessárias amostragens de várias populações, e a natureza das amostragens são fatores importantes a serem considerados. Conforme lembra Weir (1990), na análise de dados genéticos vários tipos de amostragem são utilizados, os quais podem afetar as propriedades das estimativas e determinar o tipo de inferências que se pode fazer com os resultados obtidos.

No entanto, da mesma maneira que quando amostra-se duas vezes a mesma população, as diferentes amostras irão produzir estimativas diferentes da variabilidade genética, quando se faz amostragem de diferentes gerações da mesma população ou de

diferentes populações da mesma espécie, novas estimativas serão geradas. Weir (1996) esclarece que o primeiro tipo de amostragem é uma amostragem estatística e é consequência do fato de que poderemos amostrar indivíduos diferentes cada vez que fazemos uma nova amostragem numa mesma população.

Por outro lado, quando se amostram diferentes gerações numa mesma população, estamos fazendo uma amostragem genética, uma vez que é derivada de uma amostra dos gametas produzidos pela geração anterior. Se o marcador utilizado for seletivamente neutro, as frequências alélicas permanecerão constantes, a menos que a deriva genética faça essas frequências variarem.

Dessa maneira, ao se amostrar populações aleatoriamente dentro de uma mesma espécie, os resultados das estimativas poderão ser discutidos de maneira a inferir os padrões de estrutura genética da espécie como um todo, uma vez que cada população pode ser considerada uma amostra da população da espécie.

Essa diferença entre amostragem estatística e genética também pode ser discutida em termos de efeitos fixos e aleatórios. No modelo fixo, a amostragem genética que ocorreu para dar origem à população em estudo não é considerada, e as inferências são feitas sobre a população como ela é constituída no momento em que foi amostrada.

Por outro lado, quando a intenção é fazer inferências sobre um grupo de populações, ou sobre a espécie como um todo, mesmo que as populações estejam atualmente isoladas e portanto já estejam divergindo a algum tempo, considera-se que as populações amostradas sob o conceito aleatório tenham um passado evolucionário comum. No caso de não ter havido diferenças devido à seleção, espera-se que todas as

populações compartilhem as mesmas frequências alélicas, e as diferenças que houverem serão devido a deriva apenas, podendo-se fazer inferências em relação ao tempo em que as diferentes populações dentro da espécie se diferenciaram da população ancestral (Weir, 1996).

Diferentes metodologias estatísticas vêm sendo utilizadas para caracterizar a estrutura genética das populações. As estatísticas F de Wright (1951) ou de Cockerham (Cockerham, 1969, 1973; Weir & Cockerham, 1984), são utilizadas para modelos aleatórios, enquanto que a abordagem de Nei pode ser utilizada sem necessidade de pressupostos sobre a natureza das amostragens.

Cockerham (1969) descreve seus coeficientes como medidas de correlação entre os alelos, obtidos através da decomposição das variâncias obtidas através de uma análise de variância das frequências de cada alelo. O coeficiente F , que corresponde ao F_{IT} de Wright, é o coeficiente de endogamia como um todo e, corresponde à correlação dos alelos dentro dos indivíduos em todas as populações. O coeficiente de coancestralidade θ , que corresponde ao F_{ST} de Wright, é a correlação de alelos de diferentes indivíduos dentro da mesma população, e f , ou o F_{IS} de Wright, é a correlação de alelos dentro de indivíduos dentro de uma população.

Vencovsky (1992) mostra a utilidade da técnica de análise da variância das frequências gênicas para descrever a estrutura genética das populações amostradas em níveis hierárquicos. A técnica permite decomposição das variâncias para cada nível hierárquico, independentemente das estimativas dos outros níveis, permitindo interpretação independente em cada nível amostrado. Assim, a contribuição dos efeitos

relativos dos diferentes níveis hierárquicos como famílias, populações, regiões e outros, sobre a estrutura genética da população ou espécie, pode ser melhor explorada.

2.5. Fluxo Gênico

A teoria evolutiva moderna estabeleceu suas bases na primeira metade do século XX, em um conjunto de princípios chamado de síntese evolutiva. Por esses princípios, ficou estabelecido que “as populações contêm variação genética que surge através de mutação ao acaso e recombinação; que as populações evoluem por mudanças nas frequências gênicas trazidas pela deriva genética aleatória, fluxo gênico e especialmente, pela seleção natural” (Futuyma, 1992).

Atualmente, com o desenvolvimento das teorias matemáticas e com o acúmulo crescente de dados de marcadores genéticos para estudo da variação das populações, ficou claro para a comunidade científica que é “a deriva genética o maior agente de mudança evolutiva, juntamente com a seleção natural” (Futuyma, 1992).

A deriva genética é a força evolutiva que provoca mudanças aleatórias nas frequências gênicas. À medida que a deriva genética ocorre, a variação entre as populações aumenta de geração para geração, simplesmente por um efeito de amostragem, uma vez que a frequência alélica nos pólenes e óvulos que vão constituir a próxima geração, podem variar ao acaso de uma geração para outra.

O grau com que a deriva genética vai levar as populações isoladas à homogeneização e conseqüentemente ao aumento da divergência entre elas, depende justamente da força evolutiva contrária à deriva que é o fluxo gênico. O fluxo gênico tem

o efeito de uniformizar a composição genética das populações isoladas, de modo que, na ausência de seleção, se a população for grande o suficiente para que a deriva possa ser ignorada, o fluxo gênico irá homogeneizar as frequências alélicas em todas as populações.

O termo fluxo gênico é usado na literatura com sentidos bastante diferentes. Frankel e col. (1996) mencionam dois conceitos extremos para o termo fluxo gênico. Um dos extremos é quando se refere ao evento raro que ocorre entre populações divergentes e isoladas geograficamente. Um exemplo do outro extremo é o conceito usado no trabalho de Schaal (1980, cit. por Frankel et al., 1996), que estudando uma população da espécie *Lupinus texensis*, usou o termo fluxo gênico para descrever o evento de troca de pólen entre plantas no processo normal de reprodução, realizado na escala de alguns metros.

Alguns modelos tem sido propostos para explicar como o fluxo gênico ocorre entre as populações estruturadas de diferentes maneiras. No modelo continente-ilha, o movimento de alelos ocorre unidirecionalmente de uma população grande para uma população menor isolada. O modelo de ilhas, considera que esse movimento é multidirecional e ao acaso entre num grupo de populações pequenas. No modelo de alpodras (“stepping stone”), cada população somente recebe migrantes das populações vizinhas a ela; e o modelo de isolamento por distância considera que há uma população grande e contínua, na qual a troca de alelos ocorre entre os vizinhos próximos.

Os alelos podem ser transportados tanto pelo movimento de gametas como de propágulos, mas a quantidade de troca gênica efetiva, medida pela taxa de migração m , é

geralmente muito menor que o número de gametas ou propágulos transportados, uma vez que há que se considerar a taxa de sobrevivência destes na nova população e a representatividade genética dos indivíduos migrantes (Futuyma, 1992; Giles et al., 1998).

Nos estudos em que se utilizam alelos seletivamente neutros, os tamanhos populacionais podem ser pequenos o bastante para que a deriva genética passe a ser importante. Nesse caso, a convergência das frequências gênicas, provocada pelo fluxo gênico, passa a ser contrabalanceada pela divergência aleatória causada pela deriva genética (Futuyma, 1992).

As medidas do fluxo gênico e do tamanho efetivo populacional estão entre os parâmetros mais difíceis de se estimar nas populações naturais. As estimativas de fluxo gênico podem ser feitas por métodos diretos e indiretos, que de preferência, devem ser usados conjuntamente, porque produzem informações diferentes e complementares (Slatkin, 1987).

Os métodos diretos estimam as distâncias de dispersão e o sucesso no estabelecimento dos dispersores para inferir a magnitude do fluxo gênico no espaço de tempo e nas relativamente pequenas distâncias em que as observações são feitas.

Os métodos indiretos empregam as frequências alélicas ou as diferenças em sequências de DNA para estimar o quanto de fluxo gênico pode ter ocorrido ou deve estar ocorrendo de forma a produzir os padrões de diferenciação observados nas populações (Slatkin, 1987). Nesse caso, o que se mede frequentemente é o produto $N_e m$, no qual N_e é o tamanho efetivo populacional e m é a taxa de migração, ao invés de cada

componente separadamente. O termo N_e da expressão acima deve ser utilizado no lugar do N , número de indivíduos da população porque, em última instância, é a representatividade genética do indivíduo migrante que vai determinar o fluxo gênico efetivo.

Wright (1931) supôs uma situação para o modelo continente-ilhas, em que uma determinada fração m dos N indivíduos em uma ilha fossem trocados por imigrantes a partir de uma população fonte com uma frequência alélica fixa. O autor mostra que a população dessa ilha não vai divergir da população fonte a menos que o número de migrantes ($N_e m$) seja menor que 1.

Uma forma usual de estimar o $N_e m$ é a partir do F_{ST} , que é em última análise uma medida da variância na frequência dos alelos que assume-se não ser afetada pela seleção natural. Conforme lembram Berg et al. (1998), é esperado que o equilíbrio entre deriva e migração resulte num certo grau de diferenciação das populações, cuja medida é estimada pelo F_{ST} . É por esse motivo que os estudos de diferenciação de populações permitem uma estimativa indireta da migração através do F_{ST} (Slatkin, 1985). A relação entre o F_{ST} e a taxa de migração foi desenvolvida por Wright (1931), que estabeleceu a seguinte expressão para o modelo de ilhas:

$$F_{ST} = \frac{1}{1 + 4 N_e m},$$

O modelo de ilhas adota algumas pressuposições para as quais a expressão acima é válida, quais sejam: cada deme ou subpopulação é constituída de um conjunto diplóide de organismos pertencentes a gerações não sobrepostas e os cruzamentos são aleatórios.

As estatísticas F de Wright também podem ser definidas como parâmetros da distribuição da frequência dos alelos entre indivíduos e subpopulações. Na ausência de seleção, as expectativas para essa distribuição corresponde àquelas dos parâmetros que definem de que maneira os gametas são amostrados. Nesse sentido, o F_{ST} é a variância estandarizada de p , a frequência de um alelo, entre subpopulações: $F_{ST} \cong \frac{\sigma_p^2}{p(1-p)}$.

Outra metodologia foi proposta por Slatkin (1981), utilizando as frequências médias dos alelos exclusivos de uma subpopulação. O autor menciona que, como as medidas dos F_{st} são frequentemente obtidas por isoenzimas, e como há uma controvérsia sobre a neutralidade desse tipo de marcador, poderia ser mais preciso estimar $N_e m$ a partir das frequências médias dos alelos raros presentes em apenas um dos demes amostrados $\hat{p}(1)$ (Slatkin, 1985; Barton & Slatkin, 1985). A sua suposição é que os alelos raros podem ser desvantajosos em qualquer lugar, diferentemente dos alelos que são comuns em algumas populações mas não em outras, que é um tipo de padrão de distribuição que poderia ser causado por seleção natural (Futuyma, 1992).

A metodologia dos alelos raros foi estabelecida com o uso de modelos de simulação, para mostrar que a frequência desses alelos nas amostras nas quais eles estão presentes, é inversamente relacionada ao $N_e m$ (Slatkin, 1985a). O modelo no qual o método é baseado assume uma população com d demes, cada um dos quais contendo um número N de indivíduos diploides; as gerações foram discretas e não sobrepostas; cada geração foi submetida a processos de mutação, amostragem dos gametas, migração e seleção.

No modelo, foi permitido que a deriva genética e o fluxo gênico ocorressem simultaneamente e, cada um dos demes estavam submetidos à mesma taxa de imigração m . Os autores especificaram diferentes regras para as quais cada deme poderia enviar migrantes aos outros demes, de acordo com diferentes modelos demográficos. Assim, no modelo de ilhas, os imigrantes em um deme podiam vir de qualquer um dos outros $d - 1$ demes da população; no modelo de alpodras, apenas os demes vizinhos podiam enviar migrantes. Outros modelos também foram utilizados e os autores mostram que todos eles produziram resultados comparáveis.

As simulações mostraram que o método proposto produz estatísticas relativamente independentes da taxa de mutação e da intensidade de seleção, mas é, como desejado, bastante sensível à taxa de migração da população (Slatkin 1985a, 1985b, 1987). A curva válida para valores intermediários de Nm é aproximadamente,

$$\ln(\bar{p}(1)) = a \ln(Nm) + b$$

Apesar de as estimativas de $N_e m$ através dos alelos raros não envolverem estimativa direta do F_{ST} , elas estão sujeitas aos mesmos modelos de genética de populações e às propriedades da distribuição da frequência dos alelos que o método do F_{ST} e, conseqüentemente, a violação dos pressupostos dos modelos pode levar a resultados incorretos.

Um outro pressuposto importante para a metodologia dos alelos raros é que eles estejam presentes na população a um tempo suficiente para que atinjam uma condição

próxima ao equilíbrio entre deriva genética (e possivelmente seleção e mutação) e imigração entre as populações amostradas (Barton & Slatkin, 1986).

Barton & Slatkin (1986) enfatizam ainda que, embora não estejam definidos quais seriam os estimadores mais robustos e eficientes para o $N_e m$, os dois métodos anteriormente citados tem sido usados, e as estimativas resultantes tem sido geralmente consistentes (Slatkin, 1985b).

2.6. Tamanho Efetivo Populacional

Na grande maioria dos casos, o N_e é menor que o número de indivíduos da população (N), o que significa que a representatividade genética é menor quanto menor o N_e . Este é afetado pela densidade populacional, pelo fluxo gênico, pela endogamia, pelas flutuações populacionais, pelas diferentes proporções sexuais e pela variância no número de progênies entre os indivíduos que se reproduzem.

O N_e é máximo em populações idealmente grandes, perfeitamente panmíticas; no entanto a maioria das espécies é formada por populações locais, geralmente pequenas, que divergem ao longo do tempo pelo efeito da deriva genética. Mesmo em populações contínuas de polinização aberta, o acasalamento é mais provável que ocorra entre os indivíduos mais próximos. Além disso, uma característica constante nas populações naturais de espécies arbóreas tropicais é que apenas parte dos indivíduos adultos se reproduzam a cada evento reprodutivo.

As características populacionais necessárias para se estimar o N_e são difíceis de se obter em uma população natural. As distâncias de dispersão de pólen e sementes, a

proporção sexual dos indivíduos, a frequência com que ocorrem os acasalamentos e a variância no sucesso reprodutivo são fatores muito difíceis de se estimar.

Vencosvsky (1997) propõe um procedimento para estimar o N_e baseado no conceito de Cockerham (1969), utilizando a metodologia da análise de variância dos alelos em cada loco obtidos com marcadores bioquímicos ou moleculares. O método é vantajoso porque para a sua adoção, não são necessários conhecimentos prévios do sistema de acasalamento, pode ser utilizado em casos onde diversos níveis hierárquicos foram amostrados e a estimativa pode ser baseada em qualquer número de locos e alelos.

O autor discute dois casos específicos, onde o N_e é estimado para representar a população amostrada ou quando estimamos a representatividade genética da espécie como um todo, supondo a existência de infinitas populações (Vencovsky 1997).

2.7. Marcadores Isoenzimáticos

Os estudos em genética de populações tiveram um grande impulso após a disponibilidade do uso de isoenzimas na análise genética de indivíduos. Graças a essa ferramenta pôde-se expandir a observação da variação genética a um número muito maior de espécies e suas populações de maneira bastante rápida e precisa, a um custo relativamente baixo.

Apesar de apenas 30 % das proteínas serem solúveis e que somente por volta de 25 % das diferenças em sequências de DNA nos genes estruturais que codificam as proteínas levam a diferenças detectáveis através da eletroforese, a técnica ainda é uma maneira fácil de coletar dados de muitos indivíduos em vários locos. Apesar do

aparecimento de técnicas moleculares que mostraram a possibilidade de observar a variação genética diretamente ao nível do DNA, as isoenzimas ainda continuam sendo extremamente úteis e informativas: são marcadores acessíveis, seus custos são mais baratos que as técnicas moleculares, apresentam herança mendeliana, expressão co-dominante, completa penetrância e suposta ausência de interações pleiotrópicas e epistáticas.

Apesar das vantagens apresentadas, existem algumas objeções ao uso desses marcadores, mencionadas por Alfenas et al. (1998), dentre elas: revelar apenas a variabilidade resultante após os eventos de transcrição e tradução das enzimas; a porção amostrada do genoma é bastante reduzida; controvérsias em relação à neutralidade da variabilidade isoenzimática; baixo nível de polimorfismo detectável, tanto em número de locos como em número de alelos por loco

2.8. Autocorrelação Espacial

A distribuição espacial da variabilidade genética dentro de populações naturais de plantas podem influenciar de maneira significativa os processos evolucionários e ecológicos (Epperson, 1990). Na visão de Wright (1943, 1978), Mayr (1970) e outros evolucionistas, a maneira com que a variação se distribui no espaço tem consequências diretas sobre os processos de especiação. De acordo com esses autores, a estruturação em microhabitats pode promover, através de seleção e deriva, a formação local de novos genótipos.

Ainda quando só a deriva genética está atuando, portanto na ausência de seleção natural, as frequências gênicas neutras podem estar sujeitas a um fluxo gênico limitado, o que pode conduzir ao conhecido processo de isolamento por distância (Sokal & Wartenberg, 1983; Shapcott, 1995). Nesse processo, o isolamento provocado pelo acasalamento preferencial com os indivíduos mais próximos, leva a um certo grau de endogamia dentro das subpopulações, que produz a variação espacial nas frequências alélicas frequentemente detectada em vários estudos de plantas e animais (Britten et al., 1995; Rousset, 1997; Le Corre et al., 1998).

Nas escalas espaciais abaixo da população, a variação genética reflete com frequência o sistema de acasalamento da espécie (Dyer & Rice, 1997). Espécies que não praticam panmixia total, exibem com frequência menor variação no nível populacional, enquanto que espécies panmíticas, devido à ampla distribuição do pólen e sementes, geralmente exibem maior variação nas suas populações, tamanho efetivo mais alto e estrutura espacial local menos aparente.

A maior parte das medidas de diferenciação genética necessitam da designação de subpopulações, dessa forma a estrutura pode ser quantificada através de índices como o F_{ST} (Wright, 1951) e o G_{ST} (Nei, 1973). Segundo Heywood (1991), as divergências medidas por esses índices tem interpretação restrita sob o modelo de isolamento por distância, uma vez que podem não ser capazes de detectar estrutura genética em escalas menores que a da subpopulação designada. Assim, as medidas de autocorrelação espacial seriam mais adequadas, especialmente porque não requerem a delimitação de subpopulações.

Delimitar grupos de genótipos intercruzantes, isto é, subpopulações (ou demes, usando um termo mais bem caracterizado evolutivamente), pode ser uma tarefa difícil numa área onde a distribuição da população é contínua. Na análise de autocorrelação espacial, não são adotadas pressuposições sobre a escala espacial na qual a estrutura estaria supostamente ocorrendo. Dessa maneira, pela possibilidade de se basear a análise nos genótipos dos indivíduos e nas distâncias entre eles, a análise de autocorrelação pode descrever de maneira mais eficiente a estrutura genética em uma população local que o F_{ST} e o G_{ST} (Dewey & Heywood, 1988).

A análise de autocorrelação espacial testa se a variável presente num indivíduo é independente dos valores da variável que ocorre nos indivíduos vizinhos (Sokal & Oden, 1978). Uma autocorrelação positiva a curtas distâncias representa agrupamentos de árvores com genótipos parecidos (Legendre & Fortin, 1989 citados por Shapcott, 1995). Por outro lado, uma autocorrelação negativa a curtas distâncias mostram um fenômeno de exclusão, como aqueles encontrados em plantas espaçadas de maneira regular. Do mesmo modo, esse efeito pode ocorrer quando o intervalo de amostragem realizado, por ser muito grande, não é capaz de detectar as associações (Legendre & Fortin, 1989 citados por Shapcott, 1995).

O correlograma que apresenta correlações positivas a curtas distâncias e negativas a longas distâncias é tipicamente encontrado em populações com maiores proporções de homozigotos e dispersão reduzida (Epperson, 1989). O padrão geralmente representa agregados de homozigotos, com o aparecimento de zonas intermediárias de heterozigotos e, as árvores menos parecidas, mostram-se negativamente

correlacionadas, especialmente os homozigotos para alelos diferentes. A ocorrência de significâncias negativas a longas distâncias reflete uma reduzida probabilidade de encontrar os mesmos genótipos com o aumento da distância (Epperson, 1989).

O ponto em que o correlograma cruza o eixo X , ou muda de sinal, pode ser usado como uma estimativa do tamanho de um dos lados do agregado médio. No caso de agrupamentos irregulares, esse ponto representa o tamanho médio do seu menor lado (Epperson & Clegg, 1986). As dimensões de um agrupamento são principalmente determinadas pela estrutura reprodutiva e dispersão da população, que pode também ser afetada pela densidade dos indivíduos (Antonovics & Levin, 1980).

Correlações positivas a longas distâncias são dificilmente encontradas, mas quando o são, representam a repetição de padrões ambientais, que podem estar ocorrendo com regularidade (Legendre & Fortin, 1989, citados por Shapcott, 1995). Essas correlações representam a presença de agregados de um mesmo genótipo. Uma correlação significativa a poucos metros, seguida de uma correlação não significativa a distâncias maiores, mostra a presença de agregados de indivíduos parecidos, inseridos dentro de um arranjo aleatório de indivíduos no espaço. Essas ocorrências são frequentemente associadas a pequenos agregados de indivíduos provenientes da mesma mãe, ou mesmo a agregados de indivíduos de reprodução vegetativa (Wartenberg, 1983; Epperson, 1989; Shapcott, 1995).

A estrutura genética espacial é de importância estratégica na amostragem das populações naturais, tanto para a conservação como para o melhoramento genético. Além disso, pode ser determinante para estabelecer os parâmetros para o manejo *in situ*

das populações naturais com fins econômicos. A identificação da presença de estruturação é importante para aumentar as chances na amostragem de genótipos não aparentados e para predizer o impacto que a retirada de recursos, como folhas, pode ter sobre os processos genéticos e ecológicos atuando na população.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Descrição das Áreas de Estudo

Estação Ecológica dos Caetetus

A Estação Ecológica dos Caetetus, situada entre os municípios de Gália e Alvinlândia, é área de proteção federal, com 90 % de sua área destinada à preservação integral da biota, portanto intocável. A área localiza-se entre as coordenadas geográficas 22°22' a 22°27' de Latitude Sul e 49°40' e 49°43' Longitude Oeste. A topografia da área é ondulada, com altitudes variando entre 500 m a 680 m. O solo é do tipo Podzólico Vermelho-Amarelo tb, eutrófico e de textura arenosa. Apesar de ser altamente susceptível à erosão, por ser eutrófico, possui boas qualidades químicas.

O Clima é do tipo Cwa, que segundo a classificação de Koeppen, é quente com inverno seco. A temperatura máxima anual é de 30° C, a mínima é de 10° C e a média de 20° C. A precipitação anual é de 1.480 mm e está concentrada nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro, sendo maio e junho os meses mais secos do ano. A área abriga três nascentes de córregos que formam o rio São João, pertencente à Bacia Hidrográfica do Paranapanema baixo.

A área abriga uma floresta latifoliada tropical semi-decídua, com características primárias, com árvores que atingem a altura de 25 a 30 m e diâmetro de até 1m e espécies típicas desse tipo de floresta do centro-oeste do estado de São Paulo. A flora local é considerada praticamente intacta; a área é um dos maiores e mais bem conservados remanescentes representativos desse tipo de floresta em todo o estado de

São Paulo, sendo uma oportunidade única de estudo para espécies típicas desse tipo de ecossistema.

Reserva do Matão (Arapoti PR)

A Reserva do Matão é uma área de aproximadamente 2.000 ha localizada em Arapoti Paraná, coordenadas geográficas 24° 15'S e 50° 00' W, de propriedade da Inpacel S.A.. O clima, segundo a classificação de Koeppen, está em uma transição entre o tipo Cfa, mesotérmico, com ausência de estação seca e verões quentes e o tipo Cfb mesotérmico úmido e subúmido, sem estação seca e com verões mais amenos. A precipitação média anual é de 1.465 mm. A altitude média da reserva é de 700 m e está em área de transição entre a Floresta Estacional Semidecídua e a Floresta Mista de Araucária. A área em que foi feita a coleta, localiza-se na microbacia da Onça.

Parque Estadual Intervales (Saibadela)

O Parque Estadual Intervales é uma área de conservação pertencente a Fundação Florestal, abrangendo parte da serra de Paranapiacaba, inserida entre dois vales - o do rio Paranapanema e Ribeira de Iguape. Sua área, entre as coordenadas geográficas 24° 12' a 24° 25'S e 48° 03' e 48° 30'W, estende-se pelos territórios de cinco municípios - Ribeirão Grande, Guapiara e mais três municípios pertencentes ao Vale do Ribeira, Iporanga, Sete Barras e Eldorado Paulista. O Parque é um importante remanescente da Mata Atlântica, ecossistema do qual restam somente cerca de 7 % da vegetação original, e contém 83,6% de toda a vegetação nativa remanescente no Estado de São Paulo. O estado de conservação da vegetação do Parque é considerado excelente, tendo havido apenas

alguma exploração comercial de palmito nativo na década de 70. Na década de 80 foi decretada a Área de Proteção Ambiental da Serra do Mar.

A altitude do parque varia entre 60 a 1.100 m, o clima da área da baixada, segundo a classificação de Koeppen, é do tipo Af, ou clima tropical chuvoso de floresta. Segundo Monteiro (1973) citado por SMA 1997, o clima é meridional permanentemente úmido, onde a atuação das massas de ar frio polar é mais frequente que a das massas de ar quente tropicais. As temperaturas médias anuais ficam em torno de 22° C nos meses mais quentes e abaixo de 18° nos meses mais frios. A média anual de precipitação fica em torno de 1.200 a 1.500 mm. As chuvas são bem distribuídas durante o ano, há um discreto declínio nas precipitações nos meses de inverno sem que fique caracterizada uma estação seca.

A área onde foi realizada a coleta, na base Saibadela, fica entre 100 a 300 m de altitude, em solo de depósitos aluvionares recentes e com presença de rochas de granito. A região de Saibadela fica na parte sudeste do Parque onde predominam solos são ácidos e rasos. A cobertura vegetal predominante é a Floresta Ombrófila Densa, genericamente denominada de Mata Atlântica.

Reserva de Santa Genebra

A Reserva de Santa Genebra é uma área de conservação municipal, localizada na região norte do município de Campinas SP, entre os paralelos 22° 49'45" S e 47° 06'33" W. A reserva tem uma área de 251,8 ha e altitudes que variam de 580 a 610m. O clima é do tipo Cwa, de acordo com a classificação de Koeppen, sendo quente e úmido com inverno seco e verão quente e chuvoso. A temperatura média do mês mais quente fica em torno

de 22° C e a do mês mais frio, 18° C. O relevo é levemente ondulado, ocupado por áreas de floresta estacional semidecidual (IBGE 1991). Em áreas mais baixas, ocorrem solos permanentemente encharcados ocupados por uma Floresta Paludosa (Leitão Filho, 1995). A floresta da reserva é caracterizada por mosaicos de vegetação, em que várias fases sucessionais distintas são encontradas. Ocorrem tanto áreas com florestas preservadas, formando um dossel contínuo de até 15 a 18 metros, com espécies emergentes de até 25 m, como áreas muito perturbadas, ocupadas por espécies de estágio sucessional inicial. Apesar de ser esta uma característica comum de florestas tropicais, onde normalmente fatores endógenos como queda espontânea de árvores ou galhos geram continuamente clareiras de diferentes tamanhos que iniciam a regeneração passando pelos diversos estágios sucessionais, no caso da Mata de Santa Genebra, além desse processo natural, ocorreram perturbações foram antrópicas no passado como extração seletiva de madeiras nobres e corte raso de alguns pequenos trechos para utilização da lenha (Leitão Filho, 1995). Em levantamento florístico realizado por Grombone (1999), foram encontradas 205 espécies distribuídas em 150 gêneros e 57 famílias, das quais 41,5 % ou 85 são espécies arbóreas de grande porte e 18% ou 37 espécies de árvores de pequeno porte. Morellato (1995) mostra que a vegetação apresenta espécies que perdem folhas parcial ou totalmente suas folhas durante o período seco e volta a rebrotar a partir do início da estação úmida.

Mata da Serra do Japi

A Serra do Japi está situada em uma região em que diversos tipos de alterações podem ser descritas, desde alterações geomorfológicas a alterações antrópicas mais recentes, devido a ocupação da região já ter sido feita a mais de 300 anos. Essas alterações explicam a fisionomia em mosaico, revelando a interferência de queimadas, cortes seletivos e a utilização de áreas para agricultura na sua composição florística. Além dessas perturbações antrópicas, existem aquelas naturais devidas a diferenças de solo, umidade e altitude. Além disso, está situada em uma região de interface entre duas fisionomias de vegetação distintas, de ampla distribuição no Brasil, a Mata Atlântica e as florestas mesófilas semi-decíduas do Planalto (Leitão-Filho, 1992).

As coordenadas aproximadas são 23° 11'S e 46° 52'W. Os solos das partes baixas da Serra (750 a 870 m altitude) classificam-se como Latossolo Vermelho Amarelo fase terraço, e o das partes altas Latossolo Vermelho Amarelo fase rasa (Rodrigues & Shepperd, 1992). A análise de solos mostram que nas áreas de altitudes de 920 a 1170 m, o solo é caracterizado como distrófico, com teores elevados de alumínio e fortemente ácidos. Os solos localizados em menores altitudes, onde forem coletados os indivíduos de espinheira-santa, são menos ácidos e com soma de bases mais elevada, caracterizando um solo menos distrófico que o primeiro, chegando até mesotrófico nas camadas superficiais.

O clima da Serra do Japi é classificado como super-úmido mesófilo a úmido mesófilo. A região sul, próxima a Cajamar, tem precipitação anual de 1.907 mm anuais

em média, e à medida que se desloca para o norte, a precipitação tem um decréscimo gradual, chegando a 1.367 mm em Jundiáí.

As altitudes na Serra do Japi vão de 700 a 1.300 m. As temperaturas médias anuais são influenciadas pelas altitudes, chegando a 19,2° e 15,7° C nas partes mais baixas e mais altas, respectivamente. O mês mais frio é julho, com temperaturas médias entre 15,3° e 11,8° C, e o mês mais quente é janeiro, com temperaturas médias de 22,2° e 18,4°, de acordo com a altitude.

Reserva Genética de Caçador (SC)

A Reserva Genética de Caçador é uma área pertencente à EMBRAPA e cedida à EPAGRI Empresa de Pesquisa Agropecuária e de Extensão Rural de Santa Catarina. A Reserva de 1.120,3 ha está localizada no município de Caçador, Santa Catarina, no domínio da Floresta Ombrófila Mista (Floresta de Araucária) nos planaltos elevados do Rio Uruguai no Alto Vale do Rio do Peixe. A altitude média da área é de 1.100 m.

O clima da área é do tipo Cfb (classificação de Koeppen), temperado úmido (ou mesotérmico superúmido, segundo Caldato, 1998), com geadas severas entre 10 a 25 dias por ano. A temperatura média anual está em torno de 16° C, com temperatura do mês mais quente inferior a 22° C e no mês mais frio, entre 6 a 8° C. A precipitação média anual oscila entre 1.500 a 1.700 mm, apresentando uma distribuição uniforme durante o ano todo.

A vegetação da região não é uma formação homogênea e contínua; é formada por diversas associações florísticas, constituídas por árvores características de cada formação. Na chamada floresta de pinhais, o pinheiro brasileiro (*Araucaria angustifolia*)

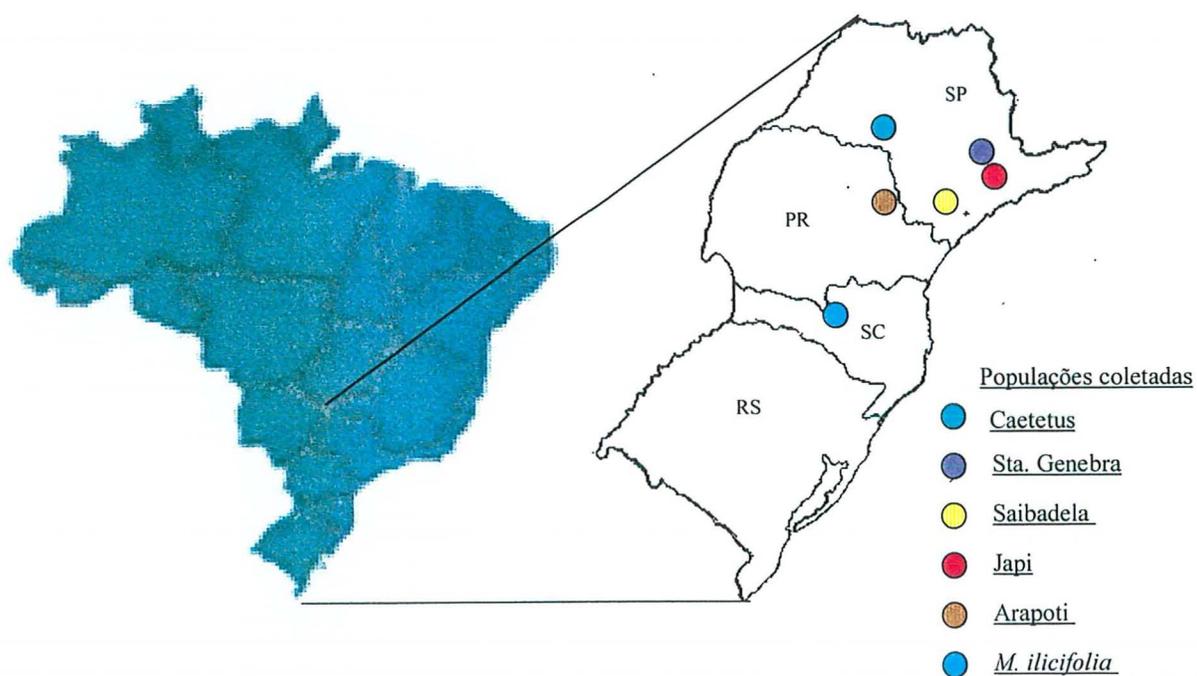
constitui o estrato emergente, seguido da sub-mata dominada por espécies como a imbuia, a erva-mate e o cedro. A espécie *Maytenus ilicifolia* ocupa o sub-bosque desse tipo de formação florestal, que é por vezes interrompida pelos campos ou capões arbustivos.

A população da espécie *Maytenus ilicifolia* foi coletada na Reserva Genética e seus arredores, dentro da Estação Experimental da EPAGRI. A maioria dos indivíduos coletados estavam em área que sofreu e continua sofrendo alterações antrópicas. Os indivíduos coletados foram em sua maioria de pequeno a médio porte (2 a 6 m de altura).

Tabela 2. Populações naturais de *Maytenus* coletadas, estado de conservação, tipo de formação florestal e altitudes médias dos locais em metros.

Espécie	Localidade	Conservação	Formação	Altitude
1. <i>M. aquifolia</i>	Parque Estadual Intervales, Sete Barras SP	Primária	Floresta Ombrófila Densa	60 – 200
2. <i>M. aquifolia</i>	Mata de Santa Genebra, Campinas SP	Secundária	Estacional Semidecidual	580 – 610
3. <i>M. aquifolia</i>	Reserva do Matão Arapoti (PR)	Secundária	Estacional Semidecidual	700
4. <i>M. aquifolia</i>	Serra do Japi, Jundiá SP	Secundária	Estacional Semidecidual	750 – 780
5. <i>M. aquifolia</i>	Estação Ecológica de Caetetus SP	Primária	Estacional Semidecidual	500 – 680
6. <i>M. ilicifolia</i>	Reserva Genética de Caçador SC	Secundária	Floresta Ombrófila Mista	1.100

Figura com as áreas de coleta



3.2. Processamento das amostras e eletroforese

A parte da planta utilizada foi o tecido foliar de indivíduos adultos e jovens. As folhas, depois de coletadas, foram transportadas sob refrigeração, sendo trazidas ao laboratório no menor tempo possível, de modo a não serem alteradas a atividade enzimática do tecido foliar, o que ocorreu no máximo 3 a 4 dias após o início das coletas.

A metodologia de extração dos tecidos, confecção básica dos géis e tampões, carregamento dos géis e outros procedimentos usuais de laboratório estão descritos em outros trabalhos (Lacerda, 1997; Reis, 1996; Souza, 1996).

Foram desenvolvidos, através de vários testes em laboratório, os protocolos básicos para extração, corrida e revelação de sete sistemas enzimáticos, adaptados para *Maytenus aquifolia* e *M. ilicifolia*.

Após os procedimentos de extração, as amostras eram conservadas em freezer a ultrabaixas temperaturas (- 80° C) até as corridas de eletroforese.

3.3. Análises dos dados

Varição Genética

A caracterização da variação genética das populações foi feita através das estimativas das frequências alélicas e da obtenção dos índices de diversidade usuais.

As frequências alélicas foram estimadas o emprego do programas BIOSYS-2 (Swofford & Selander, 1997), utilizando a seguinte expressão:

$$p_{ij} = n_{ij} / n_j \quad \text{sendo que:}$$

p_i = estimativa da frequência do alelo i na população j

n_{ij} = 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.

Os números médios de alelos por loco e por loco polimórfico (A e A_p , respectivamente) foram estimados obtendo as médias do número médio de alelos encontrada em cada loco e em cada loco polimórfico, respectivamente.

A heterozigidade 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 Heterozigidade 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.

Os índices de fixação f foram obtidos por:

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

Testes para diferenciação de populações em termos de frequências alélicas

Foram realizados testes para verificar a existência de diferenças significativas em frequências alélicas entre as populações. As análises foram realizadas através do TFPGA (Miller, 1997). A hipótese testada é que 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 (Teste de Probabilidade Combinado de Fisher, descrito em Fisher 1954, Manly 1991 e Sokal & Rohlf, 1995 citados por Miller, 1997) para detectar 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, utilizando-se 1.000 passos de desmemorização. Foram feitas todas as comparações possíveis entre as populações duas a duas, e também entre alguns grupos.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg e de Endogamia de Wright

Conforme menciona Weir (1996), o que se quer é testar a hipótese de que os desvios dos nossos dados em relação aos do modelo de Hardy-Weinberg não são significativamente diferentes de zero. No entanto, quando se tem dados de apenas uma geração, testar a nulidade dos desvios em relação às proporções de Hardy-Weinberg não é garantia de aderência ao modelo. Ainda que os pressupostos do modelo estejam presentes, uma geração pode ter suas proporções aderindo a Hardy-Weinberg por outros fatores, um deles é a apomixia (Coelho & Vencovsky, 1999).

As abordagens que tem sido usadas para testar a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg podem ser classificadas basicamente em dois grupos (Guo &

Thompson, 1992). No primeiro grupo estão os testes Qui-Quadrado e a estatística G, e no segundo grupo, os testes exatos.

No passado, a maioria dos estudos fazia uso dos testes Qui-Quadrado e G para verificar a aderência às proporções de Hardy-Weinberg. No entanto, é consenso atualmente que tais testes não são suficientemente precisos quando um ou mais genótipos tem baixa contagem esperada, levando a conclusões falsas de rejeição ou aceitação da hipótese nula. O procedimento que tem sido adotado para contornar esse problema é agrupar todos os genótipos em três categorias: 1) homozigotos para o alelo mais comum, 2) heterozigotos para o alelo mais comum e 3) todos os outros genótipos. Esse procedimento aumenta as contagens esperadas a ponto de remover o viés associado ao baixo número de indivíduos. No entanto, essa é uma solução que faz com que se perca informação no processo e sempre que possível, é preferível se adotar um teste exato, como o de Haldane (1954), que se mostra sempre melhor para esses casos.

Os testes exatos tem sido utilizados com frequência, mas como exigem computação intensa, o seu uso tem sido restrito a locos com apenas dois alelos ou utilizando o procedimento de agrupamento dos genótipos.

Guo e Thompson (1992) propuseram que, ao invés de calcular a probabilidade exata de uma distribuição multinomial, utilize-se procedimentos de randomização que dão uma aproximação da probabilidade exata verdadeira. Os autores sugerem dois métodos para estimar os níveis exatos de significância para a aderência às proporções de Hardy-Weinberg. Um deles é um algoritmo que realiza o teste pelo método de Monte Carlo convencional, e o outro é um algoritmo proposto por Metropolis et al. (1953,

citados por Guo & Thompson, 1992) inicialmente desenvolvido para uso em estudos de Física.

Miller (1992) desenvolveu um programa que disponibiliza o uso dos dois métodos, no qual o procedimento de baterias de rotinas de randomização permitem o cálculo dos erros padrão dos valores da probabilidade estimada.

O método de Monte Carlo convencional envolve a construção de conjuntos de dados aleatórios que tenham a mesmas frequências alélicas que os dados originais. A probabilidade de ocorrência de cada conjunto de dados construído aleatoriamente é então comparada à probabilidade da amostra observada. A significância do conjunto de dados original é então encontrada pela determinação da proporção do conjunto de dados que tem probabilidade menor ou igual à do conjunto de dados original.

A segunda abordagem, o método das Cadeias de Markov, obtém amostras aleatórias dos possíveis conjuntos de dados através de uma série de modificações passo a passo dos dados originais. Para que se possa usar essa rotina no TFPGA, deve-se especificar o número de baterias desejado, o número de permutações por bateria e o número de passos de desmemorização usados para estimar a probabilidade. O procedimento de desmemorização é utilizado para mudar os dados observados para uma posição aleatória antes de começar a análise (Miller, 1992).

Neste trabalho empregamos cinco métodos, o Qui-Quadrado Convencional, o teste G, o exato de Fisher conforme Haldane (1954), e os dois métodos mencionados, Monte Carlo Convencional e Cadeias de Markov, com a finalidade de observar se

haveriam diferenças em termos de aceitação ou rejeição da hipótese testada. Utilizamos para esse fim o programa TFPGA, disponibilizado por Miller (1997).

Para os testes com o método Monte Carlo Convencional e Cadeias de Markov, foram utilizadas dez baterias de análises, com 5.000 permutações cada, num total de 50.000 permutações, além de 1.000 passos de desmemorização para o Método Cadeias de Markov.

Nos locos em que as proporções genóticas observadas não aderiram às proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram realizados testes de contingência de Qui-Quadrado para testar a aderência ao equilíbrio com endogamia.

Estrutura Genética

Estatísticas F

Para a caracterização da estrutura genética das populações, foram utilizadas as estatísticas F estimadas pelo método de Weir & Cockerham (1984).

Essa metodologia foi utilizada pelo fato das cinco populações de adultos terem sido amostradas conforme o conceito aleatório. Considerou-se que as populações divergiram de uma população ancestral única, da qual as populações em estudo são amostras aleatórias. Através da análise de variância para cada alelo, foram obtidas estimativas para os coeficientes F , f e θ das populações amostradas, sendo que F é o coeficiente de endogamia total, f é o coeficiente de endogamia da população e θ é o coeficiente de coancestralidade, que mede a endogamia gerada pelo efeito de subdivisão, que é um estimador da divergência entre as populações.

Os coeficientes foram gerados com o emprego do programa GDA (Lewis & Zaikin, 1999). O programa produz análises de variância para cada alelo gerando as estimativas das variâncias que são usadas para compor os coeficientes acima citados. O programa admite a análise em diversos níveis hierárquicos, permitindo a verificação de hipóteses sobre os fatores envolvidos na divergências entre as populações, como distância geográfica, tipo de formação florestal e outros.

Foram realizadas diversas análises. Primeiramente foram estimados os coeficientes F para as cinco populações de adultos. Posteriormente, tentando explorar as possibilidades de encontrar grupos de populações que apresentassem menor efeito de subdivisão entre elas, devido a efeitos de menores distâncias por exemplo, realizamos vários contrastes, a saber: populações próximas (Japi e Caetetus) *versus* distantes (Arapoti, Caetetus e Saibadela); Arapoti e Saibadela *versus* Caetetus, Japi e Genebra; Arapoti e Japi *versus* Caetetus, Saibadela e Genebra.

O programa não faz análises quando uma população apenas está envolvida na hierarquia e por esse motivo, nas seguintes comparações, os indivíduos de cada população foram analisados em conjunto, de modo a formar duas populações, que puderam então ter seus coeficientes estimados. Dessa forma, foram comparadas: Saibadela *versus* as demais; Caetetus *versus* as demais, Próximas *versus* distantes, Arapoti e Japi *versus* Saibadela, Genebra e Caetetus.

Fluxo Gênico

Neste trabalho, o fluxo gênico foi considerado sob o conceito proposto por Ellstrand & Elam (1993) para descrever o movimento de genes entre populações diferentes e isoladas espacialmente.

As medidas de fluxo gênico foram feitas mediante duas abordagens indiretas, sendo que a mais tradicionalmente usada, proposta inicialmente por Wright (1951) foi baseada na seguinte expressão:

$$\hat{N}_e m = (1/4) \cdot (1/F_{ST} - 1),$$

sendo \hat{N}_e = Tamanho efetivo de indivíduos na população (foi utilizada a notação \hat{N} para maior facilidade daqui em diante).

m = taxa de migração

As estimativas foram obtidas neste trabalho com o coeficiente θ_p , que equivale ao \hat{F}_{ST} , obtido entre as cinco populações de *M. aquifolia* e entre as mesmas populações duas a duas. Foram também obtidos os $N_e m$ entre *M. aquifolia* e *M. ilicifolia*, utilizando-se o θ_p obtido entre as espécies e entre cada população das espécies.

Uma segunda estimativa de fluxo gênico foi obtida utilizando a frequência média dos alelos privados nas populações, conforme metodologia de Slatkin (1985a, 1985b). As estimativas foram feitas através do programa Genepop versão 3.1.d, cuja versão original foi descrita por Raymond & Rousset (1995). O programa produz três estimativas de Nm , utilizando as três linhas de regressão publicadas em Barton & Slatkin (1986),

ajustadas para três diferentes números de indivíduos (10, 25 e 50 indivíduos). Uma quarta estimativa é calculada, corrigindo os valores obtidos nas curvas de regressão, usando, segundo os autores, a linha de regressão mais próxima ao número de indivíduos na amostra.

Na concepção original da metodologia de estimação, o autor utilizou uma simulação com $n = 25$ indivíduos (Slatkin, 1985a). Posteriormente, Barton & Slatkin (1985) publicaram novas simulações com $n = 10, 25$ ou 50 indivíduos, propondo uma correção para outros números de amostras. Os autores sugerem que se multiplique a estimativa encontrada pela relação entre o número médio de indivíduos amostrados (n) e o número de indivíduos utilizado na regressão original (25 indivíduos).

Nesse método, foram feitas as mesmas combinações de populações que para as estimativas com o F_{ST} , uma vez que o método parece ser robusto quanto ao número de demes empregado nas estimativas (Slatkin, 1985b).

Tamanho Efetivo Populacional

Para o cálculo do Tamanho Efetivo Populacional N_e de cada população considerada isoladamente, utilizou-se a expressão:

$$N_e = N / (1 + f) \quad (\text{Vencovsky, 1997})$$

Sendo N = número de indivíduos adultos amostrados

f = coeficiente de endogamia intrapopulacional.

Para o caso dos indivíduos provenientes de várias populações a expressão utilizada foi

$$N_e = \frac{0,5}{\theta_m \left(\frac{1 + C_m}{M} - \frac{1}{N} \right) + \frac{1 + F}{2N}} \quad (\text{Vencovsky, 1997})$$

Onde, N = número total de indivíduos amostrados nas populações

$$N = \sum N_i, i = 1, 2, \dots, P$$

M = número de populações amostradas

C_m = quadrado do coeficiente de variação do número de indivíduos amostrados nas populações

Esse estimador mede a representatividade genética da amostra coletada em relação à população da espécie, considerando que esta é formada por infinitas populações. Para estimar o tamanho efetivo máximo que se teria conseguido amostrar com as cinco populações coletadas, calculou-se o N_e como se tivesse sido amostrado um número total de indivíduos idealmente grande e igual quantidade de indivíduos por população. Assim, N pode ser considerado infinito e o quadrado do coeficiente de variação do número de indivíduos amostrados por população fica nulo. Por essa simulação, foi estimado o N_e máximo possível de ser coletado com o coeficiente de coancestralidade obtido.

Autocorrelação Espacial

Foram realizadas análises de autocorrelação espacial em duas das populações amostradas, Saibadela e Santa Genebra. Os indivíduos em cada área tiveram sua localização demarcada para obtenção de suas coordenadas locais.

As variáveis utilizadas foram as frequências dos alelos nos indivíduos, de modo que a frequência do genótipo homocigoto para um determinado alelo foi 1,0; o heterocigoto para o mesmo alelo apresentava frequência 0,5; e todos os outros genótipos tiveram frequência nula. Os alelos raros ou privados não foram utilizados e, nos locos dialélicos, foi utilizado apenas um dos alelos, já que os alelos alternativos tem frequências dependentes. Na população de Saibadela foram analisados 11 alelos e na de Santa Genebra, foram 13 alelos.

Para a computação dos dados foi utilizado o programa “Spatial Autocorrelation Analysis Program”(SAAP) versão 4.3 (Wartenberg, 1989), que obteve os Índices I de Moran (Sokal & Oden, 1978) para cinco classes de distância para cada alelo, conforme a expressão:

$$I = (n/w) \left[\frac{\sum_i \sum_j (p_i - \bar{p})(p_j - \bar{p})w_{ij}}{\sum_j (p_i - \bar{p})^2} \right]$$

Onde:

I = Índice I de Moran, que pode assumir valores entre -1.0 (autocorrelação negativa) e + 1.0 (autocorrelação positiva)

n = número de indivíduos analisados

p_i e p_j = frequência alélica nos indivíduos i e j

\bar{p} = média de p

w_{ij} = elemento da matriz quadrada e simétrica W de dimensões $n \times n$, ao qual é dado o valor 1 para indivíduos vizinhos e 0 nos outros casos

W = matriz que expressa a relação espacial entre os n indivíduos e cuja soma, ao longo de i e j , é igual ao valor w

Para melhor interpretação, os coeficientes de autocorrelação I de Moran obtidos foram plotados em gráficos, denominados correlogramas.

O programa SAAP também fornece a significância de cada classe de distância e a probabilidade do correlograma em cada alelo. As classes de distância foram determinadas de maneira a manter um número equilibrado de pares de indivíduos em cada classe, o que fez com que as distâncias em cada classe variassem. Além disso, devido à disposição dos indivíduos em cada população, as amplitudes das classes de distância variaram. Em Santa Genebra os 28 indivíduos estão dispostos numa área de aproximadamente 10.000 m² em formato aproximadamente retangular, de modo que a distância máxima entre os indivíduos foi de 200 m. Por outro lado, em Saibadela a distância máxima entre os indivíduos foi de 1490 m, uma vez que os 31 indivíduos estão dispostos quase que linearmente ao longo da trilha que margeia o rio Saibadela, numa área de aproximadamente 70.000 m².

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção de marcadores isoenzimáticos

Não há estudos publicados que tenham utilizado marcadores isoenzimáticos nas espécies de *Maytenus*. Para este estudo, foi necessário desenvolver essa metodologia, tanto de extração como revelação de isoenzimas.

Foram testados os tampões de extração de Alfenas (Solução 1, Alfenas et al, 1998), Tampões 1, 2 e 3 de Soltis (Soltis & Soltis, 1989). O tampão 1 de Alfenas foi o melhor para a maioria dos sistemas testados. Foi adotada uma modificação, que foi a exclusão do 2-mercaptoetanol, cuja presença prejudicou a resolução do sistema peroxidase, sem que sua exclusão prejudicasse consideravelmente a revelação dos outros sistemas selecionados.

Para observar a presença de atividade enzimática para o maior número possível de sistemas, procedeu-se a testes de metodologia de revelação. Foram testados os sistemas constantes na Tabela 3, para os quais foram observadas presença ou ausência, intensidade e qualidade das bandas reveladas de acordo com metodologia desenvolvida para diferentes espécies, presentes na literatura. Para a maioria dos sistemas, os protocolos utilizados para os testes iniciais foram os descritos em Alfenas, 1991 e 1998 (AnexoI).

Tabela 3. Sistemas enzimáticos testados em *Maytenus* sp. Código Internacional de Nomenclatura (E.C.), presença e qualidade de revelação.

Sistema Isoenzimático	Código E.C.	Presença/ ausência	Qualidade
Álcool desidrogenase	EC 1.1.1.1.	Ausente	-----
Aldolase	EC 4.1.2.13.	Ausente	-----
Alfa Esterase	E.C. 3.1.1.1.	Presente	Fraca, regular
Beta Esterase	E.C. 3.1.1.1.	Presente	Irregular
Enzima Málica	E.C. 1.1.1.40.	Ausente	-----
Fosfatase Ácida	E.C. 3.1.3.2.	Presente	Razoável, regular
Fosfatase Alcalina	E.C. 3.1.3.1.	Ausente	-----
Fosfogluco Isomerase	E.C. 5.3.1.9.	Presente	Boa
Fosfoglucomutase	E.C. 5.4.2.2.	Presente	Irregular
Fosfogluconato desidrogenase	E.C. 1.1.1.44.	Presente	Boa
Glicerato desidrogenase	E.C. 1.1.1.29.	Presente	Irregular, fraca
Glucose Desidrogenase	E.C. 1.1.1.47.	Ausente	-----
6-Glucose Fosfato Desidrogenase	E.C. 1.1.1.49	Presente	Irregular, fraca
Glutamato Desidrogenase	E.C. 1.4.1.3.	Ausente	-----
Glutamato Oxaloacetato Transaminase	E.C. 2.6.1.1.	Presente	Irregular, fraca
Isocitrato Desidrogenase	E.C. 1.1.1.42.	Presente	Irregular, fraca
Leucina Aminopeptidase	E.C. 3.4.11.1.	Presente	Fraca, Regular
Malato Desidrogenase	E.C. 1.1.1.37.	Presente	Razoável, regular
Manitol Desidrogenase	E.C. 1.1.1.67.	Ausente	-----
NADH Desidrogenase	E.C. 1.6.99.3.	Ausente	-----
Peroxidase	E.C. 1.11.1.7	Presente	Boa
Xiquimato Desidrogenase	E.C. 1.1.1.25	Ausente	-----

Dentre os 22 sistemas testados, observou-se presença de bandas em 13 sistemas. Nestes sistemas, foram feitas tentativas de otimização dos protocolos de diversas formas como alteração de concentração do substrato, do pH do tampão de revelação, da concentração do corante e da sequência de revelação, de forma a se conseguir uma qualidade de bandas que permitisse interpretação genética de tais locos. Dentre eles, foram selecionados sete que apresentaram bandas com boa resolução nos géis após as modificações: Pgi, Acp, Lap, Prx, Mdh, α Est e 6-Pgdh.

Para melhorar a resolução final e otimizar o tempo de corrida dos géis nos diferentes sistemas, foram testados os tampões de cuba e de preparo dos géis. Foram testados os tampões Citrato de Morfolina (Clayton & Tretiak, 1972), Histidina (Brown et al., 1975), Tris-Citrato (Soltis et al., 1983) e Tris-Citrato-Borato (Ballve et al, 1991). 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 tampões foram Tris Citrato Borato (TCB) e Tris Citrato (TC).

Foram então utilizados, nas corridas de rotina, os tampões H para os sistemas Mdh, Prx, 6Pgdh e α Est e para os sistemas Pgi, Acp e Lap, foi utilizado o TCB, selecionados por apresentarem boa resolução e pelo menor tempo de corrida necessário, aproximadamente de 6 a 8 horas. Os tampões de corrida e revelação estão descritos no Anexo I.

Após realização das corridas eletroforéticas para cada população coletada, cada gel obtido foi documentado com fotografias ou transparentização. Procedeu-se à interpretação genética preliminar das bandas assim que os géis revelados foram obtidos. 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 e jovens de *Maytenus aquifolia* e de adultos de *M. ilicifolia*, foram encontrados 10 locos revelados com regularidade, dos quais apenas dois foram totalmente monomórficos (6Pgdh1 e 2) quando se considera apenas a população de jovens de *M. aquifolia*, e dois (Pgi1 e 6Pgdh1) foram totalmente

monomórficos quando considerada apenas a população de adultos dessa espécie. *Em M. ilicifolia*, três locos foram totalmente monomórficos (Pgi1, 6Pgdh1 e 2).

Em seguida são apresentados os resultados após revelação de cada sistema enzimático que geraram locos selecionados para serem utilizados como marcadores genéticos neste trabalho.

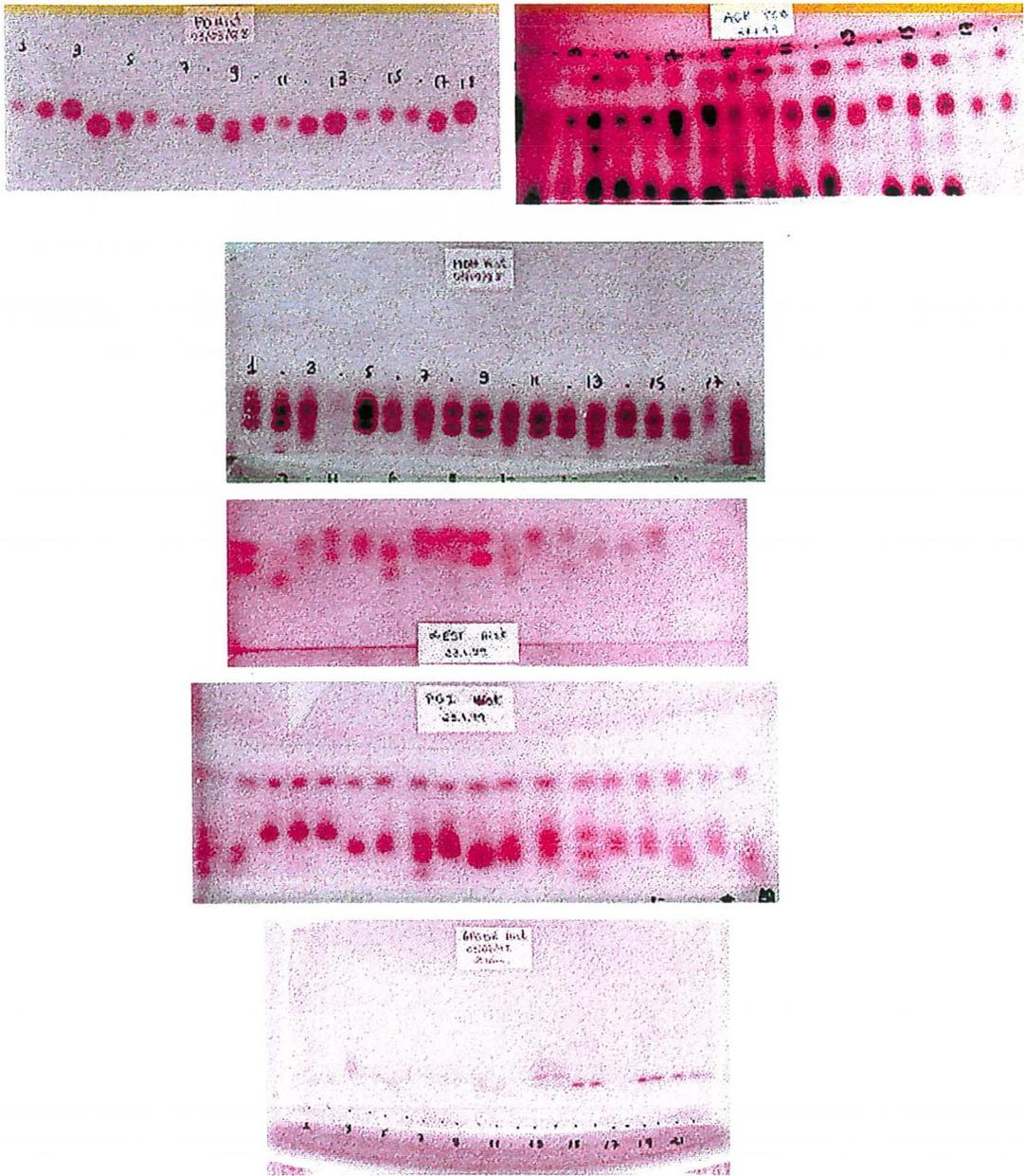


Figura 2. Amostras de géis obtidos após coloração de acordo com os diferentes protocolos isoenzimáticos estabelecidos para *Maytenus* sp.

Fosfogucose Isomerase (Pgi). Ocorrem 2 locos, o mais rápido foi monomórfico para a maioria das populações, com exceção de uma população de jovens, em que um outro alelo raro apareceu. O loco mais lento foi sempre polimórfico, dimérico, apresentando de 3 a 7 alelos, conforme a população em estudo.

Fosfatase Ácida (Acp). Ocorrem pelo menos três locos, mas apenas deles foi considerado (Acp1), pela sua regularidade e interpretação genética. Este loco, cuja enzima é monomérica, apresentou de 1 a 3 alelos nas populações.

Leucina Aminopeptidase (Lap). Ocorreu com frequência um loco, um segundo loco aparecia raramente. O loco considerado (Lap1) foi polimórfico em várias populações, com 1 a 3 alelos.

Peroxidase (Prx). Enzima que apresentou às vezes dois locos, um deles de fraca resolução e outro (Prx1) frequentemente polimórfico, monomérico, apresentando 1 a 3 alelos.

Malato Desidrogenase (Mdh). A enzima apresentou dois locos monoméricos, o mais rápido, Mdh1 apresentou de 1 a 3 alelos. Mdh2 apresentou de 1 a 4 alelos.

Alfa Esterase (α Est). Ocorreram em algumas populações, de 2 a 3 locos, mas um deles apareceu regularmente, monomérico, que foi frequentemente polimórfico, com 1 a 4 alelos.

6-Fosfogluconato Desidrogenase (6Pgdh). Ocorrem dois locos, o mais rápido foi sempre monomórfico para todas as populações, e o outro, muito pouco polimórfico, dimérico, com 1 a 2 alelos.

Na Tabela 4 resumimos os resultados descritos acima. Na Figura 2 mostramos algumas fotos de géis buscando dar uma idéia do nível de resolução conseguido para as espécies após a otimização dos protocolos e na Figura 3 mostramos os zimogramas, demonstrando a interpretação genética dada às bandas reveladas nos géis.

Tabela 4. Número de alelos e estrutura química dos sistemas isoenzimáticos selecionados para obtenção de marcadores em *Maytenus* sp. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 2000.

Sistema Enzimático	Locos	Alelos	Estrutura química
Pgi	Pgi1	1 a 2	Não determinada
	Pgi2	3 a 7	dimérica
Acp	Acp1	1 a 3	monomérica
Lap	Lap1	1 a 3	monomérica
Mdh	Mdh1	1 a 3	monomérica
	Mdh2	2 a 4	monomérica
Prx	Prx1	1 a 3	monomérica
α Est	Est1	3 a 4	monomérica
6Pgdh	6Pg1	monomórfico	Não determinada
	6Pg2	1 a 2	dimérica
Total	10	32	

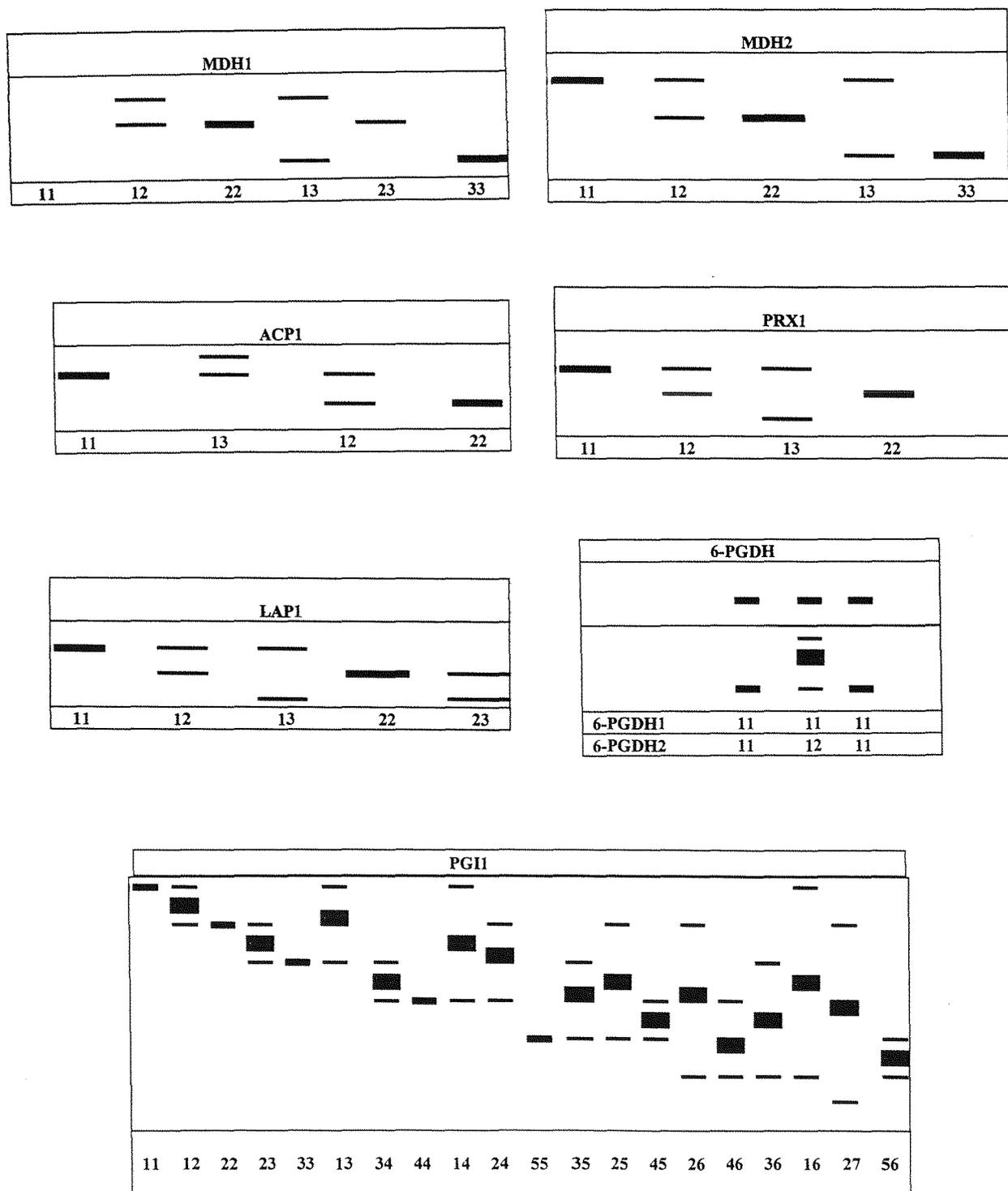


Figura 3. Zimogramas representativos das interpretações dadas às bandas nos géis revelados em *Maytenus* sp.

4.2. Caracterização da Variação Genética

Riqueza alélica

No total, foram genotipados 246 indivíduos de *M. aquifolia* e 31 de *M. ilicifolia*. O número total de alelos encontrado foi de 32, considerando-se todas as populações. Em *M. aquifolia* foram encontrados 31 alelos e apenas 22 em *M. ilicifolia* (Tabela 4). Com exceção de um, todos os alelos de *M. ilicifolia* foram encontrados em *M. aquifolia*, mas o contrário não foi verdadeiro. A espécie *M. aquifolia* mostrou, neste trabalho, ter mais riqueza alélica que *M. ilicifolia*, conforme conceito proposto por Frankel et al., (1996).

Estes resultados muito provavelmente não seriam os mesmos à medida que ampliássemos a amostragem na espécie *M. ilicifolia*. O número de indivíduos amostrados para este trabalho é quase dez vezes e o número de populações cinco vezes maior para *M. aquifolia* do que para *M. ilicifolia*. Esse argumento recebe uma evidência deste mesmo trabalho, 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. Isso mostra a necessidade de amostragens futuras mais amplas na espécie de *M. ilicifolia*, especialmente aumentando o número de populações amostradas.

A distribuição geográfica de *M. ilicifolia* é mais ao sul, e vem recebendo atenção de outros pesquisadores de instituições da região (Scheffer & Doni, com. pessoal). O foco deste trabalho é investigar em maior profundidade a diversidade em *M. aquifolia*, que tem distribuição para os Estados do sudeste, especialmente no Estado de São Paulo. A espécie *M. aquifolia* é tão utilizada para fins medicinais quanto a *M. ilicifolia* e

apresenta a mesma classe de princípios ativos que agem contra a úlcera, apesar de ser esta última a mais conhecida pela população.

A *M. aquifolia* apresenta desenvolvimento vegetativo sensivelmente mais vigoroso que *M. ilicifolia*, o que pode se mostrar vantajoso no estabelecimento de plantios da espécie. *M. ilicifolia*, por sua vez, tem como característica a ramificação desde a base, ao contrário da *M. aquifolia*, que apresenta fuste único.

Convém lembrar que, nessas espécies medicinais, as folhas e ramos são os órgãos de interesse da planta. Os objetivos de utilização de *Maytenus* compreende a domesticação e plantio ou, numa abordagem alternativa, o estabelecimento de manejo em áreas de ocorrência natural, onde a extração de folhas possa ser realizada de maneira sustentável. Assim, pode ser interessante associar, através de uma possível hibridação inter-específica, a maior capacidade de ramificação basal de uma espécie com o desenvolvimento vegetativo mais vigoroso da outra em futuros programas de melhoramento genético.

Existe o interesse de estabelecimento de programas de melhoramento genético para a espécie no Instituto Agrônomo (Bovi, com. pessoal) e no CPQBA da UNICAMP (Magalhães & Montanari, com. pessoal), visando melhorias tanto no vigor vegetativo como na capacidade de adaptação ao ambiente de cultivo. A hibridação interespecífica entre as espécies pode vir a ser uma possibilidade interessante à medida que forem realizadas coletas de germoplasma das duas espécies e seja elucidado em mais detalhes a sua biologia reprodutiva.

Frequências Alélicas

As frequências alélicas das cinco populações de adultos de *M. aquifolia* estão na Tabela 5. Dos dez locos analisados, dois foram monomórficos em todas as populações, enquanto que o restante foi polimórfico em pelo menos uma população.

Os testes de diferenciação de frequências alélicas mostraram que, de maneira geral, todas as populações diferem entre si quando são considerados os locos em conjunto (Anexo II e figuras 4 e 5).

Algumas diferenças não significativas ocorrem em alguns locos isolados, em algumas comparações. Um caso previsível é o do loco 6Pg2, que é monomórfico para todas as populações com exceção da população de Santa Genebra, onde aparece um segundo alelo. É previsível que, nesse loco, as quatro populações que têm o alelo fixado não difiram entre si. Mesmo nas comparações envolvendo as quatro populações com alelo fixado versus Santa Genebra, a presença dessa variação não foi suficiente para determinar diferenciação significativa nesse loco.

Outros casos de diferenças não significativas nas comparações de frequências dos alelos nos locos ocorreram esporadicamente, como em Saibadela vs Japi, Arapoti e Santa Genebra vs Japi (quatro e três locos não significativos, respectivamente). Vale a pena observar que, apesar de em um caso (6Pg2) todas as populações não terem diferido no mesmo loco, na maioria dos casos em que os locos não divergiram, diferentes locos estavam envolvidos na comparação.

Algumas diferenças adicionais entre as populações merecem ser analisadas em mais detalhe. O loco Pgi2 foi o que mais apresentou alelos, 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, enquanto que nas populações de Arapoti e Saibadela, o mais freqüente foi o alelo 3. Na população de Sta. Genebra, a frequência desses dois alelos, mais a de um outro alelo (alelo 4) foram bem equilibradas. Esse último alelo é menos frequente em Arapoti e Japi, e está ausente em Caetetus. Nessa população, o alelo 1 que ocorre a frequências sempre baixas em outras populações, aparece com frequência relativamente alta.

Além do loco Pgi2 já mencionado, outros três locos também variaram em relação ao alelo mais frequente entre as populações; estes foram Acp1, Mdh1 e α Est1, mas em outros três locos, Lap1, Prx1 e Mdh2, o alelo mais frequente coincide nas cinco populações.

Nas populações de jovens, foram encontrados sete locos polimórficos em Arapoti e oito no Japi (Tabela 6). As frequências alélicas nas populações de jovens, quando comparadas às dos adultos da área a qual pertencem, seguiram tendência contrária à das comparações entre populações de adultos.

Em Arapoti, no loco Pgi2, um alelo que é raro nos adultos não foi amostrado nos jovens. O alelo 3 é o mais freqüente em ambas as classes de idade, mas o alelo 5, que ocorre em 5% dos indivíduos jovens, é bastante raro nos adultos amostrados. Outras pequenas diferenças entre as frequência gênicas ocorreram entre adultos e jovens, no entanto nenhuma dessas diferenças foram significativas quando submetidas aos testes exatos de diferenciação de frequências alélicas (Anexo II).

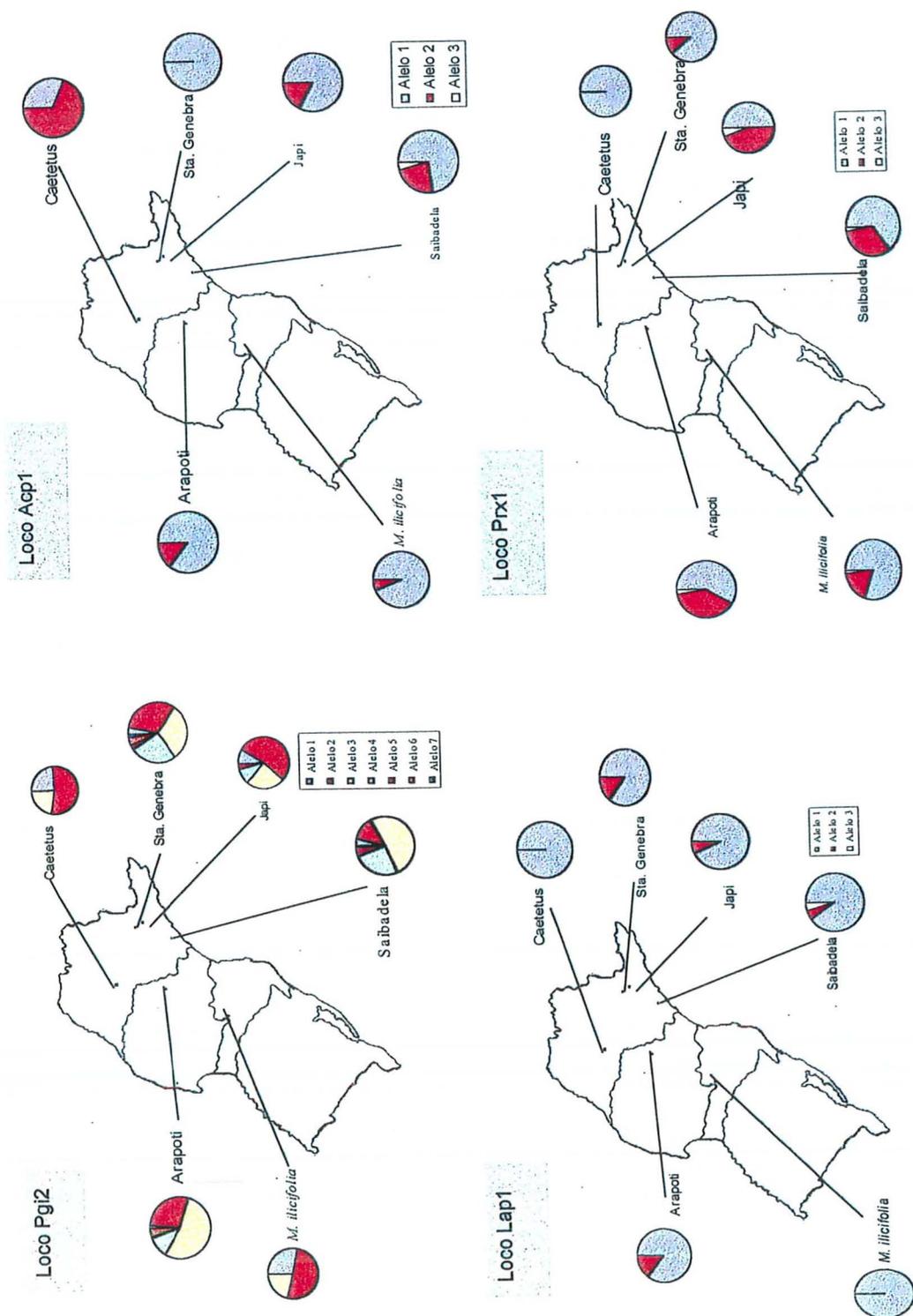


Figura 4. Gráficos representativos da distribuição dos alelos nas populações de *Maytenus*. Locos Pgi2, Acp1, Lap1, Prx1.

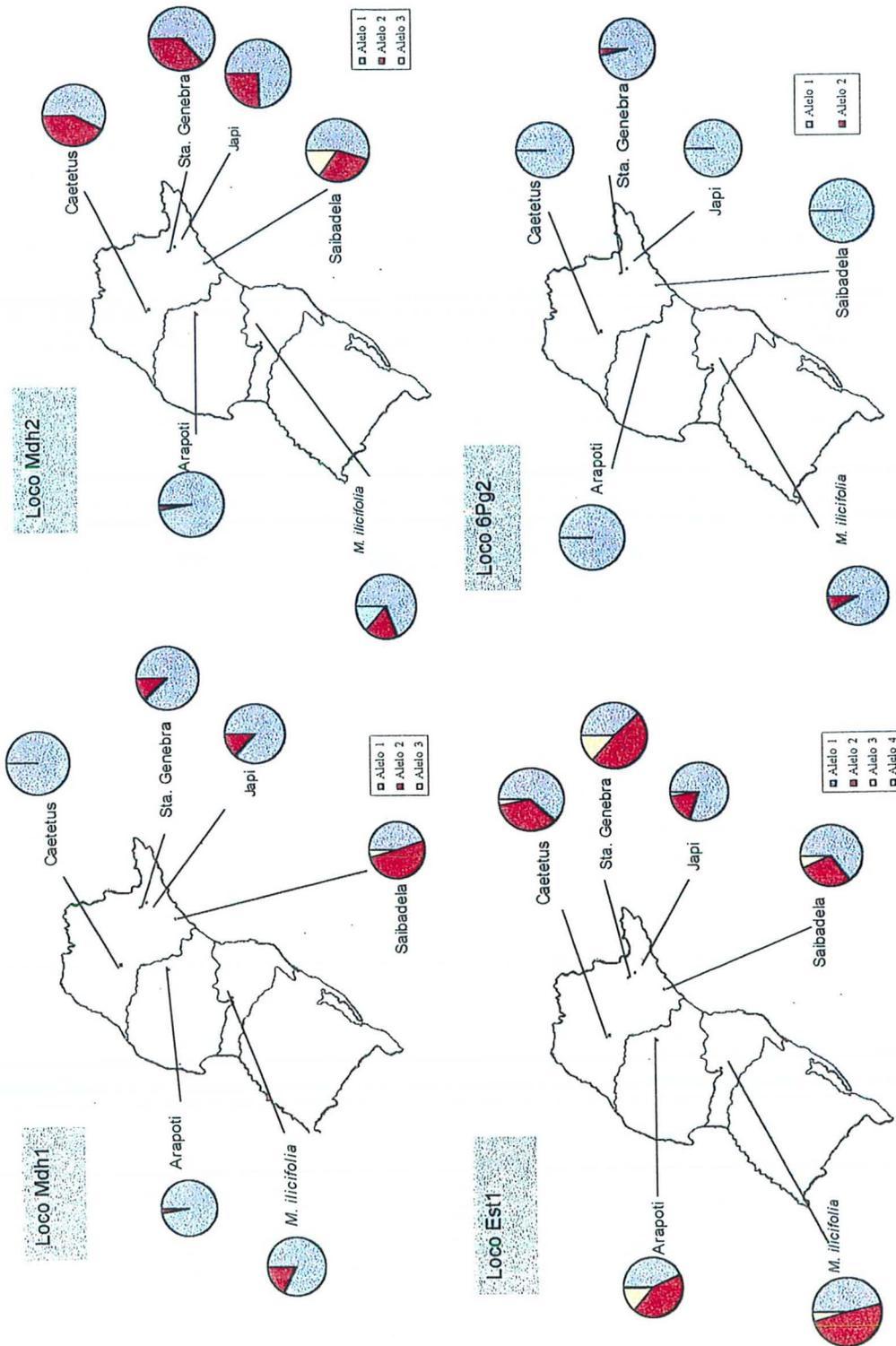


Figura 5. Gráficos representativos da distribuição dos alelos nas populações de *Maytenus*. Locus Mdh1, Mdh2, Est1, 6Pg2.

Na população de jovens do Japi, a tendência de não diferenciação dos adultos foi a mesma. Apesar de ter sido amostrado um indivíduo jovem com um alelo no loco Pgi1, que não aparece em qualquer outra população, os testes de diferenciação não detectaram diferenças significativas entre as duas classes de idade.

Na espécie *Maytenus ilicifolia*, os sete locos polimórficos submetidos aos testes de diferenciação de populações, mostraram que as diferenças entre essa população e as populações de *M. aquifolia* amostradas são significativas em termos de frequências alélicas (Anexo II).

No entanto, em alguns casos, as frequências alélicas em *M. ilicifolia* são próximas às de *M. aquifolia*. No loco Pgi2, o alelo 2 ocorre com frequência similar à encontrada na população de Caetetus de *M. aquifolia*, além de também não diferir significativamente nos locos Lap1 e Est1. Quando comparada com Arapoti, não diferiu nos locos Acpl e Est1.

Tabela 5. Tamanho da amostra, frequências alélicas, e número de alelos em cinco populações de adultos de *M. aquifolia*. Piracicaba-SP, ESALQ/USP. 2000.

Loco	Alelos	Caetetus	Arapoti	Saibadela	S.Genebra	Japi
Pgi-1	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	n	35	55	39	28	37
Pgi2	1	0,243	0,018	0,038	0,043	0,095
	2	0,529	0,282	0,128	0,304	0,527
	3	0,229	0,536	0,526	0,304	0,243
	4	0,000	0,109	0,244	0,261	0,095
	5	0,000	0,009	0,051	0,022	0,041
	6	0,000	0,045	0,013	0,043	0,000
	7	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000
	n	35	55	39	23	37
Acp	1	0,314	0,855	0,731	1,000	0,824
	2	0,686	0,145	0,231	0,000	0,176
	3	0,000	0,000	0,038	0,000	0,000
	n	35	55	39	28	37
Lap	1	1,000	0,855	0,903	0,857	0,931
	2	0,000	0,145	0,056	0,143	0,069
	3	0,000	0,000	0,042	0,000	0,000
	n	35	55	36	28	36
Prx	1	1,000	0,582	0,641	0,885	0,500
	2	0,000	0,391	0,333	0,115	0,446
	3	0,000	0,027	0,026	0,000	0,054
	n	35	55	39	26	37
Mdh-1	1	1,000	0,973	0,449	0,880	0,865
	2	0,000	0,027	0,513	0,120	0,135
	3	0,000	0,000	0,038	0,000	0,000
	n	35	55	39	25	37
Mdh-2	1	0,571	0,973	0,551	0,640	0,743
	2	0,429	0,018	0,295	0,360	0,257
	3	0,000	0,009	0,154	0,000	0,000
	n	35	55	39	25	37
αEst1	1	0,629	0,436	0,649	0,385	0,797
	2	0,343	0,427	0,284	0,481	0,176
	3	0,029	0,127	0,068	0,135	0,027
	4	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000
	n	35	55	37	26	37
6-Pgdh-1	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	n	35	55	39	28	36
6-Pgdh-2	1	1,000	1,000	1,000	0,964	1,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000
	n	35	55	39	28	36
A_r*	22,6**	16	25	27	23	22

* A_r : riqueza alélica total, ** média de número de alelos nas populações de *M. aquifolia*; n número de indivíduos na amostra.

Tabela 6. Frequências alélicas nos indivíduos jovens de *M. aquifolia* de Arapoti e Japi, em *M. aquifolia* como um todo e em *M. ilicifolia*. Piracicaba-SP, ESALQUSP, 2000.

Loco	Alelo	Arapoti jovens	Arapoti todos	Japi Jovens	Japi Todos	<i>M.</i> <i>aquifolia</i>	<i>M.</i> <i>ilicifolia</i>
Pgi1	1	1,000	1,000	0,938	0,981	0,996	1,000
	2	0,000	0,000	0,063	0,019	0,004	0,000
	N	29	84	16	53	239	31
Pgi2	1	0,000	0,012	0,031	0,075	0,068	0,290
	2	0,259	0,274	0,500	0,519	0,346	0,500
	3	0,466	0,512	0,375	0,283	0,400	0,210
	4	0,172	0,131	0,031	0,75	0,130	0,000
	5	0,052	0,024	0,063	0,047	0,030	0,000
	6	0,052	0,048	0,000	0,000	0,024	0,000
	7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000
N	29	84	16	53	234	31	
Acp1	1	0,810	0,839	0,870	0,842	0,766	0,935
	2	0,190	0,161	0,130	0,158	0,228	0,065
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000
N	29	84	23	60	246	31	
Lap1	1	0,914	0,875	0,913	0,924	0,907	1,000
	2	0,086	0,125	0,087	0,076	0,087	0,000
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000
N	29	84	23	59	242	31	
Prx1	1	0,569	0,577	0,413	0,467	0,654	0,806
	2	0,362	0,381	0,522	0,475	0,314	0,177
	3	0,069	0,042	0,065	0,058	0,033	0,016
N	29	84	23	60	244	31	
Mdh1	1	0,983	0,976	0,825	0,851	0,854	0,823
	2	0,017	0,024	0,175	0,149	0,140	0,177
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000
N	29	84	20	57	240	31	
Mdh2	1	0,931	0,958	0,711	0,732	0,749	0,694
	2	0,069	0,036	0,289	0,268	0,224	0,177
	3	0,000	0,006	0,000	0,000	0,027	0,000
	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,129
N	29	84	19	56	239	31	
Est1	1	0,293	0,387	0,870	0,825	0,570	0,468
	2	0,448	0,435	0,109	0,150	0,333	0,484
	3	0,190	0,149	0,022	0,025	0,087	0,048
	4	0,069	0,030	0,000	0,000	0,010	0,000
N	29	84	23	60	242	31	
Pgd1	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	N	29	84	24	60	246	31
Pgd2	1	1,000	1,000	1,000	1,000	0,996	0,919
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,081
N	29	84	24	60	246	31	
A_t*	23**	23	25	23	23	31	22

A_t* : riqueza alélica total, ** média de número de alelos nas populações de jovens de *M. aquifolia*.

Pode-se observar, pela tendência geral apresentada, que grandes diferenças foram detectadas entre todas as populações em quase todos os locos. Diversas características sugerem que as populações divergem significativamente. As diferenças em relação ao alelo mais comum e a presença de alelos raros em umas populações que se tornam frequentes em outras, sugere a ação de forças evolutivas como a deriva genética aleatória, que pode ocorrer aliada ao efeito de fundador, fatores muito importantes na diferenciação de populações.

O alto polimorfismo encontrado no loco Pgi2 em todas as populações estudadas, foi relatado com frequência na literatura para outras espécies (Gandara, 1995; Reis, 1996; Gribel, 1996; Balfourier, 1998). Neste trabalho, de três a sete alelos foram detectados nesse loco, com um ou dois mais frequentes e outros muito raros.

Em relação aos alelos raros, Futuyma (1992) menciona que eles tendem a desaparecer, a menos que a seleção natural os favoreça. Outros autores (Maruyama & Fuerst, 1985; Balfourier et al., 1998) mencionam que, ao contrário, a frequência de alelos raros pode aumentar depois da ocorrência de um efeito de fundador. Além disso, efeitos de gargalos populacionais podem interferir de maneira importante no processo, que pelo efeito de extinção aleatória de genótipos, pode levar ao aumento ou decréscimo de determinadas frequências gênicas.

Segundo Frankel e colaboradores (1996), a maior equidade nas frequências dos alelos numa população, seria um indicador de maior diversidade genética. Populações que apresentam maior diversidade estariam mais protegidas dos efeitos de deriva do que

as que tem alelos muito menos freqüentes do que outros, que estariam mais susceptíveis de serem perdidos.

Alguns eventos como a presença de alelos na população de adultos que não foi amostrada nos jovens ou vice-versa refletem a dificuldade de se estimar adequadamente a frequência de alelos raros. Além disso, esse tipo de resultado pode ocorrer também por outros fatores, tais como eventos aleatórios de amostragem dos gametas na formação da próxima geração. O alelo amostrado nos jovens (na população do Japi), e que não aparece nos adultos, pode também ter aparecido por fluxo gênico de indivíduos adultos não amostrados.

Alguns indivíduos adultos podem estar se reproduzindo mais que outros, por carregarem genomas mais adaptados, mas também por efeito aleatório. Assim, esses indivíduos deixariam mais descendentes nas próximas gerações. Se esse alelo for neutro, é razoável afirmar que, apesar de estar sendo amostrado numa frequência maior nessa classe de idade, esse evento isolado poderá não contribuir para o aumento da frequência desse alelo nos próximos eventos reprodutivos, uma vez que estará exposto novamente a eventos de amostragem aleatória nas próximas gerações.

Se, por outro lado, este loco estiver sob seleção e, a direção do aumento da frequência desse alelo conferir maior adaptabilidade ao genótipo que o carrega, esse alelo poderá ter sua frequência aumentada nas próximas gerações.

Em populações naturais, diversos fatores estão envolvidos com o sistema reprodutivo. Eventos aleatórios ligados a fatores ecológicos podem favorecer temporariamente certos indivíduos que irão florescer mais abundantemente, produzir mais

propágulos e, portanto, aumentar por acaso a quantidade de seus alelos nas gerações seguintes. Fatores como maior exposição à luz, maior acesso permitido aos polinizadores, maior disponibilidade de nutrientes e água, podem levar certos indivíduos a deixar mais descendentes que outros na população. Em *Maytenus*, assim como em algumas outras espécies climáticas adaptadas ao sub-bosque da floresta, é conhecida a dificuldade de se encontrar indivíduos com sementes e, quando encontrados, a produção é em pequena quantidade. Em árvores mais expostas à luz, frequentemente a produção de sementes é mais intensa.

M. ilicifolia aparenta diferir das populações de *M. aquifolia* em termos de frequências gênicas. No entanto, considerando-se a diferenciação que parece estar ocorrendo 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 costumam usar o que eles chamam de grupo externo, 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 maior que as diferenças apresentadas entre espécies próximas. Crawford, 1990 (citado por 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, citado por Moraes, 1997).

De qualquer forma, uma conclusão importante e geral é que as populações de *M. aquifolia* amostradas divergem substancialmente em suas frequências alélicas e que, apesar de diferir em frequências, *Maytenus ilicifolia* compartilha com *M. aquifolia* grande parte dos alelos, sugerindo que as espécies possam ser filogeneticamente muito próximas.

Índices de Diversidade

A porcentagem de locos polimórficos das espécies foi bastante alta, aproximadamente 60%, mas variou entre as populações (Tabela 7). A população de Caetetus apresenta o mais baixo nível de polimorfismo, seguida de Arapoti, Sta. Genebra e finalmente Japi e Saibadela, as mais polimórficas.

Observa-se também alta riqueza alélica, isto é, alto número de alelos por loco nas populações. A heterozigosidade média observada foi baixa em comparação ao nível de heterozigosidade média esperada, um reflexo do alto índice de fixação médio encontrado. A heterozigosidade esperada, ou utilizando o termo mais apropriado proposto por Nei, (1973), a diversidade gênica, é bastante alta para esta espécie de polinização e dispersão zoocórica e climácica na sucessão ecológica. Esses resultados estão relacionados ao alto número de alelos encontrado nas populações e além disso, são

um reflexo da equidade gênica, uma vez que a diversidade aumenta à medida que as frequências gênicas são mais uniformes.

Nos índices de diversidade, a exemplo das frequências alélicas, as populações também apresentam diferenças consideráveis. Assim, Caetetus mostrou ser a população com menor riqueza alélica média, $A = 1,60$ e as outras populações apresentaram índices intermediários, todos acima de 2,2 alelos por loco, considerando todos os locos. Nesse índice, Saibadela novamente se destaca, juntamente com Arapoti e Santa Genebra, 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.

Frankel et al. (1996), baseados em Hamrick & Godt (1989), apresentam dados onde as médias de riqueza alélica e outros índices de diversidade são apresentados para grupos de espécies. Os maiores índices de riqueza alélica ficam para as espécies de polinização cruzada, polinizadas pelo vento, de ampla distribuição geográfica e com modo de dispersão de sementes exozoocórico ($A = 2,40, 2,29$ e $2,96$, respectivamente). *M. aquifolia*, por suas flores pequenas e inconspícuas, tem polinização provável por insetos pequenos e inespecíficos e a contribuição pelo vento deve ser nula nessa espécie que vive no sub-dossel das florestas tropicais. A dispersão de sementes é zoocórica, muito provavelmente por pássaros, e podemos considerá-la de relativamente ampla distribuição geográfica, se considerarmos as dimensões da sua região de ocorrência.

Tabela 7. Índices de Diversidade encontrados em locos isoenzimáticos em populações naturais *Maytenus aquifolia* formada por indivíduos adultos (cinco populações) e uma população de *M. ilicifolia*.

	N*	P	A A _p	H _e H _{ep}	H _o H _{op}	F
Caetetus	35,00	40	1,60 2,50	0,204 0,255	0,106 0,132	0,487 (0,108 a 0,886)
Arapoti	55,00	50	2,50 3,40	0,236 0,295	0,124 0,154	0,479 (0,365 a 0,573)
Saibadela	38,5	70	2,70 3,42	0,336 0,481	0,217 0,271	0,358 (0,274 a 0,462)
Genebra	26,50	60	2,30 3,00	0,258 0,369	0,183 0,228	0,296 (0,027 a 0,609)
Japi	36,70	70	2,20 2,71	0,259 0,370	0,176 0,219	0,325 (0,201 a 0,481)
Médias	38,34	58	2,575 3,008	0,259 0,323	0,161 0,201	0,3820
<i>M. ilicifolia</i>	31,00	70	2,100	0,255	0,113	0,562 (0,321 a 0,778)

*N Tamanho médio da amostra por loco; A número médio de alelos/loco; P: percentagem de locos polimórficos pelo critério de 95% de frequência máxima do alelo mais comum; H_o e H_e heterozigosidades médias observadas e esperadas; F Índice de fixação por população. O Intervalo de Confiança está entre parênteses.

Em geral, as diversidades gênicas nas populações foram sempre muito mais altas que as heterozigosidades, um reflexo do alto índice de fixação.

Na única população de *Maytenus ilicifolia* a diversidade gênica foi mais que o dobro da heterozigosidade observada, ficando um pouco abaixo da média de heterozigosidade observada nas populações de *M. aquifolia*, mas acima da população de Caetetus. Nas populações de *M. aquifolia*, ocorre a mesma tendência, as diversidades

gênicas (H_e) nas populações estão sempre muito acima (41% a 93%) das heterozigosidades observadas.

Os índices bastante expressivos de riqueza alélica e diversidade gênica encontrados, mostram que a variabilidade genética nas populações de *M. aquifolia* é em geral, de alta magnitude. No entanto, uma característica verificada nas populações amostradas é o alto índice de alelos exclusivos encontrados (Tabela 7), ocorrendo a baixas frequências, indicando uma maior vulnerabilidade genética à deriva.

Frankel et al. (1996) lembram do conceito de equidade, no qual a menor variabilidade nas frequências alélicas numa espécie é um indicador de maior diversidade e, além disso, pode de certa forma manter as populações menos susceptíveis a fixação e perda de alelos quando submetidas a perturbações e gargalos.

Nas populações de *M. aquifolia* amostradas, ocorrem vários casos de alelos privados (Tabela 8). Na população de jovens de Arapoti, foi detectado um alelo na Pgi1 que não foi detectado nem no grupo dos adultos dessa população e nem em outras populações. Na população de Arapoti, ocorre um quarto alelo para a Est que não ocorreu em nenhuma outra população. Na população de Santa Genebra, ocorre um sétimo alelo para a Pgi2 e um segundo alelo para a 6Pgdh2, que não ocorrem em outras populações. Mas é na população de Saibadela que ocorre o maior número de alelos exclusivos. Ocorrem três alelos, um no Acpl1, outro no Lap1 e um terceiro no Mdh1, que não ocorreram nas outras populações. Todos esses alelos podem ser considerados raros, uma vez que ocorrem a frequências sempre menores que 0,05%. Considerando-se que a amostra média das populações incluindo os jovens ter sido de 48 indivíduos, esses alelos

ocorrem em menos que dois indivíduos nas populações amostradas. No caso do alelo exclusivo da Pgi1 no Japi e da Pgi2 em Santa Genebra, ocorreram em apenas um indivíduo cada. Nesses casos, seria recomendável no futuro a realização de amostragens mais amplas para que seja possível obter estimativas mais precisas das frequências desses alelos nas populações.

Tabela 8. Ocorrência de alelos privados para nas populações de *Maytenus aquifolia* e *M. ilicifolia*, incluindo jovens e adultos. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 2000.

Loco	Alelo	Frequência do alelo	População em que ocorre
Pgi1	2	0,0189	Japi (jovens)
Pgi2	7	0,0217	Santa Genebra
Acpl	3	0,0385	Saibadela
Lapl	3	0,0417	Saibadela
Mdh1	3	0,0385	Saibadela
Est1	4	0,0297	Arapoti
6Pg2	2	0,0357	Santa Genebra
Mdh2	4	0,1290	<i>M. ilicifolia</i>

Os índices de fixação encontrados foram significativos e bastante altos, variando de 0,29 na população de Santa Genebra a 0,48 na de Caetetus. Os testes para excesso de homozigotos foram significativos (anexo IV) Estas populações estão sofrendo endogamia, pelos possíveis mecanismos de cruzamento entre aparentados como consequência do pequeno número de indivíduos nos demes, ou também como consequência de seu sistema reprodutivo que pode incluir alguma taxa de autofecundação. Seria muito útil, em trabalhos futuros, a coleta de sementes para estudos de progênes, para investigar com profundidade o seu sistema reprodutivo.

4.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Em 62% dos casos (34 locos) a hipótese de aderência às proporções de Hardy-Weinberg foram rejeitadas com 5% de probabilidade. Nas populações de adultos, foram 60% e nas dos jovens, 67% dos locos considerados em desequilíbrio. Em *M. ilicifolia*, estavam 71% dos locos em desequilíbrio.

Os locos que mais frequentemente desviaram do equilíbrio foram os da a Prx1 com seis casos em sete (86%); Pgi2 e Est1 e Mdh2, com seis casos no total de oito cada um (75%) e Lap1 com cinco casos em sete (71%). Os locos que mais frequentemente mostraram-se em equilíbrio foram o Mdh1 com cinco casos em sete (71%) e o Acp1 com quatro casos num total de seis (67%).

Em termos das populações de *M. aquifolia*, as do Japi e de Santa Genebra foram as que mais tiveram locos aderindo às proporções esperadas. As populações de jovens do Japi e Arapoti e as de adultos de Caetetus, Arapoti e Saibadela, tiveram a maioria dos seus locos com desvios significativos.

De maneira geral, os testes realizados produziram resultados concordantes no sentido de que, apesar de as probabilidades obtidas diferirem bastante em magnitude, na maioria dos casos (46 locos no total de 54), qualquer teste utilizado levaria ao mesmo resultado de rejeição (27 locos) ou aceitação (19 locos) da hipótese nula se fosse adotado o nível de 5% de probabilidade. Usando a probabilidade a 1%, o número de casos em que os testes deram resultados discordantes sobe de oito para nove locos, sendo que em

alguns desses locos o motivo da divergência difere. Algumas dessas divergências serão discutidas.

Pelos dados analisados deste trabalho, é possível afirmar que nenhum dos dois testes de randomização teria levado a uma falsa aceitação da hipótese nula a 5% de probabilidade, isto é, em todos os casos em que houve discrepâncias, por estes testes a hipótese seria sempre rejeitada.

Nas populações de adultos de *M. aquifolia*, num total de 32 locos analisados, 12 tiveram seus desvios considerados nulos e 14 mostraram resultados significativos por todos os testes simultaneamente, totalizando 26 locos com resultados concordantes.

Dos seis locos discordantes (quatro da Pgi2, um do Mdh1 e um do Mdh2), em dois deles (Pgi2 em Arapoti e Saibadela), os testes G e Exato concordaram com os testes de randomização, levando à correta rejeição da aderência, mas nos outros quatro restantes, apenas os testes de randomização levariam a um resultado correto. Nesses quatro casos, todos os outros três testes (Qui-Quadrado, G e Exato) levariam a uma falsa aceitação da hipótese de aderência. Todos esses casos de falsa aceitação estavam associados a locos com pelo menos uma classe genotípica com número de indivíduos esperado menor que um.

Nos locos Pgi2, frequentemente várias classes genotípicas tinham número de indivíduos esperado menor que um. Em alguns desses casos, o procedimento de agrupamento de alelos para a realização do teste χ^2 levaria aos mesmos resultados que os testes G e Exato (dados não mostrados).

Em alguns casos como nos locos Acpl de Caetetus e Japi e Lap1 de Saibadela por exemplo, as diferenças de magnitude das probabilidades encontradas pelos testes foi pequena, na maioria dos casos girando em torno de um determinado valor. Em certos casos como o do Mdh2 de Saibadela, mas principalmente dos locos Pgi2 de Caetetus e Japi, as diferenças das probabilidades eram muito grandes, especialmente as probabilidades associadas ao teste Qui-Quadrado, fenômeno já mencionado.

Esses resultados confirmam a consistência dos testes de randomização, que por esse motivo tem sido recomendados em todos os casos (Guo & Thompson, 1992; Coelho & Vencovsky, 1999), especialmente agora que os programas disponíveis são simples e consideravelmente rápidos para a realização desses testes.

Tabela 9. Testes de aderência às proporções de H-W por cinco métodos para os oito locos polimórficos que ocorrem nas cinco populações de adultos de *M. aquifolia* (erros padrões entre parênteses).

Teste	Pgi2		Acp1		Lapl		Prx1		Mdh1		Mdh2		Est1		6Pg2		
	Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p	
Caetetus	x2	4,923	0,178	2,855	0,091	---	---	---	---	---	---	31,992	0,000	25,089	0,000	---	---
	G	3,6226	0,057	3,8524	0,0497	---	---	---	---	---	---	47,804	0,000	21,613	0,000	---	---
	Exato		0,0952		0,0528	---	---	---	---	---	---	---	0,000	0,000	0,000	---	---
	Monte Carlo		(0,0255)		(0,0498)	---	---	---	---	---	---	---	0,000	0,000	0,000	---	---
	Markov		(0,0037)		(0,0073)	---	---	---	---	---	---	---	(0,0000)	(0,0000)	(0,0000)	---	---
Arapoti	x2	12,926	0,608	13,606	0,000	6,784	0,009	23,524	0,000	0,000	1,000	13,846	0,003	22,517	0,001	---	---
	G	11,61	0,0007	12,723	0,0004	7,171	0,0074	29,4	0,000	0,0841	0,7718	6,1866	0,0129	17,899	0,000	---	---
	Exato		0,001		0,0005	---	---	---	---	---	---	---	0,000	0,000	0,000	---	---
	Monte Carlo		(0,0037)		(0,0001)	---	---	---	---	---	---	---	0,000	0,000	0,000	---	---
	Markov		(0,0016)		(0,0003)	---	---	---	---	---	---	---	(0,0028)	(0,0000)	(0,0000)	---	---
Saibadela	x2	15,216	0,436	2,124	0,547	11,593	0,009	11,801	0,008	5,811	0,121	4,396	0,222	20,890	0,000	---	---
	G	7,6026	0,0058	2,9426	0,0863	6,0261	0,0141	4,245	0,0394	5,9064	0,0151	1,9436	0,1633	15,842	0,0001	---	---
	Exato		0,009		0,099	---	---	---	---	---	---	---	0,0232	0,1966	0,0001	---	---
	Monte Carlo		(0,0034)		(0,1489)	---	---	---	---	---	---	---	0,0171	0,0643	0,000	---	---
	Markov		(0,0016)		(0,0103)	---	---	---	---	---	---	---	(0,0049)	(0,0055)	(0,0000)	---	---
Genebra	x2	0,478	1,000	---	---	21,319	0,000	0,007	0,933	0,171	0,680	0,000	1,000	19,775	0,000	0,000	1,000
	G	0,0166	0,8974	---	---	22,967	0,000	0,7848	0,3757	1,1232	0,2892	0,0436	0,8345	10,558	0,0012	0,0741	0,7855
	Exato		1,009		---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,2867	1,000	0,0018	1,0000
	Monte Carlo		(0,9558)		(0,0060)	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,2919	1,0000	0,0000	1,0000
	Markov		(0,9508)		(0,0143)	---	---	---	---	---	---	---	1,000	(0,0130)	(0,0000)	(0,0000)	(0,0000)
Japi	x2	8,456	0,584	0,255	0,613	12,326	0,000	12,766	0,005	0,003	0,960	3,461	0,063	0,557	0,906	---	---
	G	3,2708	0,0705	0,8454	0,3579	10,459	0,0012	15,4	0,0001	0,1891	0,6636	4,4989	0,0339	2,0116	0,1561	---	---
	Exato		0,097		0,286	---	---	---	---	---	---	---	0,5035	0,0331	0,1358	---	---
	Monte Carlo		(0,0350)		(0,2860)	---	---	---	---	---	---	---	0,5029	0,0352	0,1537	---	---
	Markov		(0,0062)		(0,0141)	---	---	---	---	---	---	---	(0,0003)	(0,0132)	(0,0077)	---	---

Tabela 10. Testes de aderência às proporções de H-W por vários métodos para os oito locos polimórficos que ocorrem nas duas populações de jovens de *M. aquifolia* e para a população de *M. iticifolia* (erros padrões estão entre parênteses).

	Pgi1		Pgi2		Acpi		Lapi		Prxi		Mdh1		Mdh2		Est1	
	Valor	p *	Valor	p												
Arapoti	x2	---	29,8322	0,0009	5,5907	0,0181	3,4197	0,0644	18,092	0,0004	0,0089	0,9247	29,000	0,000	14,593	0,0237
jovens	G	---	8,054	0,0045	4,6652	0,0308	2,1395	0,1435	7,7723	0,0053	0,0175	0,8946	14,555	0,0001	0,7768	0,3781
	Exato	---		0,0077		0,0357		0,1707		0,0075		1,0000		0,0010		0,4545
	Monte Carlo	---		0,0008		0,0351		0,1726		0,0000		1,0000		0,0011		0,0271
				(0,0005)		(0,0043)		(0,0061)		(0,0000)		(0,0000)		(0,0005)		(0,0027)
	Markov	---		0,0008		0,0364		0,1742		0,0003		1,0000		0,0009		0,0262
				(0,0005)		(0,0017)		(0,0024)		(0,0002)		(0,0000)		(0,0003)		(0,0029)
Japi	x2	16,000	0,0001	0,1956	1,2522	0,2631	23,000	0,000	21,052	0,0001	0,3602	0,548	7,213	0,0072	2,530	0,4699
jovens	G	7,4813	0,0062	10,124	0,0015	0,9894	13,590	0,0002	10,597	0,0011					0,989	0,3199
	Exato		0,0323		0,0029		0,3103		0,0016		0,0024		0,4678		0,0120	0,3103
	Monte Carlo		0,0317		0,0027		0,3085		0,0018		0,0001		0,4670		0,0117	0,3091
			(0,0021)		(0,0006)		(0,0049)		(0,0005)		(0,0002)		(0,0083)		(0,0021)	(0,0061)
	Markov		0,0329		0,0049		0,3073		0,0013		0,0001		0,4678		0,0122	0,3062
			(0,0011)		(0,0019)		(0,0035)		(0,0002)		(0,0000)		(0,0020)		(0,0009)	(0,0093)
M.	x2	22,1185	0,0001	0,1474	0,7010	---	6,2877	0,0984	6,2056	0,0127	55,3258	0,0000	19,4668	0,0002	18,9794	0,0000
iticifolia	G	5,6238	0,0177	0,2761	0,5993	---	3,7983	0,0513	5,0449	0,0247	29,5393	0,0000	7,5507	0,0060	9,8450	0,0017
	Exato		0,0288		1,0000	---	---	0,0544		0,0293		0,0000		0,0103		0,0042
	Monte Carlo		0,0001		1,0000	---	---	0,0511		0,0269		0,0000		0,0011		0,0045
			(0,0003)		(0,0000)		(0,0082)		(0,0053)		(0,0000)		(0,0013)		(0,0018)	
	Markov		0,0000		1,0000	---	---	0,0630		0,0321		0,0000		0,0019		0,0050
			(0,0000)		(0,0000)		(0,0119)		(0,0023)		(0,0013)		(0,0013)		(0,0017)	

Equilíbrio de Endogamia de Wright (EEW)

Parte dos locos aderiram às proporções do Equilíbrio de Endogamia de Wright, sugerindo que há possibilidade de essas populações estarem se reproduzindo com uma taxa constante de endogamia.

Tabela 11. Aderência ao Equilíbrio com Endogamia de Wright em locos isoenzimáticos em cinco populações e duas subpopulações de *M. aquifolia* e uma população de *M. ilicifolia*.

Pop	Loco	ξ^2		GI
<i>M. aquifolia</i> adultos				
Caetetus	Pgi2	7,45	2	*
	Est1	0,68	2	ns
Arapoti	Pgi2	24,33	5	*
	Prx1	16,44	2	***
	Mdh2	2,59	2	ns
	Est1	6,43	5	ns
Saibadela	Pgi2	33,36	5	**
	Lap1	29,28	2	***
	Prx1	2,47	2	ns
	Est1	10,76	2	**
Genebra	Est1	1,39	2	ns
Japi	Pgi2	15,86	5	ns
	Prx1	2,93	2	ns
Adultos mais jovens				
Arapoti	Pgi2	27,15	5	*
	Mdh2	6,98	2	*
	Est1	8,53	5	ns
Japi	Pgi2	29,20	4	**
Jovens				
Arapoti	Pgi2	10,58	5	ns
	Prx1	12,39	2	**
	Est1	6,74	5	ns
Japi	Pgi2	16,85	9	ns
	Prx1	1,09	2	ns
<i>M. ilicifolia</i>				
	Pgi2	2,89	2	Ns
	Mdh2	1,03	2	Ns

No entanto, chama a atenção a alta heterogeneidade presente nos locos aqui analisados. Alguns deles estão em EHW, o que pressupõe coeficiente de endogamia nulo. Um segundo grupo de locos, os que foram considerados em EEW, estão aparentemente realizando um coeficiente de endogamia significativamente positivo e constante. Ainda, uma terceira porção de locos, mostra não estar em equilíbrio, o que sugere que alguns pressupostos dos modelos utilizados não se aplica a esse terceiro grupo de locos. Esses desequilíbrios e heterogeneidades afetam de maneira importante as estimativas dos parâmetros de genética de populações, podendo conduzir a resultados viesados.

Essa significativa heterogeneidade do coeficiente de endogamia entre os locos tem sido encontrada em diversos outros trabalhos (Gandara, 1995; Reis, 1996; Maltez, 1997; Moraes, 1997; Sebben, 1997; Del Giudice, 1999 e outros), mas as causas desses desvios não puderam ainda ser investigadas. Em alguns casos, o estudo de áreas que sofreram perturbação recente, que experimentaram gargalos populacionais pode ter influenciado os resultados encontrados.

De maneira geral, considera-se que o sistema reprodutivo é uma característica intrínseca da espécie, sujeita a fatores ambientais, que podem estar sujeitos a modificações sazonais na taxa de fecundação cruzada. No entanto, supõe-se que tanto o sistema reprodutivo, como os fatores ecológicos que os afetam, interfiram igualmente em todos os locos seletivamente neutros.

Os modelos de EHW e EEW são baseados em certas premissas; violações dessas premissas causam alterações na frequências dos alelos, dos genótipos ou de ambos

(Futuyma, 1992), fazendo com que ocorram desvios da condição de equilíbrio. Os pressupostos para os modelos de EHW e EEW incluem populações idealmente grandes, panmixia e endogamia constantes de uma geração para a outra, ausência de seleção e ausência de variação nova (mutação ou migração).

Na literatura sobre o uso de marcadores isoenzimáticos em estudos de genética de populações, é clássico o debate sobre a neutralidade do polimorfismo encontrado nesses marcadores. São frequentes os trabalhos imputando à seleção essa heterogeneidade observada em locos isoenzimáticos (Torggler et al., 1995).

Algumas medidas poderiam ser sugeridas no sentido de investigar as causas do comportamento heterogêneo de locos em estudos de genética de populações. Uma sugestão seria amostrar progênies em pelo menos dois ou três anos consecutivos, verificando assim em que medida os fatores ecológicos, bióticos e abióticos podem estar interferindo no sistema reprodutivo da espécie, de modo a provocar os desequilíbrios observados. Medidas de vários anos podem dar uma estimativa da amplitude da variação que o coeficiente de endogamia pode experimentar.

Outra sugestão seria aumentar drasticamente o número de locos analisados, de modo a diminuir a variância entre os locos. Aqueles que não estivessem em equilíbrio, ou de HW ou de Wright (para o caso das espécies que praticam uma certa quantidade constante de endogamia), poderiam ser descartados das análises.

Nesse trabalho, os resultados dos testes para os desvios do EHW já mostravam que na grande maioria dos locos, os desvios se davam por excesso de homozigotos, o que já indicava a presença de um coeficiente de fixação significativamente positivo na maioria

dos locos. Esses resultados mostram indícios de que a espécie possa estar exercendo algum grau significativo de endogamia em seu sistema reprodutivo. Os resultados dos testes para deficiência ou excesso de heterozigotos para as cinco populações de adultos de *M. aquifolia* confirmam essa tendência observada (Anexo III).

4.4. Estrutura Genética

As estimativas dos coeficientes de endogamia nas populações foram bastante altas. A endogamia total média foi da ordem de $F = 0,48$ e foi mais ou menos consistente para a maioria dos locos. O loco 6Pg2 foi o único que apresentou um desvio grande da tendência geral; os outros locos mantiveram-se entre os valores de 0,27 a 0,60. O valor encontrado para esses coeficientes, de alta magnitude, reflete os altos valores encontrados para os coeficientes de endogamia f e θ_p .

As altas estimativas obtidas para o coeficiente de endogamia f , com média de $f=0,39$, também foram significativas. Esses resultados sugerem que todas as populações podem estar realizando acasalamento entre aparentados, o que pode incluir um certo nível de autofecundação. As estimativas dos valores dos f por loco são sempre positivas, e o intervalo de confiança dá uma faixa de 95% de confiança de ocorrência do coeficiente f para entre 0,27 e 0,51, que são índices bastante altos.

As estimativas de endogamia devido à subdivisão θ_p sugerem que essas populações tem divergências de alta magnitude ($\theta_p = 0,147$), e altamente significativos (intervalo de confiança de 0,09 a 0,22).

Tabela 12. Estimativas dos coeficientes de endogamia e coancestralidade nas cinco populações naturais de *Maytenus aquifolia*, a partir de oito locus isoenzimáticos nos indivíduos adultos. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 2000.

Loco	<i>f</i>	<i>F</i>	<i>Theta-P</i>
PGI1	***	***	***
PGI2	0.2051	0.2772	0.0907
ACP1	0.3450	0.5310	0.2839
LAP1	0.5670	0.5777	0.0247
PRX1	0.4834	0.5633	0.1546
MDH1	0.2692	0.5032	0.3202
MDH2	0.4274	0.5130	0.1495
EST1	0.5754	0.6008	0.0596
6PG2	-0,0239	0.0027	0.0260
Média	0.3954	0.4843	0.1470
Limites do I.C. a 95 % *			
Superior	0.5119	0.5692	0.2214
Inferior	0.2739	0.3725	0.0910

* Intervalos de Confiança obtidos por reamostragem do tipo bootstrap com 5.000 repetições.

M. aquifolia é espécie habitante do sub-bosque da Floresta Atlântica, habitat relativamente fechado e protegido do vento, o que pode dificultar a chegada de pólen de indivíduos mais distantes. Suas flores pequenas e inconspícuas, visitadas por pequenos insetos, que são frequentemente ineficientes dispersores de pólen, também são fatores que não favorecem exogamia. Esses fatores podem estar levando a essa alta taxa de endogamia e aos efeitos de subdivisão encontrados neste trabalho.

As espécies que por algum processo praticam cruzamento entre aparentados ou autofecundação, desenvolvem diferenciação entre populações com mais intensidade que

espécies panmíticas. Estas últimas tem capacidade muito maior de amostrar seus gametas adequadamente nos diferentes eventos reprodutivos, diminuindo o efeito da deriva e levando à maior homogeneização das populações. Em outras palavras, a maior taxa de fluxo gênico realizada por espécies exogâmicas tem maiores chances de contrabalançar os efeitos de deriva que as espécies com fluxo gênico limitado (Shapcott, 1995).

Em *Maytenus* sp. parece haver alta diversidade alélica nas populações, mas com pouca heterozigosidade, devido possivelmente a essa estruturação produzida pela provável baixa capacidade de dispersão dos gametas, levando a fixação de alelos e diferenciação.

Nos agrupamentos produzidos para investigar outros níveis de subdivisão nas populações amostradas, não foram encontrados efeitos significativos. Na comparação entre as populações mais próximas, Japi e Genebra, que distam menos de 40 km uma da outra, com as outras três populações que distam aproximadamente 400 km das duas primeiras e também entre si, não foram detectados efeitos devido às distâncias geográficas que as separam (Tabela 13).

Tabela 13. Estimativas dos coeficientes de endogamia f , F e de coancestralidade θ para grupos de populações.

	f	F	θ_P	θ_G
Comparações entre grupos				
Próximas vs distantes*	0.4118	0.4848	0.1240	-0.0567
Lim. I.C. 95%**	0.5070 0.3139	0.5607 0.3934	0.1804 0.0851	-0.0216 -0.1139
Ara,Saiba vs Caet,Japi,Gen	0.4118	0.4921	0.1364	-0.0249
Lim. I.C. 95%	0.5067 0.3149	0.5653 0.4087	0.1842 0.1011	0.0341 -0.1070
Saiba,Gen vs Caet,Ara,Japi	0.4118	0.4951	0.1415	-0.0054
Lim. I.C. 95%	0.5067 0.3149	0.5660 0.4078	0.2296 0.0866	0.0768 -0.0639
Ara,Japi vs Caet,Saiba,Gen	0.4118	0.4975	0.1457	0.0059
Lim. I.C. 95%	0.5067 0.3149	0.5792 0.4004	0.2141 0.0877	0.0758 -0.0513
Comparações entre grupos formados pela reunião de populações				
	f	F	θ	
Saibadela versus as demais	0,4495 (0,3325-0,5524)	0,5025 (0,3988-0,5976)	0,0963 (-0,0013-0,2514)	
Caetetus versus as demais	0,4362 (0,3245-0,5419)	0,5301 (0,4155-0,6245)	0,1666 (0,0530-0,3069)	
Próximas vs distantes*	0,4626 (0,3542-0,5560)	0,4747 (0,3715-0,5599)	0,0226 (-0,0021-0,0566)	
Ara,Japi vs Saiba, Genebra,Caetetus	0,4497 (0,3481-0,5458)	0,4851 (0,3753-0,5705)	0,0644 (0,0145-0,1224)	

*Santa Genebra e Japi versus Caetetus, Saibadela e Arapoti; Ara=Arapoti, Saiba=Saibadela, Caet=Caetetus, Gen=Santa Genebra**Limites dos Intervalos de Confiança a 95% de probabilidade obtidos através de reamostragem tipo bootstrap com 5.000 repetições.

Observamos (Tabela 13) que aparentemente não há efeitos de subdivisão entre os diferentes grupos comparados. Em todos os casos, os intervalos de confiança passam pelo zero, mostrando que os valores, ainda que positivos em algumas comparações, são

na realidade não significativos. Esse resultados mostram que as correlações intraclasse são maiores que as entre classes, com os indivíduos dentro da subdivisão hierárquica mais diferentes entre si do que entre as subdivisões (Weir, 1996).

Esse fato sugere que haveria um fluxo gênico maior entre subdivisões do que dentro das subdivisões, isto é, a situação simula um fluxo gênico maior entre populações distantes 400 km uma da outra do que entre as que distam apenas 40 km entre si. Esse resultado não pode ser interpretado biologicamente dessa forma, uma vez que é difícil imaginar qual mecanismo evolutivo, além de seleção, poderia fazer com que populações mais distantes fiquem mais parecidas do que populações mais próximas.

No modelo de isolamento por distância, em que as populações teoricamente divergem apenas por deriva, os efeitos de subdivisão provocados pela deriva seriam maiores quanto mais distantes fossem as populações, uma vez que supõe-se que o fluxo gênico tenha sido impedido há mais tempo entre as populações distantes que entre as populações mais próximas.

Há que se considerar no entanto, que pela limitada capacidade de dispersão de pólen e sementes, e do habitat da espécie não facilitarem fluxo gênico, a escala espacial da amostragem utilizada já possa ser suficiente para estabelecer divergência entre as populações comparáveis às das populações mais distantes. É possível que amostragem em populações adjacentes ou contínuas mostre a delimitação dos demes evidenciando divergências graduais entre demes próximos intercruzantes, numa escala espacial menor. A amostragem de subpopulações da espécie separadas por distâncias menores poderia revelar padrões de divergência progressivos.

Diversos estudos têm revelado estruturação genética em populações de plantas quando analisados em pequenas distâncias (Gandara, 1998 e diversos trabalhos citados em Shapcott, 1995), mas em outros casos, aparentemente o fluxo gênico tem se mostrado superior ao esperado pela biologia da planta e seu ambiente, levando a uma estrutura genética aleatória.

Saibadela é a única população da amostra localizada em Floresta Ombrófila Densa; Arapoti está em uma formação florestal que traz influências desse mesmo tipo de floresta, pela sua localização próxima a uma região que traz para o interior do planalto as suas características fisionômicas (Gandara, com. pessoal). No entanto, a análise realizada com o agrupamento dessas duas populações com as outras não identificou nenhum efeito significativo que possa ser imputado às diferenças de formação florestal a que pertencem os dois grupos comparados.

É no entanto de se esperar esse resultado, uma vez que se o modelo inclui divergência entre as populações provocado apenas por deriva, não haveria motivo para acreditar que marcadores isoenzimáticos supostamente neutros pudessem mostrar diferenças entre populações localizadas em ambientes diversos. As diferenças encontradas teriam que ser explicadas principalmente por seleção diferencial, dentre outros fatores, o que não parece ser o caso.

No segundo setor da mesma tabela, são mostradas algumas simulações em que foram reunidos indivíduos pertencentes a diferentes populações para a realização das estimativas. Com o procedimento, foi possível comparar uma população isolada com grupos de outras. Reunindo populações que tem frequência alélicas divergentes como já

demonstrado anteriormente, não foi possível detectar efeitos de subdivisão em níveis acima do de populações.

4.5. Fluxo Gênico

A despeito de terem ocorrido alguns resultados conflitantes, as tendências observadas são similares na maioria das situações para os dois métodos de estimação (Figura 7).

As estimativas de Nm obtidas revelam no entanto, que há diferenças numéricas entre as estimativas geradas pelos dois métodos (Tabela 14). Algumas incongruências entre os resultados dos métodos ocorrem, como no caso das comparações 2x3, 2x5, 4x6 e entre todas as populações de *M. aquifolia*. Além disso, as estimativas geradas com o método do coeficiente de coancestralidade são quase sempre superiores às estimativas geradas pelo método dos alelos privados.

Pode-se considerar no entanto que, em grande parte dos casos, ocorrem tendências similares nos dois métodos, em vários pontos da escala de comparações. Aparentemente, os dois métodos de estimação são ambos sensíveis a dados extremos nas medidas de divergência (método F_{ST}) ou na frequência média dos alelos privados (método dos alelos privados), como pode ser observado nos gráficos da Figura 8.

Tabela 14. Estimativas de $\hat{N}m$ utilizando os métodos do θ_p e dos alelos privados, com as comparações das populações de *M. aquifolia* e *M. ilicifolia* duas a duas e utilizando todas as populações conjuntamente ($\bar{P}^{(i)}$ = frequência média dos alelos privados, θ_p = coeficiente de coancestralidade).

	Amostra média	$\hat{N}m$ (privados)	$\bar{P}^{(i)}$	$\hat{N}m(\theta_p)$	θ_p
<i>M. aquifolia</i>					
1x2	45,00	0,6469	0,0858	0,7601	0,2475
1x3	36,64	0,2543	0,1370	0,9188	0,2139
1x4	30,56	0,2309	0,1608	0,9537	0,2077
1x5	35,92	0,2501	0,1399	1,0876	0,1869
2x3	46,64	3,1434	0,0319	1,6311	0,1329
2x4	40,56	2,3639	0,0414	2,7476	0,0834
2x5	45,93	6,2245	0,0212	2,8250	0,0813
3x4	32,25	0,8566	0,0733	2,2375	0,1005
3x5	37,57	1,5109	0,0570	2,4152	0,0938
4x5	31,44	1,0503	0,0661	2,1515	0,1041
Todas	38,25	4,0515	0,0308	1,4505	0,1470
<i>M. ilicifolia vs M. aquifolia</i>					
1x6	33	0,3764	0,1161	1,2077	0,1715
2x6	43	1,0123	0,0671	2,5003	0,0909
3x6	34,68	0,6215	0,0845	1,9201	0,1152
4x6	28,56	0,7103	0,0875	7,1464	0,0338
5x6	33,87	0,6591	0,0828	3,3419	0,0696
Todas	37,04	1,6485	0,0464	1,6129	0,1342

Populações: Caetetus, 1; Arapoti, 2; Saibadela, 3; Genebra, 4; Japi, 5 e *M. ilicifolia* (Caçador), 6.

Consequentemente, parece que os dois métodos compartilham os mesmos problemas de interpretação relacionados à magnitude do fluxo gênico entre populações. Pode ser portanto mais adequada a interpretação dos resultados aqui encontrados de maneira comparativa, evitando fazer inferências sobre os valores absolutos do número de migrantes por geração obtidos, não devendo ser interpretado como taxa corrente de fluxo gênico entre as populações.

Adotando essa perspectiva, pode-se dizer das estimativas obtidas para $\hat{N}m$ neste trabalho que, especialmente pelo método dos alelos privados, os dados sugerem fluxo

gênico baixo a moderado entre as populações de *M. aquifolia* (Tabela x) e entre estas e a população de *M. ilicifolia*, com algumas exceções. Em vários casos, os valores do número de migrantes são bem menores do que 1, o que sugere a situação prevista por Wright (1931), em que o fluxo gênico, por ser muito restrito, não chegaria a contrabalançar a divergência provocada pela deriva genética, levando as populações a progressivo isolamento.

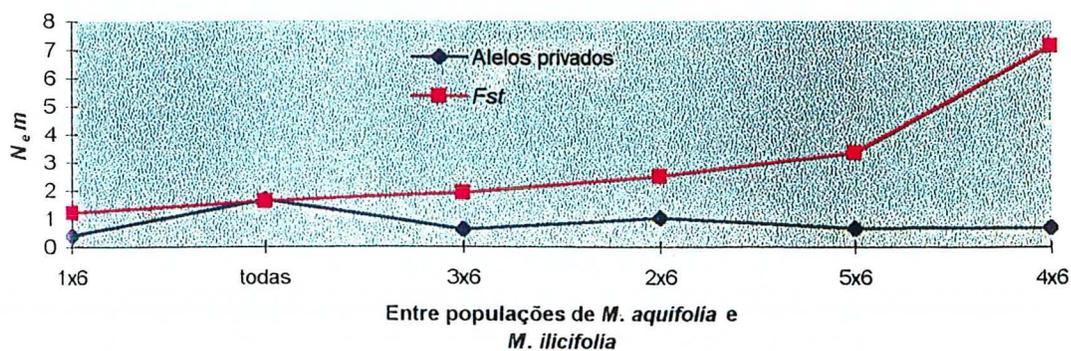
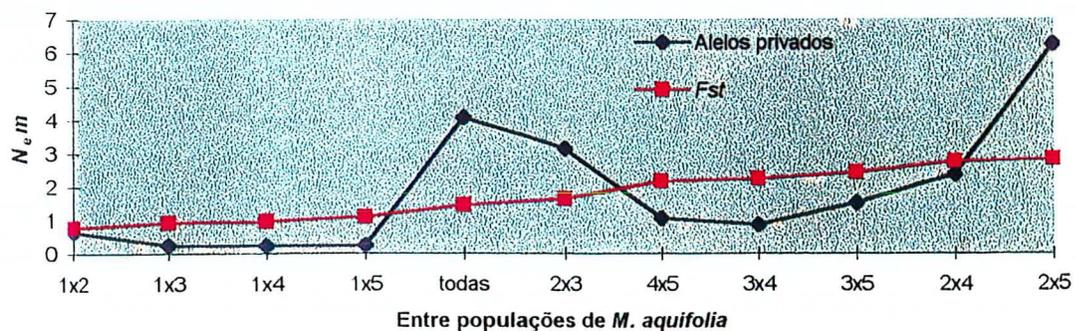


Figura 6. Representação gráfica do número de migrantes em diversas comparações entre populações de *Maytemus* sp obtidos por duas estimativas, alelos privados e θ_P (F_{ST}).

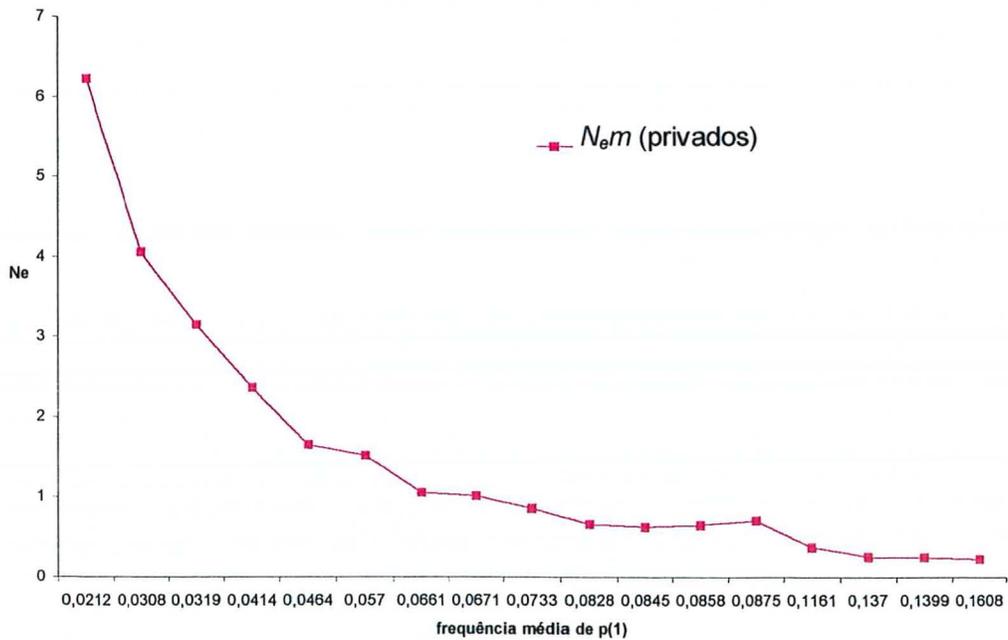
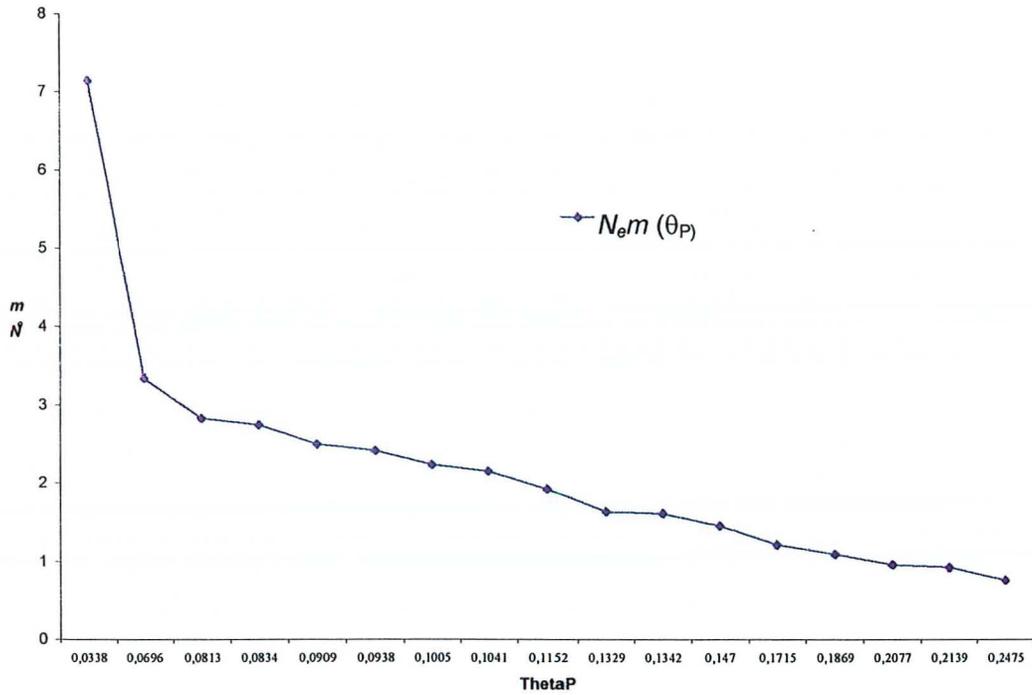


Figura 7 . Dados de origem (θ_P e $\bar{p}(1)$) e suas respectivas estimativas de número de migrantes (N_{em}) geradas pelos dois métodos de estimação.

Por esse raciocínio, a população de Caetetus parece estar isolada de todas as outras, uma vez que em todas as comparações em que ela está envolvida, as estimativas de Nm foram sempre as mais baixas, quase sempre menores que a unidade, enquanto que as outras populações apresentaram estimativas de fluxo gênico um pouco superiores, qualquer que seja o método empregado.

Por outro lado, a população de *M. ilicifolia* localizada em Santa Catarina, mostrou estar isolada da maioria das populações de *M. aquifolia* pelo método dos alelos privados, mas não pelo método θ_p , que produziu valores sempre moderatos a altos. O resultado obtido com a primeira metodologia parece ser mais próximo do senso comum, uma vez que tratam-se de populações pertencentes a espécies diferentes.

Esses resultados relativos às estimativas baseadas no coeficiente θ_p , sugerem que as populações pertencentes a duas espécies diferentes, bastante distantes geograficamente (mais de 500 km), poderiam estar trocando migrantes a taxas bem superiores a unidade, superiores inclusive ao Nm observado entre populações próximas como Santa Genebra e Japi, pertencentes à mesma espécie. Se confirmada essa situação, as duas espécies não estariam ainda isoladas reprodutivamente, ou ao menos não isoladas por um tempo suficiente para provocar reflexos nas estimativas de fluxo gênico estabelecidas pelos métodos indiretos aqui empregados.

De certa forma, essas considerações são coerentes com os dados de frequências alélicas relatados anteriormente neste trabalho, podendo apresentar uma explicação razoável para a ocorrência de muitos alelos comuns às duas espécies.

No entanto, há que se considerar as restrições que as estimativas indiretas de fluxo gênico impõem à interpretação dos dados. Os modelos demográficos e genéticos para os quais as estimativas tem interpretação direta, tem pressupostos que dificilmente estão sendo obedecidos pelas populações da maneira que se encontram atualmente. O modelo de ilhas, pressupõe infinitas populações, entre as quais haveria idêntica probabilidade de troca de migrantes. É bastante improvável que as populações atuais, completamente descontínuas, distantes muitos quilômetros umas das outras, possam estar obedecendo aos pressupostos desse modelo.

Nesse sentido, parece que haveria uma maior flexibilidade do método dos alelos privados em estimar o número de migrantes a partir de outros modelos demográficos. Slatkin (1985b) relatou que as simulações feitas com seu método no modelo de alpodras, onde as subpopulações recebem migrantes apenas de subpopulações adjacentes, mostrou que o método é relativamente insensível a modificações no modelo de troca de migrantes, produzindo estimativas comparáveis em todos eles.

Ainda assim, o método baseado nas medidas de divergência entre as populações (F_{ST} , G_{ST} e θ_p) são considerados relativamente confiáveis para estimar níveis históricos de migração (Barton & Slatkin, 1985), o que não significa que esses valores absolutos de número de migrantes estejam efetivamente ocorrendo no presente. Além disso, Frankel et al. (1996) alertam para os problemas na relação entre o F_{ST} e o número de migrantes que surgem nos extremos da escala, fazendo com que, quando os valores de divergência são muito baixos, ou ao contrário, muito altos, uma diferença muito pequena na

estimativa cause um grande efeito no número de migrantes resultante. Os autores mencionam que, por causa desse tipo de problema, não há muito significado genético em interpretar diferenças como $Nm = 1$ e $Nm = 5$, uma vez que elas podem surgir como resultado de diferenças muito pequenas na medida de divergência entre as populações. Como já mencionado, tal efeito ocorreu nos dados obtidos neste trabalho (Figuras 6, 7 e 8).

Ainda que o mesmo tipo de problema anteriormente mencionado possa ocorrer com o método dos alelos privados, as menores magnitudes de fluxo gênico detectado por esse método entre *M. ilicifolia* e *M. aquifolia*, são aparentemente mais prováveis do que os relativamente altos níveis de fluxo gênico obtidos com o método que emprega o θ_p .

Na tentativa de encontrar trabalhos na literatura que indiquem uma tendência comum entre os dois métodos empregados, não foram encontradas evidências de que os valores inferiores estimados pelo método dos alelos privados ocorra num padrão constante, ou inerente ao método.

Em um trabalho recente, Loveless et al. (1998), estudaram os padrões de diferenciação genética em *Tachigali versicolor*, uma espécie arbórea de dossel relativamente comum em florestas primárias e secundárias na Ilha de Barro Colorado, no Panamá. Os autores utilizaram medidas diretas e indiretas para estimar fluxo gênico em seis subpopulações da espécie que ocorriam na Ilha, e encontraram as estimativas menores para o método do F_{ST} ($Nm = 3,32$) do que para o método dos alelos privados ($Nm = 6,65$). Esse resultado mostra que a tendência observada neste trabalho, ou seja, os

valores superiores estimados através da metodologia do θ_p do que para o método dos alelos privados, pode não ser uma característica geral desses métodos.

Ainda nessa linha de interpretação e, de acordo com o modelo de isolamento por distância, seria razoável supor que as populações relativamente próximas como Santa Genebra e Japi, distantes 46 km uma da outra, estivessem trocando uma quantidade de migrantes maior que entre Arapoti e Japi por exemplo, que estão a quase 300 km de distância, o que de fato não ocorreu. Pelos resultados aqui obtidos, as populações mais distantes estariam trocando migrantes mais frequentemente do que as populações mais próximas.

A esse respeito, os resultados obtidos com *Silene dioica* por Giles et al. (1998) podem ser bastante esclarecedores. Os autores estudaram as estatísticas F através de nove locos isoenzimáticos nessa espécie herbácea em populações naturais que ocorrem em quatro ilhas no norte da Suécia. Os resultados por eles encontrados mostraram que as populações das ilhas foram bastante divergentes quando analisadas numa escala de alguns metros e que, o grau de diferenciação entre as subpopulações dentro das ilhas, foi quase que o dobro da diferenciação que foi encontrado entre as ilhas ($F_{PL} = 0,080$ entre sub-populações dentro das ilhas e $F_{LT} = 0,048$ entre ilhas).

Os dados de diferenciação foram interpretados em termos de fluxo gênico, mostrando que estaria ocorrendo troca gênica tanto entre sub-populações dentro das ilhas como entre as ilhas, mas que, paradoxalmente, grupos mais distantes (ilhas) estariam trocando genes a uma taxa mais alta do que grupos mais próximos (sub-populações dentro das ilhas). Os autores mencionam que, apesar desses padrões não serem

esperados, esse tipo de resultado encontra suporte na literatura, onde diversos trabalhos também revelaram esse tipo de padrão (Unruh, 1990; Johannesen & Loeschke, 1996; Lonn et al., 1996; Ingvarsson & Olsson, 1997)

Os autores explicam o aparente paradoxo dos resultados encontrados, através da combinação de três fatores: a diferença entre os tamanhos efetivos populacionais das sub-populações e ilhas, o modo de colonização e migração das sub-populações nas ilhas e a baixa taxa de migração dentro das ilhas.

Considerando o nível de diferenciação encontrado, o termo Nm para o F_{PL} (dentro das ilhas) seria o produto entre o tamanho efetivo populacional das subpopulações e a taxa de migração entre elas, enquanto que para F_{LT} (entre ilhas) seria o tamanho efetivo populacional das ilhas e a taxa de migração entre as ilhas. Os autores encontraram que, nas ilhas, o tamanho efetivo é 1.000 a 10.000 vezes maior que os tamanhos efetivos das subpopulações. Consequentemente, ainda que as taxas de migração entre as subpopulações sejam algumas ordens de magnitude maiores que entre as ilhas, o alto tamanho efetivo das ilhas aumentaria muito o termo Nm , levando a maior número de migrantes efetivos trocados entre as ilhas que entre subpopulações.

Essa linha de raciocínio é bastante esclarecedora, enfatizando a importante influência do tamanho efetivo populacional na formação do termo Nem , muitas vezes esquecida nas interpretações correntes.

Outra justificativa encontrada para os dados obtidos com *Silene dioica* foi o efeito de fundador na formação das subpopulações e das ilhas. Os autores relatam que a colonização das ilhas é realizada através de sementes provenientes de amostras aleatórias

das ilhas, enquanto que a formação de novas subpopulações dentro das ilhas é realizada através das sementes provenientes de uma única planta mãe, conforme dados encontrados em trabalhos anteriores dos mesmos autores. Mediante essas considerações, por causa dos efeitos de migração restrita dentro das ilhas, as subpopulações não contêm o mesmo número de alelos observados nas ilhas como um todo e que, por causa da deficiência de troca de genes entre subpopulações, estas mantêm sua subdivisão dentro das ilhas. Em contraste, devido ao efeito de migração entre ilhas, estas acabam, ao longo do tempo, recebendo os mesmos alelos que as outras ilhas, efeito demonstrado pelo fato das ilhas como um todo compartilharem os mesmos alelos, diminuindo os efeitos de subdivisão entre as ilhas.

Essas elegantes interpretações dada pelos autores aos resultados encontrados, pode contribuir para a interpretação dos resultados neste trabalho. Embora *Silene*, uma espécie herbácea de clima temperado e *Maytenus*, uma espécie arbórea tropical, possam ser bastante diferentes em termos de história de vida, as forças evolutivas que podem estar influenciando os padrões de subdivisão nessas espécies podem conter processos de mesma natureza.

Em *Maytenus*, a forma como os indivíduos nas subpopulações se acasalam, o modo de colonização de novas populações e diversos outros fatores de história de vida ainda são desconhecidos, sendo este o primeiro estudo em genética de populações naturais nessa espécie. Alguns processos como alto nível de endogamia nas populações, que levaria igualmente à diminuição do seu tamanho efetivo e facilitando a estruturação interna dentro das subpopulações, além de outros fatores como restrição ao fluxo de

pólen e dispersão de sementes, podem estar levando a um padrão de organização da variabilidade genética próximo ao que foi encontrado em *Silene dioica*.

4.6. Tamanho Efetivo Populacional

Na Tabela 15 estão os valores encontrados para as estimativas do tamanho efetivo populacional, dando uma idéia da amplitude da amostragem genética realizada nas populações de *M. ilicifolia* e *M. aquifolia*. As amostragens realizadas nas populações apresentaram aproximadamente 70% de representatividade genética, uma proporção abaixo do ideal, consequência do alto coeficiente de endogamia encontrado nas populações.

O N_e estimado considerando as cinco populações em conjunto foi baixo, 12,43 indivíduos ou 6,4% do total amostrado. A expressão utilizada no cálculo dessa estimativa considera a existência de um tamanho infinito de populações na espécie e, por conta disso, a amostra realizada nas cinco populações representaria muito pouco da sua diversidade genética.

O N_e máximo possível para as cinco populações da espécie também foi baixo, refletindo a alta magnitude da divergência encontrada entre as populações amostradas. Por esses resultados, fica clara a necessidade de se amostrar o máximo possível de populações da espécie. Além disso, Vencovsky (1997) recomenda amostrar igual número de indivíduos por população, uma vez que essa equivalência anularia a variância que afeta negativamente a representatividade genética da amostra.

Tabela 15. Estimativas do tamanho efetivo populacional (N_e) das populações de *M. ilicifolia*, das populações de adultos e jovens de *M. aquifolia* e da metapopulação de *M. aquifolia*.

Adultos						
	Caçador	Caetetus	Arapoti	Saibadela	Genebra	Japi
N	31,00	35,00	55,00	39,00	27,00	37,00
N_e	19,84 (64%)	23,54 (67%)	37,19 (68%)	28,72 (73%)	20,83 (77%)	27,91 (75%)
Jovens			População da espécie			
	Arapoti	Japi	N (adultos)		193	
N	29	22	N_e		12,43	
N_e	19,95 (69%)	14,29 (65%)			(6,4%)	
			N_e máx		17,01*	
					(62%)	

4.7. Autocorrelação Espacial

Os resultados das análises de estrutura espacial nas populações de Santa Genebra e Saibadela estão nas Tabelas 16 e 17, que mostram os índices I de Moran para cada alelo nas cinco classes de distância estabelecidas. Os correlogramas estão nas figuras x e y.

De maneira geral, os resultados mostram que há uma tendência à estruturação espacial nas populações analisadas, em pelo menos parte dos alelos. Em Saibadela, essa tendência parece ser mais pronunciada do que em Santa Genebra. Os alelos que apresentaram correlogramas significativos foram sete no total de 11 em Saibadela e seis no total de 13 em Santa Genebra.

Tabela 16. Coeficientes de autocorrelação espacial (Índices “I” de Moran), obtidos nos 11 alelos de seis locos polimórficos, nas cinco classes de distância estabelecidas na população de Saibadela. Amplitude das classes em metros, número de pares de comparações em cada classe e probabilidade do correlograma para cada alelo. Piracicaba, ESALQ/ USP, 2.000

Amplitude	0 – 178	179 - 380	381 - 632	633 – 942	943 - 1492	
Pares	93	93	93	93	93	
Classes	1	2	3	4	5	Probabilidade
Pgia2 ¹	0,55**	0,42**	0,02	-0,33**	-0,82**	0,000
Pgia3	0,26**	-0,17	-0,21*	0,29**	-0,34**	0,000
Pgia4	0,14*	-0,15	-0,17	0,22**	-0,20*	0,014
Acpa1	0,20**	-0,00	-0,42**	-0,02	0,08	0,000
Acpa2	0,05	0,04	-0,22*	0,02	-0,07	0,072
Prxa1	0,15*	0,09	0,00	-0,05	-0,36**	0,000
Md1a1	-0,14	-0,03	-0,02	0,02	-0,01	0,657
Md2a1	-0,03	-0,00	0,02	-0,05	-0,11	0,862
Md2a2	0,06	0,03	0,03	-0,04	-0,24**	0,023
Esta1	0,25**	0,15*	-0,25**	-0,38**	0,06	0,001
Esta3	0,04	0,12*	-0,09	-0,21*	-0,02	0,104
Média	0,14	0,05	-0,12	-0,05	-0,19	

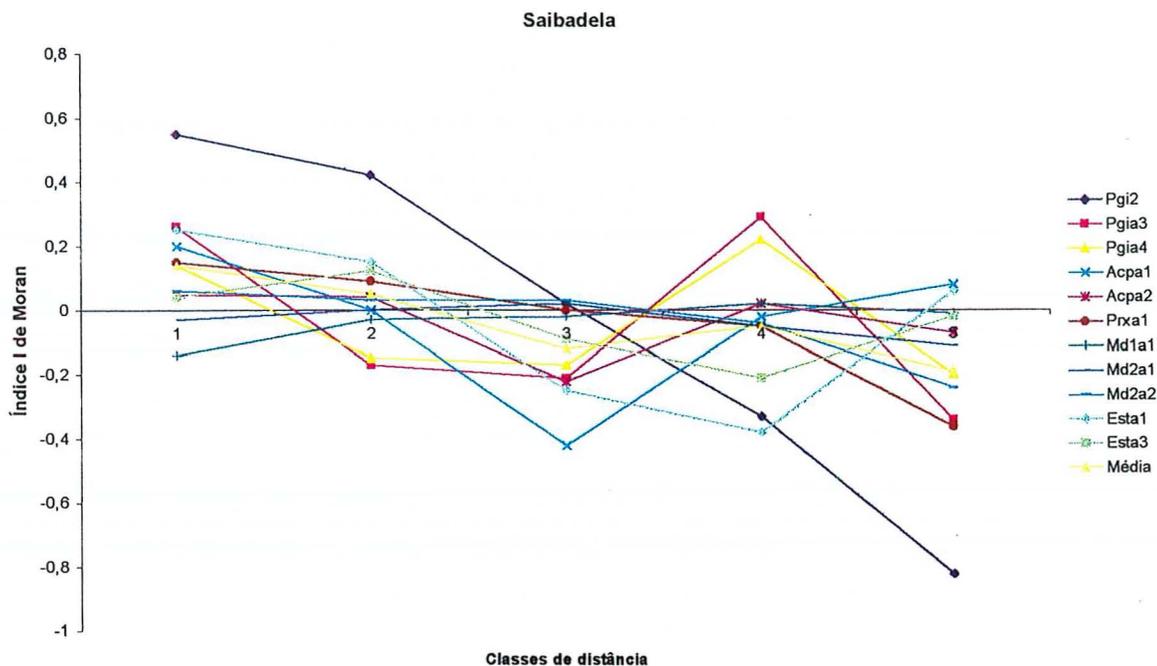
¹Alelos analisados: Pgi2 alelo 2; Pgi2 alelo 3 e assim por diante.

Tabela 17. Coeficientes de autocorrelação espacial (Índices “I” de Moran), obtidos nos 13 alelos de sete locos polimórficos, nas cinco classes de distância estabelecidas na população de Santa Genebra. Amplitude das classes em metros, número de pares de comparações em cada classe e probabilidade do correlograma para cada alelo. Piracicaba, ESALQ/ USP, 2.000

Amplitude	0- 22	23 - 41	42 - 67	68 - 100	101- 179	Probabilidade
Nº Pares	77	83	68	74	76	
Classes	1	2	3	4	5	
Pgia1	0.11	-0.14	-0.02	-0.09	-0.03	0.255
Pgia2	-0.18	-0.02	0.10	-0.02	-0.04	0.317
Pgia3	-0.09	-0.11	0.10	-0.11	0.05	0.465
Pgia4	0.01	0.01	0.13	-0.28**	-0.05	0.041
Pgia5	0.17*	0.13*	-0.18	-0.15	-0.19*	0.079
Pgia6	0.00	0.02	-0.15	0.04	-0.12	0.655
Lap1	0.07	0.00	0.21**	-0.13	-0.32**	0.001
Prx1	-0.06	-0.05	-0.01	-0.03	-0.04	1.000
Mdh1	-0.03	-0.13	0.24**	-0.12	-0.11	0.021
Mdh2	0.12	0.02	-0.37**	0.02	-0.01	0.003
Est1a1	-0.16	0.07	-0.03	-0.02	-0.05	0.421
Est1a2	0.17*	-0.02	0.00	0.03	-0.37**	0.000
6Pga1	0.15*	0.07	0.04	-0.14	-0.31**	0.002
Média	0.02	-0.01	0.00	-0.08	-0.12	

Em Saibadela, o Índice de Moran tende a ser positivo e, em grande parte dos casos, significativo nas primeiras classes de distância, mostrando a tendência das árvores mais próximas apresentarem genótipos mais parecidos que as árvores mais distantes. Além do mais, mesmo nos alelos onde o Índice não é significativo nas primeiras classes de distância, observa-se uma tendência generalizada de ocorrência maior de Índices negativos significativos nas últimas classes. Isso mostra que, a tendência de aparecimento de indivíduos com genótipos diferentes cresce com o aumento da distância.

Saibadela



Santa Genebra

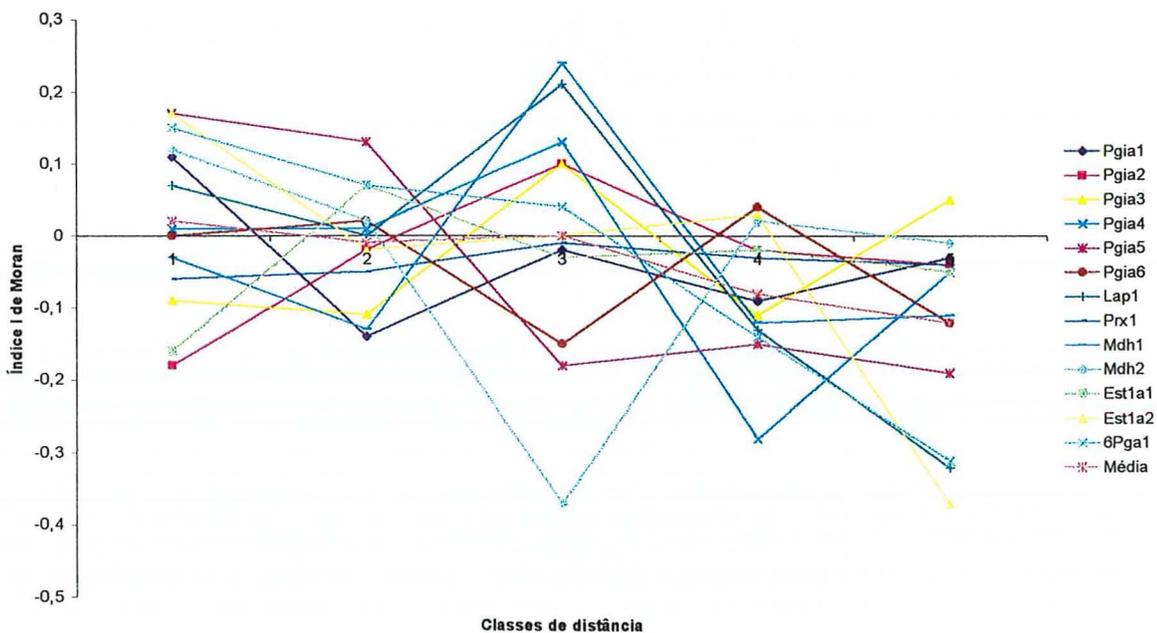


Figura 8. Correlogramas dos Índices I de Moran dos 11 e 13 alelos e suas médias nas populações de Saibadela e Santa Genebra respectivamente.

Os resultados em geral não foram consistentes para todos os alelos e locos analisados nos locais. Assim, em Saibadela, todos os alelos da Pgi2 mostraram tendência a apresentar autocorrelação, mas o mesmo não ocorreu em Santa Genebra, onde apenas o alelo 5 dessa isoenzima apresentou autocorrelação significativa. Por outro lado, o loco da Est1 apresentou alelos com autocorrelação significativa nos dois locais.

Em Santa Genebra, a maior parte dos Índices significativos são negativos e ocorrem nas classes mais distantes, indicando que existe uma tendência maior de os indivíduos localizados mais distantes apresentarem genótipos mais divergentes do que os mais próximos. Ainda nesse local, ocorrem Índices não significativos nas primeiras classes de distância, mostrando que a tendência predominante nos indivíduos mais próximos é de aleatoriedade ao invés de agregação.

A distância na qual os correlogramas passam pelo eixo dos X variou entre alelos e entre localidades, mas em geral na segunda ou terceira classe de distância os Índices I tornam-se negativos nos dois locais na maioria dos alelos.

As classes de distância variaram em amplitude nos dois locais, devido à diferença em configuração e em extensão das áreas de coleta. Em Saibadela, no caminhamento ao longo da trilha, foram coletados indivíduos a quase 1.500 m de distância um do outro e em Santa Genebra, a distância máxima entre os indivíduos foi de 179 m. O número de indivíduos analisados em cada população foi próximo (28 e 31 em Santa Genebra e Saibadela respectivamente), mostrando que a densidade populacional difere muito em cada local; a densidade em Santa Genebra chega a ser quase sete vezes maior que em Saibadela.

Considerando esse aspecto, a classe de distância na qual o correlograma passa pelo eixo dos X tem significados diferentes em cada população. Assim, em Saibadela, os agregados de genótipos parecidos ocorrem num raio de 150 a 300 m aproximadamente e em Santa Genebra, essa distância é de no máximo 40 m.

Um fato interessante ocorre no alelo 3 da Pgi2. Nesse alelo, a autocorrelação positiva significativa de indivíduos com o mesmo genótipo aparece novamente na classe de 630 a 940 m, sugerindo que podem estar presentes padrões de repetição de agregados nessa população para alguns alelos.

Na análise da estrutura espacial de populações, autocorrelações significativas podem ocorrer em resposta a diferentes fatores, tanto seletivos como aleatórios (Sokal & Oden, 1978). Os padrões clinais (gradientes de variação da frequência alélica ao longo de uma distância geográfica) ocorrem frequentemente em resposta a gradientes ambientais. Por outro lado, a ação aleatória da deriva pode provocar isolamento pela distância, sem que haja envolvimento de qualquer fator seletivo no processo. Além disso, fatores históricos como colonização recente ou interferência antrópica na população pode causar padrões próximos a uma variação clinal.

Em Saibadela, pode-se considerar a existência de um gradiente próximo a um padrão clinal. Nessa população, com características de floresta primária, localizada na maior área contínua de Floresta Ombrófila Densa no Estado de São Paulo sob proteção ambiental, os padrões de agregação de genótipos parecidos não pode ser imputado a distúrbios impostos ao seu sistema de acasalamento. Não existem evidências de qualquer fator, além dos bióticos e abióticos naturais, que possa estar impondo um

comportamento reprodutivo alterado nessa população. Se o fosse, a população de Santa Genebra poderia ter apresentado autocorrelação equivalente ou maior que a população de Saibadela. Em Santa Genebra, população localizada em um pequeno fragmento circundado por uma área urbana e submetido a décadas de interferência antrópica, seria muito mais provável detectar autocorrelação espacial devido a fatores relacionados ao aumento de endogamia devido a gargalos populacionais, o que na realidade não acontece.

Por esse motivo, a presença de autocorrelação espacial em Saibadela deve ser interpretada de outra forma. Em seus estudos, Sokal & Wartenberg (1983) determinaram que o isolamento pela distância resulta em autocorrelações espaciais significativas em quase todas as simulações, com exceção das realizadas sob o pressuposto de panmixia total. Ainda segundo Dyer & Rice (1997), a variação espacial que ocorre em escalas abaixo no nível populacional, refletem diretamente o sistema reprodutivo da espécie. Em espécies alógamas, a presença de autocorrelação pode ser imputada muitas vezes à seleção, ou ao aparecimento de um certo nível de endogamia provocado por aumento dos indivíduos aparentados (diminuição do N_e por fragmentação, corte seletivo).

Essa observação sugere que em Saibadela, desvios em relação à panmixia são bastante prováveis, como já anteriormente mostrado neste trabalho. Os índices de fixação foram significativamente positivos para todas as populações de *M. aquifolia*, sugerindo que a espécie possa praticar acasalamentos preferenciais em suas populações naturais. Essa afirmativa deverá ser verificada posteriormente, quando se dispuserem de sementes suficientes para determinar o sistema de acasalamento predominante na espécie.

A estruturação em famílias é mais freqüente em populações de acasalamento misto, onde a restrita dispersão de pólen e sementes podem estar afetando o arranjo espacial dos genótipos (Linhart & Grant, 1996). Muitos estudos tem encontrado evidências de acasalamentos entre indivíduos consanguíneos devido ao fluxo restrito de pólen em áreas geneticamente estruturadas (Epperson, 1992).

No entanto, Linhart & Grant consideram que é a seleção natural a principal força que gera diferenças na organização espacial de genótipos. Segundo eles, a afirmação de que heterogeneidade ambiental gera heterogeneidade genética é rotineiramente confirmada em diversos trabalhos da literatura (Hedrick et al., 1976, citados por Linhart & Grant, 1996).

Felsenstein (1976, citado por Balfourier et al., 1998) mostra que, na verdade, os dois processos, seleção natural e deriva aleatória podem agir conjuntamente no mesmo local, afetando alelos e locos diferentes. Na hipótese de seleção natural, certamente serão identificadas tendências diferentes para os diferentes locos e alelos, enquanto que a deriva, e muito provavelmente o sistema reprodutivo, deverá afetar todos os locos conjuntamente.

Em Saibadela, é provável que a deriva aleatória esteja predominando, ainda que alguns alelos tenham produzido comportamentos diferenciados. Aparentemente, se os alelos que não apresentaram autocorrelação significativa estiverem sob seleção, seus valores adaptativos devem ser fracos, não tendo sido capazes de produzir padrões muito destoantes do restante dos alelos, já que a maioria dos pontos, apesar de não estatisticamente significativos, seguem a mesma tendência geral.

A autocorrelação em Saibadela está provavelmente relacionadas a possíveis acasalamentos entre aparentados e a características ecológicas, como restrições à dispersão do pólen e a baixa amplitude de dispersão de sementes. Segundo Linhart & Grant (1996), o fluxo gênico e a dispersão de sementes, contrariamente à sua natureza homogeneizadora, podem operar como uma fonte importante de heterogeneidade local em curtas distâncias.

Maytenus tem síndrome de dispersão de sementes por zoocoria, sendo dispersada principalmente por pássaros. É possível que o comportamento das espécies dispersoras favoreçam a distribuição não aleatória de propágulos. A área amostrada em Saibadela é contígua ao curso do rio Saibadela. A maior disponibilidade de espaço e recursos aos animais dispersores representada pela presença do curso d'água, pode ser o fator que estaria influenciando o comportamento dos animais dispersores, favorecendo a ausência de aleatoriedade na distribuição de *Maytenus aquifolia* ao longo da área.

Em Santa Genebra, pela menor evidência de autocorrelação ocorrida nesse local, os efeitos de estruturação inerentes à espécie podem estar sendo influenciados pela maior densidade populacional ali presente, contrabalançando os efeitos de heterogeneidade encontrados em Saibadela. Além disso, as distâncias entre os indivíduos coletados em Santa Genebra foram da ordem de 1 a 200 m, equivalente às distâncias da primeira classe de Saibadela, o que pode ter sido insuficiente para detectar a estruturação. Em Saibadela, quando as classes de distância foram aumentadas para 10 classes, a estruturação não ficou muito evidente (dados não mostrados). Seria muito informativo se

as duas populações fossem amostradas na mesma escala espacial, amostrando aleatoriamente indivíduos localizados a distâncias equivalentes às de Saibadela.

Esses resultados encontrados tem evidente significado prático. Com o reconhecimento da existência de um certo nível de estruturação local dos genótipos nas populações de *Maytenus*, as medidas de conservação da espécie podem ser melhor estabelecidas, assim como a proposição de práticas de manejo em áreas naturais.

O conhecimento da estrutura populacional espacial pode melhorar a eficiência da amostragem para conservação *ex situ*, de maneira a maximizar a diversidade genética ou minimizar a consanguinidade, além de ser de especial relevância na definição de número e tamanhos mínimos de áreas para conservação *in situ*. A estrutura pode também afetar estudos de genética de populações naturais que, se ignorada, pode levar por exemplo, a problemas de interpretação do sistema de acasalamento ou da significância seletiva dos genótipos.

Na seleção de áreas e parâmetros para manejo sustentado, a presença de estrutura espacial na distribuição dos alelos permite levar em conta fatores importantes relacionados à sustentabilidade da população no local onde se está preconizando o manejo.

Se a espécie confirmar a presença de ocorrência agregada de genótipos similares em suas populações, as práticas de manejo devem levar em conta essa característica da espécie. Assim, seria razoável propor a escolha de uma ou algumas árvores, num agrupamento de árvores similares, da qual não seriam retiradas folhas.

A coleta de folhas normalmente é feita com o corte simultâneo dos ramos, o que impede que aquele indivíduo floresça e produza sementes em dois anos consecutivos, uma vez que a indução de floração só ocorre nos ramos do ano anterior. Por essa prática, alguns indivíduos do agrupamento seriam preservados da exploração, permanecendo aptos a reprodução contínua, e os outros indivíduos do agrupamento poderiam ser manejados com mais liberdade.

5. CONCLUSÕES

As populações de *Maytenus aquifolia* apresentaram medidas de polimorfismo, do número de alelos, da heterozigosidade observada e diversidade gênica comparáveis às encontradas na literatura para as espécies com alta variabilidade genética.

As frequências alélicas diferiram significativamente entre as populações, de maneira que vários alelos variaram em frequência conforme a população considerada; além disso, as populações mostraram a presença de alelos raros e exclusivos.

A maioria dos locos nas populações não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg e há possibilidade de estarem praticando um certo nível de endogamia estável, devido ao excesso de homozigotos detectado. As populações exibiram índices significativos de endogamia interna e alta diferenciação genética entre populações, medidos através das estatísticas F estimadas através do método da análise de variância.

Essa diferenciação entre populações não mostrou estar relacionada com a distância geográfica, com o tipo de floresta nem com o nível de interferência antrópica nas populações. A análise através dos coeficientes de coancestralidade não mostrou tendência de isolamento por distância. Populações distantes foram mais similares geneticamente que populações mais próximas. Os processos evolutivos que podem estar interferindo na formação desse tipo de estrutura devem estar relacionados a características ligadas ao sistema reprodutivo, ao baixo nível de fluxo gênico local, baixo tamanho efetivo populacional e possivelmente a efeitos de fundador.

As populações analisadas quanto à estruturação genética espacial local apresentaram autocorrelação espacial dos alelos em nível moderado (Saibadela) a fraco (Santa Genebra). Houve heterogeneidade dos alelos em relação à presença de autocorrelação espacial, o que sugere que podem estar havendo forças seletivas, ainda que fracas, interferindo no processo.

O fluxo gênico estimado indiretamente a partir dos coeficientes de coancestralidade e da frequência alélica dos alelos privados mostraram que em alguns casos, essas populações tem estado isoladas e em outros, tem trocado genes a níveis historicamente baixos. O nível de fluxo gênico atual não pode ser inferido a partir desses dados, uma vez que as populações atualmente não estão conectadas e são desconhecidos os processos que poderiam estar atualmente conectando geneticamente essas populações.

A espécie *Maytenus ilicifolia* compartilhou a presença de muitos alelos das populações de *M. aquifolia*, indicando que a primeira é muito próxima filogeneticamente a esta última. O fluxo gênico estimado entre espécies sugere que é possível que estas não estejam completamente isoladas reprodutivamente, ou se estão, o fizeram a um espaço de tempo não muito distante.

O tamanho efetivo populacional mostrou estar entre 60% e 70% do número de indivíduos nas populações e, na população da espécie como um todo, a coleta de cinco populações com o nível de divergência genética apresentado, representou muito pouco da variabilidade genética provavelmente presente na espécie, um reflexo direto do alto nível de divergência entre as populações.

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que a espinheira-santa é uma espécie com características diferentes da esperada para as espécies arbóreas tropicais, que apresentam em geral pouca subdivisão interna, alto fluxo gênico e baixa diferenciação entre populações. Algumas características da história de vida da espécie não estão esclarecidas, de modo que seria importante o aprofundamento dos estudos em termos de características reprodutivas e ecológicas, como fluxo de pólen e dispersão de sementes e taxa de cruzamento, para esclarecer a origem do nível de estruturação encontrado.

Os resultados encontrados neste trabalho trazem diversas implicações para a conservação, manejo sustentado e melhoramento genético da espécie.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; BRUNE, W.; OLIVEIRA, J.R.; ALONSO, S.K.; SCORTICHINI, M.
 Extração de Proteínas para Eletroforese. In: ALFENAS, A.C. (Ed.) **Eletroforese proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. Cap. 2, p. 87-114.
- BALFOURIER, F.; CHARMET, G.; RAVEL, C. Genetic differentiation within and between natural populations of perennial and annual ryegrass (*Lolium perenne* and *L. rigidum*). **Heredity**, 81:100-110, 1998.
- BALLVE, R. M. L.; BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H. P.; SIQUEIRA, W.J.; SOBRINHO, J.T.; POMPEU JÚNIOR. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucleares no melhoramento de citros. **Bragantia**, v.50, n.1, p. 57-76. 1991.
- BARTON, N.H.; SLATKIN, M. A Quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. **Heredity**, 56:409-415, 1986.
- BERNACCI, L.C.; LEITÃO FILHO, H.F. Flora Fanerogâmica da Fazenda São Vicente, Campinas SP **Revista Bras. Bot.**, 19(2):149-164, 1996. DX107
- BRITTEN, H.B.; BRUSSARD, P.F.; MURPHY, D.D.; EHRlich, P.R. A test for Isolation by Distance in Central Rocky Mountain and Great Basin Populations of Edith's Checkerspot Butterfly (*Euphydryas editha*). **Journal of Heredity**, 86:2040-210, 1995.
- BROWN, A. H. D., MATHESON, A. C., ELDRIGE, K. G. Estimation of the mating system of *Eucalyptus oblique* L'Herit by using allozyme polymorphism. **Australian Journal of Botany**, v. 23, p. 931-949, 1975.
- CARLINI, E. A.; BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado 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**. Central de Medicamentos, CEME/AFIP, 1988. Brasília 128 p.
- CARVALHO-OKANO, RITA MARIA. Estudos Taxonômicos do Gênero *Maytenus* MOL. Emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil Extra-Amazônico. **Tese de Doutorado**. Campinas, Unicamp, 1992, 253 pp.
- CAVASSAN, O.; CESAR, O.; MARTINS, F.R. Fitossociologia da vegetação arbórea da reserva estadual de Bauru, Estado de São Paulo. **Revista Brasil Bot.** 72(2):91-106, 1984. DX105

- CLAYTON, J. ; TRETIAK, D. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **Journal of Fisheries Research Board of Canada**, v. 29, p. 1169-1172. 1972.
- COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, v.23, p. 72-84, 1969.
- CRAWFORD, D. J. Generation and analysis of data from enzyme electrophoresis. In: _____ **Plant molecular systematics**. New York: John Wiley & Sons, 1990. P. 80-93.
- DYER, A R.; RICE, K.J. Evidence of spatial genetic structure in a California bunchgrass population. **Oecologia**, 112:333-339, 1997.
- ELLSTRAND, N.; ELAM, D. Population Genetic Consequences of small population size: Implications for Plant Conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**. 24:217-42, 1993.
- FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H.D.; BURDON, J. J. **The Conservation of Plant Biodiversity**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 299p.
- FURLAN, M. 1984. Estudo químico de *Maytenus evonymoidis* Reiss. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992, 631p.
- GAKUNJU, D.M.N.; MBERU, E.K.; DOSSAJI, S.F.; GRAY, A.I.; WAIGH, R.D.; WATERMAN, P.G.; WATKINS, W.M. Potent antimalarial activity of the alkaloid nitidine, isolated from a Kenyan herbal remedy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 1995, 39: 12, 2606-2609.
- GANDARA, F. B. **Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)**. Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP, 1996. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências).
- GILES, B. E.; LUNDQVIST, E.; GOUDET, J. Restricted gene flow and subpopulation differentiation in *Silene dioica*. **Heredity**, 80:715-723, 1998.
- GONZALEZ, A.G.; ALVARENGA, N.L.; RAVELO, A.G.; JIMENEZ, I.A.; BAZZOCCHI, I.L.; CANELA, N.J.; MOUJIR, L.M. Antibiotic phenol nor-triterpenes from *Maytenus canariensis*. **Phytochemistry**. 1996, 43: 1, 129-132.
- GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. **Biometrics**. 1992, 48:361-371.

- HAMRICK, J.L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, **69**(10):1685-93, 1982.
- 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**. Sinauer, Sunderland, Massachusetts: 43-63. 1990.
- HERRERA, R.M.; PEREZ, M.; MARTIN-HERRERA, D.A.; LOPEZ-GARCIA, R.; ABANAL, R.M.; ARIAS, A. Antimicrobial activity of extracts from plants endemic to the Canary Islands.
- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F.B.; SOUZA, L.M.I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. In: II Simpósio Brasileiro sobre Fragmentação Florestal. 1998. Anais. **Série Técnica IPEF** (no prelo).
- KAGEYAMA, P.; GANDARA, F.B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e conservação: In: III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira, Águas de Lindóia, 1993. **Anais**. São Paulo. ACIESP, 1993. Vol. II, p.1-9.
- LEGENDRE, P.; FORTIN, M. J. Spatial pattern and ecological analysis. **Vegetatio**, **80**:107-138, 1989.
- LEITÃO-FILHO, H.F. A vegetação. In: Leitão-Filho, H.F.; Morellato, L.P. (eds) **Ecologia e Preservação de uma Floresta tropical Urbana - Reserva de Santa Genebra**. Campinas: Editora da Unicamp. 1995, p. 19-29.
- LEWIS, P. O., ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d15). Free program distributed by the authors over the internet from the GDA Home Page at <http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/> 2000.
- LINHART, Y. B.; GRANT, M.C. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **27**:237-77, 1996.
- LOVELESS, M.D. & HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **15**:65-95, 1984.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J. L.; FOSTER, R. B. Population structure and mating system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. **Heredity**, **81**:134-143, 1998.
- MALTEZ, H. M. **Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. – Apocynaceae (peroba rosa) em um floresta estacional semidecidual no Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto de Biologia, UNICAMP, 1997. 132p. Dissertação (Mestrado em Ciências).

- MEIRA NETO, J.A.A.; BERNACCI, L.C.; GROMBONE, M.T.; TAMASHIRO, J.Y.; LEITÃO-FILHO, H.F. Composição florística da Floresta Semidecídua de Altitude do Parque Municipal da Grota Funda (Atibaia, Estado de São Paulo). **Acta Bot. Bras.** 3(2):51-74, 1989.
- 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, 1997. 197p. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas).
- MORELLATO, L. P. As estações do ano na floresta. In: LEITÃO-FILHO, H. F.; MORELLATO, L. P. **Ecologia e Preservação de uma Floresta Tropical Urbana - Reserva de Santa Genebra**. Campinas: Editora da Unicamp. 1995, p. 37-41.
- MORELLATO, L. P. C.; LEITÃO-FILHO, H. F. Padrões de frutificação e dispersão na Serra do Japi. In: MORELLATO, L. P. C. (Org) **História Natural da Serra do Japi - ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil**. Campinas: Unicamp/Fapesp, p. 112-140, 1992.
- MORELLATO, L.P.C.; LEITÃO-FILHO, H.F.; RODRIGUES, R.R.; JOLY, C.A. Estratégias fenológicas de espécies arbóreas em floresta de altitude na serra do Japi, Jundiá, São Paulo. **Revista Brasileira de Biologia**, 50(1):149-162, 1990.
- NEGREIROS, O C. Características Fitossociológicas de uma comunidade de floresta latifoliada pluvial tropical visando ao manejo do palmito, *Euterpe edulis*, Mart. **Dissertação de Mestrado**, Piracicaba: Universidade de São Paulo, 1982, 104 p.
- 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.
- NEIGEL, J.E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review of Ecology and Systematics**. 28:105-28, 1997.
- OLIVEIRA, MGM; MONTEIRO, MG; MACAUBAS, C; BARBOSA, VP; CARLINI, EA. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**. 1991, 34: 1, 29-41; 23 ref.
- PAGANO, S.N.; LEITÃO-FILHO, H.F. Composição Florística do estrato arbóreo de mata mesófila semidecídua, no município de Rio Claro (Estado de São Paulo). **Revista Brasil. Bot.** 10:37-47, 1987. **Phytotherapy Research**. 1996, 10: 4, 364-366.

- PINTO, H. S. Clima da Serra do Japi. *In*: MORELLATO, L. P. C. (Org) **História Natural da Serra do Japi - ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil**. Campinas: Unicamp/Fapesp, p. 30-39, 1992.
- 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.
- REIS, M. S. **Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpe edulis* Martius)**. Piracicaba: Departamento de Genética, ESALQ/USP, 1996. Tese (Doutorado em Agronomia).
- REYNOLDS, J.; WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. **Genetics**, **105**:767-779, 1983.
- RITLAND, K. Genetic Distance, Diversity, and Clustering Programs GD and GDD. Toronto, 1990.
- RODRIGUES, R.R.; SHEPHERD, G. J. Análise da variação estrutural e fisionômica da vegetação e características edáficas, num gradiente altitudinal na Serra do Japi. *In*: MORELLATO, L. P. C. (Org) **História Natural da Serra do Japi - ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil**. Campinas: Unicamp/Fapesp, p. 64-96, 1992.
- RODRIGUES, R.R.; MORELLATO, L.P.C.; JOLY, C.A.; LEITÃO-FILHO, H.F. Estudo florístico e fitossociológico em um gradiente altitudinal de mata estacional mesófila semidecídua, na Serra do Japi, Jundiaí, SP. **Revista Brasil. Bot.** **12**:71-84, 1989. DX110
- RODRIGUES, R.R.; MORELLATO, L.P.C.; JOLY, C.A.; LEITÃO Filho, H.F. Estudo florístico e fitossociológico em um gradiente altitudinal de mata estacional mesófila semidecídua, na Serra do Japi, Jundiaí, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, **12**:71-84 (1989).
- ROUSSET, F. Genetic Differentiation and Estimation of Gene Flow from F-Statistics under Isolation by Distance. **Genetics** **145**:1219-1228, 1997.
- SEKAR, K.V.S.; Campagne, J.M.; Sneden, A.T. 5-Benzoyl-5-deacetylwilforidine: a new sesquiterpene nicotinoyl alkaloid from *Maytenus buchananii*. **Planta-Medica**. 1996, **62**: 4, 368-370.
- SHAPCOTT, A. The spatial genetic structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). **Heredity**, **74**:28-38, 1995.
- SHIROTA, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. Structures of xuxuarines, stereoisomeric triterpene dimers from *Maytenus chuchuhuasca*. **Tetrahedron**. 1995, **51**: 4, 1107-1120.

- SIQUEIRA, M. Análise florística e ordenação de espécies arbóreas da Mata Atlântica através de dados binários. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Biologia, UNICAMP. Campinas, 1994, 143 p.
- SLATKIN, M. Estimating levels of gene flow in natural populations. **Genetics**, **99**, 323-335, 1981.
- SLATKIN, M. Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. **Science**, **236**:787-792, 1987.
- SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review in Ecology and Systematics**, **16**, 393-430, 1985b.
- SLATKIN, M. Rare alleles as indicators of gene flow. **Evolution**, **39**, 53-65, 1985a.
- SLATKIN, M.; BARTON, N. H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, **43**:1349-1368, 1989.
- SOKAL, R.R. , WARTENBERG, D. E. A test of spatial autocorrelation analysis na isolation-by-distance model. **Genetics**, v. 105, n. 1, p. 219-237, 1983.
- SOKAL, R.R., ODEN, N. L. Spatial autocorrelation in biology. 2. Some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest. **Biological journal of the Linnaean Society**, v. 10, p. 229-249, 1978.
- SOLTIS, D. E., HAUFLER, C. H., DARROW, D.C., GASTONY, G.J. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**, v. 73, p. 9-27, 1983.
- SOUZA-FORMIGONI, MLO; OLIVEIRA, MGM; Monteiro, MG; Silveira-Filho, NG; Braz, S; Carlini, EA; Silveira-Filho, NG. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**. 1991, **34**: 1, 21-27.
- SWOFFORD, D.L.; SELLANDER, R.B. BIOSYS-2. A Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Genetics. June, 1997.
- TORGGLER, M. G. F., CONTEL, E. P. B., TORGGLER, S. P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Sociedade Brasileira de Genética, SÉRIE MONOGRAFIAS Nº 1, 1995. 186p.
- TORRES, R.B.; MARTINS, F.R.; KINOSHITA, L.S. Climate, soil and tree flora relationships in forests in the state of São Paulo, southeastern Brasil. **Revista Brasil. Botanica** **20**(1):41-49, 1997.

- VENCOVSKY, R. Análise de Variância de Frequências Alélicas. **Revista Brasileira de Genética**. 15(1):53-60, Suppl. 1, 1992.
- VENCOVSKY, R. Biometrical Approaches for molecular markers: estimation of effective population size. *In*: International Workshop on Agricultural Biotechnology. **Proceedings**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1997. p.21-22.
- VILEGAS, J.H.Y.; Lanças, F.M.; Antoniosi-Filho, N.R. High temperature capillary GC analysis of phytopreparations of "Espinheira Santa" (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolia* Celastraceae), a Brazilian antiulcer plant. **Chromatographia**. 1995, 40: 5-6, 341-344.
- VILEGAS, J.H.Y.; Lancas, F.M.; Cervi, A.C. High resolution gas chromatography analysis of 'espinheira santa' (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*): analysis of crude drug adulterations. **Phytotherapy-Research**. 1994, 8: 4, 241-244; 7 ref.
- WEIR, B. S. **Genetic Data Analysis II**. Methods for Discrete Population Genetic Data. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 1996. 445p.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F- Statistics for the analysis of populations structure. **Evolution**, 38(6):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. 323-354, 1951.

Anexo I.**Tampões de Extração, Corrida e Coloração para os sistemas isoenzimáticos revelados em *Maytenus sp.*****Tampão de extração baseado em Alfenas, 1.998.**

Histidina (H)	
Fosfato de sódio bibásico	0,6 g
Sacarose.....	7,0 g
PVP-40	2,56 g
DTT	50,0 mg
L-ácido ascórbico	100 mg
DIECA	100 mg
Bissulfito de sódio	50 mg
Borato de sódio (bórax)	50 mg
Polietilenoglicol – 6000	1 g
Água desionizada (ou destilada) (q.s.p.)	100 mL

O pH da solução é 8,5, aproximadamente.

Tampões de Corrida:**H – Eletrodo:**

Tris 0,2 M

Ácido cítrico 0,05 M

H Gel:

Tampão de eletrodo diluído a 1,9%

Tampões de revelação:**Lap**

Leucine (dissolver em 2 ml de metanol 10%)	25 mg
Fast black	30 mg
Tampão Tris maleato 0,1 M pH: 5,4 (q.s.p.)	20 ml
H ₂ O	50 ml

Pgi

Frutose-6-fosfato, Na ₂	30 mg
NADP ⁺ , Na ₂	1 ml (10 mg)
MTT ou NBT	1 ml (10 mg)
PMS	1 ml (1 mg)
MgCl ₂ (1%)	1 ml (10 mg)
Tampão Tris-HCl 0,1 M pH: 8,0 (q.s.p.)	50 ml
Glucose-6-fosfato desidrogenase (G ₆ PDH)	10 µl

Mdh

DL-ácido málico 0,5 M pH: 8,0 (titular com NaOH)	0,04 ml
MTT ou NBT	1 ml (10 mg)
NAD	1 ml (10 mg)
PMS	1 ml (10 mg)
Tampão Tris- HCl 0,1 M pH: 8,5	50 ml

Prx

O-Dianisidina	30 mg
Etanol (p.a)	25 ml
Tampão Acetato de Sódio 0,1 M pH: 4,5	50 ml
Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂ - 3%)	1 ml
<ul style="list-style-type: none"> • Agitar o etanol e a dianisidina; adicionar o tampão acetato • incubar por 30' em estufa a 35° C • após os 30', adicionar 1 ml de H₂O₂ (3%) 	

Est**Solução A**

α-Naftil acetato	40 mg/1 ml de acetona 50%
Tampão Fosfato de Sódio 0,05 M pH: 6,0	40 ml

Solução B

Fast Garnet GBC	30 mg/2 ml N-propanol
Tampão Fosfato de Sódio 0,05 M pH: 6,0	40 ml
<ul style="list-style-type: none"> • Imergir o gel na solução A por 20'; em seguida adicionar a solução B. 	

6Pgdh

Ácido 6-fosfogluônico	20 mg
NADP ⁺ , Na ₂	1 ml (10 mg)
MTT ou NBT	1 ml (10 mg)
PMS	1 ml (1 mg)
MgCl ₂ (1%)	1 ml (10 mg)
Tampão Tris-HCl 0,1 M pH: 8,0 (q.s.p.)	50 ml

Acp

α-Naftil Fosfato de Sódio	50 mg
Fast Garnet GBC salt	50 mg
MgCl ₂ (1%)	1 ml (10 mg)
Tampão Acetato de Sódio 0,1 M pH: 5,0 (q.s.p.)	50 ml

Procedimento: Diluir os reagentes em seus respectivos tampões; adicionar a solução sobre os géis e incubá-los no escuro até o surgimento das bandas (aproximadamente 40 – 60 minutos.

Anexo II.1. Testes de diferenciação de frequências alélicas entre populações. Comparações de populações de *M. aquifolia* duas a duas (graus de liberdade do χ^2 entre parênteses).

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
	χ^2 104,9014 (16) 0,0000		χ^2 107,6605 (16) 0,0000		χ^2 89,3851 (16) 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
	χ^2 83,2344 (16) 0,0000		χ^2 74,3843 (16) 0,0000		χ^2 68,7785 (16) 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
	χ^2 75,9588 (16) 0,0000		χ^2 83,7805 (16) 0,0000		χ^2 66,9898 (16) 0,0000	
	Genebra vs. Japi		Arapoti adultos vs. Jovens		Japi adultos vs. jovens	
Pgi1	---	---	---	---	0,0915	0,0034
Pgi2	0,0161	0,0039	0,3852	0,0156	0,4491	0,0129
Acp1	0,0002	0,0001	0,5022	0,0047	0,6067	0,0059
Lap1	0,2510	0,0059	0,3251	0,0058	0,7379	0,0031
Prx1	0,0000	0,0000	0,4400	0,0158	0,6859	0,0129
Mdh1	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,5897	0,0060
Mdh2	0,2222	0,0075	0,1894	0,0046	0,8122	0,0040
Est1	0,0000	0,0000	0,0545	0,0066	0,7343	0,0080
6Pg2	0,1890	0,0028	---	---	---	---
	χ^2 74,5869 (16) 0,0000		χ^2 16,3245 (14) 0,2940		χ^2 10,8370 (16) 0,8194	

* p probabilidade exata e ** erro padrão (S.E.) obtidos por rotina do programa TFGA (Miller, 1997).

Anexo II.2. Testes exatos para comparações de frequências alélicas entre populações de *M. aquifolia* e *M. ilicifolia*. Comparações de populações duas a duas e entre grupos. (Graus de liberdade do χ^2 entre parênteses).

loco	p *	S.E. **	p	S.E.	p	S.E.
	Caetetus vs. <i>M. ilicifolia</i>		Arapoti vs. <i>M. ilicifolia</i>		Saibadela vs. <i>M. ilicifolia</i>	
Pgi1	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000
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
	χ^2 90,8435 (18) 0,0000		χ^2 105,0782 (18) 0,0000		χ^2 97,2216 (18) 0,0000	
	Genebra vs. <i>M. ilicifolia</i>		Japi vs. <i>M. ilicifolia</i>		Todas as populações	
Pgi1	1,0000	0,0000	0,5329	0,0032	0,2627	0,0074
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
	χ^2 56,4421 (18) 0,0000		χ^2 94,8001 (18) 0,0000		χ^2 158,9321 (18) 0,0000	

Comparações entre grupos

	(Caetetus) vs. (Arapoti, Saibadela, Genebra, Japi)		(Saibadela) vs. (Caetetus, Arapoti, Genebra, Japi)		<i>(M. ilicifolia)</i> vs. (Caetetus, Arapoti, Saibadela, Genebra, Japi)	
Pgi1	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000
Pgi2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Acp1	0,0000	0,0000	0,0160	0,0034	0,0030	0,0010
Lap1	0,0014	0,0009	0,0078	0,0018	0,0253	0,0036
Prx1	0,0000	0,0000	0,4860	0,0219	0,0584	0,0079
Mdh1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6013	0,0116
Mdh2	0,0004	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Est1	0,3194	0,0192	0,5237	0,0237	0,1421	0,0172
6Pg1	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000
6Pg2	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0003	0,0002
	χ^2 147,4099 (20) 0,0000		χ^2 107,7665 (20) 0,0000		χ^2 103,8316 (20) 0,0000	

* p probabilidade exata e ** erro padrão (S.E.) obtidos por rotina do programa TFPGA (Miller, 1997).

AnexoIII. Coeficientes para deficiência ou excesso de heterozigotos para as cinco populações de adultos de *M. aquifolia*.

Loco	H _o	H _e	F	D	ξ ₂	P
Caetetus						
PGI2	23	21,329	-0,078	0,078	0,41	0,5226
ACP1	10	15,086	0,337	-0,337	3,98	0,0461
MDH2	0	17,143	1,000	-1,000	35,00	0,0000
EST1	4	17,029	0,765	-0,765	24,28	0,0000
Arapoti						
PGI2	23	34,018	0,324	-0,324	12,92	0,0003
ACP1	6	13,673	0,561	-0,56	17,32	0,0000
LAP1	8	13,673	0,415	-0,415	9,47	0,0021
PRX1	11	27,936	0,606	-0,606	23,62	0,0000
MDH1	3	2,918	-0,028	0,028	0,04	0,8353
MDH2	1	2,936	0,659	-0,659	36,15	0,0000
EST1	16	33,591	0,524	-0,524	26,23	0,0000
Saibadela						
PGI2	17	25,103	0,323	-0,323	10,56	0,0012
ACP1	12	16,038	0,252	-0,252	3,21	0,0731
LAP1	5	6,486	0,229	-0,229	3,08	0,0793
PRX1	12	18,615	0,355	-0,355	5,76	0,0164
MDH1	13	200,833	0,376	-0,376	6,77	0,0092
MDH2	18	22,833	0,212	-0,212	3,11	0,0779
EST1	7	18,284	0,617	-0,617	20,29	0,0000
S.Genebra						
PGI2	16	17,065	0,062	-0,062	0,28	0,5965
LAP1	0	6,857	1,000	-1,000	28,00	0,0000
PRX1	6	5,308	-,130	0,130	0,44	0,5060
MDH1	4	5,280	0,242	-0,242	1,47	0,2255
MDH2	12	11,520	-0,042	0,042	0,04	0,8350
EST1	5	15,673	0,681	-0,681	20,47	0,0000
6PG2	2	1,929	-0,037	0,037	0,04	0,8446
Japi						
PGI2	19	23,811	0,202	-0,202	3,95	0,0469
ACP1	9	10,716	0,160	-0,160	0,95	0,3300
LAP1	1	4,653	0,785	-0,785	22,19	0,0000
PRX1	9	20,284	0,556	-0,556	15,08	0,0001
MDH1	8	8,649	0,075	-0,075	0,21	0,6482
MDH2	9	14,122	0,363	-0,363	4,87	0,0274
EST1	10	12,311	0,188	-0,188	1,64	0,2003

* estimativa não viesada de Nei