

## CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Ilex paraguariensis* St. Hil.

WENDT, S. N.<sup>1,2</sup>; SOUSA, V. A.<sup>2</sup>; QUOIRIN, M.<sup>1</sup>; STURION, J. A.<sup>1</sup>; SANTOS E. C. S.<sup>2</sup>

### RESUMO

*Ilex paraguariensis*, popularmente conhecida como erva-mate, é uma espécie de grande importância econômica, social e cultural para a região Sul do Brasil. Devido à composição química das folhas, possui diversas aplicações industriais, destacando-se a produção de bebidas. Apesar de sua expressão socioeconômica, existe pouca informação sobre a biologia e a variabilidade genética das populações naturais. Estes conhecimentos são essenciais aos programas de melhoramento e de conservação dos recursos genéticos. Marcadores bioquímicos (isoenzimas) são amplamente utilizados nos estudos da genética de populações florestais, pois oferecem diversas vantagens, destacando-se a expressão codominante, que permite distinguir genótipos homocigotos de heterocigotos. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar, geneticamente, populações naturais de *I. paraguariensis*, utilizando marcadores isoenzimáticos. Três populações naturais (Quatro Barras-PR, Jaguariaíva-PR e Barão de Cotegipe-RS) foram analisadas, utilizando sete locos gênicos: *GOT-A*, *PGI-B*, *NDH-A*, *NDH-B*, *6-PGDH-A*, *6-PGDH-B* e *G-6PDH*. Observaram-se 65% dos locos polimórficos, com média de 2,00 alelos por loco e 2,54 alelos por loco polimórfico. A média da heterocigosidade esperada foi de 0,359 e a observada foi de 0,210. As populações de Quatro Barras e Jaguariaíva apresentaram maior similaridade genética, enquanto que Barão de Cotegipe foi a mais divergente.

Palavras-chave: erva-mate, estrutura genética, isoenzimas.

## GENETIC CHARACTERIZATION IN NATURAL POPULATIONS OF *Ilex paraguariensis* St. Hil.

### ABSTRACT

*Ilex paraguariensis*, also known as “erva-mate”, is a species that plays important economic, social and cultural roles in southern Brazil. Diverse industrial application of its leaves is possible, especially for tea production. In spite of its social and economic expression, there is only a few information on the biology and on genetic variation of natural populations. These knowledge can be useful as a guide for breeding and genetic conservation programs. Biochemical markers (isozymes) have been widely applied in forest population genetics studies, especially due to their co-dominant nature, allowing to recognize heterozygote and homozygote genotypes. The present work had the objective to study the population genetic aspects of *Ilex paraguariensis* in natural populations by using isozymes markers. Three natural populations (Quatro Barras-PR, Jaguariaíva-PR and Barão de Cotegipe-RS) were examined, using seven gene loci: *GOT-A*, *PGI-B*, *NDH-A*, *NDH-B*, *6-PGDH-A*, *6-PGDH-B* and *G-6PDH*. Sixty-five percent of loci were polymorphic; the average number of alleles per locus

---

<sup>1</sup>Universidade Federal do Paraná-UFPR; <sup>2</sup>Embrapa Florestas-CNPq, Estrada da Ribeira, Km 111, Caixa Postal 319, CEP: 83411-000. Colombo-PR-Brasil. Fone: (41) 666-1313 Fax: (41) 666-1276. Endereço eletrônico: snwendt@hotmail.com

was 2.00 and the average number of alleles per polymorphic locus were 2.54. The mean expected and observed heterozygosities were 0.359 and 0.21, respectively, showing a slight excess of homozygotes. Quatro Barras and Jaguariaíva populations showed the greatest genetic similarity, while Barão de Cotegipe was divergent from the others.

Key-words: “erva-mate”, genetic structure, isozymes.

## INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), é uma espécie arbórea, típica das regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, sendo encontrada no Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai, ocupando 5% do território nacional e 3% da América do Sul. Ela desempenha importante papel sócio-econômico, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Sua principal utilização é na produção de bebidas, mas apresenta grande potencial para outras aplicações industriais como corante, conservante alimentar, medicamentos, produtos de higiene e cosméticos (Maccari Junior, 2000).

Embora seja uma cultura de grande expressão, existe pouca informação sobre a biologia e a estrutura genética das populações naturais da erva-mate. O conhecimento sobre a quantidade e a distribuição da variabilidade é indispensável no delineamento dos programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos da espécie.

Diversos fatores podem influenciar a estrutura genética das populações naturais, destacando-se a amplitude geográfica e o fluxo gênico, sendo este dependente do sistema reprodutivo e da taxa de sexo em espécies dióicas. Como a erva-mate ocorre em uma ampla região geográfica, espera-se encontrar variabilidade entre populações, como resultado da adaptação local. A amplitude geográfica tem sido considerada um dos principais fatores que influenciam a variabilidade das espécies lenhosas.

A erva-mate apresenta dioicia críptica, flores diclinas com um dos sexos abortivos (Ferreira et al., 1983), implicando em fecundação cruzada obrigatória. A proporção de sexo também desempenha um papel importante no fluxo gênico, pois exerce influência direta sobre o tamanho efetivo da população (Silvertown & Doust, 1993) e deve ser considerada na reprodução da erva-mate.

Marcadores isoenzimáticos são amplamente utilizados em estudos clássicos de genética de populações, pois apresentam custo relativamente baixo e a expressão codominante, que permite diferenciar genótipos homozigotos de heterozigotos (Berg & Hamrick, 1997) e tem sido efetivos como indicadores da diversidade genética dentro e entre populações de espécies lenhosas (Bergmann & Hattemer, 1998). O presente trabalho teve por objetivo caracterizar, geneticamente, três populações naturais de *I. paraguariensis*, utilizando marcadores isoenzimáticos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material vegetal*

Coletaram-se amostras de folhas jovens de 50 indivíduos (25 machos e 25 fêmeas) em três populações naturais, sendo duas do Paraná (Quatro Barras e Jaguariaíva) e uma do Rio Grande do Sul (Barão de Cotegipe) (Tabela 1).

TABELA 1. Coordenadas geográficas das populações naturais de *I. paraguariensis* utilizadas no estudo com marcadores isoenzimáticos.

População	Altitude (m)	Latitude (S)	Longitude (W)
Quatro Barras-PR	904	25° 22'	49 <sup>0</sup> 04'
Barão de Cotegipe-RS	683	27° 37'	52° 22'
Jaguariaíva-PR	827	24° 15'	49 <sup>0</sup> 42'

### *Eletroforese*

As folhas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, adicionou-se 0,02 g de PVPP e o tampão de extração, contendo 1% de mercaptoetanol, 6,0 g de PVP, 5,0 g de sacarose, 0,15 g de Na<sub>2</sub>EDTA, 0,4 g de DTT e 0,15 g de BSA, dissolvidos em 100 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5. A eletroforese foi realizada em gel horizontal de amido (12,97 % penetrose e 1,35 % sacarose). Os sistemas de tampão do gel e do eletrodo utilizados foram: Ashton (pH 8,1), para GOT (Glutamato oxaloacetato transaminase) e PGI (Fosfoglucose isomerase) e Tris-citrato (pH 7,5) para NDH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase), 6-PGDH (6-fosfogluconato desidrogenase) e G-6PDH (Glucose-6-fosfato desidrogenase). Os locos gênicos analisados foram *GOT-A*, *PGI-B*, *NDH-A*, *NDH-B*, *6-PGDH-A*, *6-PGDH-B* e *G-6PDH-A*.

### *Medidas de variabilidade*

Os dados obtidos foram analisados através dos programas BYOSIS (Swofford & Selander, 1997) e GSED (Gillet, 1998). As árvores de distância genética (Nei, 1972 e Gregorius, 1974) foram construídas através do NTSYS (Rohlf, 1992).

A variação genética foi analisada utilizando as seguintes medidas: número de alelos por locos ( $A/L$ ), número de locos polimórficos ( $P$ ), diversidade genética ( $\nu$ ) (Gregorius, 1987), diversidade gamética ( $\nu_{gam}$ ) (Gregorius, 1978), heterozigosidade observada ( $H_a$ ) e esperada ( $H_e = \delta_T$ ) (Gregorius, 1987). A diferenciação genética das populações foi verificada utilizando a estatística-F (Wright, 1965), baseada na medida de quanto as frequências genotípicas desviam da esperada, em três níveis hierárquicos, para a espécie ( $T$ ), população ( $S$ ) e indivíduo ( $I$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Estrutura alélica*

As três populações apresentaram grande divergência na estrutura genética (Tabela 2). O loco *GOT-A*, apresentou três alelos, sendo  $A_2$  o mais freqüente. O loco gênico *PGI-B* apresentou um grande número de alelos (cinco), sendo  $B_2$  o mais freqüente, seguido do  $B_1$ , na três populações. Todavia, na população de Jaguariaíva, a sua frequência foi maior (0,563), comparativamente a Quatro Barras (0,370) e Barão de Cotegipe (0,350). Os alelos  $B_4$  e  $B_5$  foram raros, principalmente nas populações de Barão de Cotegipe e Jaguariaíva. O alelo *NDH-A<sub>3</sub>* apareceu somente em Barão de Cotegipe. O loco *NDH-B* apresentou dois alelos, sendo *NDH-B<sub>2</sub>* o mais freqüente. Nos locos *6-PGDH-A* e *6-PGDH-B*, os alelos mais freqüentes, em todas as populações, foram  $A_2$  e  $B_1$ . O alelo *G-6PDH-A<sub>1</sub>* predominou na população de Jaguariaíva, enquanto que *G-6PDH-A<sub>2</sub>* foi mais freqüente em Quatro Barras e

Barão de Cotegipe. *G-6PDH-A<sub>3</sub>* apareceu em baixa frequência na população de Quatro Barras.

TABELA 2. Estruturas alélicas em populações naturais de *I. paraguariensis* referentes a sete locos polimórficos.

Loco gênico	Alelo	Quatro Barras	Barão de Cotegipe	Jaguariaíva
<i>GOT-A</i>	1	0,076	0,115	0,045
	2	0,880	0,854	0,841
	3	0,043	0,031	0,114
<i>PGI-B</i>	1	0,290	0,280	0,219
	2	0,370	0,350	0,563
	3	0,180	0,310	0,167
	4	0,080	0,020	0,021
	5	0,080	0,040	0,031
<i>NDH-A</i>	1	0,213	0,094	0,152
	2	0,787	0,781	0,848
	3	0,000	0,125	0,000
<i>NDH-B</i>	1	0,106	0,090	0,102
	2	0,894	0,910	0,898
<i>6-PGDH-A</i>	1	0,213	0,140	0,080
	2	0,681	0,800	0,830
	3	0,106	0,060	0,090
<i>6-PGDH-B</i>	1	0,930	0,840	0,920
	2	0,070	0,160	0,080
<i>G-6PDH</i>	1	0,152	0,244	0,400
	2	0,826	0,600	0,356
	3	0,022	0,156	0,244

#### *Diversidade alélica*

O loco *6-PGDH-B* mostrou a mais baixa diversidade alélica, seguida pelo *GOT-A* (Tabela 3). A maior diversidade alélica foi encontrada no loco *PGI-B* em todas as populações. Com relação à média dos sete locos, a população de Barão de Cotegipe foi levemente superior às demais.

TABELA 3. Diversidade alélica ( $\nu$ ) de populações naturais de *I. paraguariensis*.

Origem	Loco gênico							Pool gênico
	<i>GOT-A</i>	<i>PGI-B</i>	<i>NDH-A</i>	<i>NDH-B</i>	<i>6-PGDH-A</i>	<i>6-PGDH-B</i>	<i>G-6PDH-A</i>	
Quatro Barras	1,277	3,757	1,504	1,235	1,923	1,150	1,416	1,515
Barão de Cotegipe	1,345	3,344	1,575	1,196	1,508	1,368	2,253	1,608
Jaguariaíva	1,385	2,542	1,346	1,224	1,422	1,173	2,889	1,529

#### *Varição genética*

As populações foram polimórficas em 65% dos locos analisados, com média de 2,00 alelos por loco e 2,54 alelos por loco polimórfico (Tabela 4). No estudo realizado por Palma-

Silva et al. (2000), utilizando os sistemas  $\alpha$  e  $\beta$ -esterase obtiveram apenas três locos, sendo todos polimórficos, com 3,79 alelos por loco. O valor de  $A/L$  obtido por esses autores pode ter sido superior em função da análise de um número restrito de locos, todos polimórficos. No presente estudo, o número de sistemas e locos analisados foi superior abrangendo, dessa forma, uma porção mais ampla do genoma.

A heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) foi de 0,359 e a observada ( $H_a$ ) de 0,210, mostrando um excesso de homozigotos. A população de Barão de Cotegipe apresentou superioridade nos diversos parâmetros analisados como número de alelos por loco ( $A/L$ ), diversidade alélica ( $\nu$ ), diversidade gamética ( $\nu_{gam}$ ), heterozigosidade observada ( $H_a$ ) e esperada ( $H_e$ ), quando comparada com Quatro Barras e Jaguariaíva. Estes resultados indicam que Barão de Cotegipe apresentou uma maior diversidade genética, apesar dos valores não serem tão discrepantes das outras duas populações.

TABELA 4. Medidas de variabilidade genética nas populações naturais de *I. paraguariensis*.

Origem	Tamanho ( $N$ )	Multiplicidade genética		Diversidade alélica	Diversidade gamética	Heterozigosidade	
		( $A/L$ )	( $P$ )	( $\nu$ )	( $\nu_{gam}$ )	( $H_a$ )	( $H_e$ )
Quatro Barras	50	1,950	0,650	1,515	27,893	0,213	0,344
Barão de Cotegipe	50	2,000	0,650	1,608	39,354	0,218	0,382
Jaguariaíva	50	1,950	0,650	1,529	27,936	0,199	0,350

#### *Diferenciação genética*

A estatística-F (Tabela 5) mostrou que, em relação a  $F_{IS}$ , que mede o desvio relativo entre a heterozigosidade observada e a esperada dentro de populações, os locos *NDH-B* e *6-PGDH-B* apresentaram valores negativos (-0,0343 e -0,0619, respectivamente), indicando um leve excesso de heterozigotos nesses locos. Todavia, a média de todos os locos foi positiva (0,4159), mostrando excesso de homozigotos nas populações estudadas.

Os valores de  $F_{ST}$  variaram amplamente, sendo de 0,0005 em *NDH-B* e 0,1007 em *6-PGDH-A*. A média foi de 0,0355, indicando baixa diferenciação genética entre as populações. A maior variabilidade ocorreu dentro de população (96,45%). Esses resultados são similares aos obtidos por Gauer & Cavalli-Molina (2000) que, utilizando a técnica RAPD, constataram que 85% da variabilidade da espécie é intrapopulacional e apenas 15% interpopulacional. Gregianini & Winge (2000) obtiveram resultados semelhantes, utilizando proteínas de reserva das sementes para verificar a variabilidade intra e interpopulacional.

Segundo Hamrick et al.(1992) os níveis de variação genética nas populações florestais podem ser explicadas pela sua história de vida e características ecológicas. Espécies como a erva-mate, que se distribuem em ampla região de ocorrência e são de reprodução alógama obrigatória, caracterizam-se por apresentar alta variabilidade genética e intenso fluxo gênico. Entretanto, a baixa divergência encontrada entre as populações analisadas pode ser devido à recente fragmentação das populações desta espécie, não havendo tempo suficiente para gerar significativa diferenciação genética.

Conforme os resultados obtidos, evidencia-se que, para fins de conservação do germoplasma, deve-se amostrar um maior número de indivíduos dentro de populações, a fim de assegurar uma maior representatividade da variabilidade genética da espécie.

TABELA 5. Estatística-F para os sete locos polimórficos nas populações naturais de *I. paraguariensis*.

Locos	$F_{IS}$	$F_{ST}$	$F_{IT}$
<i>GOT-A</i>	0,1599	0,0093	0,1677
<i>PGI-B</i>	0,1770	0,0222	0,1953
<i>NDH-A</i>	0,7366	0,0213	0,7422
<i>NDH-B</i>	-0,0343	0,0005	-0,0337
<i>6-PGDH-A</i>	0,4098	0,0195	0,04214
<i>6-PGDH-B</i>	-0,0619	0,0175	-0,0433
<i>G-6PDH-A</i>	1,000	0,1007	1,000
Média	0,4159	0,0355	0,4366

A diferenciação genética entre populações também foi examinada utilizando análises de agrupamento (Figuras 1 e 2). Conforme os dendrogramas, as populações de Quatro Barras e Jaguariaíva, do Paraná, apresentaram maior similaridade genética, enquanto que Barão de Cotegipe, do Rio Grande do Sul, foi a mais divergente. O grau de diversidade genética pode estar relacionado com a distância geográfica.

FIGURA 1. Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de Nei (1972), para as populações de Quatro Barras (QB), Barão de Cotegipe (BC) e Jaguariaíva (J).

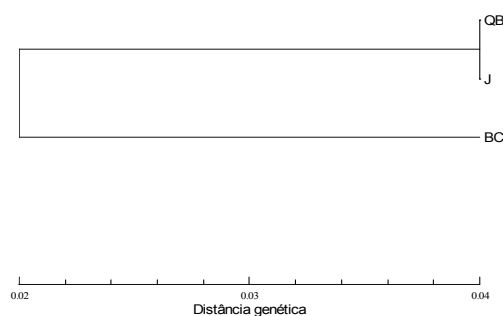
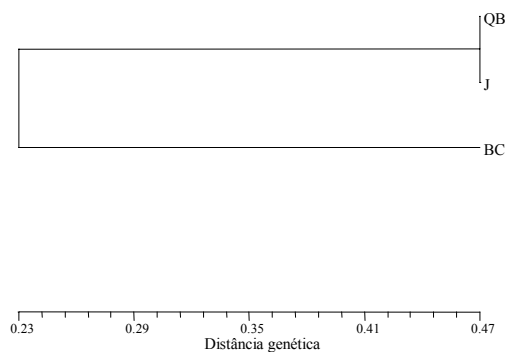


FIGURA 2. Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de Gregorius (1974) para as populações de Quatro Barras (QB), Barão de Cotegipe (BC) e Jaguariaíva (J).



## CONCLUSÕES

A maior variabilidade genética da erva-mate encontra-se dentro das populações, podendo estar relacionada à característica reprodutiva da espécie (alógama), que permite intenso fluxo gênico entre populações. Embora a espécie possua uma ampla região de ocorrência natural, a baixa divergência entre as populações pode ser devido ao recente isolamento, provocado pelo extrativismo e degradação das florestas.

A diversidade genética entre as populações da região norte e sul de ocorrência natural, evidenciam o efeito da distância geográfica, refletindo o histórico dessas populações.

## AGRADECIMENTOS

O trabalho contou com o apoio financeiro do CNPq-Brasil e da Embrapa Florestas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal of Forest Research**, Canada, v.27, n. 3, p. 415-424, mars. 1997.
- BERGMANN, F.; HATTEMER, H. H. Isozymes in forest genetics research. In: MANDAL, A. K.; GIBSON, G. L. (eds.) **Forest Genetics Tree Breeding**. CBS Publishers & Distributors, New Dehli, 1998. p.227-238
- FERRREIRA, A. G.; KASPARY, R.; FERREIRA, H. B.; ROSA, L. M. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis*. St. Hil. **Brasil Florestal**, Brasília, n. 53, p. 29-33, 1983.
- GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, S. Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. **Heredity**, London, v. 84, p. 647-656, 2000.
- GILLET, E. M. GSED: Genetic Structures from Eletrophoresis data, Version 1.1 User's manual. Institut Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Universität Göttingen. Germany. 1998. <http://www.uni-forst.gwdg.de/forst/fg/index.htm>
- GREGIANINI, T.S.; WINGE, H. Variabilidade de proteínas de reserva em populações naturais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae). In: II CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE E III REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, 2000, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: Edição dos Organizadores, 2000. p. 373-377.
- GREGORIUS, H. R. Genetischer abstand zwischen populationen. I. Zur Konzeption der genetischen abstandmessung. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 23, p.22-27, juni. 1974.
- GREGORIUS, H. R. The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. **Mathematical Bioscience**, Göttingen, v. 41, p. 253-271, 1978.
- GREGORIUS, H. R. The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 74, Berlin, p. 397-401, 1987.
- HAMRICK, J. L.; GODT, M. J.; SHERMAN-BROYLES, S. L. Factors influencing levels of genetic diversity in wood plant species. **New Forest**, v. 6, n. 1/4, Dordrecht, p. 95-124, 1992.
- MACCARI JUNIOR, A. (Coord.). **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba: Câmara Setorial de Cadeia Produtiva da Erva-mate, 2000. 160 p. (Série PDACT, 1).
- NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, Illinois, p. 283-292, 1972.

PALMA-SILVA, C.; WOLLHEIM, C.; WINGE, H. Variabilidade isoenzimática intra e interpopulacional em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). In: II CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE E III REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, 2000, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: Edição dos Organizadores, 2000. p. 381-385.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Software, New York. 1992.

SILVERTOWN, J. W.; DOUST, J. L. **Introduction to Plant Population Biology**. Blackwell Science Ltd. Oxford, 1993. 210 p.

SWOFFORD, D. L., SELANDER, R. B. BIOSYS-2: A Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Genetics. User's Manual. Department of Genetics and Development, Univ. of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois. USA. 1997. IGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**. v. 29, Lawrence, p. 395-420, 1965.