

Esterases no exame da estrutura populacional de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae).

Aylton Saturnino TEIXEIRA¹, Lena da Silva CHAVES², Kaoru YUYAMA¹

RESUMO

Dois sistemas enzimáticos (esterase e esterase-D), analisados pela técnica de eletroforese em gel de amido, em folhas jovens de plantas cultivadas em terra firme, de sementes provenientes de três amostras de populações naturais de camu-camu, *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae, procedentes de Iquitos, Boa Vista e Uatumã, revelaram a presença de 6 locos: Est-1, Est-2, Est-3, Est-4, Est-D1 e Est-D2. Dois dos seis locos gênicos examinados no presente estudo (Est-3 e Est-D2) mostraram-se polimórficos, sendo desse modo considerados valiosos no estudo de caracterização da estrutura populacional da espécie. Os padrões de polimorfismo revelados nos locos Est-3 e Est-D2 de camu-camu, são típicos de enzimas monoméricas e diméricas, respectivamente. O loco Est-3 apresentou um grande desbalanço genético dentro e entre as amostras populacionais examinadas, devido ao excessivo número observado de plantas heterozigóticas em relação ao número esperado. O loco Est-D2 apresentou um polimorfismo exclusivo para os alelos Est-D2¹, Est-D2² e Est-D2³, e um bom balanço genético na amostra populacional de Uatumã. Em função disso, dentre os demais locos gênicos aqui investigados, o loco Est-D2 parece ser o mais adequado para identificação e delimitação de prováveis estoques de camu-camu. Portanto, recomenda-se que esse loco esteja presente na lista dos marcadores isoenzimáticos a serem usados em futuras prospecções sobre genética populacional dessa espécie na região amazônica. Dados sobre a distribuição das freqüências alélicas, estimativas das distâncias genéticas, e estimativas de variação genética nos 6 locos de esterases examinados, foram eficazes na demonstração de diferenças genéticas entre as amostras populacionais examinadas da espécie. Os maiores valores de heterozigidade média (0,1353); proporção de locos polimórficos (0,33) e número médio de alelos por loco (1,33) revelados na amostra populacional de Uatumã, devem-se ao fato dessa amostra ter apresentado um loco polimórfico a mais (Est-D2), em relação as demais amostras investigadas.

PALAVRAS-CHAVE

Camu-camu (*Myrciaria dubia*), estrutura populacional, esterases (esterase e esterase-D), isoenzimas

Esterases for examining the population structure of Camu-camu (Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh-Myrtaceae).

ABSTRACT

Two enzymatic systems (esterase and esterase-D), analysed by using the starch gel electrophoresis technique on young plant leaves cultivated in higher land (terra firme), from seeds of camu-camu, *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae obtained from three natural population samples (Iquitos, Boa Vista and Uatumã) revealed 6 loci: Est-1, Est-2, Est-3, Est-4, Est-D1 and Est-D2. Two of the six gene loci presently examined (Est-3 and Est-D2) showed to be polymorphic, which makes them valuable for characterizing the species population structure. The polymorphism patterns shown in the Est-3 and Est-D2 loci of camu-camu, are typical of monomeric and dimeric enzymes, respectively. The locus Est-3 showed a huge genetic imbalance within and among the population samples examined, due to an excessive observed number of heterozygote plants compared to their expected numbers. The locus Est-D2 showed an exclusive polymorphism for the alleles Est-D2¹, Est-D2² and Est-D2³, and a good genetic balance in the Uatumã population sample. Therefore, among all gene loci investigated here, Est-D2 seems to be the most suitable locus for identifying and delimiting probable camu-camu stocks. Hence, this locus has to be present in the list of the isoenzymatic markers for future research on the species population genetics in the Amazon region. Data on allelic frequency distribution, genetic distance and genetic variation estimates of the 6 esterase loci investigated, were effective for demonstrating genetic differences among the surveyed species population samples. The highest values of mean heterozygosity (0.1353); proportion of polymorphic loci (0.33) and average number of alleles per locus (1.33) revealed in the Uatumã population sample, are due to the presence of an extra polymorphic locus (Est-D2) when compared with other surveyed samples.

KEY WORDS

Camu-camu (*Myrciaria dubia*), population structure, esterases (esterase and esterase-D), isoenzymes

¹ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Av. André Araújo, 2936, Petrópolis, 69083–000, Manaus, AM, Brasil. saturn@inpa.gov.br

² Bolsista do CNPq, modalidade DTI

INTRODUÇÃO

O camu-camu, *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae, é uma espécie silvestre com aparente distribuição indo da região central do estado do Pará, passando pelo médio e alto rio Amazonas, até a parte oriental do Peru, ao longo do rio Casiquiare e grande porção da alta e média bacia do rio Orinoco; onde quer que seja encontrada a espécie, parece ser uma planta de beira de rio e ilhas (McVaugh, 1969). A maior concentração das populações e diversidade da espécie é encontrada na Amazônia peruana, ao longo dos rios Ucayali e Amazonas e seus afluentes (Villachica, 1966), principalmente às margens do rio Supay (tributário do baixo Ucayali), e do rio Nanay (tributário do alto Amazonas) (Mendonza *et al.*, 1989). Nos estados do Amazonas, Rondônia e Roraima, o camu-camu é encontrado naturalmente (Chávez Flores, 1988) porém, não tão freqüente e abundante como se observa ao longo dos rios e lagos da Amazônia peruana, onde são encontradas grandes populações nativas quase monoespecíficas (Peters e Vasquez, 1987).

Das Mirtáceas cultivadas na Amazônia, o camu-camu é uma espécie que vem despertando grande interesse na área nutricional, devido ao alto teor de Vitamina C (ácido ascórbico) encontrado nos frutos: 2.950 mg em 100g de polpa (Andrade *et al.*, 1991), excedendo em muito aos apresentados pela maioria das plantas cultivadas no Brasil. O fruto dessa espécie é muito usado no preparo de refresco, sorvete, picolé, geléia, licor caseiro, xarope, xampu e marmelada. No entanto, devido a sua elevada acidez, dificilmente são consumidos *in natura*.

Em termos taxonômicos o camu-camu precisa de investigações mais acuradas, devido a existência de inúmeros variantes morfológicos na espécie. Há indícios de ocorrência de pequenas populações de diferentes ecótipos em toda bacia do rio Solimões/Amazonas, chamando-se atenção para a existência de um tipo arbustivo e outro arbóreo, com status taxonômico ainda não definido.

O estudo de marcadores moleculares (isoenzimas e DNA), tem colaborado de forma significativa como ferramenta auxiliar na definição do status taxonômico e populacional de várias espécies vegetais e animais (Ferguson, 1980; Torggler *et al.*, 1995; Alfenas, 1998; Ferreira e Grattapaglia, 1998). Dos vários marcadores moleculares disponíveis na atualidade, as isoenzimas pela relativa simplicidade, rapidez e baixo custo das análises em relação aos outros marcadores, têm gerado uma gama enorme de informações práticas na identificação de espécies, híbridos, populações naturais e cultivadas de diversos organismos vivos. As esterases, por apresentarem uma enorme diferenciação em seus padrões isoenzimáticos, têm sido amplamente usadas na identificação de espécies e cultivares de importância agrônômica tais como: ervilha, *Pisum sativum* L. (Coelho *et al.*, 1991); moranga, *Cucurbita maxima* (Amaral Júnior *et al.*, 1994); acerola, *Malpighia glabra* L. (Freitas *et al.*, 1995); couve-manteiga, *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D. C. (Sawazaki *et al.*, 1997); soja,

Glycine max L. Merrill, e feijão, *Phaseolus vulgaris* L. (Anti, 2000), entre outras. A identificação correta de camu-camu tanto em nível morfológico, quanto em nível genético-molecular, deverá contribuir de modo decisivo para os programas de conservação e melhoramento genético da espécie. O presente trabalho, apresenta o potencial das isoenzimas de esterase e esterase-D na caracterização da estrutura populacional, identificação e delimitação de prováveis estoques de camu-camu na região amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção dos extratos protéicos e posterior análise eletroforética dos sistemas enzimáticos (esterase e esterase-D), foram coletadas folhas jovens de camu-camu de 24 plantas da Fazenda Yurican, Km 100 da Rodovia AM-010, cultivadas de sementes provenientes de uma população natural de Iquitos-Peru; e de 60 plantas do banco de germoplasma do setor de hortaliças da CPCA-INPA, Km 14 da Rodovia AM-010, sendo 30 cultivadas de sementes provenientes de uma população natural de São Sebastião do Uatumã-AM, e 30 cultivadas de sementes provenientes de uma população natural de Boa Vista-RR. As distâncias aproximadas em linha reta entre Iquitos e Boa Vista; Iquitos e São Sebastião do Uatumã e Boa Vista e São Sebastião do Uatumã são de 1.562, 1.686 e 666 Km, respectivamente, com uma distância média de 1.305 Km. Todas as plantas foram cultivadas em terra firme.

A solução para a extração de esterases, foi preparada de acordo com a metodologia descrita por Alfenas *et al.* (1991). Em um almofariz de porcelana previamente congelado, 200 mg de folhas recém coletadas foram trituradas, adicionando-se sempre uma pitada de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) em 2,40 ml de solução extratora gelada. Após a trituração, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio de 5 ml e centrifugadas a 3.000 rpm por 20 minutos. Os sobrenadantes protéicos foram rapidamente transferidos com auxílio de pipetas tipo Pasteur, para outros tubos de ensaio de 5ml e armazenados a -20 °C, até o momento das análises eletroforéticas.

Géis de amido da Sigma a 13% foram preparados adicionando-se 280 ml do tampão do gel, contendo 2,80 ml do tampão da cuba. Tanto para análise eletroforética de esterase, quanto para esterase-D, o tampão do gel foi preparado com Tris (hydroxymethyl-aminomethane) 0,03 M e ácido cítrico 0,005 M. O tampão das cubas para os dois sistemas enzimáticos examinados, foi feito com hidróxido de lítio a 0,06 M e ácido bórico 0,30 M de acordo com Ridgway *et al.*, (1970). O amido foi cozido em um balão de fundo redondo de 2 litros por meio de agitação contínua, com auxílio de um agitador mecânico, até o ponto de ebulição. Os extratos de proteínas solúveis foram absorvidos em pedaços retangulares de papéis de filtro da Whatman 3 MM (8 mm x 6 mm), e inseridos nos géis. A eletroforese foi conduzida a 150 V durante 3 horas e 30 minutos, com a migração eletroforética ocorrendo em direção ao anodo.

A solução de coloração para esterase foi preparada com 3,00 ml de α -nafil acetato 1%, dissolvido em acetona 50%; 100 mg do corante fast blue RR salt e 100 ml de tris-HCl 0,05M, pH 7,10, ajustado com uma solução de Na OH 0,10 M (Alfenas *et al.*, 1991). Para esterase-D, a solução de coloração foi preparada de acordo com o método de Hopkinson *et al.*, (1973), em que 10mg de 4-metil umbeliferil acetato foi dissolvido em 5 ml de acetona. Em seguida essa mistura foi lentamente adicionada a 100ml de tampão acetato (acetato de sódio 0,05 M, pH 5,20, ajustando-se o pH com ácido acético glacial). Uma pequena quantidade da solução de coloração foi colocada sobre o gel, e a visualização das bandas foi feita sob a incidência de luz ultravioleta, com auxílio de uma câmara de UV.

O programa Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) desenvolvido por Miller (1997), foi usado para realizar as seguintes análises estatísticas nos locos de esterases detectados em camu-camu: 1. análise descritiva para estimativa das frequências alélicas e heterozigosidade média; 2. teste de verossimilhança máxima (G) assumindo-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg; 3. estimativa das distâncias genéticas segundo o método de Rogers (1972), modificado por Wright (1978); 4. análise de agrupamento das distâncias genéticas usando o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Arithmetic Average); e 5. testes exatos para diferenciação populacional segundo Raymond e Rousset (1995).

RESULTADOS

Dois sistemas enzimáticos (esterase e esterase-D), analisados pela técnica de eletroforese em gel de amido, em folhas jovens de 84 plantas cultivadas em terra firme,

de sementes procedentes de três amostras de populações naturais de camu-camu (Iquitos, Boa Vista e Uatumã) revelaram a presença de 6 locos: Est-1, Est-2, Est-3, Est-4, Est-D1 e Est-D2. Os padrões isoenzimáticos observados em esterase são apresentados na Figura 1.

Uma análise detalhada na distribuição das frequências alélicas (Tabela 1, Figura 2), mostra um monomorfismo nos locos: Est-1, Est-2, Est-4 e Est-D1 para os alelos Est-1¹, Est-2¹, Est-4¹ e Est-D1¹, nas três amostras populacionais examinadas (Iquitos, Boa Vista e Uatumã). Em duas amostras populacionais (Iquitos e Boa Vista), o loco Est-D2 mostrou-se monomórfico para o mesmo alelo Est-D2². O loco Est-3 revelou polimorfismo para os alelos Est-3¹ e Est-3² nas três

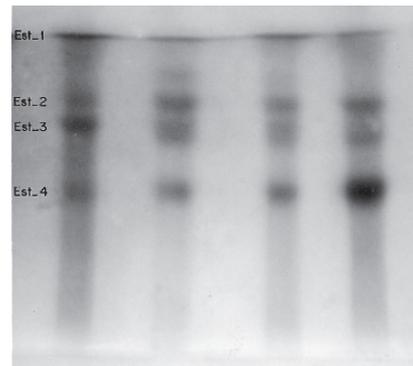


Figura 1 - Padrões da enzima esterase revelados nos locos monomórficos (Est-1, Est-2 e Est-4) e no loco polimórfico (Est-3) em camu-camu (*Myrciaria dubia*). Da esquerda para direita os genótipos revelados em Est-3 são: Est-3¹¹, Est-3¹², Est-3²² e Est-3²².

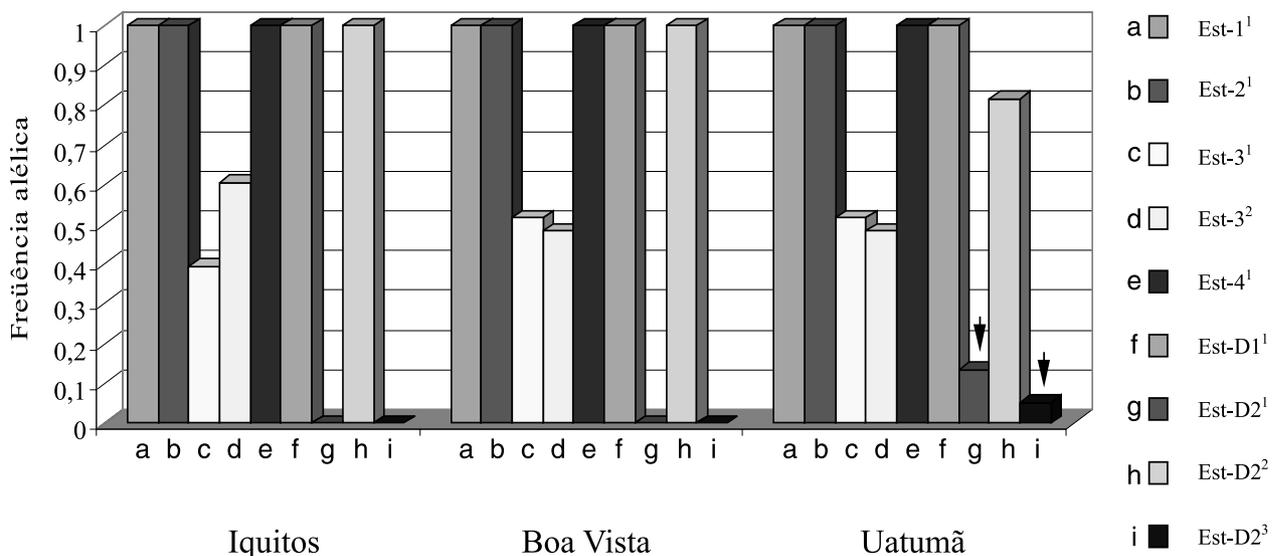


Figura 2 - Representação gráfica da distribuição das frequências alélicas reveladas em seis locos de esterases (esterase e esterase-D), em três amostras populacionais de camu-camu (*Myrciaria dubia*). As setas indicam os alelos exclusivos detectados na amostra populacional de Uatumã.

Tabela 1 - Frequências alélicas observadas em seis locos de esterases (esterase e esterase-D), em três amostras populacionais de camu-camu (*Myrciaria dubia*).

	Amostras populacionais			Total
	Iquitos ¹ N=24	Boa Vista ² N=30	Uatumã ³ N=30	
Frequências alélicas em Esterase				
Est-1 ¹	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Est-2 ¹	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Est-3 ¹	0,3958	0,5167	0,5167	0,4821
Est-3 ²	0,6042	0,4833	0,4833	0,5179
Est-4 ¹	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Frequências alélicas em Esterase-D				
Est-D1 ¹	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Est-D2 ¹	0,0000	0,0000	0,1333	0,0476
Est-D2 ²	1,0000	1,0000	0,8167	0,9345
Est-D2 ³	0,0000	0,0000	0,0500	0,0179

¹ Plantio comercial da Fazenda Yurican, Km 100 da Rodovia AM-010

^{2,3} Banco de germoplasma do Setor de Hortaliças da CPCA-INPA, Km 14 da Rodovia AM-010

amostras populacionais, enquanto que o loco Est-D2 apresentou polimorfismo para os alelos Est-D2¹, Est-D2² e Est-D2³ somente na amostra populacional de Uatumã. Em suma, do total de nove alelos detectados nos seis locos examinados (Est-1¹, Est-2¹, Est-4¹, Est-3¹, Est-3², Est-D1¹, Est-D2¹, Est-D2² e Est-D2³), os alelos Est-D2¹ e Est-D2³ foram exclusivos da amostra populacional de Uatumã, com frequências alélicas de 0,1333 e 0,0500, respectivamente. Os padrões de polimorfismo revelados nos locos Est-3 e Est-D2 de camu-camu, são típicos de enzimas monoméricas e diméricas, respectivamente.

Para verificar o balanço gênico populacional, teste de verossimilhança máxima (G) assumindo-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 2) foi aplicado para se examinar a distribuição dos genótipos no loco Est-3. Diferenças estatísticas altamente significantes foram detectadas em todas as amostras populacionais testadas: Iquitos ($G_{(1)} = 13,5381$, $P < 0,001$), Boa Vista ($G_{(1)} = 34,1522$, $P < 0,001$) e Uatumã ($G_{(1)} = 34,1522$, $P < 0,001$), e também entre elas ($G_{(1)} = 53,2647$, $P < 0,001$). Esse grande desbalanço genético ocorreu devido ao excessivo número observado de plantas heterozigóticas, em relação ao número esperado em todas as amostras populacionais. Esse mesmo teste aplicado para se investigar a distribuição genotípica no loco Est-D2, apresentou um bom balanço genético na amostra populacional de Uatumã ($G_{(3)} = 1,9739$; $0,70 > P > 0,50$), e também entre todas as amostras populacionais testadas ($G_{(3)} = 2,9042$; $0,50 > P > 0,30$).

Tabela 2 - Teste de verossimilhança máxima (G) assumindo-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi aplicado para se examinar a distribuição dos genótipos nos locos polimórficos de esterases (Est-3 e Est-D2) em três amostras populacionais de camu-camu (*Myrciaria dubia*). () = Valores esperados.

	Amostras populacionais			
	Iquitos ¹ N=24	Boa Vista ² N=30	Uatumã ³ N=30	Total N=84
Genótipos em Est-3				
Est-3 ¹¹	0(3,76)	1(8,01)	1(8,01)	2(19,53)
Est-3 ¹²	19(11,48)	29(14,98)	29(14,98)	77(41,95)
Est-3 ²²	5(8,76)	0(7,01)	0(7,01)	5(22,53)
Frequências alélicas em Est-3				
Est-3 ¹	0,3958	0,5167	0,5167	0,4821
Est-3 ²	0,6042	0,4833	0,4833	0,5179
Teste de Hardy-Weinberg				
df	1	1	1	1
G	13,5381	34,1522	34,1522	53,2647
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

	Amostras populacionais			
	Iquitos ¹ N=24	Boa Vista ² N=30	Uatumã ³ N=30	Total N=84
Genótipos em Est-D2				
Est-D2 ¹¹	0	0	0(0,53)	0(0,1905)
Est-D2 ¹²	0	0	7(6,53)	7(7,4762)
Est-D2 ¹³	0	0	1(0,40)	1(0,1429)
Est-D2 ²²	24	30	20(20,01)	74(73,3601)
Est-D2 ²³	0	0	2(2,45)	2(2,8036)
Est-D2 ³³	0	0	0(0,08)	0(0,0268)
Frequências alélicas em Est-D2				
Est-D2 ¹	0,0000	0,0000	0,1333	0,0476
Est-D2 ²	1,0000	1,0000	0,8167	0,9345
Est-D2 ³	0,0000	0,0000	0,0500	0,0179
Teste de Hardy-Weinberg				
df	-	-	3	3
G	-	-	1,9739	2,9041
P	-	-	0,70-0,50	0,50-0,30

¹ Plantio comercial da Fazenda Yurican, Km 100 da Rodovia AM-010

^{2,3} Banco de germoplasma do Setor de Hortaliças da CPCA-INPA, Km 14 da Rodovia AM-010; df = Graus de liberdade

Considerando apenas a distribuição das frequências alélicas dos locos polimórficos (Est-3 e Est-D2) testes exatos de Raymond e Rousset (1995), aplicados para se checar

Tabela 3 - Testes exatos para análise de diferenciação populacional (Raymond e Rousset, 1995), baseados na distribuição das frequências alélicas dos locos polimórficos (Est-3 e Est-D2) em três amostras populacionais de camu-camu (*Myrciaria dubia*).

	Amostras populacionais		
	IQUITOS	Boa Vista	Uatumã
IQUITOS			
Boa Vista	2,77/0,596		
Uatumã	14,374/0,006	17,610/0,002	

Tabela 4 - Estimativa das distâncias genéticas de acordo com o método de Rogers (1972) modificado por Wright (1978), baseada nos locos de esterases detectados em três amostras populacionais de camu-camu (*Myrciaria dubia*).

	Amostras populacionais		
	IQUITOS	Boa Vista	Uatumã
IQUITOS			
Boa Vista	0,0493		
Uatumã	0,0832	0,0670	

diferenciação populacional entre as amostras populacionais de camu-camu, revelaram a possível existência de duas sub-populações: "Uatumã" e "IQUITOS/BoaVista" (Tabela 3). De fato, percebe-se uma diferença estatística significativa, quando a amostra populacional de Uatumã é comparada com as amostras populacionais de IQUITOS e Boa Vista ($\chi^2_{(4)} = 14,374$; $P = 0,006$; $\chi^2_{(4)} = 17,610$; $P = 0,002$, respectivamente), enquanto que nenhuma diferença estatística é detectada, quando as amostras populacionais de IQUITOS e Boa Vista são comparadas ($\chi^2_{(4)} = 2,77$; $P = 0,596$).

Tabela 5 - Resumo da variação genética observada em três amostras populacionais de camu-camu (*Myrciaria dubia*). () = Desvio padrão.

	Amostras populacionais			Total
	IQUITOS ¹ N=24	Boa Vista ² N=30	Uatumã ³ N=30	
Número de locos	6	6	6	6
Proporção de locospolimórficos ⁴	16 %	16 %	33 %	33 %
Número médio de alelos por loco	1,16	1,16	1,33	1,50
Heterozigosidade média	0,0797 (0,1952)	0,0832 (0,2038)	0,1353 (0,2178)	0,1039 (0,2000)

¹ Plantio comercial da Fazenda Yurican, Km 100 da Rodovia AM-010

^{2,3} Banco de germoplasma do Setor de Hortaliças da CPCA-INPA, Km 14 da Rodovia AM-010

⁴ Segundo os dois critérios de definição de polimorfismo ($P \leq 0,95$ ou $P \leq 0,99$)

A suspeita de existência dessas duas sub-populações de camu-camu, é também demonstrada comparando-se as distâncias genéticas estimadas pelo método de Rogers (1972), modificado por Wright (1978) entre as amostras populacionais examinadas (Tabela 4). A menor distância genética (0,0493), foi revelada entre as amostras populacionais de IQUITOS e Boa Vista, fazendo com que estas apareçam agrupadas no dendrograma (Figura 3) construído pelo método UPGMA, portanto, separadas da amostra populacional do Uatumã.

As estimativas de variação genética nos 6 locos das amostras populacionais de camu-camu entre as amostras populacionais examinadas (Tabela 5), apresentam mais uma vez a amostra populacional de Uatumã se destacando das demais. Os maiores valores de heterozigosidade média (0,1353); proporção de loci polimórficos (0,33) e número médio de alelos por loco (1,33) detectados na amostra populacional de Uatumã, devem-se ao fato dessa amostra ter apresentado um loco polimórfico a mais (Est-D2), em relação as demais amostras investigadas. Os elevados valores dos desvios padrões observados na (Tabela 5), são em decorrência do número bem maior de locos monomórficos revelados nas amostras, em relação aos polimórficos.

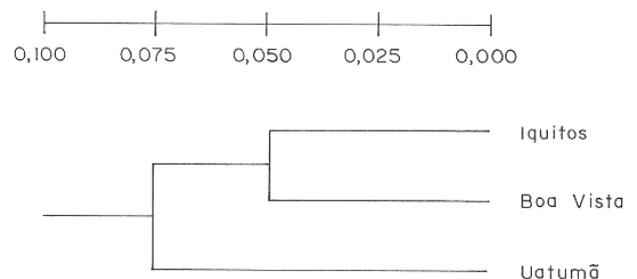


Figura 3 - Dendrograma gerado dos dados apresentados na Tabela 4, de acordo com o método UPGMA, baseado na estimativa das distâncias genéticas de Rogers (1972), modificada por Wright (1978), nos locos de esterases revelados nas amostras populacionais de camu-camu (*Myrciaria dubia*).

DISCUSSÃO

O conhecimento da distribuição das frequências alélicas em diversos marcadores isoenzimáticos polimórficos, constitui-se num pré-requisito básico para a identificação e delimitação dos estoques de plantas, ou de qualquer outro organismo. Obviamente se o objetivo no presente estudo, é caracterizar a estrutura populacional de camu-camu (*Myrciaria dubia*), para uma possível identificação e delimitação dos seus estoques naturais, torna-se necessário a inclusão entre os marcadores isoenzimáticos a serem examinados, àqueles que normalmente se apresentam polimórficos. Neste contexto, as esterases e outras enzimas não envolvidas no metabolismo celular (fosfatases, peroxidases, álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase), são bem apropriadas para alcançar o objetivo acima proposto, já que elas apresentam altas taxas de substituição de aminoácidos eletroforeticamente detectáveis em suas estruturas moleculares; respondem diretamente à diversidade ambiental; e revelam conseqüentemente uma maior variabilidade genética, quando comparadas a outros marcadores isoenzimáticos (Gillespie e Langley; 1974). De fato, inúmeros casos de polimorfismo em esterases já tem sido registrados numa elevada proporção de organismos das mais variadas espécies (Ferguson, 1980). Em plantas especificamente, padrões polimórficos de esterases já têm sido observados em ervilha, *Pisum sativum* L. (Oliveira, 1976); pinho, *Ponderosa pine* (Mitton *et al.*, 1979); dendê, *Elaeis guineensis*, Jacq. (Santos *et al.*, 1993); capim elefante, *Pennisetum purpureum* Schum. (Augustiini e Tcacenco, 1993); moranga, *Cucurbita maxima* (Amaral Junior *et al.*, 1994); couve manteiga, *Brassica oleraceae* L. var. *acephala* D. C. (Sawasaki *et al.*, 1997), entre outras. Do total de 6 locos gênicos examinados (1,50 alelos por loco), dois deles (33,33 %), *i.e.*, locos Est-3 e Est-D2, mostraram-se polimórficos, sendo desse modo considerados valiosos no estudo de caracterização populacional de camu-camu.

O grande desbalanço gênico revelado pelo loco Est-3, dentro e entre as amostras populacionais examinadas, devido ao excessivo número observado de plantas heterozigóticas, pode estar indicando um processo de seleção em favor dessas plantas, em detrimento das plantas homozigóticas. No entanto, isso só pode ser confirmado por meio de estudos experimentais. Em Myrtaceae, seleção em favor de plantas heterozigóticas em estudos alozímicos, tem sido observado em *Eucalyptus* (Moran e Brown, 1980; Eldridge e Griffin, 1983; Potts *et al.*, 1987).

O loco Est-D2, dentre os demais locos gênicos aqui analisados, por ter apresentado um polimorfismo exclusivo e um bom balanço genético na amostra populacional de Uatumã, indica ser o mais adequado para identificação e delimitação de prováveis estoques de camu-camu. Desse modo, recomenda-se que esse loco esteja na lista dos marcadores isoenzimáticos a serem utilizados, em futuras prospeções sobre genética populacional da espécie na região amazônica.

Considerando que o nosso propósito, não é estudar a filogenia molecular da espécie onde neste caso teríamos certamente que utilizar um grande número de locos (20 ou mais) incluindo locos monomórficos e polimórficos, a escolha não aleatória dos locos no presente estudo, torna-se perfeitamente aplicável.

Sabe-se que populações naturais de plantas localizadas no centro de distribuição geográfica "centro de origem" da espécie são mais densas, contínuas e apresentam uma maior variabilidade genética. Em contrapartida, as populações marginais (mais isoladas) são mais limitadas quanto ao livre fluxo gênico entre elas, sendo geneticamente menos variáveis (Hamrick e Godt, 1989). No caso específico de camu-camu, um amplo estudo sobre a distribuição das frequências alélicas de vários marcadores moleculares polimórficos incluindo isoenzimas e DNA (minisatélites e microsátélites), em amostras populacionais de várias áreas geográficas na Amazônia, poderá contribuir bastante na definição do centro de origem dessa espécie.

O valor da heterozigosidade média obtida nos locos de esterases examinados em camu-camu (0,1039), está dentro da faixa encontrada nas angiospermas florestais tropicais (0,1110) (Hamrick e Loveless, 1986). Embora Nei e Roychoudhury (1974) considerem que essa medida está sujeita a variação no tamanho amostral, ela ainda é a indicação mais confiável do grau de variação genética populacional, sendo portanto a medida preferida pela maioria dos geneticistas populacionais (Ayala e Kiger, 1980; Smith e Robertson, 1981). O maior valor da heterozigosidade média, encontrado na amostra populacional de Uatumã (0,1353), que a diferencia das amostras populacionais de Iquitos e Boa Vista, não pode ser atribuído a variação no tamanho amostral, e sim a uma possível diferenciação genética entre elas, já que os valores de N das referidas amostras são bem próximos. A observação de um maior valor de heterozigosidade média encontrada na amostra populacional de Uatumã, deve-se a presença do polimorfismo no loco Est-D2 segregando os alelos Est-D2¹, Est-D2² e Est-D2³, e o monomorfismo revelado neste loco para o alelo Est-D2², nas demais amostras testadas. No processo de especiação, a ausência de um livre fluxo gênico entre as populações naturais, faz com que elas se tornem diferenciadas geneticamente ao longo do tempo, como forma de adaptação às diferentes condições ambientais. Como resultado da seleção natural, populações tornam-se menos ou mais adaptadas às diferentes condições locais, adquirindo desse modo formas geneticamente diferenciadas (Ayala e Kiger, 1980). Grande parte das pesquisas sobre melhoramento genético em espécies florestais, envolve estudos sobre adaptação de árvores de populações naturais à diversas condições ambientais tais como: latitude, pluviosidade, tipos de solo, temperatura, etc. (Falkenhagen, 1985).

A variação genética revelada em camu-camu, entre as sub-populações identificadas: “Uatumã” e “IQUITOS/Boa Vista”, pode estar refletindo às diferentes condições ambientais, dos locais de procedência, já que, as condições edáficas de Uatumã a saber: solos podzólicos (arenoso e pobres em nutrientes minerais), sujeitos à inundações por água preta, são diferentes dos latossolos e/ou hidromórficos das regiões de IQUITOS e Boa Vista, sujeitos à inundações por água branca. Neste contexto, estudos adicionais envolvendo amostras populacionais de camu-camu de diferentes áreas geográficas, para se detectar possíveis padrões de variação genética entre as populações, associados às diferentes condições ambientais da Amazônia, tornam-se fundamentais na geração de subsídios básicos para implementação de programas de conservação e manejo sustentável da espécie na região.

CONCLUSÃO

Dados sobre a distribuição das frequências alélicas, estimativas das distâncias genéticas, e estimativas de variação genética nos 6 locos de esterases, foram eficazes na demonstração de diferenças genéticas entre as amostras populacionais de camu-camu (*Myrciaria dubia*) examinadas: Uatumã, IQUITOS e Boa Vista. Testes exatos aplicados para se checar diferenciação populacional, usando-se a distribuição das frequências alélicas dos locos polimórficos (Est-3 e Est-D2) revelaram uma diferença significativa quando a amostra populacional de Uatumã é comparada com as amostras populacionais de IQUITOS e Boa Vista ($\chi^2_{(4)} = 14,374$; $P = 0,006$; $\chi^2_{(4)} = 17,610$; $P = 0,002$, respectivamente). Dos 6 locos gênicos examinados (Est-1, Est-2, Est-3, Est-4, Est-D1 e Est-D2), o loco Est-D2 por ter apresentado um polimorfismo exclusivo, e um bom balanço genético na amostra populacional de Uatumã ($G_{(3)} = 1,9739$; $0,70 > P > 0,50$), mostrou-se o mais adequado para identificação e delimitação de possíveis estoques de camu-camu. Sugere-se que esse loco esteja presente na relação dos marcadores isoenzimáticos a serem usados em futuras prospeções sobre genética populacional dessa espécie. Os padrões de polimorfismo revelados nos locos Est-3 e Est-D2 de camu-camu, são típicos de enzimas monoméricas e diméricas, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq/ Programa Trópico Úmido – PTU, pela concessão de uma bolsa de estudo DTI e pelos recursos financeiros ao projeto. Ao Programa Piloto para Proteção das Florestas Tropicais – PPG7, pelo financiamento parcial do projeto. Ao Dr. Wawrick Estevam Kerr, Diretor do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, pelo incentivo, apoio permanente às pesquisas realizadas com camu-camu; pela leitura e sugestões feitas ao manuscrito. Ao Dr. Jorge Ivan Rebelo Porto, do mesmo modo pela leitura

e sugestões feitas ao manuscrito. Ao Sr. José Carlos Paula Raposo, técnico de laboratório da CPBA/INPA, pelo auxílio substancial nas análises eletroforéticas, e ao Sr. Ildelfonso Alexandre da Silva técnico da CPCA/INPA pela prestimosa ajuda, durante a coleta das amostras no campo.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Alfenas, A.C. 1998. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. UFV. Impr. Univ. Viçosa. 574pp.
- Alfenas, A.C.; Peters, I.; Brune, W.; Passador, G.C. 1991. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. UFV. Impr. Univ. Viçosa. 242pp.
- Amaral Junior, A.T.; Casali, V.W.D.; Alfenas, A.C.; Passador G.C.; da Silva Derly, J.H. 1994. Análise isoenzimática de acessos de moranga. *Hort. bras.*, 12 (1): 37-38.
- Andrade, J.S.; Galeazi, M.A.M.; Aragão, G.C.; Chavez-Flores, W.B. 1991. Valor nutricional do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) cultivado em terra firme da Amazônia Central. *Revista brasileira de fruticultura*, 13: 307-311.
- Anti, A.B. 2000. Caracterização de germoplasma de soja e de feijão através de eletroforese de isoenzimas da semente. *Bragantia*, 59(2): 139-142.
- Augustin, E.; Tcacenco, F.A. 1993. Isoenzimatic characterization of elephant grass (*Penisetum purpureum* Schum), germplasm. *Rev. Brasil. Genet.*, 16(3): 685-696.
- Ayala F.J.; Kiger, Jr. J.A. 1980. *Modern Genetics*. The Benjamins/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park. Califórnia. 844pp.
- Chávez Flores, W.B. 1988. A importância econômica do camu-camu. *Toda fruta*, 3(27):37-7.
- Coelho, P.J.A.; Fonseca, M.E.N.; Giordano, L.B. 1991. Análise isoenzimática de cultivares de ervilha. *Horticultura Brasileira*, 9(2): 90-91.
- Eldridge, K.G.; Griffin, A.R. 1983. Selfing effects in *Eucalyptus regnans*. *Silvae e Genet.*, 32: 216-221.
- Falkenhagen, E.R. 1985. Isozyme studies in provenance research of forest trees. *Theor. Appl. Genet.*, 69: 335-347.
- Ferguson, A. 1980. *Biochemical systematics and evolution*. Blackie Glasgow and London. 194pp.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília, DF, Ministério da Agricultura e do Abastecimento – MA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia. 220pp.
- Freitas, N.S.A.; Burity, H.A.; Bezerra, J.E.F. ; Da Silva, M.V. 1995. Caracterização de clones de acerola (*Malpighia glabra* L.) através dos sistemas isoenzimáticos peroxidase-esterase. *Pesq. Agropec., Brasil.*, 30(12): 1453-1457.
- Giselleppie, J.H.; Langley, C.H. 1974. A general model to account for enzyme variation in natural populations. *Genetics*, 76: 837-884.

- Hamrick, J.L.; Godt, M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. *In: Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L.; Weir, B.S. (Eds). Plant population genetics, breeding, and genetic resources.* Massachusetts, Sinauer, p 43-63.
- Hamrick, J.L.; Loveless, M.D. 1986. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. *Biotropica*, 18 (3): 201-207.
- Hopkinson, D.A.; Mestringer, M.A.; Cortner, J., and Harris, H. 1973. Esterase-D: a new human polymorphism. *Ann. Hum. Genet.*, 37: 119-137.
- McVaugh, R. 1969. Botany of the Guyana highland. Part VIII. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 18(2):55-286.
- Mendoza, O.; Picón, C.; Gonzáles T., J.; Cárdenas M.,R.; Padilla T.; C.; Mediávilla G., M.; Lleras, E.; Delgado de la F., F. 1989. *Informe de la expedición de recolección de germoplasma de camu-camu (Myrciaria dubia) en la amazonía peruana.* Informe Técnico nº11. Programa de Investigación en Cultivos Tropicales. INIA. Lima. 19pp.
- Miller, M.P. 1997. *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 author.
- Mitton, J.B.;Y.B.Linhart.; K.B.Sturgeon.; J.L.Hamrick.1979. Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine. *The Journal of Heredity*, 70 (2):86-89.
- Moran, G.F; Brown, A.H.D.1980. Temporal heterogeneity of outcrossing rates in Alpine Ash (*Eucalyptus delegatensis* R.T.Bak.). *Theor. Appl. Genet.*,57: 101-105.
- Nei, M.; Roychoudhury, A.K. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76: 379-390.
- Oliveira, H.A.1976. *Padrões eletroforéticos e genética de isoenzimas na identificação de cultivares e linhagens de Pisum sativum L. e sua utilização no melhoramento genético.* Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 136pp.
- Peters, C.M.; Vásquez, A. 1986/1987. Estudios ecológicos de camu-camu (*Myrciaria dubia*), producción de frutos em poblaciones naturales. *Acta Amazonica*, 16/17 (nº único):161-174.
- Potts, B.M.; Potts, W.C.; Cauvin, B.1987. Inbreeding and interspecific hybridization in *Eucalyptus gunnii*. *Silvae e Genet.*, 36: 194-199.
- Raymond, M.L.; Rousset, F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49: 1280-1283.
- Ridgway, G.J.; S.W.Sherburne.; R.D.Lewis. 1970. Polymorphism in the esterases of atlantic henrring. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 99:147-151.
- Rogers, J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *In: Studies in Genetics VII*, University of Texas, Austin, TX, USA. Publication nº 7213, p. 145-154.
- Santos, M.M.; Simões,L.S.; Mestriner, M.A.1993. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) esterase genetic polymorphism revealed by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. *Rev. Brasil.Genet.*,16(3): 679-683.
- Sawazaki, H.E.; Nagai, H.; Sodek, L.1997. Caracterização da variabilidade genética em couve manteiga utilizando isoenzima e RAPD. *Bragantia*, 56 (1): 9-19.
- Smith, P.J.; Robertson, D.A.1981. Genetics evidence for two species of sprata (*Sprattus*) in New Zeland Waters. *Mar.Biol.*, 62: 227-233.
- Torggler, M.G.F.; Contel, E.P.B.; Torggler, S.P. 1995. *Isoenzimas: variabilidade genética em plantas.* Sociedade Brasileira de Genética. São Paulo-Ribeirão Preto. 175pp.
- Villachica, H. 1996. *El cultivo del camu-camu (Myrciaria dubia (H.B.K.) McVaugh) en la Amazonia Peruana.* Tratado de Cooperación Amazónica. Lima. 95pp.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations*, vol.4. *Variability within and among natural populations.* Universty of Chicago Press, Chicago. 580pp.

RECEBIDO EM 31/08/2001
ACEITO EM 13/01/2004