

SIMONE NEUMANN WENDT

GENÉTICA DE POPULAÇÕES EM
***Ilex paraguariensis* St. Hil.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, área de concentração: Agroindústria, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Processos Biotecnológicos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marguerite Quoirin

Co-Orientadora: Dr^a Valderês A. de Sousa

CURITIBA

2005

À minha família, pelo amor,
compreensão e estímulo em todos os
momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela Sua presença constante em minha vida e por mais esta oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À minha família, especialmente aos meus pais (Wilmar e Edith), pelos ensinamentos, apoio incondicional e imenso amor.

À Profa. Dra. Marguerite Quoirin, pela oportunidade, orientação e amizade.

À Dra. Valderês Aparecida de Sousa, pela amizade, exemplo de dedicação, profissionalismo e valiosos ensinamentos transmitidos durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Alexandre Sebbenn, pela fundamental contribuição nas análises e discussões dos resultados, importantes sugestões e grande incentivo.

À pesquisadora Cristina Mazza, pela compreensão e oportunidade.

Ao Dr. José Alfredo Sturion, pela confiança, integrando-me ao projeto de erva-mate e pelas valiosas informações sobre a cultura.

Ao Dr. Jarbas Shimizu, pelas contribuições ao trabalho.

Ao Jonatas Gueller, pela amizade, apoio técnico e principalmente pelo “espírito de aventura” e bom humor durante as coletas.

Aos estagiários Elisa e Felipe, pela colaboração nas análises laboratoriais e agradável convivência.

Ao Tiago, pelas fotos de erva-mate, esquemas dos géis e auxílio na formatação da tese, além da amizade, paciência e companheirismo.

À Maria Lúcia (Malu), pela ajuda na aquisição de reagentes e equipamentos.

À Simone Sopchacki, pelo auxílio técnico na fase inicial do trabalho.

Ao grupo do monitoramento ambiental, especialmente à Cristina e ao Edelberto, pela confecção do mapa da Área de Produção de Sementes e cálculos das distâncias geográficas entre as populações.

A todos os proprietários de sítios, fazendas, além da Ervateira Barão de Cotegipe, do Instituto Florestal de Campos do Jordão e da Companhia do Exército de Canoinhas, que permitiram e colaboraram na realização das coletas.

À *Embrapa Florestas* que, através de sua chefia, permitiu a utilização de suas dependências, equipamentos e reagentes necessários.

Ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas do Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos pelo apoio.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e a CAPES pelo suporte financeiro ao curso.

Ao Grupo Espírita Laços Eternos, especialmente à tia Ivoni, pelos ensinamentos, amparo, preces e energias positivas.

Aos amigos que compartilharam momentos felizes e dividiram os não tão felizes, Adriana, Andréa, Marta, Rosane, Márcia, Rose, Engels, Helenice, Marquinho, Jurandir, Guilherme, Cristiane, Alessandro e Juliana.

Aos pesquisadores e funcionários da *Embrapa Florestas* por terem me recebido tão bem, especialmente, à Marisa, Namie, Maria, Letícia, Leonardo e Marcela, pelas horas de descontração e amizade.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1. A espécie <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.	21
3.1.1. Aspectos taxonômicos e botânicos.....	21
3.1.2. Distribuição natural.....	24
3.1.3. Importância sócio-econômica	26
3.1.4. Programas de melhoramento e conservação genética	28
3.2. Marcadores genéticos	29
3.2.1. Marcadores bioquímicos.....	30
3.2.2. Marcadores moleculares	32
3.3. Herança e ligação dos marcadores isoenzimáticos	37
3.4. Sistema reprodutivo e determinação de paternidade	39
3.5. Estrutura e variação genética de populações	42
CAPÍTULO I. IDENTIFICAÇÃO, ANÁLISES DE HERANÇA E LIGAÇÃO DOS LOCOS ISOENZIMÁTICOS EM <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.....	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1. Material vegetal e amostragem.....	50
2.2. Extração das enzimas	51
2.3. Eletroforese	52
2.4. Avaliação dos zimogramas.....	52
2.5. Análise de segregação	53
2.6. Análise de desequilíbrio de ligação.....	54

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.1. Extração das enzimas	56
3.2. Determinação dos sistemas enzimáticos	56
3.3. Descrição dos padrões isoenzimáticos	57
3.3.1. Locos monomórficos	57
3.3.2. Locos polimórficos	58
3.3.3. Definição dos sistemas enzimáticos para <i>I. paraguariensis</i>	61
3.4. Análise de segregação	63
3.5. Análise de desequilíbrio de ligação.....	67
4. CONCLUSÕES.....	70
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
CAPÍTULO II. ESTUDO DO SISTEMA DE REPRODUÇÃO E ANÁLISE DE PATERNIDADE EM ÁREA DE PRODUÇÃO DE SEMENTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil. UTILIZANDO MARCADORES ISOENZIMÁTICOS	75
1. INTRODUÇÃO.....	76
2. MATERIAL E MÉTODOS	77
2.1. Material vegetal e amostragem.....	77
2.2. Extração das enzimas e eletroforese.....	77
2.3. Análise do sistema de reprodução	77
2.4. Análise de paternidade.....	80
2.5. Estrutura genética dentro de progênes de polinização aberta mediante análise de paternidade.....	81
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1. Sistema de reprodução	84
3.1.1. Freqüências alélicas dos óvulo e pólen	84
3.1.2. Homogeneidade nas freqüências alélicas do pólen efetivo e das árvores masculinas da população	86
3.1.3. Índices de fixação	87
3.1.4. Taxa de cruzamento multiloco e uniloco.....	88
3.1.5. Taxa de cruzamentos correlacionados	89
3.1.6. Coeficiente de coancestria e tamanho efetivo da variância	90
3.2. Análise de paternidade e estrutura genética dentro de progênes de polinização aberta	92

4. CONCLUSÕES.....	100
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
CAPÍTULO III. CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil. UTILIZANDO MARCADORES ISOENZIMÁTICOS	105
1. INTRODUÇÃO.....	106
2. MATERIAL E MÉTODOS	108
2.1. Material vegetal e amostragem.....	108
2.2. Extração das enzimas e eletroforese.....	111
2.3. Caracterização da estrutura e variação genética	111
2.3.1. Medidas de parâmetros genéticos básicos	111
2.3.2. Medidas de estrutura e variação genética dentro de populações	112
2.3.3. Medidas de estrutura e variação genética entre populações.....	114
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
3.1. Estrutura alélica	117
3.2. Diversidade alélica	119
3.3. Variação genética dentro de populações	120
3.4. Diferenciação genética entre populações	122
3.5. Diferenciação genética entre os sexos em <i>I. paraguariensis</i>	127
4. CONCLUSÕES.....	133
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134
CAPÍTULO IV. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil. UTILIZANDO MARCADORES RAPD	137
1. INTRODUÇÃO.....	138
2. MATERIAIS E MÉTODOS	139
2.1. Material vegetal e amostragem.....	139
2.2. Extração do DNA genômico	139
2.3. Amplificação do DNA e eletroforese	140
2.4. Análise estatística	141
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	142
4. CONCLUSÕES.....	147
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	148

4. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	150
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	153

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Árvore adulta de <i>I. paraguariensis</i> em plantio	22
FIGURA 2. Inflorescências (A - masculinas e B - femininas) e flores (C - masculinas e D - femininas) de <i>I. paraguariensis</i> (Fotos cedidas por Valderês A. de Sousa e Tiago L. Daros/ <i>Embrapa Florestas</i>)	23
FIGURA 3. Frutos em diferentes estádios de maturação (A) e sementes (B) de <i>I. paraguariensis</i> (Fotos cedidas por Valderês A. de Sousa e Tiago L. Daros/ <i>Embrapa Florestas</i>)	24
FIGURA 4. Área de ocorrência natural <i>I. paraguariensis</i> (FONTE: OLIVEIRA; ROTTA, 1985)	25
FIGURA 5. Forças evolucionárias e sua influência sobre a estrutura fenotípica de uma população (HATTEMER; MÜLLER-STARCK, 1990, citado por SOUSA, 2000)	46
FIGURA 6. Representação esquemática dos fenótipos observados, representados por números, nos zimogramas de <i>I. paraguariensis</i> para os sistemas GOT, PGI, G-6PGDH, 6-PGDH e NDH, com sua codificação. Zonas de cor cinza não foram analisadas e os alelos rachurados foram observados apenas nas populações naturais	62
FIGURA 7. Perfis isoenzimáticos produzidos pelos sistemas GOT (1), PGI (2) e 6-PGDH (3) em <i>I. paraguariensis</i>	63
FIGURA 8. Freqüência de contribuição paterna para a descendência de <i>I. paraguariensis</i> , na Área de Produção de Sementes (APS). (C) Cascavel; (CM) Campo Mourão; (S) Soledade e (T) Toledo	94
FIGURA 9. Freqüência de distância entre as árvores polinizadoras e as árvores maternas, na Área de Produção de Sementes (APS) de <i>I. paraguariensis</i>	96
FIGURA 10. Freqüência de distância entre as árvores masculinas e as femininas que tiveram sementes coletadas, na Área de Produção de Sementes (APS) de <i>I. paraguariensis</i>	97
FIGURA 11. Esquema da Área de Produção de Sementes (APS) de <i>I. paraguariensis</i> . A linha indica o cruzamento entre a matriz e o polinizador	98

FIGURA 12. Distribuição de freqüência para o coeficiente de coancestria entre as matrizes e os pais identificados, na Área de Produção de Sementes (APS) de <i>I. paraguariensis</i>	99
FIGURA 13. Localização geográfica das populações naturais de <i>I. paraguariensis</i> amostradas e analisadas. (1) Barão de Cotegipe; (2) Três Barras; (3) Quatro Barras; (4) Jaguariaíva; (5) Caarapó e (6) Campos do Jordão. (Adaptado de OLIVEIRA; ROTTA, 1985).....	110
FIGURA 14. Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de NEI (1978), para as populações de Barão de Cotegipe (BC), Três Barras (TB), Quatro Barras (QB), Jaguariaíva (J), Caarapó (C) e Campos do Jordão (CJ).....	124
FIGURA 15. Diferenciação alélica (D_j) entre as populações naturais de <i>I. paraguariensis</i> representadas pelos diagramas em caracol. Os comprimentos dos raios indicam D_j e o raio do círculo é igual a δ . As populações são denominadas por (BC) Barão de Cotegipe, (TB) Três Barras, (QB) Quatro Barras, (J) Jaguariaíva, (C) Caarapó e (CJ) Campos do Jordão.....	126
FIGURA 16. Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de NEI (1978), para as populações de Barão de Cotegipe (BC), Três Barras (TB), Quatro Barras (QB), Jaguariaíva (J), Caarapó (C) e Campos do Jordão (CJ), subdivididas em fêmeas (F) e machos (M).....	129
FIGURA 17. Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de GREGORIUS (1974), para as populações de Barão de Cotegipe (BC), Três Barras (TB), Quatro Barras (QB), Jaguariaíva (J), Caarapó (C) e Campos do Jordão (CJ), subdivididas em fêmeas (F) e machos (M).....	129
FIGURA 18. Diferenciação alélica (D_j) entre as populações naturais de <i>I. paraguariensis</i> representadas pelos diagramas em caracol. Os comprimentos dos raios indicam D_j e o raio do círculo é igual a δ . As populações são denominadas por (BC) Barão de Cotegipe, (TB) Três Barras, (QB) Quatro Barras, (J) Jaguariaíva, (C) Caarapó e (CJ) Campos do Jordão. (F) fêmeas e (M) machos	131
FIGURA 19. Produtos da amplificação por RAPD em 28 indivíduos da procedência Pinhão, usando o <i>primer</i> OPH-12. M = DNA Ladder 100 pb, 1-28 = indivíduos analisados	143

FIGURA 20. Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de NEI (1978), entre as procedências Ivaí, Pinhão e Cascavel, de <i>I. paraguariensis</i>	145
FIGURA 21. Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de NEI (1978), entre as progênies das procedências Ivaí (1 a 7), Pinhão (8 a 14) e Cascavel (15 a 21), de <i>I. paraguariensis</i>	145

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Número de árvores (fêmeas e machos) de cada procedência, pertencentes à Área de Produção de Sementes (APS) de <i>I. paraguariensis</i> , localizada em Colombo (PR)	50
TABELA 2. Sistemas enzimáticos testados em <i>I. paraguariensis</i>	53
TABELA 3. Sistemas tampão gel/eletrodo e condições de corrida, empregados no estabelecimento de protocolo de isoenzimas para <i>I. paraguariensis</i>	53
TABELA 4. Avaliação da resolução dos géis em função dos sistemas enzimáticos testados e tampões gel/eletrodo utilizados.....	57
TABELA 5. Teste para hipótese de segregação regular (G) de marcadores isoenzimáticos em <i>I. paraguariensis</i>	65
TABELA 6. Árvores de <i>I. paraguariensis</i> com desvios de segregação da razão esperada 1:1, para diferentes locos enzimáticos	66
TABELA 7. Valores da medida composta de Burrows para o desequilíbrio gamético ($\hat{\Delta}_{ij}$) e testes de qui-quadrado (χ^2) para hipótese de segregação independente em pares de locos isoenzimáticos de <i>I. paraguariensis</i>	68
TABELA 8. Divergência genética entre as freqüências alélicas do pólen e óvulo nas progênes de <i>I. paraguariensis</i>	84
TABELA 9. Divergência genética entre as freqüências alélicas das árvores femininas e masculinas da população de <i>I. paraguariensis</i>	85
TABELA 10. Divergência genética entre as freqüências alélicas do pólen efetivo e das árvores masculinas da população de <i>I. paraguariensis</i>	86
TABELA 11. Estimativas de parâmetros do sistema de reprodução em <i>I. paraguariensis</i>	88
TABELA 12. Estrutura genética dentro de progênes de polinização aberta de <i>I. paraguariensis</i>	93
TABELA 13. Estruturas alélicas em populações naturais de <i>I. paraguariensis</i> referentes a sete locos polimórficos	118
TABELA 14. Diversidade alélica (n) de populações naturais de <i>I. paraguariensis</i> ..	119
TABELA 15. Medidas de variabilidade genética nas populações naturais de <i>I. paraguariensis</i>	120

TABELA 16. Estatísticas-F para os sete locos polimórficos nas populações naturais de <i>I. paraguariensis</i> , para machos e fêmeas	123
TABELA 17. Diferenciação alélica (D_j), diferenciação alélica média (δ) (GREGORIUS; ROBERDS, 1986) nas populações naturais de <i>I. paraguariensis</i>	125
TABELA 18. Estruturas alélicas em populações naturais de <i>I. paraguariensis</i> , subdividas em fêmeas (F) e machos (M), referentes a sete locos polimórficos	127
TABELA 19. Medidas de variabilidade genética nas populações naturais de <i>I. paraguariensis</i> , subdividas em fêmeas (F) e machos (M)	128
TABELA 20. Diferenciação alélica (D_j), diferenciação alélica média (δ) (GREGORIUS; ROBERDS, 1986) nas populações naturais de <i>I. paraguariensis</i> , subdividas em fêmeas (F) e machos (M).....	130
TABELA 21. Relação dos <i>primers</i> e suas respectivas seqüências de nucleotídeos, utilizados em <i>I. paraguariensis</i>	140
TABELA 22. Relação dos <i>primers</i> utilizados em <i>I. paraguariensis</i> e o polimorfismo produzido.....	142
TABELA 23. Análise de variância molecular (AMOVA) para procedências e progênies de <i>I. paraguariensis</i>	144

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS - Área de Produção de Sementes
BSA - soro albumina bovina
CTAB - k hexadecil trimetil amônio brometo
DNA - ácido desoxiribonucleico
dNTP- desoxirribonucleosídeos trifosfatos
DTT - DL-ditiotreitol
EDTA - etileno diamino tetracético
EP - erro padrão
GDA - Genetic Data Analysis
GPS - sistema de posicionamento global
KCl - cloreto de potássio
MgCl₂ - cloreto de magnésio
Na₂EDTA - etilendiaminatetereacetato dissódico
NaCl - cloreto de sódio
pb - pares de bases
PVP - polivinil pirrolidona
PVPP - polivinil polipirrolidona
rpm - rotação por minuto
TBE - tris-boro-EDTA
TE - tris-EDTA
Tris - tris (hidroximetil) aminometano
Tris-HCl - tris (hidroximetil) aminometano hipoclorida

RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é encontrada no Brasil, Paraguai e Argentina, onde apresenta grande importância econômica. Devido à exploração predatória e à fragmentação das florestas, esta espécie apresenta-se potencialmente em risco de extinção. Portanto, medidas de conservação devem ser tomadas com base em conhecimentos científicos que não encontram-se disponíveis. O objetivo desse trabalho foi estudar geneticamente populações cultivadas e naturais, para inferências sobre o sistema de reprodução, análise de paternidade e variabilidade genética, utilizando-se marcadores bioquímicos e moleculares. Os resultados do sistema de reprodução na Área de Produção de Sementes (APS) indicaram endogamia, decorrente de cruzamentos entre parentes. A proporção de irmãos-completos nas progênies foi de 40,1% e de meios-irmãos foi 59,9%. O coeficiente médio de coancestria dentro de progênies (\hat{q}_{xy}) foi estimado em 0,186, sendo superior ao esperado em progênies de meio-irmãos. O número efetivo de polinizadores foi reduzido ($\hat{N}_{ep} = 2,5$). O tamanho efetivo de variância ($\hat{N}_{e(v)}$) foi de 2,53, sendo inferior ao esperado em uma população idealizada. A análise de paternidade permitiu determinar o pai de 54% das progênies. Porém, o poder de exclusão foi baixo. Constatou-se que apenas três árvores contribuíram com 62% do pólen efetivo, confirmando a ausência de panmixia nos cruzamentos. Com relação a estrutura genética de populações naturais, observou-se 65% dos locos polimórficos, com média de 1,80 alelos por loco e 2,23 alelos por loco polimórfico. A heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,221$) foi superior à observada ($H_o = 0,163$), mostrando um leve excesso de homozigotos. As populações do Sul apresentaram valores superiores às do Centro-oeste e Sudeste do Brasil, nos diversos parâmetros analisados, indicando maior variabilidade genética nestas populações. A estatística-F (WRIGHT, 1965) mostrou maior variabilidade genética dentro da população (87,14%) do que entre elas (12,86%). Na análise molecular, por meio de marcadores RAPD, do teste de procedências e progênies, foram produzidos 159 fragmentos, sendo 70,44% polimórficos. A distância genética entre as procedências e progênies foi restrita. Verificou-se maior variação genética dentro das procedências (88,28%), principalmente entre as progênies (55,53%), do que entre as procedências (11,72%). Com base nos resultados, recomenda-se eliminar os indivíduos aparentados e realizar amostragem diferenciada, para melhor representar a população na APS. Como a diversidade genética mostrou-se relativamente baixa, estando concentrada dentro de populações, aconselha-se conservar fragmentos maiores para reter a variação intrapopulacional e número razoável de fragmentos para reter parte da variação genética existente entre populações.

ABSTRACT

Ilex paraguariensis is a native species that occurs in Brazil, Paraguay and Argentina. It plays an important economical role in this region. Due to intensive exploitation and fragmentation this species became endangered to extinction. Therefore conservation measures must be taken using basic scientific knowledge not yet available. The aim of this work was to characterize genetically natural and plantation populations to infer the reproductive system, paternity analysis and genetic variability, using as tools biochemical and molecular markers. In the seed production area (APS) inbreeding was detected as consequence of breeding among relatives. The proportion of full-sibs individuals in the progenies was 40.1% and in half-sibs progenies was 59.9 %. The average coancestry coefficient within progenies (\hat{q}_{xy}) was 0.186 and was higher than expected for half-sibs progenies. The effective pollinators number was reduced ($\hat{N}_{ep} = 2.5$). The variance effective size ($\hat{N}_{e(v)}$) was 2.53, lower than expected for an ideal population. In the paternity analysis it was possible to determine the pollen donor (father tree) for 54% of progenies. However the exclusion power was low as only three trees contributed with 62% of effective pollen, showing that panmixis did not occur in such population. In relation to genetic structure in natural populations, 65% of loci were polymorphic; the average number of alleles per locus was 1.8 and the average number of alleles per polymorphic locus was 2.23. The average expected heterozygosity ($H_e = 0.221$) was higher than observed ($H_o = 0.163$), showing a slight excess of homozygotes. The populations from the southern region showed higher values for many genetic parameters, indicating higher genetic variability than midwest and southeast populations. The F-statistics (WRIGHT, 1965) showed higher genetic variability within population (87.14%) than among populations (12.86%). The molecular analysis (RAPD) of provenance and progenies produced 159 fragments where 70.44% were polymorphic. The genetic distance between provenances and progenies was restricted. The genetic variation was higher within provenances (88.28%), especially between progenies (55.53%), than among provenances (11.72%). Based in these results it is advisable to remove the relative individuals and to sample more individuals to best represent the APS. For genetic conservation it is recommended to maintain greater fragments to retain the intrapopulation variation and a reasonable number of areas to retain the genetic variation among populations.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. - Aquifoliaceae) é uma espécie arbórea, típica das regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, sendo encontrada no Brasil, Paraguai e Argentina. Desempenha importante papel sócio-econômico, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina, contribuindo para a manutenção do pequeno agricultor no campo e empregando grande número de trabalhadores na indústria.

As folhas e ramos de erva-mate são utilizados, principalmente, na produção de bebidas, como chimarrão e chás, mas estudos recentes têm revelado importantes substâncias químicas na sua composição, possibilitando o desenvolvimento de novos produtos, como: medicamentos, corantes, conservantes alimentares, produtos de higiene e cosméticos (MACCARI JUNIOR, 2000).

Para atender a crescente demanda de mercado, a implantação de ervais com elevada produtividade, qualidade e rentabilidade é desejável. Porém, a baixa qualidade genética e fisiológica das sementes utilizadas tem sido um fator limitante e a produção ainda é insuficiente (ZANON, 1988; RESENDE; STURION; CARVALHO, 1995; MACCARI JUNIOR, 2000). Por esse motivo, a exploração predatória da erva-mate nativa continua acontecendo. Este fato, associado ao desmatamento das florestas, pela expansão da agricultura e exploração de madeira, aumenta os riscos de erosão genética e coloca a espécie em risco de extinção em populações naturais.

A despeito da sua importância, existem poucos estudos sobre a biologia e a estrutura genética da erva-mate, bem como, sobre o efeito da fragmentação nas populações naturais, o grau de erosão genética e os fatores determinantes da variabilidade. Segundo HAMRICK; LINHART; MITTON (1979), a variabilidade genética nas espécies florestais depende da amplitude de distribuição geográfica, taxonomia, ciclo de vida, modo de reprodução, sistema genético, forças evolutivas (deriva genética, seleção, mutação, migração, fluxo gênico), número de cromossomos e estágios sucessionais.

No período que antecedeu a década de 70, a variabilidade genética era avaliada e expressa, exclusivamente, através das características quantitativas ou

morfométricas. Posteriormente, foram desenvolvidos marcadores bioquímicos (isoenzimas) e moleculares, que prevalecem até hoje.

Os marcadores bioquímicos revelam variabilidade de proteínas (enzimas), que são o produto gênico. Estes marcadores são amplamente utilizados em estudos clássicos de genética de populações florestais, pois apresentam algumas características, como: a expressão codominante, que permite diferenciar os genótipos homozigotos de heterozigotos; a possibilidade de analisar várias enzimas e amostras simultaneamente; os procedimentos são simples, rápidos e relativamente de baixo custo e a técnica pode ser adaptada para diversas espécies (LIENGSIRI; PIEWLUANG; BOYLE, 1990; BERGMANN; HATTEMER, 1998; FINKELDEY, 1998; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Entretanto, alguns fatores limitam a sua utilização, como: a cobertura parcial do genoma; o baixo polimorfismo detectado em cada loco; o número limitado de sistemas enzimáticos disponíveis e a ausência de polimorfismo em um ou vários locos isoenzimáticos (BERGMANN; HATTEMER, 1998; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Para verificar a variabilidade genética molecular, diversas técnicas têm sido utilizadas, destacando-se: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e microssatélites (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998).

A técnica RAPD consiste na amplificação de segmentos de DNA ao acaso, utilizando um único *primer*, com dez pares de bases de extensão, cuja sequência nucleotídica é arbitrária. Quando comparada às demais técnicas moleculares, é considerada simples, rápida, com custo relativamente baixo, geradora de um número ilimitado de marcadores, com alto nível de polimorfismo. As principais limitações consistem na baixa reprodutibilidade dos resultados e na restrita informação genética por loco, devido a sua expressão dominante (não distingue o heterozigoto do homozigoto), não permitindo estimar, precisamente, diversos parâmetros que influenciam a estrutura genética das populações (WILLIAMS et al., 1990; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os conhecimentos referentes à quantidade e distribuição da variação genética de *I. paraguariensis*, bem como, ao sistema de reprodução da espécie, que desempenha grande influência na estrutura genética, são imprescindíveis para

indicar estratégias ideais para a conservação dos recursos genéticos e melhoramento da cultura (FRANKEL, BROWN; BURDON, 1998; LIENGSIRI; PIEWLUANG; BOYLE, 1990).

Dentro desse contexto, o trabalho propõe gerar informações básicas sobre o sistema reprodutivo, realizar inferências de fluxo gênico e caracterizar a estrutura genética de populações naturais e cultivadas, contribuindo sobremaneira para o delineamento de programas de conservação e melhoramento genético desta espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar geneticamente *Ilex paraguariensis* St. Hil., utilizando marcadores bioquímicos e moleculares.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para a espécie *Ilex paraguariensis*:

- Desenvolver protocolo para a extração de proteínas e identificar locos isoenzimáticos para estudos genéticos;
- Verificar o modo de herança e o desequilíbrio de ligação dos marcadores isoenzimáticos;
- Estudar o sistema de reprodução e analisar a paternidade em Área de Produção de Sementes (APS), utilizando marcadores isoenzimáticos;
- Caracterizar a variabilidade e a estrutura genética de populações naturais, utilizando marcadores isoenzimáticos;
- Determinar a variabilidade genética em um teste de procedências e progênes, utilizando marcadores RAPD.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A espécie *Ilex paraguariensis* St. Hil.

3.1.1. Aspectos taxonômicos e botânicos

Ilex paraguariensis St Hil., popularmente conhecida como erva-mate, foi classificada pelo naturalista francês August de Saint Hillaire, do Museu de História Natural de Paris, em 1822. Segundo MATTOS (1985), citando PARODI; GRONDONA (1949), o material tipo de *Ilex paraguariensis* foi coletado nas proximidades de Curitiba, que na época pertencia ao estado de São Paulo, do qual se desmembrou em 1853.

O gênero *Ilex* pertence à família Aquifoliaceae que apresenta cerca de 600 espécies, sendo 220 nativas da América do Sul, das quais 68 ocorrem no Brasil (GIBERTI, 1995b; SCHERER, 1997).

A erva-mate é uma espécie perene, com porte arbóreo e grande longevidade, podendo alcançar cem anos. Sua altura é variável, dependendo da idade e do tipo de sítio, podendo atingir até 30 m na floresta, porém, quando podada, geralmente não ultrapassa os 7 m de altura (Figura 1) (MAZUCHOWSKI, 1989; CARVALHO, 2003).

Possui o tronco cilíndrico, reto ou pouco tortuoso, geralmente com 20 a 40 cm de diâmetro, podendo chegar a 100 cm. A casca possui espessura de até 20 mm, sendo a externa de cor cinza-clara a acastanhada, persistente e com textura de áspera a rugosa. A casca interna apresenta textura arenosa e cor branca-amarelada que, após incisão, escurece rapidamente em contato com o ar (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; CARVALHO, 2003).

As folhas são simples, alternas, geralmente estipuladas, de textura variando de subcoriáceas a coriáceas, glabras e mostram-se estreitas na base e geralmente obtusas no vértice. O limbo foliar apresenta forma obovada, com 5 a 10 cm de comprimento por 3 a 4 cm de largura; a margem é irregularmente serrilhada ou denteada, sendo o terço da base geralmente liso. As nervuras laterais são pouco impressas na face adaxial, e salientes na abaxial. O pecíolo é relativamente curto,

medindo de 7 a 15 mm de comprimento (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; MAZUCHOWSKI, 1989; CARVALHO, 2003).

FIGURA 1. Árvore adulta de *I. paraguariensis* em plantio



As flores são pequenas, pedunculadas e dispostas nas axilas das folhas superiores. Possuem um cálice gamossépalo com quatro sépalas de cor verde clara e uma corola formada por quatro pétalas de coloração branca. Entre as pétalas aparecem quatro estames (FONT QUER, 1953).

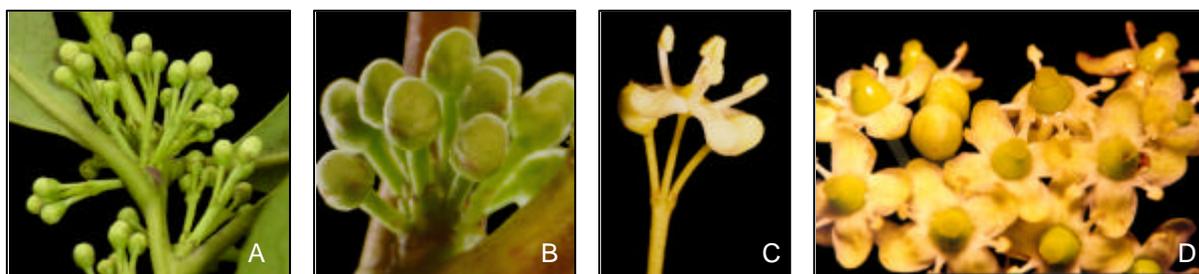
A espécie é dióica críptica ($2n = 40$), com flores díclinas, com um dos sexos abortivo (flores masculinas e femininas em indivíduos separados). As flores masculinas possuem ovário rudimentar não funcional (pistilódio) e as femininas, estames rudimentares estéreis (estaminódios) (FERREIRA et al., 1983).

A identificação do sexo das árvores pode ser realizada através das características de suas inflorescências e flores, conforme descritas por SCHOEMBERG; DINOUTTI (1989). Segundo os autores, as árvores masculinas apresentam inflorescências constituídas por pedúnculo muito curto (braquiblasto), que se ramifica (quatro ou cinco ramos) e cada ramo possui duas ou três flores dispostas no mesmo nível, tendo pedúnculos mais longos do que das flores

femininas (Figura 2A). As flores masculinas caracterizam-se pelo ovário abortado, com aspecto rudimentar, sem estigma. O androceu possui anteras maiores, perfeitas e férteis (Figura 2C). As inflorescências femininas apresentam apenas uma unidade peduncular (braquiblasto), constituída por ramos curtos e concrecidos e as flores dispõem-se em diversos níveis ao longo da unidade caulinar (Figura 2B). O ovário é bem desenvolvido, sem estilete, com estigma amplo. As anteras são menores, modificadas e estéreis (Figura 2D).

O período de floração ocorre de setembro a dezembro, sendo predominante em outubro (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; SOUSA; DAROS; STURION, 2003). Por ser uma espécie dióica, o sistema reprodutivo é obrigatoriamente alógamo. A polinização é basicamente entomófila, sem especificidade de polinizadores, sendo realizada por inúmeros insetos (Hymenoptera, Coleoptera, Hemiptera e Diptera), embora alguma transferência de pólen pelo vento não possa ser descartada (FERREIRA et al., 1983).

FIGURA 2. Inflorescências (A - masculinas e B - femininas) e flores (C - masculinas e D - femininas) de *I. paraguariensis* (Fotos cedidas por Valderês A. de Sousa e Tiago L. Daros/*Embrapa Florestas*)



Os frutos são drupas globosas de 4 a 6 mm de diâmetro, tetraloculares, de superfície lisa. Durante o processo de maturação, a coloração do fruto altera-se, passando de verde a branco, no início do processo, para vermelho ou violáceo até quase preto, quando completamente maduro (Figura 3A). A polpa é mucilagínosa e cada fruto produz quatro ou cinco sementes. As mesmas apresentam uma coloração marrom que varia de claro a escuro, são muito duras, pequenas e de forma variável (Figura 3B) (MARIATH et al., 1995; CARVALHO, 2003).

O amadurecimento dos frutos começa em dezembro e estende-se até março (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; SOUSA; DAROS; STURION, 2003). A maturação é bastante heterogênea, sendo encontrados, na mesma árvore, frutos verdes, fisiologicamente maduros e frutos que ultrapassaram o período de maturação (ZANON, 1988). A dispersão dos frutos e sementes é zoocórica, realizada principalmente pelos pássaros (ornitocoria), que se alimentam dos frutos maduros (CARVALHO, 2003).

FIGURA 3. Frutos em diferentes estádios de maturação (A) e sementes (B) de *I. paraguariensis* (Fotos cedidas por Valderês A. de Sousa e Tiago L. Daros/Embrapa Florestas)



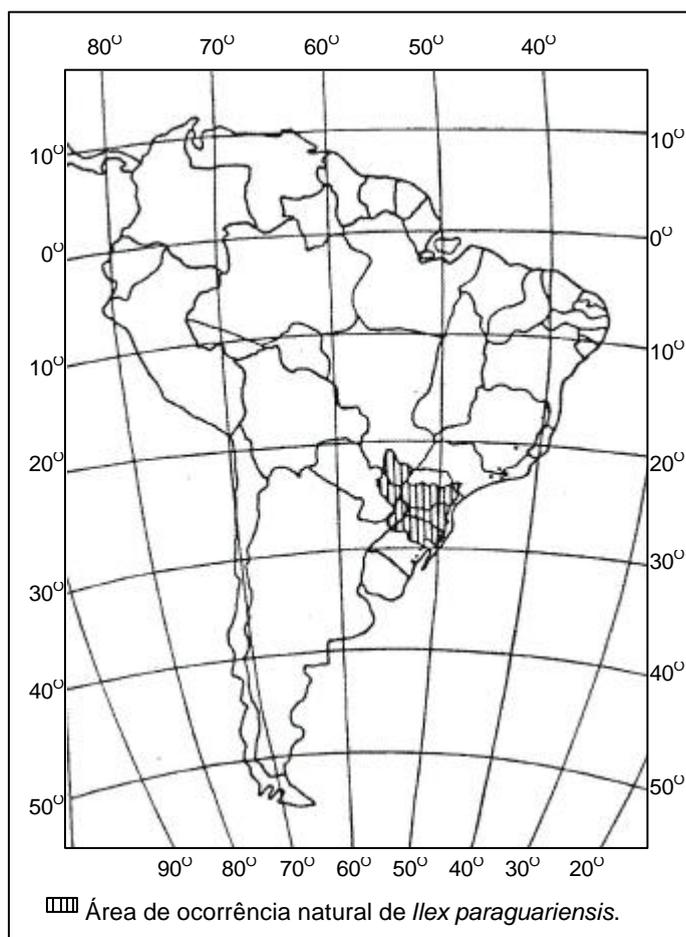
3.1.2. Distribuição natural

A distribuição natural da erva-mate compreende uma área de aproximadamente 540.000 km², sendo encontrada no Brasil, Paraguai e Argentina. No Brasil, estão situados 450.000 km² do total, correspondendo a 5% do território nacional, abrangendo a região centro-norte do Rio Grande do Sul, quase totalidade do estado de Santa Catarina, centro-sul e sudoeste do Paraná, sul do Mato Grosso do Sul e pontos isolados no leste de São Paulo e sudeste de Minas Gerais (OLIVEIRA; ROTTA, 1985; GIBERTI, 1995a).

No Brasil, a erva-mate cresce espontaneamente em regiões constituídas por Floresta com *Araucaria angustifolia* e matas subtropicais. Não sendo encontrada em zonas de campos naturais e de mata branca, caracterizada pela ausência de *A. angustifolia*. Na Argentina e Paraguai, a erva-mate ocorre, principalmente, nos sub-bosques das matas do Rio Paraná e afluentes, onde a presença de araucária não é constatada (OLIVEIRA; ROTTA, 1985).

A superfície de abrangência geográfica de *I. paraguariensis* estende-se desde a latitude de 21° até 30° S e longitudes de 48° 30' até 56° 10' W, com altitudes variando de 500 a 1000 m, podendo ocorrer em regiões além destes limites (Figura 4).

FIGURA 4. Área de ocorrência natural *I. paraguariensis* (FONTE: OLIVEIRA; ROTTA, 1985)



Segundo o mapeamento climático de Koeppen, baseado nas interações entre temperatura e precipitação, a distribuição predominante da erva-mate concentra-se nos tipos climáticos Cfb (temperado úmido, com temperatura média do mês mais quente inferior a 22 °C), seguido pelo Cfa (temperado úmido, com temperatura média do mês mais quente superior a 22 °C). Entretanto, a espécie também ocorre em pequenas áreas onde os tipos climáticos são Cwa (temperado ou subtropical com inverno seco) e Aw (tropical com inverno seco). A precipitação pluvial média

anual gira em torno de 1500 mm (OLIVEIRA; ROTTA, 1985), podendo ocorrer leve déficit hídrico na região noroeste do Paraná e sul do Mato Grosso do Sul (CARVALHO, 2003).

A erva-mate é tolerante a solos de baixa fertilidade natural, com baixo teor de nutrientes trocáveis e de alto teor de alumínio. Ocorre em solos com textura média (entre 15 e 35% de argila), sendo raramente encontrada em arenosos (menos de 15% de argila). Prefere solos com profundidade média a profundos, úmidos e bem drenados (OLIVEIRA; ROTTA, 1985; CARVALHO, 2003).

3.1.3. Importância sócio-econômica

A erva-mate era utilizada pelas tribos guaranis, que habitavam as regiões das bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, antes da colonização européia. Na época, comunidades indígenas do Chile, Peru e Bolívia atravessavam os Andes para comercializar as folhas secas da planta, através de permuta (LINHARES, 1969; BRAGAGNOLO; PAN; KLOSOVSKI FILHO, 1980; PRAT KRICUN, 1990).

Os colonizadores incorporaram rapidamente o hábito dos indígenas de utilizar a infusão das folhas secas trituradas como bebida. Entretanto, esse costume passou a ser considerado um “vício” pelos eclesiásticos, que tentaram impedir o seu consumo, considerando repudiados e excomungados os que fizessem uso da bebida. Essa atitude serviu como incentivo maior para a sua utilização, então, para salvar o rebanho da cristandade, a igreja resolveu suspender as punições, assegurando o consumo e o futuro econômico do produto (LINHARES, 1969; LESSA, 1986).

O impulso na economia ervateira surgiu com os jesuítas, no século XVII, que perceberam o valor da bebida e a fonte inesgotável de riqueza que ela pressupunha, se explorada em bases mais racionais. Além de intensificar o comércio, eles passaram a cultivar a espécie, contribuindo de forma significativa nos aspectos silviculturais, ou seja, no manejo do cultivo (LINHARES, 1969; PRAT KRICUN, 1990).

A expulsão dos jesuítas, em 1768, teve como conseqüência a decadência dos ervais e a perda da tradição de cultivo. Aproximadamente 100 anos depois a Argentina voltou a plantar erva-mate, atingindo sua auto-suficiência por volta de

1940 (REDIG, 1985). No Brasil, praticamente até hoje a atividade ervateira é extrativista, dependendo de ervas nativas, porém, o cultivo dessa espécie vem recebendo destaque nos últimos anos.

A erva-mate possui grande importância econômica, social e cultural para o Sul do Brasil, Nordeste da Argentina e grande parte do Paraguai. Integra um dos mais tradicionais sistemas agroflorestais, sendo uma das culturas que concorrem para a manutenção do pequeno produtor no meio rural.

No Brasil, é explorada economicamente em cerca de 596 municípios dos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul, com 180 mil propriedades rurais envolvidas, sendo na maioria, constituídas de pequenos e médios produtores. A erva-mate abastece 750 indústrias, gerando 710 mil empregos, com uma produção de aproximadamente 700 mil toneladas por ano do produto industrializado (MACCARI JUNIOR, 2000).

O Rio Grande do Sul foi o maior produtor brasileiro na década de 70, respondendo por 50% da produção, mas sua participação foi reduzida para 25% em 1999. O Paraná passou a ocupar o seu lugar, produzindo 37% do total, seguido de Santa Catarina com 36%.

Grande parte da produção brasileira é comercializada internamente (80%), ficando o restante para exportação. Dentre os países importadores, o Uruguai absorve quase integralmente a erva-mate exportada, ficando pequenos volumes para Chile, Alemanha e Paraguai (GAZETA GRUPO DE COMUNICAÇÕES, 1999).

Sua principal utilização é na produção de bebidas, principalmente na forma de chimarrão e chás, mas devido às suas propriedades fitoquímicas, apresenta grande potencial para outras aplicações industriais como corante, conservante alimentar, medicamentos, produtos de higiene e cosméticos (MACCARI JUNIOR, 2000).

A erva-mate apresenta na sua composição química, substâncias de grande interesse terapêutico como: cafeína, teobromina, substâncias tânicas, flavonóides, vitaminas e minerais, que agem sobre o sistema cardiovascular, respiratório, tecido muscular, trato gastrointestinal e também apresentam propriedades estimulantes sobre o sistema nervoso central, assim como, função anti-reumática, antioxidante e diurética (ALIKARIDIS, 1987; FUCHS; WANNMACHER, 1998, MACCARI JUNIOR, 2000).

Devido à utilização medicinal, foi incorporada em várias farmacopéias como nas francesas em 1866 e 1884, na portuguesa em 1876, na argentina em 1898, na brasileira em 1929, nas venezuelanas em 1898, 1910, 1927 e 1939, as mexicanas em 1904, 1925 e 1952 e na paraguaia em 1944 (IMBESI, 1964).

3.1.4. Programas de melhoramento e conservação genética

O aumento do consumo de *I. paraguariensis*, tanto no mercado interno quanto externo, e a queda de produção dos ervais nativos, devido ao desmatamento e expansão da fronteira agrícola, motivou o plantio desta espécie em cultivos homogêneos puros ou em associação.

Estima-se que 15 milhões de mudas de erva-mate são produzidas anualmente na região Sul a partir de sementes colhidas sem qualquer critério de seleção, de árvores nativas e povoamentos implantados. Como consequência, os ervais apresentam alta taxa de mortalidade, desenvolvimento heterogêneo e baixa produtividade, com reflexos negativos na qualidade do produto final.

Os programas de melhoramento de erva-mate tiveram início na Argentina, em 1970 (PRAT KRICUN; BELINGHERI, 1995) e já existem três cultivares recomendados para plantio, que não se adaptam às condições brasileiras (FRANCO, 1992).

No Brasil, o melhoramento é mais recente, mas cabe destacar os programas desenvolvidos pela EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina) e *Embrapa Florestas*, com a seleção de procedências, progênies, indivíduos e clones (DA CROCE; FLOSS, 1999; RESENDE et al., 2000).

O único parâmetro de avaliação nestes programas consiste na produção de massa foliar. Entretanto, a preocupação com a qualidade do produto final tem despertado o interesse dos melhoristas em associar outras características ao processo de seleção de indivíduos. As análises fitoquímicas, visando determinar e quantificar os componentes químicos presentes na erva-mate, podem ser empregadas para selecionar plantas com determinadas características para a indústria, como por exemplo, sabor suave (DONADUZZI et al., 2000; CANSIAN et al., 2003a).

Com relação ao programa de conservação dos recursos genéticos de erva-

mate, além dos dois grupos citados anteriormente, uma terceira equipe multi-institucional formada pela UFRGS, FEPAGRO e UNIJUI, está envolvida na formação de bancos de germoplasma (WINGE, 1997).

Entretanto, existem poucos trabalhos sobre a biologia e, principalmente, sobre a estrutura genética da erva-mate. Algumas pesquisas foram realizadas utilizando marcadores moleculares (RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA) para determinar a diversidade genética em populações naturais (GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000; CANSIAN et al., 2003a) e também em testes de procedências e progênies de programas de melhoramento (VIDOR et al., 2002a; VIDOR et al., 2002b). Os resultados obtidos indicam que a base genética da erva-mate é relativamente estreita, colocando-a como uma espécie potencialmente em risco de extinção.

WOLLHEIM; WINGE (1992) realizaram um estudo preliminar sobre paternidade e fluxo gênico, analisando as progênies de três árvores, através de marcadores isoenzimáticos; porém, as autoras sugerem que outras populações sejam estudadas. CANSIAN et al. (2003b) identificaram os polinizadores de uma planta matriz de erva-mate, utilizando marcadores RAPD.

Estudos clássicos de genética de populações devem ser conduzidos para estimar diversos parâmetros que influenciam a estrutura genética, como a variação genética entre e dentro de populações, a heterozigosidade esperada e observada, a herança genética e o fluxo gênico. Esse conhecimento é fundamental para o estabelecimento de estratégias de coleta e conservação genética, formação dos bancos de germoplasma e desenvolvimento de programas de melhoramento.

3.2. Marcadores genéticos

Marcadores genéticos são características qualitativas com herança Mendeliana, facilmente reconhecidas e cuja expressão não sofre influência ambiental (ROBINSON, 1998). Geralmente são controlados por um ou poucos locos gênicos (FINKELDEY, 1998). Eles podem ser morfológicos, bioquímicos (isoenzimas) ou moleculares.

3.2.1. Marcadores bioquímicos

As isoenzimas são definidas como múltiplas formas moleculares de uma enzima que ocorrem num mesmo organismo e que desempenham a mesma atividade catalítica (MOSS, 1982). São controladas geneticamente por um ou vários genes situados no mesmo loco ou em locos diferentes, respectivamente (SCANDALIOS, 1969). Quando representam a expressão fenotípica de alelos situados no mesmo loco são denominadas de aloenzimas (GOTTLIEB, 1971).

As enzimas (polipeptídios) são consideradas os produtos primários dos genes. Portanto, alterações na seqüência de DNA, devido a mutações, como substituição de nucleotídios, deleção ou adição, conduzem, na maioria dos casos, a mudanças na seqüência dos aminoácidos. Sendo assim, a propriedade cinética da enzima é influenciada quando essas mutações alteram a carga elétrica ou a conformação da molécula. As diferenças de mobilidade das duas formas de enzimas (forma original e mutada) podem ser verificadas com a utilização de técnicas eletroforéticas apropriadas para a separação de moléculas. Então, diferentes formas moleculares de uma enzima (isoenzima), detectadas através de eletroforese, são decorrentes de diferenças entre os genes que codificam a enzima (BERGMANN; HATTEMER, 1998).

A técnica isoenzimática envolve basicamente três etapas: a extração de proteínas do tecido vegetal, a separação destas proteínas através de eletroforese e a coloração histoquímica do gel.

Os extratos protéicos são obtidos pela maceração da amostra em soluções extratoras apropriadas. O tampão de extração deve promover a extração das proteínas e manter a sua atividade catalítica, além de prevenir a oxidação de compostos fenólicos associados, que inativam as enzimas ou alteram a mobilidade das moléculas de proteínas.

A eletroforese é utilizada para a separação das moléculas de acordo com a sua carga elétrica, peso molecular e forma. A movimentação das moléculas ocorre através de um suporte poroso em um tampão adequado (gel de amido, poliacrilamida, acetato de celulose ou agarose), quando submetidas a um campo elétrico. Nestas condições, as moléculas migram em direção ao pólo oposto a sua carga (proteínas negativas migram em direção ao pólo positivo).

É possível a visualização das isoenzimas no gel, após a separação do extrato protéico através da eletroforese, com a adição de corantes histoquímicos específicos, que fornecem substrato para as enzimas. O padrão de bandas isoenzimáticas (zimograma) resulta da catalisação de uma reação química pela isoenzima presente no gel. Os zimogramas são interpretados geneticamente, considerando-se a estrutura molecular de cada enzima (monomérica, dimérica, tetramérica, etc.), os locos e os alelos presentes (LIENGSIRI; PIEWLUANG; BOYLE, 1990; ALFENAS, 1998; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

As isoenzimas apresentam algumas propriedades que as tornam interessantes ao estudo de genética de populações florestais. Entre elas, podemos citar: a) a expressão da maioria das isoenzimas não é influenciada pelo ambiente (com exceções das peroxidases, esterases, fosfatases e amilases); b) possuem atividade em diferentes estágios ontogenéticos ou partes da planta (com exceção das catalases e peroxidases ácidas); c) pequenas quantidades de tecido são necessárias para a realização das análises; d) apresentam natureza codominante, que permite distinguir o genótipo homocigoto dominante do heterocigoto; e) várias enzimas e amostras podem ser analisadas simultaneamente; f) os procedimentos são simples, rápidos e com custos acessíveis; g) a técnica pode ser adaptada para muitas espécies (LIENGSIRI; PIEWLUANG; BOYLE, 1990; BERGMANN; HATTEMER, 1998; FINKELDEY, 1998; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores isoenzimáticos apresentam algumas limitações: a) cobertura parcial do genoma, apenas as regiões codificantes são analisadas; b) polimorfismo detectável em cada loco é reduzido (número de alelos por loco); c) número de sistemas enzimáticos detectados é limitado e muitas vezes não ocorre variação genética para um ou vários locos isoenzimáticos (BERGMANN; HATTEMER, 1998; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Apesar destas restrições, os marcadores isoenzimáticos são importantes ferramentas para os evolucionistas, geneticistas e melhoristas e embora novas técnicas moleculares tenham surgido, estes marcadores ainda são amplamente utilizados em estudos genéticos (SOUSA, 2000). Eles apresentam diversas aplicações na conservação dos recursos genéticos e melhoramento florestal, pois permitem caracterizar os sistemas de cruzamento, realizar análise de paternidade, estimar as taxas de fluxo gênico e migração, avaliar a eficiência de pomar de

sementes, caracterizar a estrutura genética de populações, estudar a filogênia e taxonomia das espécies e auxiliar no mapeamento genético de característica de interesse (GLAUBITZ; MORAN, 2000).

Existem poucos trabalhos utilizando marcadores isoenzimáticos para *I. paraguariensis*. Além disso, foram empregados somente os sistemas alfa e beta esterases (WOLLHEIM, 1991; WOLLHEIM; WINGE, 1992; PALMA-SILVA; WOLLHEIM; WINGE, 2000). Essas enzimas apresentam alto polimorfismo, estando envolvidas no metabolismo secundário e atuando sobre diversos substratos (GILLESPIE; KOJIMA, 1968; GILLESPIE; LANGLEY, 1974). Entretanto, diversos autores afirmam serem influenciadas pelo ambiente e imitarem a segregação Mendeliana, induzindo a estimativas viesadas das frequências alélicas e hiperestimativas dos níveis de heterozigosidade (CHAGALA, 1996; SOUSA, 2000).

3.2.2. Marcadores moleculares

Com o advento de modernas técnicas de biologia molecular, surgiram diversos métodos que podem ser empregados para detectar variabilidade genética ao nível de DNA. Os mais utilizados em estudos genéticos e em programas de melhoramento são: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e microssatélites (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998).

Na técnica RFLP, o DNA é digerido com enzimas de restrição, que clivam a fita dupla de DNA em seqüências específicas, gerando um grande número de fragmentos de diferentes tamanhos. Os mesmos são separados por eletroforese, posteriormente desnaturados e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (processo denominado de *Southern blot*). A membrana é exposta a uma solução contendo sonda radioativa, que hibridiza com a região homóloga de DNA, permitindo a visualização destes fragmentos através do processo de autoradiografia. O polimorfismo ocorre devido à variação na distribuição dos sítios de restrição na fita de DNA, gerando fragmentos de diferentes tamanhos, que resultam em diferenças na posição das bandas no gel (FORREST, 1994; AQUADRO et al., 1998; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores RFLP têm a vantagem de cobrir, potencialmente, todo o genoma, o que não ocorre com isoenzimas; possuem expressão codominante, permitindo identificar genótipos heterozigotos e homozigotos; o número de marcadores é praticamente ilimitado; o polimorfismo alélico é maior quando comparado a marcadores isoenzimáticos; apresentam alta consistência e repetibilidade dos resultados. Entretanto, existem algumas limitações: a técnica é laboriosa e exige pessoal especializado; é necessária a disponibilidade de uma biblioteca de sondas; utiliza material radioativo e o custo é bastante elevado (FORREST, 1994; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O grande avanço na área de marcadores moleculares surgiu com o desenvolvimento da tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR - Polymerase Chain Reaction), concebida por Kary Mullis em meados da década de 80, que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um determinado fragmento de DNA (MULLIS; FALOONA, 1987). A facilidade, a rapidez e a sensibilidade dessa técnica possibilitaram o surgimento de uma nova geração de marcadores moleculares baseados em PCR, entre eles: RAPD, AFLP e microssatélites, que diferenciam-se em função da metodologia empregada para revelar a variabilidade.

A reação de PCR baseia-se na amplificação de um fragmento específico de DNA pela enzima DNA polimerase, usando um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), que hibridizam em direções opostas e delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Os *primers* são sintetizados artificialmente de maneira a complementar as seqüências específicas que flanqueiam a região alvo, sendo necessário informações prévias sobre essas seqüências para o desenho dos mesmos. As etapas da reação de PCR consistem na desnaturação da fita dupla de DNA, anelamento dos *primers* com as seqüências complementares por hibridização e a extensão dos *primers*, a partir de cada terminal 3', por adição de nucleotídeos pela enzima DNA polimerase. Este ciclo é repetido várias vezes, ocorrendo a amplificação do DNA em progressão geométrica. Esta escala de amplificação, permite iniciar a reação com quantidades mínimas de DNA e terminar com grandes quantidades de uma seqüência específica (ERLICH, 1989; STEFFAN; ATLAS, 1991; WAUGH, 1997; HOEZEL; GREEN, 1998).

Em 1990, dois grupos, trabalhando independentemente, desenvolveram uma

técnica para detecção de polimorfismo que não requer informações prévias sobre a seqüência de DNA para o desenho dos *primers* específicos. WILLIAMS et al. (1990) patentearam a tecnologia como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), nome mais comumente utilizado, e WELSH; MCCLELLAND (1990) a denominaram de AP-PCR (Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction).

A tecnologia RAPD baseia-se na amplificação de segmentos de DNA ao acaso, utilizando *primers* mais curtos, com dez pares de bases de extensão, cuja seqüência nucleotídica é arbitrária. A seqüência amplificada pode ser visualizada na forma de uma banda no gel de agarose. Cada *primer* arbitrário dirige a síntese de vários segmentos de DNA, simultaneamente, em diversos pontos do genoma (WAUGH, 1997; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). O polimorfismo é reconhecido pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência, deste mesmo fragmento, em outro genótipo (CRUZ, 1998).

Quando comparada a outras técnicas moleculares, a técnica RAPD apresenta como vantagens a simplicidade de execução e custos inferiores, a rápida obtenção de marcadores, a necessidade de pequenas quantidades de DNA e a possibilidade de gerar um número ilimitado de marcadores com alto nível de polimorfismo. As limitações dos marcadores RAPD consistem no baixo conteúdo de informação genética por loco, pois são marcadores genéticos dominantes, não sendo possível distinguir o genótipo heterozigoto do homozigoto dominante, e na alta sensibilidade da técnica, ocasionando baixa reprodutibilidade dos resultados (HALLDÉN et al., 1996, FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; ZHIVOTOVSKY, 1999; LACERDA et al., 2001). Apesar desses problemas, a técnica RAPD é, até o momento, a mais amplamente utilizada nos estudos de diversidade genética, auxiliando nos programas de melhoramento e conservação dos recursos genéticos.

Na técnica AFLP, o DNA genômico é clivado com duas enzimas de restrição, uma de corte raro e outra de corte freqüente e, posteriormente, ligado a adaptadores específicos que possuem terminais complementares às extremidades resultantes da clivagem pelas enzimas de restrição. Em seguida, é realizada a reação de PCR para a amplificação seletiva de fragmentos com *primers* específicos que contém a seqüência complementar aos adaptadores e ainda 1 a 3 nucleotídeos adicionais na extremidade 3'. Por último, é feita a separação dos fragmentos por eletroforese em

gel de poliacrilamida (BROWN; KRESOVICH, 1996; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998; COSTA et al., 2000).

Os marcadores AFLP têm como vantagens o grande número de marcadores analisados em um único gel, com alto poder de detecção de variabilidade genética; não requerem informação prévia de seqüência de DNA; há a possibilidade de diferentes combinações entre *primers* e enzimas de restrição; e possuem maior robustez dos resultados, quando comparados com a técnica RAPD. Entretanto, a principal limitação dos marcadores AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por loco, pois, assim como os marcadores RAPD, são de natureza dominante. Além disso, a análise AFLP envolve um maior número de etapas, necessitando de maior quantidade de reagentes e equipamentos, incrementando o custo das análises (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; HOEZEL; GREEN, 1998; ZHIVOTOVSKY, 1999; COSTA et al., 2000).

Os marcadores microssatélites, também conhecidos como SSR (Simple Sequence Repeats), consistem de pequenas seqüências com 1 a 6 pares de bases, repetidas e adjacentes, distribuídas no genoma. As regiões contendo as seqüências simples repetidas são amplificadas através de PCR, utilizando-se um par de *primers* específico, de 20 a 30 bases, complementares às seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite. Os segmentos amplificados geralmente apresentam alto polimorfismo, devido à presença de números variáveis de elementos simples repetidos e cada segmento de tamanho diferente representa um alelo específico do mesmo loco. A detecção dos produtos amplificados é feita através de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. Cada loco é analisado individualmente ao se utilizar o par de *primers* construído especificamente para a sua amplificação (SCHLÖTTERER, 1998; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SALLES et al., 2003).

Os marcadores microssatélites são muito atrativos aos geneticistas, pois possuem diversas vantagens, como a expressão codominante e o multialelismo, que conferem a esses marcadores o mais alto polimorfismo, quando comparados aos demais marcadores moleculares. Os mesmos são abundantes e uniformemente dispersos no genoma, podendo ser eficientemente analisados empregando-se a reação de PCR, além de possibilitar a utilização de dois ou mais *primers* na mesma reação de PCR (ensaios multiplex). Embora essa técnica seja muito atrativa, para o uso rotineiro dos microssatélites é necessário, primeiramente, amplificar uma região,

posteriormente seqüenciá-la e, finalmente, sintetizar os iniciadores específicos para cada loco. A partir de então, o loco marcador pode ser utilizado indefinidamente naquela espécie. Sendo assim, há um custo elevado e trabalho intenso no início, mas subseqüentemente torna-se baixo e simples (BROWN; KRESOVICH, 1996; BRONDANI et al., 1998; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SCHOLÖTTERER, 1998; COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001; SALLES et al., 2003).

Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis apresentam uma ampla capacidade de amostragem do genoma, sendo de grande potencial para a avaliação da diversidade genética tanto para aplicações filogenéticas e evolutivas quanto para fins práticos em programas de conservação e de melhoramento genético.

É importante salientar que a escolha de uma ou outra técnica de marcadores moleculares deve ser baseada no objetivo do trabalho a ser desenvolvido, considerando-se as condições disponíveis e também as vantagens e limitações de cada classe de marcador.

Os marcadores RAPD, devido a sua simplicidade e rapidez, têm sido amplamente utilizados nas seguintes situações: identificação de origem parental, identificação e proteção de variedades e/ou clones patenteados, certificação de pureza genética de linhagens e híbridos, caracterização do germoplasma, construção de mapas genéticos, seleção assistida de caracteres de interesse agrônômico, estimativas de distâncias genéticas e em genética de populações (TIMMERMAN; MCCALLUM, 1993, FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998; SILVEIRA et al., 2003; ZIMBACK et al., 2004; WADT; KAGEYAMA, 2004).

A utilização de marcadores moleculares como uma ferramenta auxiliar ao melhoramento clássico de culturas perenes é extremamente atraente, tendo em vista o tempo necessário para completar uma geração de melhoramento destas espécies. A perspectiva de caracterizar a variabilidade genética do material e tornar mais eficientes os cruzamentos e a seleção precoce, aumentando o ganho genético por unidade de tempo, faz com que o melhoramento destas culturas seja a área onde o uso efetivo desta tecnologia tende a ter as melhores perspectivas de sucesso.

Em *I. paraguariensis* já foram desenvolvidos alguns trabalhos utilizando marcadores moleculares (RAPD). Podemos citar os realizados por GAUER; CAVALLI-MOLINA (2000) e CANSIAN (2003), visando determinar a variabilidade

genética em populações naturais, e os de VIDOR et al. (2002a e 2002b), estudando diferentes procedências de erva-mate. Entretanto, esses estudos ainda são insuficientes para elucidar as bases genéticas da espécie.

3.3. Herança e ligação dos marcadores isoenzimáticos

O conhecimento sobre o controle genético e o modo de herança dos marcadores isoenzimáticos é um pré-requisito para a sua utilização em estudos genéticos (HATTEMER; BERGMANN; ZIEHE, 1993). A complexidade na interpretação dos fenótipos enzimáticos, como presença de alelos nulos, sobreposição de zonas, presença de bandas heterodímeras interlocos, entre outras, são elucidadas através da análise de herança (GILLET; HATTEMER, 1989).

A validação dos marcadores isoenzimáticos como marcadores genéticos, mediante a análise de herança, deve ser a primeira atividade de pesquisa a ser realizada em um estudo de genética de populações. Essa atividade deve ser planejada, o que não ocorre na maioria dos trabalhos científicos (PASTORINO; GALLO, 1998).

Vários métodos foram desenvolvidos para inferir sobre o modo de herança, levando em consideração as características dos indivíduos a serem estudados.

O método clássico para a análise de herança foi desenvolvido por Mendel, em 1866, no estudo realizado com ervilhas. Mendel utilizou cruzamentos controlados e observou a segregação da progênie de irmãos completos. No mínimo um dos pais deve ser heterozigoto para o loco gênico analisado, para que a variação dentro da progênie possa ser observada (FINKELDEY, 1998). A segregação fenotípica esperada da descendência depende do número de locos gênicos que controlam a característica, da relação de dominância e dos genótipos dos parentais. A segregação observada e a esperada podem ser comparadas através de análises estatísticas, que testam a segregação Mendeliana da característica estudada (HATTEMER, 1991).

O cruzamento controlado em espécies arbóreas é difícil de ser realizado, pois as fases de receptividade e viabilidade do pólen são, geralmente, muito curtas, existe assincronia no florescimento e, na maioria dos casos, as árvores são muito altas, dificultando o processo. Além disso, o número de descendentes obtidos

nesses cruzamentos é reduzido, prejudicando as análises estatísticas (GILLET; HATTEMER, 1989; FINKELDEY, 1998). WOLLHEIM (1991), trabalhando com erva-mate, realizou o estudo de herança de um loco isoenzimático, através da análise de progênies de sete cruzamentos controlados (três fêmeas e cinco machos), que originaram apenas 74 plântulas, sendo este número restrito para estimativas precisas.

Em coníferas, informações sobre o controle genético de isoenzimas é facilmente obtido, pois as sementes apresentam um endosperma haplóide que contém somente os genes maternos, permitindo a observação do genótipo ordenado. A identificação dos gametas maternos permite utilizar sementes de polinização aberta em estudos de herança (HATTEMER, 1991). Vários trabalhos foram conduzidos com coníferas, dentre eles: *Cupressus sempervirens* (PAPAGEORGIOU; PANETSOS; HATTEMER, 1994); *Pinus sylvestris* (CHERNODUBOV, 1994); *Larix sukaczewii* (TIMERJANOV, 1997); *Sequoia sempervirens* (ROGERS, 1997); *Austrocedrus chilensis* (PASTORINO; GALLO, 1998) e *Araucaria angustifolia* (SOUSA; HATTEMER; ROBINSON, 2002).

O terceiro método, descrito por GILLET; HATTEMER (1989), foi desenvolvido para angiospermas (caso de *I. paraguariensis*) e compara o genótipo da árvore materna, que deve ser heterozigota para a característica estudada, com a segregação de sua progênie de polinização aberta. Neste caso, o modo de herança é identificado sem a obrigatoriedade do cruzamento controlado. Ao contrário, os cruzamentos devem ser casualizados. O estudo de herança foi realizado para angiospermas, como: *Quercus robur* (ZANETTO et al., 1996), *Salix viminalis* (THORSÉN et al., 1997); *Salix alba* e *Salix fragilis* (TRIEST et al., 1998), *Pterocarpus indicus* (FINKELDEY; GUZMAN; CHANGTRAGOON, 1998), *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (MURILLO; HATTEMER, 1997) e *Genipa americana* (SEBBENN, 2004). Este método é bastante interessante para espécies florestais tropicais cujos cruzamentos controlados são muito difíceis ou impossíveis de serem realizados.

Um dos princípios da segregação Mendeliana considera que a união das células reprodutivas femininas e masculinas para a formação de um zigoto é um processo casualizado que une pares de determinantes hereditários (HARTL, 1994; GILLET; HATTEMER, 1989). O equilíbrio de segregação é assumido em estudos de

genética de populações. Entretanto, muitos autores têm encontrado desvios de segregação. Segundo GILLET; GREGORIUS (1992), os seguintes fatores podem explicar esses desvios: a) o processo de meiose pode ser interrompido, resultando em formação desigual de tipos gaméticos; b) os tipos gaméticos resultantes da meiose diferem na sua capacidade de sobreviver ao estágio de fertilização; c) pode ocorrer uma fertilização diferencial dos tipos gaméticos como consequência de uma relação de fusão específica, determinada pelo sistema de cruzamento.

A análise de ligação é definida como associação entre genes localizados no mesmo cromossomo. Para esses genes, a razão de segregação não obedece a lei de distribuição independente de Mendel, preconizando que ao se considerar dois ou mais genes, cada um comporta-se independentemente do outro.

Para o estudo da estrutura genética e do sistema de reprodução, que envolvem estimativas multilocus, o conhecimento da ligação existente entre locos é importante a fim de se obter estimativas confiáveis (LEWANDOWSKI; BURCZYK; MEJNARTOWICZ, 1992; THORSÉN et al., 1997). Quando características econômicas importantes encontram-se ligadas em grupos, marcadores genéticos ligados a essas características possuem grande valor para programas de melhoramento (RUDIN; EKBERG, 1978). Esse é o princípio utilizado para a construção de mapas genéticos.

3.4. Sistema reprodutivo e determinação de paternidade

O sistema de reprodução é a forma de como as espécies transferem suas informações genéticas de uma geração para outra (WRIGHT, 1921), podendo ser assexuado ou sexuado.

No primeiro caso, a descendência é gerada a partir de tecidos de um único organismo somente por divisões mitóticas, não ocorrendo meiose e, conseqüentemente, recombinações. A progênie é idêntica ao genótipo original e denominada de clone. Entretanto, a reprodução de organismos superiores geralmente envolve o processo sexual, onde dois indivíduos produzem gametas de tipos opostos que se fundem e formam um zigoto, originando uma descendência com diferentes genótipos multilocos (FINKELDEY, 1998).

Espécies sexuadas podem ter os seguintes sistemas de reprodução: autogamia, alogamia ou sistema misto. Na autogamia ocorre fusão dos gametas masculinos e femininos de um mesmo indivíduo (autofecundação). Na alogamia, verifica-se cruzamento entre indivíduos diferentes. No sistema misto, os dois processos anteriores são detectados, com predominância de um deles, conforme a relação entre as taxas de cruzamento e autofecundação (RAMALHO; ABREU; SANTOS, 2001; SOUZA JÚNIOR, 2001).

Diversos fatores genéticos e ecológicos interferem no sistema reprodutivo de uma espécie. Dentre eles, podemos citar: a) o sistema sexual (monoícia, dioícia ou hermafroditismo) e a presença de auto-incompatibilidade (MURAWSKI; HAMRICK, 1991; FINKELDEY, 1998; LEE, 2000); b) o tamanho e a densidade populacional, que corresponde ao número de árvores florescendo por hectare (ROUTLEY; MAVRAGANIS; ECKERT, 1999; FRANCESCHINELLI; BAWA, 2000); c) a estrutura espacial, relativa ao modo de distribuição das árvores em florescimento (FINKELDEY, 1998); d) a fenologia do florescimento, relacionada a variações entre os períodos de floração das plantas (BOSHIER; CHASE; BAWA, 1995); e) o modo de polinização e o comportamento dos polinizadores (FRANCESCHINELLI; BAWA, 2000).

Os métodos tradicionais para avaliação do sistema reprodutivo baseiam-se na observação dos cruzamentos e do comportamento dos agentes polinizadores, no exame da morfologia floral e de resultados de experimentos de polinização controlada. As taxas de cruzamentos são inferidas pela análise das progênies, mediante marcadores morfológicos conhecidos. Esses métodos fornecem indicações sobre o sistema reprodutivo de uma espécie, mas não permitem uma medida direta do sucesso reprodutivo de populações (PAIVA; KAGEYAMA; VENCOVSKY, 1993; PAIVA; KAGEYAMA; VENCOVSKY, 1994).

Com o advento dos marcadores bioquímicos (isoenzimas), as taxas de cruzamentos puderam ser estimadas mais efetivamente do que pelos métodos tradicionais (BAWA, 1976). Segundo RITLAND; JAIN (1981), dados eletroforéticos conferem maior poder e versatilidade nas estimativas, pois muitos locos segregantes, com alelos codominantes, podem ser freqüentemente encontrados nas populações.

O sistema de reprodução de uma espécie tem papel fundamental na determinação da estrutura genética espacial e temporal das populações (RITLAND; JAIN, 1981; MURAWSKI; DAYANANDAN; BAWA, 1994). Segundo HAMRICK (1983) e HAMRICK; GODT (1989), em espécies de autofecundação a maior variabilidade genética encontra-se entre populações, enquanto que em espécies de cruzamento a variabilidade é maior dentro de populações. No sistema misto, a variabilidade é intermediária, entre espécies autógamas e alógamas, sendo o potencial de diferenciação entre populações variável em função do balanço dessas duas formas de reprodução (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

O conhecimento do sistema reprodutivo é de grande importância para os programas de melhoramento e conservação dos recursos genéticos da espécie, pois permite delinear estratégias que otimizem a amostragem da variabilidade genética e também indica os modelos genético-estatísticos apropriados para a estimativa dos parâmetros genéticos (SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN, 2003; FREITAS et al., 2004).

A maioria das pesquisas sobre o sistema de cruzamento em espécies arbóreas tem sido realizada em populações naturais. Diversas espécies já foram estudadas, utilizando marcadores isoenzimáticos, como: *Tectona grandis* (KERTADIKARA e PRAT, 1995), *Austrocedus chilensis* (PASTORINO, 2000), *Thuja plicata* (O'CONNEL et al., 2001), *Acacia aroma* e *A. macracantha* (CASIVA et al., 2004); dentre outras. No Brasil, já foram pesquisadas: *Genipa americana* (SEBBENN; KAGEYAMA; VENCOSVKY, 1998), *Cariniana legalis* (SEBBENN et al., 2000a), *Esenbeckia leiocarpa* (SEOANE; SEBBENN; KAGEYAMA, 2001), *Copaifera langsdorfii* (OLIVEIRA; CARVALHO; ROSADO, 2002), *Cedrela fissilis* (PÓVOA, 2002), *Cryptocarya moschata* (MORAES; MONTEIRO, 2002), *Chorisia speciosa* (SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN, 2003), *Mimosa scabrella* (SOBIERAJSKI, 2004) e *Senna multijuga* (RIBEIRO; LOVATO, 2004).

Alguns trabalhos têm sido feitos em pomares e Áreas de Produção de Sementes (APS), principalmente com espécies temperadas, visando conhecer sua influência na endogamia, depressão endogâmica, adaptação, ligação gênica e contaminação de pólen (FRIEDMAN; ADAMS, 1985; RITLAND; EL-KASSABY, 1985; EL-KASSABY; PARKINSON; DEVITT, 1986; EL-KASSABY et al., 1986; WANG; LIN, 1998). Além disso, informam sobre a magnitude da taxa de cruzamento, presença de

cruzamento entre indivíduos aparentados, taxa de autofecundação, etc. (CLEGG, 1980; WEIR, 1996). Esses estudos são importantes, pois asseguram a qualidade genética das sementes produzidas, porém são raros. Pesquisas foram realizadas com *Pinus sylvestris* (MUONA; YAZDANI; RUDIN, 1987), *Pinus taeda* (BUSH; SMOUSE, 1991) e *Eucalyptus grandis* (BURGESS et al., 1995).

A determinação da paternidade a partir de dados genéticos vem tornando-se uma área de estudo interessante na biologia da população, auxiliando no conhecimento do modo de reprodução e dispersão genética (ELLSTRAND; MARSHALL, 1985). Esse tipo de estudo teve início na área humana e animal, expandindo-se para os vegetais.

Em APS a análise de paternidade é extremamente atrativa, pois permite identificar os prováveis pais envolvidos nos cruzamentos, conhecer sobre o sucesso reprodutivo dos indivíduos, detectar contaminação de pólen externo e inferir sobre os padrões de dispersão do pólen (LIAN; MIWA; HOTETSU, 2001; WANG, 2004; ROBLEDO-ARNUNCIO; GIL, 2005).

Os primeiros estudos de análise de paternidade foram baseados na exclusão de paternidade. Entretanto, vários pais eram geneticamente compatíveis com a descendência analisada, mesmo quando a probabilidade de exclusão dos machos era elevada (MARSHALL et al., 1998).

Posteriormente, diferentes métodos foram desenvolvidos e estes estimavam a verossimilhança de paternidade dos machos não excluídos, mas a interpretação destes resultados era difícil. Então, MARSHALL et al. (1998), definiram uma estatística delta (Δ) que auxilia na determinação da paternidade, indicando qual o macho com maior probabilidade de ser o pai, em um intervalo de confiança relaxado (80%) ou restrito (95%). A análise considera o número de machos candidatos a pai, a proporção de machos amostrados e as falhas ou erros nos dados genéticos. Segundo os autores, o programa CERVUS 2.0 é indicado para as análises de paternidade, utilizando-se dados codominantes.

3.5. Estrutura e variação genética de populações

A quantidade e o modo de distribuição da variação genética dentro e entre populações são fatores determinantes no sucesso dos programas de conservação e

melhoramento genéticos (LIENGSIRI; PIEWLUANG; BOYLE, 1990). Esses fatores são influenciados pelo sistema genético e pelas forças evolucionárias (FINKELDEY, 1998).

O sistema genético envolve um complexo aparato utilizado pela população a fim de assegurar a sua existência, principalmente no que se refere à manutenção da adaptabilidade a futuras mudanças ambientais, determinando a organização e a transmissão da informação genética e também o tipo e a quantidade de combinações genéticas produzidas em uma população. Diversos componentes formam o sistema genético: sistema sexual, sistema reprodutivo, fluxo gênico, sistemas de incompatibilidade, sistemas de recombinação e sistemas adaptativos (HATTEMER, 1991; FINKELDEY, 1998).

O sistema sexual refere-se aos tipos: machos, fêmeas ou bissexuais (macho/fêmea). A determinação desses tipos genéticos ocorre, geralmente, sob rigoroso controle genético. As espécies monóicas possuem gametas femininos e masculinos na mesma planta, dióicas apresentam gametas femininos e masculinos em plantas diferentes e as hermafroditas possuem flores completas, ou seja, com gametas femininos e masculinos na mesma flor. Nas florestas tropicais, o sistema sexual predominante é o hermafroditismo, sendo seguido pela dioícia, enquanto nas temperadas predomina a monoícia (BAWA; OPLER, 1975; FINKELDEY, 1998; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Relacionado ao sistema sexual, encontra-se o sistema reprodutivo, envolvendo os elementos que influenciam a fusão de gametas e a produção de zigotos. A estrutura genotípica de uma população é especialmente determinada pelo sistema reprodutivo, sendo as estimativas das taxas de autofecundação e de cruzamento particularmente importantes nesse contexto (FINKELDEY, 1998).

O sistema de incompatibilidade dificulta ou impossibilita alguns tipos de cruzamentos. Quando o sistema atua antes que o zigoto seja formado, é denominado de pré-zigótico, tendo como objetivo primordial à prevenção de autofecundação (auto-incompatibilidade). Quando age após a fusão dos gametas, é chamado de pós-zigótico, atuando no embrião, semente ou plântula (auto-esterilidade). Esse sistema elimina as plantas endogâmicas da população, durante os estágios precoces de desenvolvimento (FINKELDEY, 1998).

O sistema adaptativo envolve todos os elementos do sistema genético que contribuem para a adaptabilidade dos indivíduos e populações, em resposta às alterações ambientais, climáticas, fragmentação das florestas, cortes seletivos, práticas silviculturais, etc. O objetivo principal é a preservação da população. Essa adaptação é acompanhada de mudanças na estrutura genética populacional (FINKELDEY, 1998).

O sistema de recombinação determina a formação de novos genótipos a partir dos existentes. Este sistema está relacionado ao sistema reprodutivo e a quantidade de variação genética (FINKELDEY, 1998).

Diversas forças evolucionárias alteram o conjunto gênico da população, são elas: mutação, seleção natural, migração (sementes), fluxo gênico (pólen) e deriva genética (FINKELDEY, 1998).

A mutação é a origem da variação genética, sendo considerada qualquer mudança herdável no material genético. Tais mudanças podem ocorrer devido à substituição de um ou poucos nucleotídeos na seqüência de DNA, denominada de mutação pontual, ou podem ser mutações cromossômicas, afetando o número e a estrutura dos cromossomos, como: aneuploidia, poliploidia, deleções, translocações, inversões, etc. Embora a taxa de mutação seja muito baixa e fraca para alterar as freqüências alélicas, constitui-se a fonte de variação sobre a qual atuam outras forças evolucionárias. A maioria das mutações são prejudiciais ou neutras (não interferem na sobrevivência e capacidade reprodutiva), sendo poucas favoráveis ao organismo (HARTL, 1994; HARTL; CLARK, 1997).

Segundo FINKELDEY (1998), o transporte de pólen (fluxo gênico) ou sementes (migração) pode aumentar a multiplicidade genética da população, se os genes presentes em uma população migrarem para outra que não os possuam, e com isso diminuir a diferenciação genética entre populações.

O fluxo gênico encontra-se estreitamente relacionado ao sistema reprodutivo. Nas florestas tropicais, a maioria das espécies são monóicas, auto-incompatíveis ou predominantemente de cruzamentos. Isso implica que para a fertilização há necessidade de transporte de pólen de uma planta para o estigma de outra planta da mesma espécie (xenogamia). O transporte de pólen é realizado por vetores, que podem ser o vento (anemofilia), animais (zoofilia), insetos (entomofilia), dentre outros (FINKELDEY (1998).

A migração consiste no transporte de informação genética via sementes diplóides. Possui importância na formação de “vizinhança” de plantas geneticamente relacionadas, para o tamanho populacional e a expansão da espécie. O principal vetor para a dispersão de sementes é o vento (anemocoria), mas também são dispersas pela água (hidrocoria), gravidade (barocoria), animais (zoocoria), dentre outros (FINKELDEY, 1998).

A seleção natural é uma consequência da diferente capacidade que os organismos geneticamente distintos têm de produzir descendentes (FINKELDEY, 1998). Essa diferença no desempenho dos indivíduos não é aleatória e atua de maneira discriminativa no seu fenótipo (VALOIS; SALOMÃO; ALLEM, 1996). A seleção não aumenta a multiplicidade, mas geralmente contribui na manutenção, ou mesmo no incremento, da diversidade genética pelas vantagens seletivas de alelos raros ou genótipos heterozigotos. É o principal fator evolucionário que causa alteração na estrutura genética, visando a adaptação da população ao meio-ambiente (FINKELDEY, 1998). Entretanto, as variações ocasionadas na frequência alélica pela seleção natural são determinadas pelas circunstâncias presentes, não podendo moldar-se a ambientes futuros (FUTUYMA, 2002). A base da seleção é a diferente sobrevivência dos genótipos (seleção de viabilidade) e as diferentes contribuições dos genótipos na formação da progênie (seleção de fertilidade) (FINKELDEY, 1998).

O processo de deriva genética consiste em mudança aleatória na frequência gênica, provocando a perda de alelos e a invariabilidade de locos polimórficos (fixação de alelos). As principais consequências da deriva genética são a redução da variabilidade genética dentro das populações e a contribuição significativa na diferenciação entre populações. A deriva ocorre em função do tamanho populacional, sendo mais forte nas populações pequenas (HARTL, 1994; FINKELDEY, 1998; FUTUYMA, 2002).

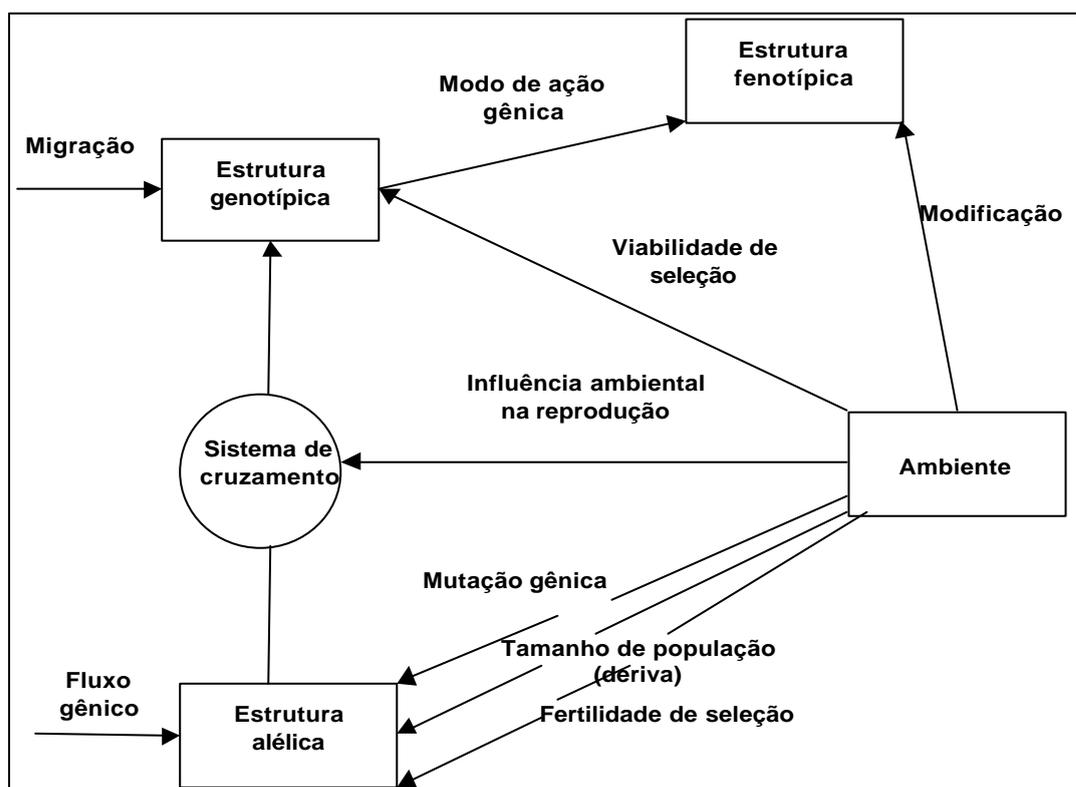
Os fatores evolucionários geralmente não alteram a estrutura genética isoladamente, mas em conjunto, compensando ou complementando um ao outro. A ação das forças evolucionárias, considerando os diferentes componentes da estrutura da população, é representada na Figura 5.

Diversos estudos têm sido realizados considerando o efeito de diferentes características de história de vida e variáveis ecológicas sobre a estrutura e os níveis

de diversidade genética de populações de plantas, utilizando marcadores isoenzimáticos (HAMRICK; LINHART; MITTON, 1979; HAMRICK; GODT; SHERMAN-BROYLES, 1992).

HAMRICK; LINHART; MITTON (1979) relataram que espécies lenhosas, perenes, de ciclo longo, com ampla distribuição geográfica, pertencentes a estágios sucessionais tardios, predominantemente alógamas, polinizadas pelo vento, com alta fecundidade e intenso fluxo gênico, apresentam maior variabilidade genética intrapopulacional que espécies com outras combinações.

FIGURA 5. Forças evolucionárias e sua influência sobre a estrutura fenotípica de uma população (HATTEMER; MÜLLER-STARCK, 1990, citado por SOUSA, 2000)



A erva-mate é uma espécie perene, com ciclo de vida longo, possui ampla distribuição natural, dioicida críptica, implicando em fecundação cruzada obrigatória, sendo a polinização realizada por insetos. Com isso, espera-se alta diversidade genética da espécie.

Estudos genéticos em *I. paraguariensis* ainda são escassos, embora algumas pesquisas tenham sido desenvolvidas objetivando estimar a variabilidade genética. WINGE et al. (1995) e PALMA-SILVA; WOLLHEIM; WINGE (2000), utilizaram dois sistemas enzimáticos, alfa e beta esterases, para estudar populações naturais de erva-mate. Os resultados mostraram maior variabilidade genética intrapopulacional e as distâncias genéticas foram diretamente correlacionadas com as distâncias geográficas entre elas. Esses autores utilizaram poucos locos isoenzimáticos e os sistemas empregados podem ter sido influenciados por ambiente; além disso, mesmo utilizando uma técnica codominante, poucos parâmetros genéticos foram estimados. GREGIANINI; WINGE (2000) utilizaram proteínas de reserva de sementes e também verificaram alta diversidade dentro de populações.

Marcadores moleculares (RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA) foram empregados por GAUER; CAVALLI-MOLINA (2000) e CANSIAN et al. (2003a) na análise genética de populações naturais de erva-mate e os resultados obtidos com essa técnica foram semelhantes aos anteriores. Os marcadores RAPD mostraram-se eficientes para estimar a variabilidade; porém, por serem de natureza dominante (não distinguem o heterozigoto do homozigoto), não permitem estimar diversos parâmetros que influenciam a estrutura genética das populações. Esse conhecimento é fundamental para o estabelecimento de estratégias de conservação, organização dos bancos de germoplasma e desenvolvimento de programas de melhoramento.

**CAPÍTULO I. IDENTIFICAÇÃO, ANÁLISES DE HERANÇA E LIGAÇÃO DOS
LOCOS ISOENZIMÁTICOS EM *Ilex paraguariensis* St. Hil.**

1. INTRODUÇÃO

Desde 1970 os marcadores isoenzimáticos vêm sendo utilizados em estudos genéticos de espécies florestais, tornando-se uma excelente ferramenta aos programas de melhoramento e conservação dos recursos genéticos. Dentre as diversas vantagens destes marcadores, destaca-se a expressão codominante, que permite diferenciar o genótipo homozigoto dominante do heterozigoto, e o custo relativamente baixo (BERGMANN; HATTEMER, 1998; FINKELDEY, 1998).

Os marcadores isoenzimáticos são empregados no estudo do sistema de reprodução, na caracterização de diversidade e estrutura genética das populações, na determinação do fluxo gênico e migração, nos estudos de filogenia e taxonomia das espécies e no mapeamento genômico (GLAUBITZ; MORAN, 2000). Entretanto, para que esses marcadores sejam considerados marcadores genéticos, torna-se necessário conhecer o modo de herança, bem como, o equilíbrio de ligação entre os locos (GILLET; HATTEMER, 1989). Tais estudos são freqüentes em coníferas, mas escassos em arbóreas folhosas.

Ilex paraguariensis St. Hil. (erva-mate) é uma arbórea folhosa, nativa da América do Sul. Devido à composição química das folhas, apresenta diversas aplicações industriais, destacando-se a produção de bebidas. Embora seja uma cultura de grande valor comercial para o Sul do Brasil e países limítrofes, como Paraguai e Argentina, diversos aspectos referentes a sua biologia e genética são, ainda, desconhecidos.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolo para extração de proteínas e identificar locos isoenzimáticos para estudos genéticos em *I. paraguariensis* e verificar o modo de herança e desequilíbrio de ligação dos marcadores isoenzimáticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e amostragem

Para identificar os sistemas enzimáticos adequados ao estudo genético de *I. paraguariensis*, utilizou-se material proveniente de um teste combinado de procedências e progênies, com 14 anos de idade. O teste sofreu desbaste e passou a ser considerado como Área de Produção de Sementes (APS), estando localizado na *Embrapa Florestas*, em Colombo (PR), a 25° 20' S, 49° 14' W e 920 m de altitude. O tipo climático é Cfb na classificação de Koeppen (temperado úmido, com temperatura média do mês mais quente inferior a 22 °C) e temperatura média anual de 16 °C.

A área é constituída por 82 árvores, sendo três procedências do Paraná, Toledo (24° 43' S, 53° 45' W e 530 m de altitude), Cascavel (24° 57' S, 53° 27' W e 750 m de altitude) e Campo Mourão (24° 02' S, 52° 24' W e 590 m de altitude) e uma do Rio Grande do Sul, Soledade (28° 49' S, 52° 30' W e 700 m de altitude) (Tabela 1).

Amostras de folhas jovens foram coletadas em cinco plantas de cada procedência, aleatoriamente. As folhas foram tratadas diferentemente: 1) liofilizadas (72 horas) e, posteriormente, acondicionadas em congelador a – 20°C, 2) acondicionadas a – 20°C, 3) acondicionadas a – 80°C e 4) armazenadas em geladeira (5°C).

TABELA 1. Número de árvores (fêmeas e machos) de cada procedência, pertencentes à Área de Produção de Sementes (APS) de *I. paraguariensis*, localizada em Colombo (PR)

Procedência	Número de árvores	
	Fêmeas	Machos
Toledo-PR	21	31
Cascavel-PR	7	5
Campo Mourão-PR	7	6
Soledade-RS	2	3
Total	37	45

Adicionalmente aos tecidos foliares, coletaram-se frutos de todas as árvores nos meses de fevereiro e março de 2003, sendo estes imediatamente macerados para a separação das sementes, que permaneceram em local sombreado e

ventilado para secagem. Em seguida, realizou-se a estratificação das mesmas, para amolecimento do tegumento e maturação dos embriões, período que teve seis meses de duração. Após a estratificação, transferiu-se as sementes para o solo, para a germinação. Quando as plântulas atingiram, aproximadamente, 3 cm de altura e apresentavam três folíolos, foram repicadas para os tubetes (36 plântulas de cada matriz).

Para as análises de herança e ligação, utilizou-se tecido foliar das árvores adultas que originaram as sementes (25 matrizes) e das respectivas progênes (30 indivíduos por matriz). Não foram analisadas todas as fêmeas do pomar, devido à falta de produção de sementes ou ao atraso na germinação das progênes.

2.2. Extração das enzimas

Diferentes tampões de extração foram testados para a homogeneização das amostras foliares: tampão de extração número 1 e número 4, descrito por ALFENAS (1998) e o tampão utilizado por SOUSA (2000), com algumas modificações, visando eliminar os efeitos causados pelos compostos fenólicos presentes em abundância nas folhas de erva-mate. O tampão de extração de SOUSA (2000), adaptado para erva-mate, possui a seguinte composição química: PVP-40 6%, sacarose 5%, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0,004 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, DTT $0,026 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, BSA 1,5% e mercaptoetanol 1%, dissolvidos em tampão Tris-HCl $0,067 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,5.

No estabelecimento do protocolo isoenzimático utilizou-se 200 mg de tecido foliar, desprovido da nervura central e das bordas. As folhas foram maceradas manualmente, com uso de almofariz e pistilo, na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, adicionou-se 0,02 g de PVPP (exceção feita ao tampão 4) e 640 μL do tampão de extração.

Para a extração das enzimas das progênes foram realizadas algumas alterações visando dinamizar o processo. As amostras foliares, aproximadamente 100 mg, foram colocadas em tubos de microcentrífuga e maceradas, na presença de nitrogênio líquido, com um macerador elétrico. Posteriormente, adicionou-se 0,01 g de PVPP e 240 μL do tampão de extração de SOUSA (2000) adaptado para erva-mate, como anteriormente descrito.

As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 13.000 rpm a 4 °C por 10 minutos. Os extratos protéicos, absorvidos por papéis filtros Whatman número 3 (*wicks*) foram colocados em microplacas e armazenados no congelador a – 80°C até o momento das análises eletroforéticas.

2.3. Eletroforese

Foram testados 18 sistemas enzimáticos (Tabela 2) em diferentes sistemas de gel/eletrodo (Tabela 3), para identificar os mais adequados ao estudo de *I. paraguariensis*. A separação dos produtos protéicos foi realizada a partir de eletroforese horizontal, tendo como meio suporte de penetrose (13%) e sacarose (1,35%). As condições de corrida variaram conforme o sistema gel/eletrodo empregado (Tabela 3). Ao término da corrida eletroforética, o gel gerou várias fatias que foram coloridas para as enzimas específicas.

2.4. Avaliação dos zimogramas

Os resultados obtidos na revelação dos sistemas enzimáticos foram avaliados segundo a sua resolução, adotando-se os seguintes critérios: resolução ótima (+), resolução regular (\pm), resolução ruim (-), sem atividade (s.a.) e não realizado (n.r.).

A interpretação dos zimogramas seguiu padrões descritos por Alfenas (1998). As zonas codificadoras foram identificadas a partir da sua migração; a mais rápida (catódica) foi denominada de zona um, a de migração mais lenta (anódica) como dois, e assim subseqüentemente. Esta identificação foi empregada tanto para as zonas, como para os alelos.

TABELA 2. Sistemas enzimáticos testados em *I. paraguariensis*

Enzima	Sigla	E. C.
Aconitase	ACO	4.2.1.3
Álcool desidrogenase	ADH	1.1.1.1
Enzima málica	ME	1.1.1.40
Fosfatase ácida	ACP	3.1.3.2
Fosfoglucosomerase	PGI	5.3.1.9
Fosfoglucosomutase	PGM	2.7.5.1
6-Fosfogluconato desidrogenase	6-PGDH	1.1.1.44
Formiato desidrogenase	FDH	1.2.1.2
Glucose desidrogenase	GDH	1.4.1.3
Glucose-6-fosfato desidrogenase	G-6PDH	1.1.1.49
Glutamato oxaloacetato transaminase	GOT	2.6.1.1
Isocitrato desidrogenase	IDH	1.1.1.42
Leucina aminopeptidase	LAP	3.4.11.1
Malato desidrogenase	MDH	1.1.1.37
Menadiona redutase	MR	1.6.99.2
NADH desidrogenase	NDH	1.6.99.3
Peroxidase	PO	1.11.1.7
Xikimato desidrogenase	SKDH	1.1.1.25

E. C.: Enzyme Code

TABELA 3. Sistemas tampão gel/eletrodo e condições de corrida, empregados no estabelecimento de protocolo de isoenzimas para *I. paraguariensis*

Sistema	Tampão do Eletrodo	Tampão do Gel	Condições de Corrida
Lítio -borato (pH 8,1)	Ácido bórico 0,191 mol.L ⁻¹ Hidróxido de lítio 0,042 mol.L ⁻¹	Tris 0,051 mol.L ⁻¹ Ácido cítrico monoidratado 0,009 mol.L ⁻¹ 5% (v/v) tampão do eletrodo	75 mA cte. durante 5 h
Tris-citrato (pH 7,5)	Tris 0,149 mol.L ⁻¹ Ácido cítrico monoidratado 0,043 mol.L ⁻¹	Tris 0,148 mol.L ⁻¹ Ácido cítrico monoidratado 0,043 mol.L ⁻¹ Diluição: 1 tampão:3 água	150 V cte. durante 5 h e 30 min
Morfolina-citrato (pH 6,1)	Ácido cítrico monoidratado 0,04 mol.L ⁻¹ Titular com N-(aminopropil) morfolina até pH 6,1	Ácido cítrico monoidratado 0,04 mol.L ⁻¹ Titular com N-(aminopropil) morfolina até pH 6,1 Diluição: 1 tampão:20 água	65 mA cte. durante 5 h

2.5. Análise de segregação

O estudo da herança isoenzimática de *I. paraguariensis* foi realizado com base no método descrito por GILLET; HATTEMER (1989), que compara o genótipo de árvore materna com a segregação de suas progênes de polinização aberta. As seguintes condições devem ser satisfeitas: a) toda progênie da árvore materna A_iA_i ;

deve possuir o alelo A_i da árvore-mãe; b) no caso de uma árvore-mãe heterozigota (A_iA_j , $i \neq j$): b.1) cada indivíduo da progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna, A_i , A_j , b.2) o número de progênies heterozigotas A_iA_j (N_{ij}) deve ser igual a soma das progênies homozigotas A_iA_i (N_{ii}) e A_jA_j (N_{jj}), $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$, b.3) o número de progênies heterozigotas A_iA_k (N_{ik}) deve ser igual ao número de progênies heterozigotas A_jA_k (N_{jk}), $N_{ik} = N_{jk}$, com $k \neq i, j$.

O teste G (SOKAL; ROHLF, 1981), com um grau de liberdade, foi utilizado para comparar os fenótipos observados em cada progênie de árvores maternas heterozigotas, com o esperado pela hipótese de segregação 1:1. Após, todos os testes individuais foram somados e um teste G total foi obtido ($\sum G_{Hipótese1:1}$), com n graus de liberdade, sendo n o número de progênies usadas no teste. Simultaneamente, os fenótipos observados foram somados e um teste G agrupado para a segregação 1:1 foi obtido ($G_{1:1Agrupado}$), com um grau de liberdade. A hipótese de heterogeneidade de segregação entre progênies foi realizada usando-se um teste G de heterogeneidade ($\sum G_{heterogenádade}$), através da subtração do teste G agrupado ($G_{1:1Agrupado}$), do teste G total ($\sum G_{Hipótese1:1}$). Esses testes são aditivos de forma que $\sum G_{Hipótese1:1} = \sum G_{heterogenádade} + G_{1:1Agrupado}$, com n , $n-1$ e 1 grau de liberdade, respectivamente (SOUSA; HATTEMER; ROBINSON, 2002). Se os testes resultavam significativos, progênies de árvores heterozigotas que apresentaram desvios da segregação 1:1 eram excluídas do conjunto de dados e as análises eram repetidas. Os locos foram designados com letras e números, e os alelos com números, em ordem decrescente de migração do ânodo para o cátodo.

2.6. Análise de desequilíbrio de ligação

O teste de desequilíbrio de ligação foi realizado com base na medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows, Δ_{ij} (WEIR, 1979), usando o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 1999). A medida de desequilíbrio de ligação de Burrows é a mais indicada em situações em que a união de gametas pode não ter ocorrido de forma aleatória e a identificação dos genótipos é incompleta (WEIR;

COCKERHAM, 1979). A hipótese de segregação independente foi testada com o teste de qui-quadrado (χ^2) descrito por WEIR (1979).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Extração das enzimas

O tampão de extração que apresentou os melhores resultados foi o descrito por SOUSA (2000), adaptado para erva-mate.

As folhas liofilizadas, bem como as armazenadas em congelador, não apresentaram perfis eletroforéticos satisfatórios após quinze dias de armazenamento. A atividade enzimática de alguns sistemas como: NDH, SKDH, FDH, ADH e 6-PGDH foi reduzida, comprometendo a resolução dos zimogramas. Esse resultado foi semelhante ao obtido por KALIL FILHO; DEL LAMA; MESTRINER (1998), em estudos com *Hevea* sp. Os autores observaram que amostras liofilizadas, armazenadas por mais de uma semana, não apresentaram zimogramas bem definidos para todas as enzimas estudadas.

Os melhores resultados foram obtidos com o extrato protéico de folhas conservadas em geladeira, cujos *wicks* foram armazenados em congelador a -80°C . Estes mantiveram atividade por um período maior de tempo, de cerca de um mês, para as enzimas com menor atividade, e vários meses para as de atividade mais intensa. Portanto, esta foi a maneira mais adequada para manutenção da atividade enzimática de folhas de erva-mate.

3.2. Determinação dos sistemas enzimáticos

Os resultados dos sistemas enzimáticos e seus respectivos tampões gel/eletrodo são apresentados na Tabela 4.

Dos 18 sistemas testados para o estabelecimento do protocolo, 12 apresentaram boa resolução. No tampão gel/eletrodo Lítio-borato pH 8,1 foram selecionadas as enzimas: PGI, PGM, GOT e MR; e no tampão Tris-citrato pH 7,5 as enzimas: ADH, GDH, G-6PDH, IDH, MDH, NDH, SKDH e 6-PGDH.

Cinco sistemas foram monomórficos, apresentando um único alelo: PGM, ADH, GDH, IDH e SKDH. Os demais apresentaram variação.

TABELA 4. Avaliação da resolução dos géis em função dos sistemas enzimáticos testados e tampões gel/eletrodo utilizados

Enzimas	Tampões gel/eletrodo		
	Lítio-borato (pH 8,1)	Tris-citrato (pH 7,5)	Morfolina-citrato (pH 6,1)
ACO	s.a.	n.r.	s.a.
ADH	-	+	n.r.
ME	n.r.	n.r.	±
ACP	n.r.	n.r.	±
PGI	+	n.r.	±
PGM	+	n.r.	s.a.
FDH	n.r.	s.a.	n.r.
GDH	-	+	n.r.
G-6PDH	n.r.	+	n.r.
GOT	+	-	s.a.
IDH	n.r.	+	n.r.
LAP	s.a.	n.r.	n.r.
MDH	-	+	n.r.
MR	+	±	s.a.
NDH	-	+	n.r.
PO	s.a.	n.r.	±
SKDH	n.r.	+	-
6-PGDH	n.r.	+	±

Resolução ótima (+); resolução regular (±); resolução ruim (-); sem atividade (s.a.); não realizado (n.r.)

3.3. Descrição dos padrões isoenzimáticos

Os padrões isoenzimáticos dos sistemas utilizados ainda não foram descritos para *I. paraguariensis*. Por esse motivo, os resultados serão comparados aos obtidos para outras espécies florestais.

3.3.1. Locos monomórficos

Álcool desidrogenase (ADH)

Apenas uma zona monomórfica foi observada. Embora a literatura indique que a estrutura da enzima é dimérica, nos trabalhos com *Cedrela fissilis* (PÓVOA, 2002) e *Caryocar brasiliensis* (MELO JÚNIOR, 2003), a estrutura encontrada foi monomérica.

Fosfoglucomutase (PGM)

A PGM gerou uma zona sem variação. Resultado semelhante foi obtido com *Esenbeckia leiocarpa* (SEOANE; SEBBENN, 2004). A PGM caracteriza-se por ser

monomérica (SEBBENN et al. 2000b; SOUSA; HATTEMER; ROBINSON, 2002; RIBEIRO; LOVATO, 2004).

Glucose desidrogenase (GDH)

GDH mostrou uma única zona de atividade, apenas com um alelo. Resultados semelhantes foram observados em *Austrocedus chilensis* (PASTORINO, 2000), *Pinus merkusii* (SIREGAR, 2000) e *Araucaria angustifolia* (SOUSA; HATTEMER; ROBINSON, 2002).

Este sistema apresenta-se multimérico. Foram encontrados híbridos de *Acacia mangium* e *Acacia auriculiformis* com estruturas tetraméricas e octoméricas (WICKNESWARI, 1989); já, para *Picea abies*, constatou-se um padrão hexamérico (KONNERT; MAURER, 1995).

Isocitrato desidrogenase (IDH)

Observou-se apenas uma zona sem variação. O mesmo padrão foi obtido para *Araucaria angustifolia* (SOUSA, 2000). Segundo TRIEST et al. (1998), OLIVEIRA (1999) e PASTORINO (2000), a enzima possui estrutura dimérica.

Xikimato desidrogenase (SKDH)

Somente uma zona monomórfica foi detectada no zimograma. Em *Alnus acuminata*, este resultado também foi encontrado (GAMBOA, 1997). Esta enzima tem sido descrita na literatura como monomérica (KONNERT; MAURER, 1995; THORSÉN et al., 1997; GUSSON, 2003).

3.3.2. Locos polimórficos

Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT)

Neste sistema foram identificadas três zonas polimórficas, cada uma contendo dois alelos. As zonas dois e três mostraram polimorfismo bastante alto; porém, a intensidade das bandas apresentou-se muito clara e com sobreposição de alelos, dificultando a interpretação dos zimogramas. A primeira zona apresentou um padrão típico de enzima dimérica, com o heterozigoto representado por três bandas. Nas amostras analisadas, não foi detectado o segundo alelo em homozigose.

Diversos trabalhos relatam a estrutura dimérica e a presença de mais de uma zona para esse sistema. ZANETTO et al. (1996) verificaram três zonas polimórficas em *Quercus robur*, assim como KAWAGUICI; KAGEYAMA (2001) em *Calophyllum brasiliense*.

Fosfogluco isomerase (PGI)

Duas zonas com atividade foram identificadas. A mais rápida não apresentou polimorfismo, enquanto que a outra foi altamente polimórfica, apresentando quatro alelos. GAMBOA (1997) observou semelhante zimograma em *Alnus acuminata*, porém, com três alelos na segunda zona. SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN (2004), nos estudos com *Chorisia speciosa*, relataram a presença de uma zona polimórfica, com quatro alelos.

No presente trabalho, onde analisaram-se populações naturais, detectou-se dois alelos na zona de migração mais rápida e o aparecimento de um quinto alelo na segunda zona.

Os fenótipos heterozigotos observados na zona B mostraram que a enzima é dimérica para erva-mate. O mesmo padrão foi encontrado por KONNERT; MAURER (1995) e SEBBENN (2004).

Glucose-6-fosfato desidrogenase (G-6PDH)

O gel corado para G-6PDH revelou apenas uma zona com dois alelos. Em *I. paraguariensis* verificou-se uma estrutura monomérica. SEBBENN et al. (2000a) e GUSSON (2003), estudando *Cariniana legalis* e *Eschweilera ovata*, respectivamente, observaram o mesmo tipo de estrutura. Entretanto, KONNERT; MAURER (1995) descrevem a enzima como dimérica, no trabalho com *Picea abies*.

Malato desidrogenase (MDH)

A enzima MDH produziu três zonas, sendo as duas primeiras polimórficas, com dois alelos cada, e a terceira monomórfica. As zonas polimórficas apresentaram estrutura dimérica com sobreposição de locos, gerando zimograma de difícil interpretação. A maioria dos trabalhos descreve esta enzima como dimérica (ZANETTO et al., 1996, ROGERS, 1997, FINKELDEY; GUZMAN; CHANGTRAGOON, 1998). Entretanto, SEBBENN et al. (2000b) e KAWAGUICI;

KAGEYAMA (2001) nos estudos realizados com *Tabebuia cassinoides* e *Calophyllum brasiliensis*, respectivamente, encontraram esta enzima com estrutura monomérica.

Menadiona redutase (MR)

O sistema MR apresentou uma única zona com dois alelos. Porém, por ser uma enzima de estrutura tetramérica, houve grande dificuldade na interpretação dos géis.

Este padrão também foi relatado nos trabalhos realizados com *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (MURILLO; HATTEMER, 1997) e *Quercus robur* (ZANETTO et al., 1996).

NADH desidrogenase (NDH)

Duas zonas com atividade enzimática foram reveladas nesse sistema, sendo a primeira polimórfica, com dois alelos, e a segunda monomórfica. As bandas apresentavam baixa intensidade, principalmente as da zona de migração mais rápida.

No estudo conduzido com populações naturais, a segunda zona apresentou polimorfismo (dois alelos), sendo utilizada nas análises posteriores.

Para erva-mate a enzima revelou padrão típico de enzima monomérica, de acordo com o observado por KONNERT; MAURER (1995). Entretanto, SIREGAR (2000) relata que a enzima pode apresentar estrutura multimérica, mesmo tendo obtido padrões monoméricos para *Pinus merkusii*.

6-fosfogluconato desidrogenase (6-PGDH)

Duas zonas polimórficas foram reveladas, cada uma contendo dois alelos em estrutura dimérica.

A mesma estrutura foi observada por ZANETTO et al. (1996), SOUSA; HATTEMER; ROBINSON (2002) e GUSSON (2003). Entretanto, SEBBENN et al. (2000a) obtiveram uma zona com característica monomérica e OLIVEIRA (1999) relatou a presença de duas zonas polimórficas, sendo uma dimérica e a outra monomérica.

3.3.3. Definição dos sistemas enzimáticos para *I. paraguariensis*

Nos trabalhos de análises genéticas, utilizam-se os locos polimórficos. Neste estudo, sete sistemas enzimáticos apresentaram variação. Entretanto, as enzimas MR e MDH, embora tenham apresentado boa resolução, não permitiram a interpretação confiável dos fenótipos no gel. Por este motivo, serão excluídas das análises de herança e de ligação.

FALLOUR; FADY; LEFEVRE (1997) e FINKELDEY; GUZMAN; CHANGTRAGOON (1998) trabalhando com *Pinus pinea* e *Pterocarpus indicus*, respectivamente, também descartaram a enzima MR, devido ao seu complexo controle genético, dificultando as análises dos zimogramas. A enzima MDH também não foi utilizada por KONNERT; RUETZ; FROMM (2001), no estudo realizado com *Acer pseudoplatanus*, por gerar um complicado padrão enzimático, com numerosas bandas que apresentaram taxas de migração semelhantes e se sobrepuseram no zimograma.

A Figura 6 ilustra, esquematicamente, os padrões de zimogramas obtidos para erva-mate e a Figura 7 apresenta os perfis isoenzimáticos para os sistemas GOT, PGI e 6-PGDH.

FIGURA 6. Representação esquemática dos fenótipos observados, representados por números, nos zimogramas de *I. paraguariensis* para os sistemas GOT, PGI, G-6PGDH, 6-PGDH e NDH, com sua codificação. Zonas de cor cinza não foram analisadas e os alelos rachuriados foram observados apenas nas populações naturais

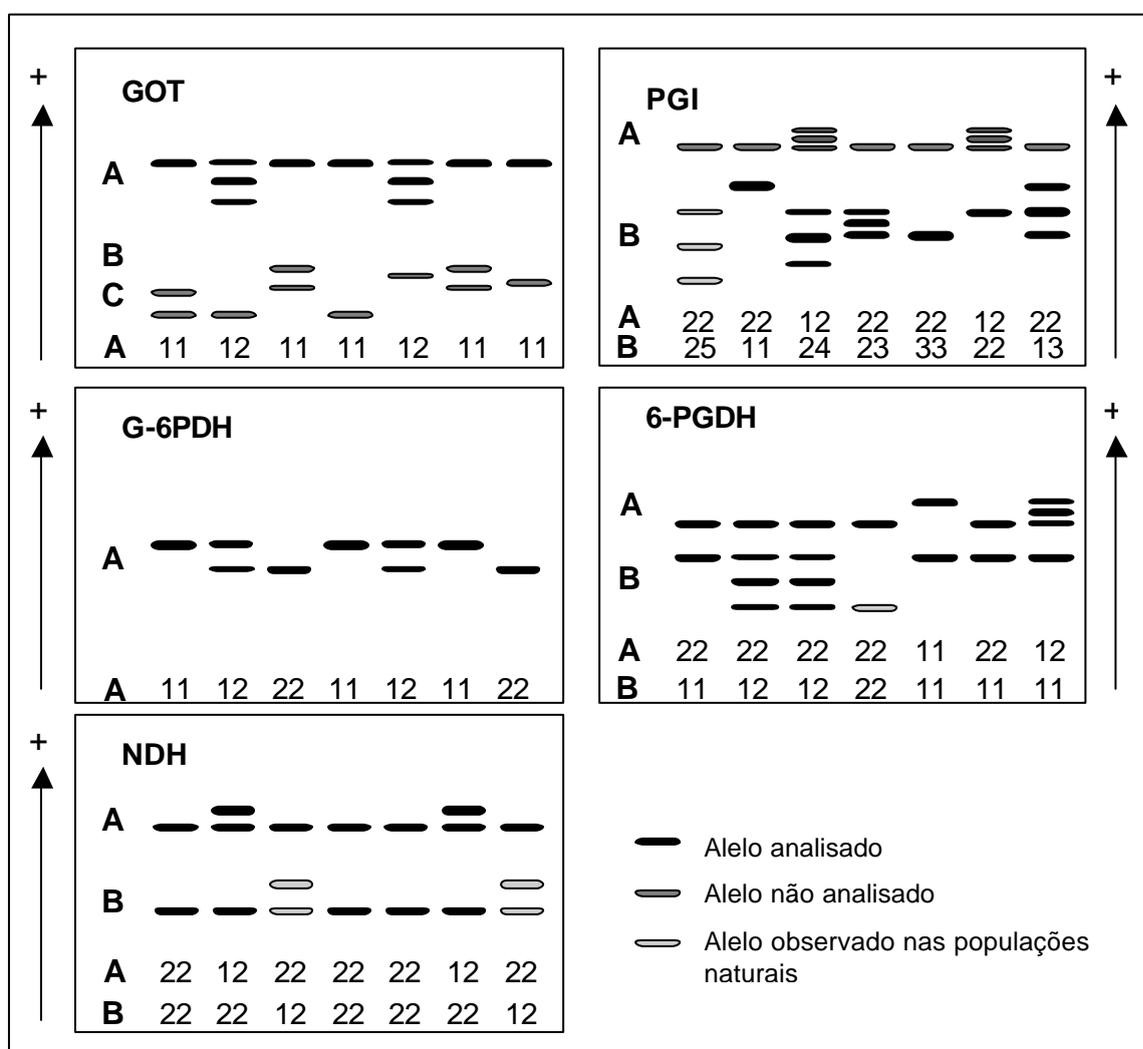
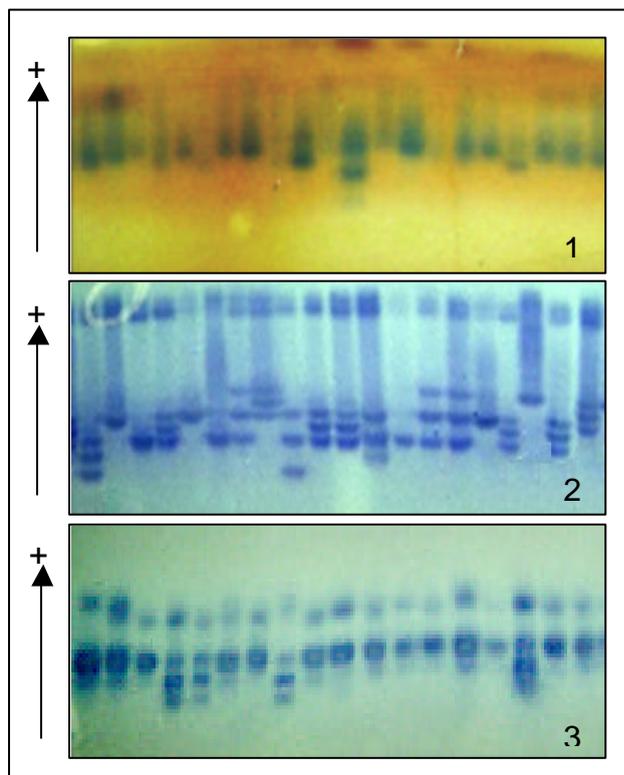


FIGURA 7. Perfis isoenzimáticos produzidos pelos sistemas GOT (1), PGI (2) e 6-PGDH (3) em *I. paraguariensis*



3.4. Análise de segregação

As enzimas GOT, PGI, 6-PGDH e G-6PDH apresentaram boa resolução. Entretanto, a enzima NDH foi excluída das análises de segregação devido à fraca intensidade das bandas produzidas pelas progênies.

O sistema GOT apresentou três zonas com atividade, entretanto somente a GOT-A foi utilizada para a análise de segregação, pois as demais foram difíceis de serem interpretadas no zimograma. A zona GOT-A é controlada por um loco com dois alelos. Embora o alelo A_2 não tenha aparecido em homozigose, as três árvores heterozigotas analisadas não apresentaram desvio de segregação, tanto no teste G total ($\sum G_{Hipótese1:1}$), de heterogeneidade ($\sum G_{Heterogeneidade}$) como no teste da hipótese de segregação agrupada 1:1 ($G_{1:1Agrupado}$), permitindo considerar que essa zona de atividade está sob controle de um loco de herança codominante (Tabela 5).

A análise de segregação dos alelos B_1 e B_2 do loco $PGI-B$ apresentou desvios significativos em todos os testes realizados. Esse resultado deve-se ao desvio da progênie C51, que, ao ser excluída das análises, proporcionou o ajuste dos locos em todos os testes (Tabela 5). A árvore em desequilíbrio (C51) apresentou excesso de genótipos heterozigotos (N_{jk}) na sua progênie, sendo predominante o tipo B_2B_3 (25 indivíduos) (Tabela 6). Dentre as razões para esse comportamento, podemos supor a presença de alelos deletérios, favorecendo a sobrevivência do tipo B_2B_3 . A ligação entre genes marcadores e alelos deletérios foi descrita por FURNIER et al. (1986) e STRAUSS; CONKLE (1986), como uma das causas de distorções de segregação. A ocorrência de alelos deletérios recessivos ligados a genes marcadores é geralmente alta, em espécies arbóreas de polinização cruzada (WILLIAMS; SAVOLAINEN, 1996).

As três árvores heterozigotas B_2B_3 para o loco $PGI-B$, apresentaram segregações regulares dos alelos B_2 e B_3 . Os genótipos maternos B_1B_3 , B_1B_4 e B_2B_4 foram observados em apenas uma árvore. Os alelos B_1 e B_3 segregaram conforme o esperado no teste ($G_{1:1Agrupado}$). Entretanto, as duas últimas progênies apresentaram desvio de segregação na razão 1:1 (Tabela 5). A progênie da mãe heterozigota B_1B_4 revelou um excesso de genótipos do tipo N_{jk} (15 plantas B_1B_2 e três do tipo B_1B_3 , dentre 30). A progênie da árvore T54 (genótipo B_2B_4) mostrou excesso do alelo B_2 . Dos 30 indivíduos analisados, 12 apresentaram os genótipos homozigotos B_2B_2 e 16 apresentaram o heterozigoto B_1B_2 (Tabela 6). Em ambos os casos, observou-se que os desvios de segregação são dependentes do alelo, sendo o B_4 desfavorecido. No loco $PGI-B$ constatou-se que o alelo B_2 é o mais freqüente, seguido pelo B_1 . Segundo SOUSA (2000), distorções de segregação também podem ser causadas pela chamada vantagem seletiva do alelo mais freqüente no loco.

TABELA 5. Teste para hipótese de segregação regular (G) de marcadores isoenzimáticos em *I. paraguariensis*

Loco	Genótipo materno	Caso	Número de árvores (n)	$\sum N_{ij} : \sum (N_{ii} + N_{jj})$	$\sum N_{ik} : \sum N_{jk}$	$\sum G_{Hipótese 1:1}$ GL = n	$\sum G_{Heterogeneidade}$ GL = n-1	$G_{1:1 Agrupado}$ GL = 1	Árvores com desvio de segregação
GOT-A	A ₁ A ₂	a	3	46:43	-	0,30	0,20	0,10	
PGI-B	B ₁ B ₂	a	10	106:133	14:43	56,12 **	37,81 **	18,31 **	1
		b	9	105:131	13:18	28,55	24,87	3,68	
	B ₁ B ₃	a	1	10:9	5:6	-	-	0,90	
	B ₁ B ₄	a	1	2:3	18:7	-	-	13,33 **	1
	B ₂ B ₃	a	3	37:40	6:7	7,19	7,07 *	0,12	
	B ₂ B ₄	a	1	0:12	17:0	-	-	40,20 **	1
6-PGDH-A	A ₁ A ₂	a	11	79:194	-	77,92 **	27,93 **	49,99 **	8
		b	3	34:40	-	6,27	5,79	0,49	
6-PGDH-B	B ₁ B ₂	a	1	16:14	-	-	-	0,13	
G-6PDH-A	A ₁ A ₂	a	11	111:212	-	42,39 **	10,28	32,12 **	6
		b	5	63:83	-	3,27	0,52	2,75	

N_{ij} e $N_{ii}+N_{jj}$ são os números observados dos genótipos heterozigotos e homozigotos, respectivamente.

a Inclui todas as árvores heterozigotas em um dado loco.

b Exclui as árvores com distorção de segregação em um dado loco.

(**) $P < 0,010$; (*) $P < 0,050$.

TABELA 6. Árvores de *I. paraguariensis* com desvios de segregação da razão esperada 1:1, para diferentes locos enzimáticos

Loco/ Árvore	Genótipo materno	Tamanho da amostra	Segregação observada					χ^2 (A)	χ^2 (B)
			N_{ii}	N_{jj}	N_{ij}	N_{ik}	N_{jk}	$N_{ii}+N_{jj}=N_{ij}$	$N_{ik}=N_{jk}$
<i>PGI-B</i>									
C51	B_1B_2	28		1	1	1	25	0,00	22,15 ***
T67	B_1B_4	30	2	1	2	18	7	0,20	4,84 *
T54	B_2B_4	29	12	0	0	17	0	12,00 ***	17,00 ***
<i>6-PGDH-A</i>									
S36	A_1A_2	27	4	15	8	-	-	4,48 *	---
CM39	A_1A_2	23	3	19	1	-	-	19,17 ***	---
CM44	A_1A_2	27	4	16	7	-	-	6,26 *	---
C51	A_1A_2	25	0	21	4	-	-	11,56 ***	---
T52	A_1A_2	21	3	12	6	-	-	3,86 *	---
T67	A_1A_2	26	6	13	7	-	-	5,54 *	---
T75	A_1A_2	28	7	15	6	-	-	9,14 **	---
T78	A_1A_2	22	4	12	6	-	-	4,72 *	---
<i>G-6PDH-A</i>									
CM34	A_1A_2	30	19	4	7	-	-	9,63 **	---
S36	A_1A_2	30	20	2	8	-	-	7,50 **	---
C42	A_1A_2	29	7	13	9	-	-	4,97 *	---
T66	A_1A_2	30	14	7	9	-	-	5,63 *	---
T75	A_1A_2	28	11	10	7	-	-	8,04 **	---
T80	A_1A_2	30	18	4	8	-	-	7,50 **	---

(***) $P < 0,001$; (**) $P < 0,010$; (*) $P < 0,050$.

O loco *6-PGDH-A* apresentou excesso de homozigotos, provocando desvios de segregação significativos a 1% de probabilidade em todos os testes realizados (Tabela 5). Desvios de segregação foram observados em oito amostras, sendo duas estatisticamente significativo ao nível de 0,1%, uma a 1% e cinco a 5% (Tabela 6). Entretanto, quando foram excluídas as progênies que apresentavam desvios, os valores ajustaram-se às proporções esperadas. O excesso de homozigotos observado, principalmente do tipo A_2A_2 , em um número considerável de árvores, pode sugerir a existência de um alelo nulo segregando nesse loco. Os alelos B_1 e B_2 , do loco *6-PGDH-B*, segregaram de forma regular, na única progênie analisada (Tabela 5). Diversos autores têm relatado distorções de segregação em locos da enzima 6-PGDH em espécies arbóreas (CHELIAK et al., 1984; STRAUSS; CONKLE, 1986; SOUSA; HATTEMER; ROBINSON, 2002).

O loco *G-6PDH-A* mostrou desvios de segregação no teste total ($\sum G_{Hipótese1:1}$) e no teste da hipótese de segregação agrupada 1:1 ($G_{1:1Agrupado}$). Seis progênies apresentaram desvios de segregação individual, com apenas duas ao nível de 5%

de probabilidade e quatro a 1%. Quando eliminaram-se as progênies com desvios, a razão de segregação 1:1 foi estabelecida (Tabela 5). O desvio de segregação de algumas árvores foi causado pelo excesso de homocigotos, entretanto não foi alelo-dependente. O alelo A_1 foi favorecido em cinco casos e o A_2 em um caso (Tabela 6). A causa do desequilíbrio pode ser a presença de um alelo nulo ou a problemas de amostragem para esse sistema. CHELIAK; PITEL (1985) relataram a presença de um alelo nulo no loco gênico 6-PGDH, em *Larix laricina*.

Observou-se que algumas árvores apresentaram desvio de segregação individual da proporção 1:1, em determinados locos isoenzimáticos. Porém, quando excluiu-se as árvores em desequilíbrio das análises, todos os locos apresentaram conformidade com a segregação esperada, nos testes G realizados (G total, G agrupado e G de heterogeneidade). Portanto, não há motivos suficientes para rejeitar a hipótese de que os locos analisados em *I. paraguariensis* não estejam sob controle genético e segregando nas proporções mendelianas 1:1.

Diversos autores detectaram distorções de segregação em árvores individuais de várias espécies, dentre eles: YING; MORGENSTERN (1990) estudando *Larix laricina*; MURILLO; HATTEMER (1997) em *Alnus acuminata*; FINKELDEY; GUZMAN; CHANGTRAGOON (1998) em *Pterocarpus indicus*; KONNERT; RUETZ; FROMM (2001) em *Acer pseudoplanatus* e SOUSA; HATTEMER; ROBINSON (2002) em *Araucaria angustifolia*.

3.5. Análise de desequilíbrio de ligação

Não foi possível estudar o desequilíbrio de ligação entre todas as combinações dos cinco locos avaliados em *I. paraguariensis* já que poucas árvores maternas eram heterocigotas para vários locos simultaneamente. Dos dez pares de combinações possíveis entre os cinco locos enzimáticos, seis foram analisados com relação à independência de segregação dos locos.

Apenas três árvores indicaram desvios significativos na hipótese de segregação independente: CM39 (GOT-A:6-PGDH-A), T52 (GOT-A:PGI-B) e C66 (PGI-B:G-6PDH-A). Embora, aparentemente estes locos estejam fisicamente ligados ou em desequilíbrio de ligação, a baixa magnitude da medida de desequilíbrio de

ligação de Burrows ($\hat{\Delta}_{ij}$) revela que as ligações são fracas, considerando a amplitude de valores que a estimativa pode assumir (-0,25 a 0,25). A maior medida de desequilíbrio de ligação ($\hat{\Delta}_{ij}$) foi observada na árvore T66, entre a combinação dos locos *PGI-B:G-6PDH-A* (0,131) (Tabela 7), com significância estatística de 5% de probabilidade.

TABELA 7. Valores da medida composta de Burrows para o desequilíbrio gamético ($\hat{\Delta}_{ij}$) e testes de qui-quadrado (χ^2) para hipótese de segregação independente em pares de locos isoenzimáticos de *I. paraguariensis*

Locos/Árvores	$\hat{\Delta}_{ij}$	χ^2
<i>6-PGDH-A: G-6PDH-A</i>		
S36	0,009	0,04
CM39	-0,082	2,68
T67	-0,035	0,34
T75	0,033	0,21
<i>GOT-A:6-PGDH-A</i>		
CM39	-0,058	4,39 *
T52	0,017	0,18
<i>PGI-B:6-PGDH-A</i>		
S36	0,018	0,21
C51	-0,006	0,20
T52	0,024	0,68
T78	0,056	1,15
<i>GOT-A:G-6PDH-A</i>		
CM39	-0,064	3,63
<i>GOT-A:PGI-B</i>		
T52	0,057	305,09 ***
<i>PGI-B:G-6PDH-A</i>		
S36	-0,043	2,06
C42	0,042	0,57
T66	0,131	5,88 *
T78	-0,030	0,57

(*) $P < 0,050$; (***) $P < 0,001$.

No caso dos pares de locos *GOT-A:6-PGDH-A* e *PGI-B:G-6PDH-A*, o desequilíbrio foi significativo a 5% de probabilidade apenas em uma das árvores testadas e não significativo nas demais (Tabela 7), sugerindo que o desequilíbrio detectado não seja devido à ligação física entre os locos, mas sim, ao desequilíbrio gamético, causado possivelmente por seleção. Se o desequilíbrio fosse causado por

ligação física, todas as árvores testadas deveriam ter revelado ausência de segregação independente entre os alelos dos locos.

Através do teste de qui-quadrado detectou-se desequilíbrio de ligação a 0,1% de probabilidade apenas na combinação *GOT-A:PGI-B*. Contudo, embora o desequilíbrio de ligação observado entre os locos *GOT-A:PGI-B* seja forte, ele foi detectado baseado em apenas uma progênie. Para confirmar a forte relação de dependência entre os alelos desses locos, seriam necessários estudos envolvendo um maior número de progênies.

O desequilíbrio de ligação entre os locos *GOT-A:PGI-B* também foi observado em *Pinus taeda* e os autores não puderam afirmar se esses locos estão localizados no mesmo cromossomo ou não (ADAMS; JOLY, 1980). O desequilíbrio de ligação nas combinações *GOT-A:6-PGDH-A* e *PGI-B:G-6PDH-A* não foi relatado em estudos com espécies arbóreas.

A exclusão de um dos locos de cada par de ligações quebra a associação entre esses, de forma que possam ser usados em estudos onde a hipótese de ausência de ligação é necessária como estudos do sistema de reprodução e análise de paternidade. A medida de desequilíbrio de ligação de Burrows indicou que os níveis aparentes de ligação não são fortes e, portanto, não devem ter grande influência nas estimativas multilocos de parâmetros genéticos.

Nas combinações entre locos onde não foram detectados indícios de desequilíbrio de ligação, pode-se afirmar que os alelos de diferentes locos não estão ligados ou em desequilíbrio gamético e segregam independentemente entre si.

4. CONCLUSÕES

1. Cinco sistemas enzimáticos podem ser utilizados para estudos genéticos de *I. paraguariensis*: GOT, PGI, NDH, 6-PGDH e G-6PDH;
2. Os locos isoenzimáticos GOT, PGI, 6-PGDH e G-6PDH obedecem a segregação Mendeliana;
3. Foram detectados indícios de desequilíbrio de ligação em alguns locos isoenzimáticos; entretanto, não devem influenciar as estimativas multilocos.
4. Após análise de herança e desequilíbrio de ligação, constatou-se que os locos GOT, PGI, 6-PGDH e G-6PDH podem ser utilizados como marcadores genéticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. T.; JOLY, R. J. Linkage relationships among twelve allozyme loci in loblolly pine. **The Journal of Heredity**, v. 71, p. 199-202, 1980.

ALFENAS, C. A. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

BERGMANN, F.; HATTEMER, H. H. Isozymes in forest genetics research. In: MANDAL, A. K., GIBSON, G. L. (Ed.) **Forest Genetics and Tree Breeding**. New Dehli: CBS Publishers & Distributors, 1998. p. 227-238.

CHELIAK, W. M.; MORGAN, K.; DANCINK, B. P.; STROBECK, C.; YEH, F. C. Segregation of allozymes in megagametophytes of viable seed from a natural populations of jack pine, *Pinus banksiana* Lamb. **Theoretical and Applied Genetics**, n. 69, p. 145-151, 1984.

CHELIAK, W. M.; PITEL, J. A. Inheritance and linkage of allozymes in *Larix laricina*. **Silvae Genetica**, v. 34, n. 4-5, p. 142-148, 1985.

FALLOUR, D.; FADY, B.; LEFEVRE, F. Study on isozyme variation in *Pinus pinea* L.: evidence for low polymorphism. **Silvae Genetica**, v. 46, n. 4, p. 201-207, 1997.

FINKELDEY, R. **An Introduction to Tropical Forest Genetics**. Lecture Notes. Georg-August University Göttingen, Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, 1998. 241 p.

FINKELDEY, R., GUZMAN, N. de; CHANGTRAGOON, S. Inheritance of isozyme phenotypes in *Pterocarpus indicus* Willd. **Forest Genetics**, v. 3, n. 3, p. 165-170, 1998.

FURNIER, G. R.; KNOWLES, P.; ALKSIUK, M. A.; DANCIK, B. P. Inheritance and linkage of allozymes in seed tissues of whitbark pine. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 28, p. 601-604, 1986.

GAMBOA, O. M. **Genetic investigations in natural populations of *Alnus acuminata* ssp *arguta* (Schlectendal) Furlow from Central America**. Göttingen, 1997. 145 f. Dissertation (Doctor of Forestry Science) - University of Göttingen.

GILLET, E.; HATTEMER, H. H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, v. 63, p. 135-141, 1989.

GLAUBITZ, J. C.; MORAN, G. F. Genetic tools: the use of biochemical and molecular markers. In: YOUNG, A., BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Ed.) **Forest Conservation Genetics: Principles and Practice**. New York: CABI Publishing, p. 39-59. 2000.

GUSSON, E. **Uso e diversidade genética em populações naturais de biriba (*Eschweilera ovata* [Cambess.] Miers): subsídios ao manejo e conservação da**

espécie. Piracicaba. 2003. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

KALIL FILHO, A. N.; DEL LAMA, M. A.; MESTRINER, M. A. Aperfeiçoamento da técnica de eletroforese para análise isoenzimática de clones de seringueira (*Hevea* sp.). **Acta Amazônica**, v. 28, n. 1. p. 31-40, 1998.

KAWAGUICI C. B.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic diversity of tree groups of individuals (adults, young and seedlings) of *Calophyllum brasiliense* in a population of gallery forest. **Scientia Forestalis**, n. 59, p. 131-143, jun. 2001.

KONNERT, M.; MAURER, W. **Isozymic investigations on Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) and European silver fir (*Abies alba* Mill):** a practical guide to separation methods and zymogram evaluation. Bayerische Landesanstalt für forstliche Saat-und Pflanzenzucht. Teisendorf, Germany, 1995. 78 p.

KONNERT, M.; RUETZ, W.; FROMM, M. Genetic variation in *Acer pseudoplatanus* L. I. Inheritance of isozyme variants. **Forest Genetics**, v. 8, n. 1, p. 25-37, 2001.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: versão 1.1 para Windows 95/NT**. 1999. Disponível: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>.

MELO JÚNIOR, A. F. **Variabilidade genética em populações naturais de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) caracterizada por meio de isoenzimas**. Lavras, 2003. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras.

MURILLO, O.; HATTEMER, H. H. Inheritance of isozyme variants in *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (Schlectendal) Furlow. **Silvae Genetica**, v. 46, n. 1, p. 51-55, 1997.

OLIVEIRA, V. R. de **Diversidade genética em populações naturais de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) DC.) na região semi-árida de nordeste brasileiro**. Piracicaba, 1999. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo.

PASTORINO, M. J. **Genetic variation and reproduction system of *Austrocedrus chilensis* (D. DON) Florin et Boutelje, a cypress endemic to the Andean-Patagonian Forest**. Göttingen, 2000. 166 f. Dissertation (Doctor of Forestry Science) - University of Göttingen.

PÓVOA, J. S. R. **Distribuição da variação genética de *Cedrela fissilis* Vell., em fragmentos florestais, no sul de Minas Gerais, por meio de isoenzimas**. Lavras, 2002. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras.

RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Mating system in a neotropical tree species, *Senna multijuga* (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 418-424, 2004.

ROGERS, D. L. Inheritance of allozymes from seed tissues of the hexaploid gymnosperm, *Sequoia sempervirens* (D Don) Endl (Coast redwood). **Heredity**, v. 78, p. 166-175, 1997.

SEBBENN, A. M. Herança e desequilíbrio gamético em algumas isoenzimas polimórficas em *Genipa americana* L. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 65-72, 2004.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; ZANATTO, A. C. S. Mating system in populations of *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze: implications for genetic conservation and improvement. **Scientia Forestalis**, n. 58, p. 25-40, 2000a.

SEBBENN, A. M.; SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOSKY, R. Effects of the management on the genetic structure of caixeta (*Tabebuia cassinoides*) populations. **Scientia Forestalis**, n. 58, p. 127-143, 2000b.

SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M. Herança genética e desequilíbrio de ligação em isoenzimas de *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal**, v. 16, n. 1, p. 57-63, 2004.

SIREGAR, I. Z. **Genetic aspect of the reproductive system of *Pinus merkusii* Jungh. Et de Vriese in Indonesia**. Göttingen, 2000. 147 f. Dissertation (Doctor of Forestry Science) - University of Göttingen.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry. The Principle and Practice of Statistics in Biological Research**. 2 ed. San Francisco, USA: W. H. Freeman and Co., 859 p., 1981.

SOUSA, V. A. **Population genetic studies in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. Göttingen, 2000. 161 f. Dissertation (Doctor of Forestry Science) - University of Göttingen.

SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H.; ROBINSON, I. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvae Genetica**, v. 51, n. 5-6, p. 191-196, 2002.

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Genetic structure in fragmented populations *Chorisia speciosa* St. Hil. **Scientia Forestalis**, n. 65, p. 70-79, 2004.

STRAUSS, S. H.; CONKLE, M. T. Segregation, linkage and diversity of allozymes in knobcone pine. **Theoretical and Applied Genetics**, n. 72, p. 483-493, 1986.

THORSÉN, J.; JORDE, P. E.; ARAVANOPOULOS, F. A.; GULLBERG, U.; ZSUFFA, L. Inheritance and linkage of isozyme loci in the basket willow (*Salix viminalis* L.). **The Journal of Heredity**, v. 88, n. 2, p. 144-150, 1997.

TRIEST, L.; GREEF, B. de; D'HAESELEER, M.; ECHCHGADDA, G.; VAN SLYCKEN, J.; COART, E. Variation and heritance of isozyme loci in controlled crosses of *Salix alba* and *Salix fragilis*. **Silvae Genetica**, v. 47, n. 2-3, p. 88-94, 1998.

WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, Lawrence, v. 35, p. 235-354, 1979.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. **Heredity**, Lund, v. 43, p. 105-111, 1979.

WICKNESWARI, R. Use of isozyme analysis in a proposed *Acacia mangium* x *Acacia auriculiformis* hybrid seed production orchard. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 2, p. 157-164, 1989.

WILLIAMS, C. G.; SAVOLAINEN, O. Inbreeding depression in conifers: implications for breeding strategy. **Forest Science**, n. 42, p. 102-117, 1996.

YING, L.; MORGENSTERN, E. K. Inheritance and linkage relationships of some isozymes of *Larix laricina* in New Brunswick, Canada. **Silvae Genetica**, v. 39, n. 5-6, p. 245-251, 1990.

ZANETTO, A.; KREMER, A.; MÜLLER-STARCK, G.; HATTEMER H. H. Inheritance of isozymes in pedunculate oak (*Quercus robur* L.). **Heredity**, v. 87, p. 364-370, 1996.

CAPÍTULO II. ESTUDO DO SISTEMA DE REPRODUÇÃO E ANÁLISE DE PATERNIDADE EM ÁREA DE PRODUÇÃO DE SEMENTES DE *Ilex paraguariensis* St. Hil. UTILIZANDO MARCADORES ISOENZIMÁTICOS

1. INTRODUÇÃO

Ilex paraguariensis St. Hil, popularmente conhecida como erva-mate, é uma espécie dióica críptica, com flores díclinas e um dos sexos abortivo (FERREIRA et al., 1983). O período de floração ocorre de setembro a dezembro (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; SOUSA; DAROS; STURION, 2003). Por ser uma dióica, o sistema de cruzamento é alógamo obrigatório. A polinização é realizada, principalmente, por insetos (entomófila), porém, pode ocorrer alguma transferência de pólen pelo vento. A dispersão de sementes ocorre por zoocoria, especialmente por aves (FERREIRA et al., 1983; CARVALHO, 2003).

O conhecimento do sistema de reprodução é de fundamental importância para o delineamento de estratégias para programas de melhoramento e conservação genética da espécie, pois permite a aplicação de métodos amostrais mais efetivos e o uso de modelos matemáticos mais precisos para estimar os diversos parâmetros genéticos (SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN, 2002; FREITAS et al., 2004; SOBIERAJSKI, 2004). A análise de paternidade, além de verificar a contribuição efetiva dos indivíduos da população, também auxilia no conhecimento do modo de reprodução e permite determinar o fluxo gênico (ELLSTRAND; MARSHALL, 1985). Esses estudos tiveram grande impulso a partir do desenvolvimento das técnicas bioquímicas e moleculares.

Existem poucos trabalhos em pomares ou Área de Produção de Sementes (APS) visando verificar a ocorrência de endogamia, presença de cruzamentos entre indivíduos aparentados, ausência de panmixia, contribuição efetiva dos machos, contaminação de pólen externo, dentre outros. Entretanto, esses estudos são extremamente importantes para assegurar a qualidade genética das sementes produzidas (RITLAND; EL-KASSABY, 1985; EL-KASSABY; PARKINSON; DEVITT, 1986; WANG; LIN, 1998; LIAN; MIWA; HOTETSU, 2001; WANG, 2004; ROBLEDO-ARNUNCIO; GIL, 2005).

O objetivo deste trabalho foi estudar o sistema de reprodução e analisar a paternidade em Área de Produção de Sementes (APS), utilizando marcadores isoenzimáticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e amostragem

Para o estudo do sistema de reprodução e análise de paternidade de *I. paraguariensis*, utilizou-se material do teste combinado de procedências e progênies da *Embrapa Florestas*, descrito em detalhes no item 2.1, do Capítulo I. Esse material sofreu desbaste (seleção) e passou a ser considerado como Área de Produção de Sementes (APS). As árvores foram selecionadas com base na produção de massa foliar.

Para inferência sobre o sistema de reprodução, utilizou-se tecido foliar de 25 árvores femininas (matrizes) e das respectivas progênies (30 indivíduos por matriz) e para o estudo de paternidade incluiu-se todas as árvores masculinas dessa população (45 machos).

2.2. Extração das enzimas e eletroforese

A extração das enzimas e a condução da eletroforese seguiram metodologia descrita nos itens 2.2 e 2.3, do Capítulo I. Utilizaram-se as seguintes enzimas: PGI e GOT, no tampão Lítio-borato pH 8,1; 6-PGDH e G-6PDH, no tampão Tris-citrato pH 7,5.

Foram analisados os seguintes locos gênicos: *GOT-A*, *PGI-B*, *6-PGDH-A*, *6-PGDH-B* e *G-6PDH-A*.

2.3. Análise do sistema de reprodução

O sistema de reprodução de *I. paraguariensis* foi analisado com base nos modelos de reprodução misto de RITLAND; JAIN (1981) e cruzamentos correlacionados (RITLAND, 1989), utilizando o programa "Multilocos MLTR" (RITLAND, 2002).

O modelo de cruzamento misto assume que as progênies resultam de uma mistura de autofecundação e cruzamento. O modelo de cruzamentos

correlacionados assume que a parte oriunda de cruzamentos foi gerada tanto por cruzamentos aleatórios quanto por biparentais.

As pressuposições do modelo misto, descritos por RITLAND; JAIN (1981) são: a) o conjunto de pólen é homogêneo para o cruzamento de todos os genótipos maternos; b) a fecundidade é uniforme entre as plantas (todas as plantas têm igual capacidade de gerarem descendentes); c) os alelos de diferentes locos segregam independentemente (equilíbrio de ligação); d) os locos avaliados não sofreram seleção ou mutação entre o período de fertilização e a análise dos indivíduos.

Os parâmetros estimados foram: freqüências alélicas dos óvulo e pólen envolvidos nos cruzamentos; índice de fixação nas árvores maternas (\hat{F}_{mat}); taxa populacional de cruzamento multiloco (\hat{t}_m); taxa populacional de cruzamento uniloco (\hat{t}_s); taxa de cruzamento entre aparentados ($1-\hat{t}_s$); correlação multiloco de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$), correlação uniloco de paternidade ($\hat{r}_{p(s)}$), de onde deriva-se a proporção de irmãos-completos (\hat{r}_p) e meios-irmãos ($1-\hat{r}_p$). O erro padrão das estimativas dos parâmetros foi obtido através de 500 reamostragens *bootstraps*.

A inferência dos cruzamentos aleatórios foi realizada pelo teste de homogeneidade das freqüências alélicas do óvulo e do pólen, usando a estatística \hat{F}_{ST} (WRIGHT, 1965). A significância de \hat{F}_{ST} , para cada loco, foi obtida pelo teste de qui-quadrado, proposto por WORKMAN; NISWANDER (1970), calculado da seguinte forma:

$$c^2 = 2n\hat{F}_{ST}(k-1), \text{ com } GL = (k-1)(s-1)$$

sendo n o número de gametas nos dois grupos (pólen e óvulo); k o número de alelos e s o número de grupos.

Tais análises também foram utilizadas para verificar se as freqüências alélicas do pólen efetivo divergiam das freqüências alélicas das árvores masculinas e se as freqüências alélicas das árvores masculinas diferiam das femininas.

Os índices de fixação na população adulta (\hat{F}_a), nas árvores masculinas (\hat{F}_m) e nas progênies (\hat{F}_p) e seus respectivos intervalos de confiança foram obtidos por

10.000 reamonstragens *bootstraps*, estimativas obtidas utilizando o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 1999).

Para conhecer o parentesco médio dentro das progênies, estimou-se o coeficiente médio de coancestria (\hat{q}_{xy}) entre plantas dentro de progênies. O coeficiente \hat{q}_{xy} foi obtido a partir do coeficiente de correlação de parentesco (\hat{r}_{xy}) dentro de progênies, calculado a partir de parâmetros do sistema de reprodução, conforme derivações de RITLAND (1989):

$$\hat{r}_{xy} = 0,25(1 + \hat{F})[4\hat{s} + (\hat{t}^2 + \hat{r}_s \hat{t} \hat{s})(1 + \hat{r}_p)]$$

sendo \hat{F} o coeficiente de endogamia na geração parental e \hat{s} a taxa de autofecundação ($1 - \hat{t}_m$). A definição dos demais parâmetros é a mesma apresentada anteriormente. Em espécies diplóides, na ausência de endogamia, o coeficiente de parentesco (\hat{r}_{xy}) é o dobro do coeficiente de coancestria (q_{xy}), de forma que $\hat{q}_{xy} = \hat{r}_{xy} / 2$. Além disso, a espécie em estudo é dióica, não ocorrendo autofecundação, sendo a taxa de cruzamento igual a um ($\hat{t} = 1$) para todas as plantas, de forma que a correção de autofecundação é igual a zero ($\hat{r}_s = 0$) e o valor estimado do coeficiente de coancestria dentro de progênies pode ser reduzido a:

$$\hat{q}_{xy} = 0,125(1 + \hat{F})(1 + \hat{r}_p)$$

Adicionalmente, para conhecer a representatividade genética das progênies, estimou-se o tamanho efetivo de variância ($\hat{N}_{e(v)}$) da progênie com base na variância amostral das freqüências alélicas (COCKERHAM, 1969), utilizando-se uma população idealizada como referência (SEBBENN, 2002):

$$\hat{N}_{e(v)} = \frac{0,5}{\hat{q}_{xy} \left(\frac{n-1}{n} \right) + \frac{1 + \hat{F}_p}{2n}}$$

2.4. Análise de paternidade

Para entender, detalhadamente, os cruzamentos na APS realizou-se a análise de paternidade, utilizando-se o programa CERVUS 2.0 (MARSHALL et al., 1998). As análises foram conduzidas a partir dos genótipos de 25 árvores maternas e suas progênes (30 indivíduos/matriz) e de todas as 45 árvores masculinas candidatas a pai, caracterizados para os cinco locos isoenzimáticos.

O programa CERVUS 2.0 calcula para cada loco a razão entre as probabilidades de duas hipóteses alternativas para cada candidato a pai. A hipótese $H_{(1)}$ representa o candidato a verdadeiro pai e $H_{(0)}$ representa um candidato a pai, de ocorrência aleatória na população, de modo que a razão de máxima verossimilhança (*likelihood ratio* - LR) é:

$$LR = H_{(1)}/H_{(0)}$$

Para cada candidato é calculada uma LR total, por multiplicação das LR de cada loco individual, assumindo-se segregação independente entre locos (locos em equilíbrio de ligação). O logaritmo natural (\log_e) desta LR total é denominado de *LOD score*. Esse valor sendo positivo indica que o candidato é mais provável de ser o verdadeiro pai, do que um outro macho selecionado aleatoriamente. Quando dois ou mais candidatos apresentam um *LOD score* positivo, uma estatística Δ foi aplicada. Essa estatística (Δ), é definida como a diferença do *LOD score* entre o mais provável pai (maior *LOD score* positivo) e o segundo mais provável pai (segundo maior *LOD score* positivo).

A significância dos valores de Δ é acessada por testes de paternidade simulados pelo programa. A simulação utiliza as freqüências alélicas observadas na população para conduzir testes de paternidade para um grande número de progênes, com o objetivo de gerar distribuições do Δ . As simulações levam em conta o número de candidatos a pai (estimados a partir de dados de campo), a proporção amostrada de candidatos a pai (estimados a partir de dados de campo), a proporção de locos que foram genotipados nos indivíduos (calculados a partir do conjunto de dados genéticos) e a freqüência de erros de genotipagem. Na etapa final da simulação são gerados valores críticos de Δ , de modo que a significância

dos valores de λ , encontrados nos testes de paternidade conduzidos na população estudada, possa ser determinada.

O macho com o maior *LOD score* será indicado como o pai se a diferença entre o seu *LOD score* e o do segundo candidato a pai (λ score) for maior do que o λ crítico. Neste trabalho, 95% e 80% foram escolhidos como níveis restritos e relaxados de confiança, respectivamente. Um λ crítico foi calculado para cada nível de confiança.

As pressuposições usadas nas inferências de paternidade com o programa CERVUS, foram as seguintes: para cada árvore feminina haviam dez árvores masculinas vizinhas (vizinhança reprodutiva), a proporção de árvores masculinas amostradas foi de 100% e a taxa de erro de genotipagem foi de 0,01. Foram realizadas 10.000 repetições nas simulações e adotados os níveis de confiança restrito, de 95%, e relaxado, de 80%, para determinar o verdadeiro parental paterno.

2.5. Estrutura genética dentro de progênies de polinização aberta mediante análise de paternidade

A estrutura genética dentro de progênies foi caracterizada pela estimativa do coeficiente de coancestria, dentro de progênies, e pelo tamanho efetivo de variância. Ambas estimativas foram calculadas para os resultados da análise de paternidade usando dois métodos: RITLAND (1989) e SQUILLACE (1974).

Segundo RITLAND (1989), baseando-se na análise de paternidade determinou-se o número efetivo de árvores polinizadoras (\hat{N}_{ep}) que contribuíram para a descendência de cada árvore materna, contando-se o número de diferentes pais determinados como candidatos a pai verdadeiro. Conforme o autor, o número efetivo de árvores polinizadoras (\hat{N}_{ep}) pode ser estimado por meio da correlação de paternidade,

$$\hat{N}_{ep} = \frac{1}{\hat{r}_p}$$

de forma que possuindo um dos parâmetros, estima-se o outro. Assim, calculou-se a correlação de paternidade mediante:

$$\hat{r}_p = \frac{1}{\hat{N}_{ep}}$$

Estimou-se o coeficiente de coancestria (\hat{q}_{xy}) e o tamanho efetivo de variância ($\hat{N}_{e(v)}$), utilizando-se as expressões descritas no item 2.3.

De posse do número efetivo de árvores polinizadoras, estimou-se a proporção de irmãos-completos (\hat{P}_{IC}) e meios-irmãos (\hat{P}_{MI}), com base na metodologia descrita por SQUILLACE (1974), usando-se as seguintes expressões:

$$\hat{P}_{IC} = \sum_{i=1}^j \frac{[m_i(m_i n - 1)]}{n - 1}$$

$$\hat{P}_{MI} = \frac{(1 - \hat{s})[n(1 - \hat{s}) - 1]}{n - 1} - \hat{P}_{IC}$$

onde n é o número de plantas dentro de progênies; m_i é a proporção de plantas filhas do pai i , $i = 1, 2, \dots, j$; \hat{s} é a taxa de autofecundação e j é o número de pais.

Como a erva-mate é espécie dióica, a taxa de autofecundação é zero ($\hat{s} = 0$) e a proporção de meios-irmãos reduz-se a:

$$\hat{P}_{MI} = 1 - \hat{P}_{IC}$$

Estimou-se o coeficiente médio de coancestria por meio da expressão:

$$\hat{q}_{xy} = \hat{q}_{IC} \hat{P}_{IC} + \hat{q}_{MI} \hat{P}_{MI}$$

onde \hat{q}_{IC} e \hat{q}_{MI} são os coeficientes de coancestria entre irmãos-completos e meios-irmãos em populações com endogamia (\hat{F}_p) e coancestria (\hat{q}_p) na geração parental, respectivamente:

$$\hat{q}_{IC} = 0,25(1 + \hat{F}_p + 2\hat{q}_p)$$

$$\hat{q}_{MI} = 0,125(1 + \hat{F}_p + 6\hat{q}_p)$$

Desta forma, a estimativa do coeficiente médio de coancestria dentro de progênies pode ser definida como:

$$\hat{q}_{xy} = 0,25(1 + \hat{F}_p + 2\hat{q}_p) \sum_{i=1}^j \frac{[m_i(m_i n - 1)]}{n-1} + 0,125(1 + \hat{F}_p + 6\hat{q}_p) \left\{ 1 - \sum_{i=1}^i \frac{[m_i(m_i n - 1)]}{n-1} \right\}$$

A partir do coeficiente médio de coancestria estimou-se o tamanho efetivo de variância, pela mesma expressão descrita no item 2.3.

O parentesco entre plantas dentro da APS foi calculado a partir do coeficiente de coancestria, descrito em LOISSELE et al. (1995). O estimador multiloco do coeficiente de coancestria entre cada par de indivíduos i e j , é:

$$\hat{q}_{ij} = \frac{\sum_{i=1}^k (p_i - \bar{p}_k)(p_j - \bar{p}_k)}{\sum_{k=1}^K \bar{p}_k (1 - \bar{p}_k)} + \frac{1}{(2n-1)}$$

onde, p_i e p_j são as frequências do alelo k nos indivíduos i e j (assumindo valores de 0, 0,5 e 1 em indivíduos homocigotos para o alelo alternativo, heterocigotos e homocigotos para o alelo sob consideração, respectivamente) e \bar{p}_k é a média da frequência do alelo k na amostral de tamanho n (HARDY; VEKEMANS, 2003). O coeficiente de coancestria foi calculado para todos os pares de indivíduos da APS. Adicionalmente, estimou-se o coeficiente de endogamia de cada planta. Tais estimativas foram obtidas utilizando o programa SPAGEDI (HARDY; VEKEMANS, 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Sistema de reprodução

3.1.1. Frequências alélicas dos óvulo e pólen

A estimativa das divergências entre as frequências alélicas dos gametas femininos e masculinos mostrou diferenças significativas para os locos *PGI-B* e *6-PGDH-B* ao nível de 0,1% de probabilidade (Tabela 8). Segundo RITLAND; JAIN (1981) e LEE et al. (2000), a heterogeneidade nas frequências alélicas do pólen e do óvulo pode ser atribuída a diferenças na função masculina e feminina das plantas, imigração de pólen externo à população amostrada, seleção entre o período de polinização e análise isoenzimática, amostragem não representativa das árvores maternas, desvios de cruzamentos aleatórios provocados por autofecundações, cruzamentos biparentais, cruzamentos entre indivíduos aparentados (endogâmicos) e variação na fenologia de florescimento e hábitos dos polinizadores.

TABELA 8. Divergência genética entre as frequências alélicas do pólen e óvulo nas progênies de *I. paraguariensis*

Loco	Alelo	Pólen	Óvulo	\hat{F}_{ST}	<i>n</i>	GL	χ^2
<i>GOT-A</i>	1	0,930	0,940	0,000	745	1	0,61
	2	0,070	0,060				
<i>PGI-B</i>	1	0,149	0,280	0,011	748	3	16,79 ***
	2	0,673	0,600				
	3	0,108	0,080				
	4	0,069	0,040				
<i>6-PGDH-A</i>	1	0,238	0,280	0,002	647	1	2,97
	2	0,762	0,720				
<i>6-PGDH-B</i>	1	0,947	0,980	0,008	747	1	11,57 ***
	2	0,053	0,020				
<i>G-6PDH-A</i>	1	0,795	0,780	0,000	721	1	0,48
	2	0,205	0,220				

(***) $P < 0,001$; (*n*) tamanho amostral; (GL) graus de liberdade.

De acordo com a comparação nas frequências alélicas das árvores masculinas e femininas (Tabela 9), existem diferenças genéticas significativas entre os sexos para o loco *G-6PDH-A*. Nas fêmeas, o alelo A_1 foi predominante, enquanto nos machos, as frequências dos alelos A_1 e A_2 foram semelhantes. Contudo, isto não explica os desvios observados nos locos *PGI-B* e *6-PGDH-B*. Acredita-se que, neste

caso, as divergências entre as freqüências de pólen e óvulo ocorram devido ao cruzamento entre indivíduos aparentados e/ou assincronia do período de florescimento. SOUSA; DAROS; STURION (2003) realizaram estudo de fenologia na APS no mesmo ano em que foram coletadas as sementes para esse trabalho, e os resultados obtidos por esses autores confirmam assincronia no período de florescimento.

Diversos estudos têm detectado divergências significativas entre as freqüências de pólen e óvulo, em espécies arbóreas, como: *Cariniana legalis* (SEBBENN et al., 2000a), *Senna multijuga* (RIBEIRO; LOVATO, 2004), *Acacia aroma* e *Acacia macracantha* (CASIVA et al., 2004).

A homogeneidade nas freqüências alélicas do pólen e do óvulo é uma das pressuposições do modelo misto de reprodução de RITLAND; JAIN (1981). Contudo, segundo esses autores, quando se analisa mais de quatro ou cinco locos, a violação quanto à pressuposição de homogeneidade das freqüências alélicas do pólen e óvulo têm pouco efeito sobre a estimativa da taxa de cruzamento multiloco na população. Além disso, desvios observados nas freqüências alélicas dos gametas, podem ser estudados como informações adicionais do sistema de reprodução.

TABELA 9. Divergência genética entre as freqüências alélicas das árvores femininas e masculinas da população de *I. paraguariensis*

Loco	Alelo	Fêmeas	Machos	\hat{F}_{ST}	<i>n</i>	GL	χ^2
GOT-A	1	0,940	0,922	0,001	70	1	0,17
	2	0,060	0,078				
PGI-B	1	0,280	0,167	0,012	70	3	1,75
	2	0,600	0,711				
	3	0,080	0,067				
	4	0,040	0,056				
6-PGDH-A	1	0,222	0,210	0,000	70	1	0,03
	2	0,778	0,790				
6-PGDH-B	1	0,980	0,956	0,005	70	1	0,67
	2	0,020	0,044				
G-6PDH-A	1	0,786	0,530	0,072	70	1	10,15 **
	2	0,214	0,470				

(**) $P < 0,01$; (*n*) tamanho amostral; (GL) graus de liberdade.

3.1.2. Homogeneidade nas freqüências alélicas do pólen efetivo e das árvores masculinas da população

Na Tabela 10 são apresentados os resultados das divergências genéticas entre as freqüências alélicas do pólen efetivo e das árvores masculinas da população. Apenas o loco *G-6PDH-A* apresentou divergência genética significativa ao nível de 1%, indicando que o pólen efetivo não representa as freqüências alélicas da população masculina, ou seja, o pólen não representa o conjunto gamético polínico potencial presente nos machos. Este resultado pode ser interpretado como indicativo de desvios de cruzamentos aleatórios, visto que nem todas as árvores masculinas contribuíram de forma homogênea para a descendência.

Diversos fatores podem ser responsáveis por essa divergência, dentre eles: cruzamentos biparentais, que podem estar associados a vizinhanças; variação espacial e temporal na fenologia de florescimento e fecundidade; e a proporção de árvores adultas contribuindo efetivamente no processo reprodutivo (MURAWSKI; HAMRICK, 1991; MITTON, 1992).

TABELA 10. Divergência genética entre as freqüências alélicas do pólen efetivo e das árvores masculinas da população de *I. paraguariensis*

Loco	Alelo	Pólen da progênie	Pólen dos machos	\hat{F}_{ST}	<i>n</i>	GL	χ^2
<i>GOT-A</i>	1	0,930	0,922	0,000	45	1	0,02
	2	0,070	0,078				
<i>PGI-B</i>	1	0,149	0,167	0,002	45	3	0,17
	2	0,673	0,711				
	3	0,108	0,067				
<i>6-PGDH-A</i>	4	0,069	0,056	0,001	45	1	0,10
	1	0,238	0,210				
<i>6-PGDH-B</i>	2	0,762	0,790	0,000	45	1	0,04
	1	0,947	0,956				
<i>G-6PDH-A</i>	2	0,053	0,044	0,079	45	1	7,07 **
	1	0,795	0,530				
	2	0,205	0,470				

(**) $P < 0,01$; (*n*) tamanho amostral; (GL) graus de liberdade.

3.1.3. Índices de fixação

O índice de fixação de WRIGHT (1965) mede a relação entre a heterozigosidade observada e a esperada em uma população de cruzamentos aleatórios, conforme as expectativas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A estimativa do índice de fixação foi positiva e não significativa na população ($\hat{F}_a = 0,061$), mas positiva e significativa nas progênies ($\hat{F}_p = 0,105$; $P < 0,05$), indicando endogamia e sugerindo a ocorrência de seleção contra homozigotos entre as fases juvenil e adulta (Tabela 11). Resultados semelhantes em espécies arbóreas tropicais foram descritos por SEBBENN (2001), SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN (2003), GUSSON (2003) e SOBIERAJSKI (2004), comparando as árvores adultas com suas progênies.

Segundo FINKELDEY (1998), autofecundações e cruzamentos entre parentes causam endogamia, tendo efeitos negativos sobre a capacidade adaptativa e reprodutiva das populações, como perda de vigor e fertilidade. Em erva-mate, não ocorrem autofecundações, por se tratar de uma espécie dióica, de forma que o cruzamento entre parentes (entre árvores masculinas e femininas) é a única forma de geração de endogamia. Ainda, como a endogamia é igual a coancestria entre os parentais cruzados (LINDGREN; GEA; JEFFERSON, 1996), é possível afirmar que a endogamia de 0,105 (Tabela 11) foi gerada pelo cruzamento entre parentes aproximadamente no grau de meios-irmãos ($q_{xy} = 0,125$).

Analisando-se separadamente as árvores maternas e paternas, observa-se excesso significativo de heterozigotos nas fêmeas ($\hat{F}_{mat} = - 0,200$; $P > 0,05$) e endogamia significativa nos machos ($\hat{F}_m = 0,125$; $P > 0,05$) (Tabela 11). Em lenhosas dióicas, as fêmeas apresentam um esforço reprodutivo (florescimento e frutificação) superior aos machos, empregando grande parte dos seus recursos na reprodução e menos na manutenção e crescimento. Conseqüentemente, a taxa de mortalidade é superior nas fêmeas (LLOYD; WEBB, 1977). Esses resultados foram comprovados em estudos realizados com *Ilex aquifolium* (OBESO, 1997; OBESO; ALVAREZ-SANTULLANO; RETUERTO, 1998). O excesso de heterozigotos observados nas fêmeas de erva-mate poderia ser justificado pela morte prematura dos indivíduos endogâmicos, através da seleção natural, devido à menor capacidade adaptativa e

ao reduzido vigor ou pela eliminação das fêmeas, supostamente homozigotas, menos produtivas da população, visto que foi realizada uma seleção em relação à produção de massa foliar.

TABELA 11. Estimativas de parâmetros do sistema de reprodução em *I. paraguariensis*

Parâmetros	Estimativas
Número total de árvores matrizes: m_t	37
Número de árvores matrizes tipadas: m	25
Número de progênies: n	750
Índice de fixação na população adulta ($n = 70$): \hat{F}_a	0,061 (- 0,023 a 0,161)
Índice de fixação nas árvores maternas ($n = 25$): \hat{F}_{mat}	- 0,200 [0,007]
Índice de fixação nas árvores masculinas ($n = 45$): \hat{F}_m	0,125 (0,016 a 0,241)
Índice de fixação nas progênies ($n = 750$): \hat{F}_p	0,105 (0,001 a 0,205)
Taxa de cruzamento multiloco (\hat{t}_m)	0,955 [0,017]
Taxa de cruzamento uniloco (\hat{t}_s)	0,964 [0,025]
Taxa de cruzamento entre aparentados ($1 - \hat{t}_m$)	0,045
Correlação multiloco de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$)	0,401 [0,040]
Correlação uniloco de paternidade ($\hat{r}_{p(s)}$)	0,401 [0,042]
Cruzamentos envolvendo árvores polinizadoras parentes: $\hat{r}_{p(s)} - \hat{r}_{p(m)}$	0,000 [0,007]
Proporção de irmãos-completos (\hat{r}_p)	0,401
Proporção de meios-irmãos ($1 - \hat{r}_p$)	0,599
Número efetivo de árvores polinizadoras: $\hat{N}_{ep} = 1 / \hat{r}_p$	2,5
Coefficiente médio de coancestria dentro de progênies: \hat{q}_{xy}	0,186
Tamanho efetivo de variância ($\hat{N}_{e(v)}$)	2,53
Tamanho efetivo de variância total: $\hat{N}_{e(v)(t)} = m_t \hat{N}_{e(v)}$	93,61

** $P < 0,01$; (): $IC_{95\%}$ = intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade; []: $1,96EP$.

3.1.4. Taxa de cruzamento multiloco e uniloco

A taxa de cruzamento multiloco (\hat{t}_m) de 0,955 e uniloco (\hat{t}_s) de 0,964, foram estatisticamente diferentes de um, a julgar pelo intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade (Tabela 11). Em espécies dióicas, pela ausência de autofecundação, todas as divergências das taxas multiloco e uniloco de um, são atribuídas aos cruzamentos entre indivíduos aparentados. A diferença entre o valor

um e a taxa de cruzamento multiloco ($1 - \hat{t}_m$), que no caso apresentou a menor estimativa de cruzamento, indicou a ocorrência de 4,5% de cruzamentos entre parentes. Isto explica a alta endogamia observada nas progênes, confirmando que realmente ocorreram cruzamentos entre parentes na população.

Em APS, especialmente, é desejável evitar qualquer nível de endogamia. Para tanto, é necessário descobrir quem são os indivíduos aparentados e evitar a coleta de sementes de árvores femininas que tenham um ou mais parentes na área, embora o procedimento mais indicado seria eliminar um dos parentes da população.

3.1.5. Taxa de cruzamentos correlacionados

A correlação \hat{r}_p mede a proporção de indivíduos gerados por cruzamentos biparentais (irmãos-completos). Adicionalmente, diferenças positivas entre as taxas uniloco e multiloco ($\hat{r}_{p(s)} - \hat{r}_{p(m)}$) indicam que os pais participantes da polinização tinham relação de parentesco. Na Tabela 11, verifica-se que as estimativas das correlações uniloco ($\hat{r}_{p(s)}$) e multiloco ($\hat{r}_{p(m)}$) de paternidade foram altas e iguais (0,401), indicando que parte das progênes foram geradas pelos mesmos pai e mãe, sendo, portanto, irmãos-completos.

Os cruzamentos biparentais podem ocorrer devido ao comportamento dos polinizadores, visitando sistematicamente árvores próximas; ao número reduzido de árvores vizinhas; ao assincronismo no período de florescimento e a ocorrência de poliandria ou depósito de múltiplos grãos de pólen de um único polinizador (SUN; RITLAND, 1998; FREITAS et al., 2004). A APS é composta por 45 árvores masculinas e não existem evidências de poliandria em erva-mate, de forma que a causa mais provável esteja associada ao comportamento forrageiro dos polinizadores e ao assincronismo do florescimento.

Conceitualmente, a correlação de paternidade mede a proporção de progênes de cruzamentos que são irmãos-completos. Como nas espécies dióicas, a reprodução só ocorre por cruzamentos, sendo $t = 1$, a correlação de paternidade representa a proporção de pares de indivíduos dentro das progênes que são irmãos-completos. Com base em tais resultados, estima-se que 40,1% das

progênies são irmãos-completos e 59,9% ($1-\hat{r}_p$) meios-irmãos, indicando fortes desvios de cruzamentos aleatórios (panmixia).

Alta correlação de paternidade também foi encontrada em algumas espécies tropicais, como: *Carianiana legalis* (\hat{r}_p variando de 0,210 a 0,324; SEBBENN et al., 2000a), *Eucalyptus marginata* (\hat{r}_p variando de 0,530 a 0,920; MILLAR et al., 2000) e *Senna multijuga* (\hat{r}_p variando de 0,249 a 0,309; RIBEIRO; LOVATO, 2004).

O número efetivo de árvores (\hat{N}_{ep}) participando na polinização, foi estimado em apenas três (2,5), demonstrando forte restrição na contribuição paterna (Tabela 11).

Se na APS os cruzamentos fossem perfeitamente aleatórios, todas as árvores masculinas contribuiriam para a descendência e as progênies seriam todas de meios-irmãos. Desvios da pressuposição de panmixia, em testes de progênies de polinização aberta, podem gerar superestimativas na variância genética aditiva e demais parâmetros relacionados, como herdabilidade e ganhos esperados de seleção (NAMKOONG, 1966; SQUILLACE, 1974; SEBBENN et al., 2000a) e requerem a coleta de maiores tamanhos amostrais para programas de conservação genética *ex situ* e reflorestamentos (SEBBENN, 2002).

Esses resultados evidenciam que, ao coletar sementes de espécies arbóreas de polinização aberta, para implementação de programas de melhoramento, conservação dos recursos genéticos e reflorestamento, deve-se considerar a existência de meios-irmãos e irmãos-completos dentro das progênies.

3.1.6. Coeficiente de coancestria e tamanho efetivo da variância

O coeficiente médio de coancestria dentro de progênies (\hat{q}_{xy}) foi estimado em 0,186, ou seja, 32,8% superior ao esperado em progênies de meios-irmãos (0,125) (Tabela 11). Esse resultado confirma as estimativas de correlação de paternidade, indicando alto grau de parentesco entre plantas dentro de progênies.

O coeficiente de coancestria é especialmente interessante para conhecer o tamanho efetivo de variância, que mede a representatividade genética de uma população a partir de suas progênies. Em uma população idealizada (tamanho

infinito, cruzamentos aleatórios, ausência de seleção, mutação e migração) o tamanho efetivo de variância corresponde a quatro ($\hat{N}_{e(v)} = 4$). Entretanto, desvios das pressuposições que caracterizam a população idealizada causam reduções no tamanho efetivo de variância. O valor estimado para $\hat{N}_{e(v)}$ foi 2,53, sendo 36,7% inferior ao esperado em sementes coletadas de uma população idealizada. Este resultado implica que maiores tamanhos amostrais serão necessários para a manutenção da variabilidade genética em programas de melhoramento e conservação genética.

Algumas populações naturais também apresentaram o tamanho efetivo de variância inferior ao idealizado: *Copaifera langsdorffii* ($\hat{N}_{e(v)} = 2,80$) (OLIVEIRA; CARVALHO; ROSADO, 2002), *Eschweilera ovata* ($\hat{N}_{e(v)} = 2,05$) (GUSSON, 2003) e *Mimosa scabrella* ($\hat{N}_{e(v)} = 2,56$) (SOBIERAJSKI, 2004).

O tamanho efetivo de variância total na APS foi de 93,61. Se os cruzamentos fossem perfeitamente aleatórios, este tamanho seria de 148 (4 x 37 árvores maternas). A literatura sugere que o tamanho efetivo de 50 é suficiente para manter a endogamia na faixa de 1% por geração e reter 90% da heterozigosidade atual, durante 10 gerações, em um loco com dois alelos, de populações de cruzamentos aleatórios, sem sobreposição de gerações e sem seleção, mutação e imigração de genes (FRANKEL; SOULÉ, 1981). Evidentemente, estas pressuposições não se ajustam ao caso da erva-mate, mas como o tamanho efetivo estimado real da APS é quase o dobro (93,61) do determinado por FRANKEL; SOULÉ (1981), esta diferença a mais pode acomodar parte dos desvios das pressuposições e as sementes coletadas na referida área de produção podem, provavelmente, reter potencial de manutenção de grande parte da variabilidade genética atual durante dez gerações.

3.2. Análise de paternidade e estrutura genética dentro de progênies de polinização aberta

A análise de paternidade permitiu determinar o pai de 406 progênies (54%), das 750 analisadas. Entretanto, em apenas seis progênies (0,8%) o nível de confiança observado foi o restrito (95%). Embora o número de pais detectados tenha sido elevado, o baixo poder de exclusão observado, deve-se à utilização de um conjunto de locos isoenzimáticos pouco polimórficos (Tabela 12).

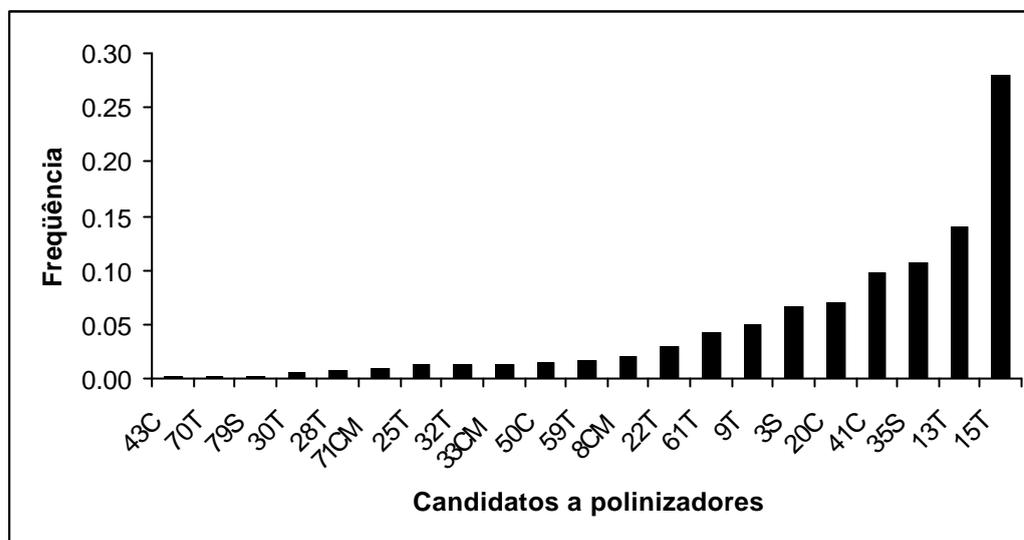
Observando-se a Tabela 12, constata-se que o número efetivo de árvores polinizadoras foi bastante variável, oscilando entre duas (matrizes T52 e T68) e 13 (matriz T75), com média de 6,72 árvores polinizadoras por matriz. Algumas árvores masculinas contribuíram mais para a descendência do que outras (Figura 8). Os resultados indicam que 62% (252) das sementes com paternidade definida foram originadas da contribuição polínica de apenas três árvores masculinas (35S, 13T e 15T), sendo 15T responsável por 29% das fertilizações efetivas. Estes resultados sugerem que as sementes coletadas da APS são compostas por misturas de irmãos-completos, meios-irmãos maternos e meios-irmãos paternos.

TABELA 12. Estrutura genética dentro de progênies de polinização aberta de *I. paraguariensis*

Mãe	n	N_{ep}	Squillace (1974)				Ritland (1989)			Distância (m)	Desvio padrão (m)
			\hat{P}_{IC}	\hat{P}_{MI}	\hat{q}_{xy}	$\hat{N}_{e(v)}$	\hat{r}_p	\hat{q}_{xy}	$\hat{N}_{e(v)}$		
C01	14	4	0,418	0,582	0,286	1,57	0,250	0,173	2,50	26,90	7,57
C06	18	10	0,092	0,908	0,178	2,24	0,100	0,163	2,67	41,52	20,42
C42	23	12	0,087	0,913	0,172	2,38	0,083	0,135	3,31	37,23	21,54
C51	24	5	0,286	0,714	0,178	2,51	0,200	0,178	2,56	32,37	13,94
CM07	13	5	0,359	0,641	0,212	1,98	0,200	0,150	2,83	60,04	16,70
CM34	16	8	0,242	0,758	0,213	1,94	0,125	0,167	2,58	27,65	6,64
CM39	15	8	0,095	0,905	0,186	2,03	0,125	0,167	2,56	28,91	12,64
CM44	18	9	0,137	0,863	0,177	2,30	0,111	0,155	2,81	44,00	17,81
S36	6	4	0,133	0,867	0,246	1,52	0,250	0,173	2,12	28,23	11,95
T27	21	6	0,229	0,771	0,191	2,09	0,167	0,188	2,38	49,82	29,33
T52	7	2	0,429	0,571	0,203	1,88	0,500	0,223	1,81	33,34	1,11
T54	23	6	0,320	0,680	0,193	2,23	0,200	0,178	2,55	60,06	16,55
T56	14	7	0,220	0,780	0,186	2,10	0,143	0,170	2,50	43,40	24,02
T60	18	5	0,359	0,641	0,213	2,06	0,200	0,166	2,67	43,51	8,74
T62	16	6	0,283	0,717	0,232	1,89	0,167	0,161	2,69	48,64	20,02
T64	7	3	0,286	0,714	0,448	1,05	0,333	0,184	2,11	39,32	8,38
T66	16	11	0,058	0,942	0,163	1,90	0,091	0,168	2,55	40,05	14,80
T67	18	9	0,065	0,935	0,253	1,69	0,111	0,165	2,65	40,05	14,80
T68	14	2	0,857	0,143	0,329	1,41	0,500	0,228	1,96	51,75	0,18
T75	22	13	0,087	0,913	0,187	2,28	0,077	0,135	3,31	52,57	20,80
T77	19	5	0,228	0,772	0,190	2,18	0,200	0,179	2,49	64,16	14,84
T78	13	7	0,103	0,897	0,197	1,92	0,143	0,158	2,66	67,93	17,52
T80	21	9	0,176	0,824	0,328	1,41	0,111	0,139	3,20	43,59	18,99
T81	17	7	0,103	0,897	0,203	1,94	0,143	0,170	2,56	43,52	21,06
T82	13	5	0,205	0,795	0,241	1,63	0,200	0,181	2,35	54,92	11,78
Média		6,72	0,234	0,766	0,224	1,94	0,189	0,170	2,58	44,28	19,60
Desvio padrão		2,94	0,172	0,172	0,065	0,35	0,111	0,022	0,36	11,50	

(n) número de progênies com pais identificados; (N_{ep}) número efetivo de polinizadores; (\hat{P}_{IC}) proporção de irmãos-completos; (\hat{P}_{MI}) proporção de meios-irmãos; (\hat{q}_{xy}) coeficiente de coancestria; ($\hat{N}_{e(v)}$) tamanho efetivo de variância e (\hat{r}_p) proporção de irmãos-completos. (C) Cascavel; (CM) Campo Mourão; (S) Soledade e (T) Toledo

FIGURA 8. Freqüência de contribuição paterna para a descendência de *I. paraguariensis*, na Área de Produção de Sementes (APS). (C) Cascavel; (CM) Campo Mourão; (S) Soledade e (T) Toledo



Ampla variação foi encontrada com relação à proporção de irmãos-completos (\hat{P}_{IC}), com valores entre 0,058 (matriz T66) e 0,857 (matriz T68), e valor médio de 0,234, correspondendo a 23,4%. A proporção de meios-irmãos (\hat{P}_{MI}) variou de 0,143 (matriz T68) a 0,942 (matriz T66), com valor médio de 0,766 (76,6%) (Tabela 12). Como previsto, as matrizes polinizadas por maior número de machos apresentaram menor proporção de irmãos-completos do que as fecundadas por um número restrito de pais. A proporção média de irmãos-completos (\hat{r}_p) determinada por análise de paternidade, onde somente as progênies que tiveram seus pais definidos foram consideradas, apresentou o valor de 0,189 (18,9%), enquanto, nas análises a partir do modelo de cruzamentos correlacionados de RITLAND (1989) (Tabela 11), onde todas as progênies foram consideradas, a proporção de irmãos-completos foi 0,401 (40,1%). Embora esses resultados tenham sido diferentes, ambos indicam que a maior proporção das progênies são de meios-irmãos e que existem fortes desvios de cruzamentos aleatórios (panmixia).

As estimativas médias do coeficiente de coancestria (\hat{q}_{xy}) calculadas pelo método de SQUILLACE (1974) e pelo de RITLAND (1989), foram diferentes: 0,224 e 0,170, respectivamente (Tabela 12). Entretanto, as estimativas de RITLAND (1989)

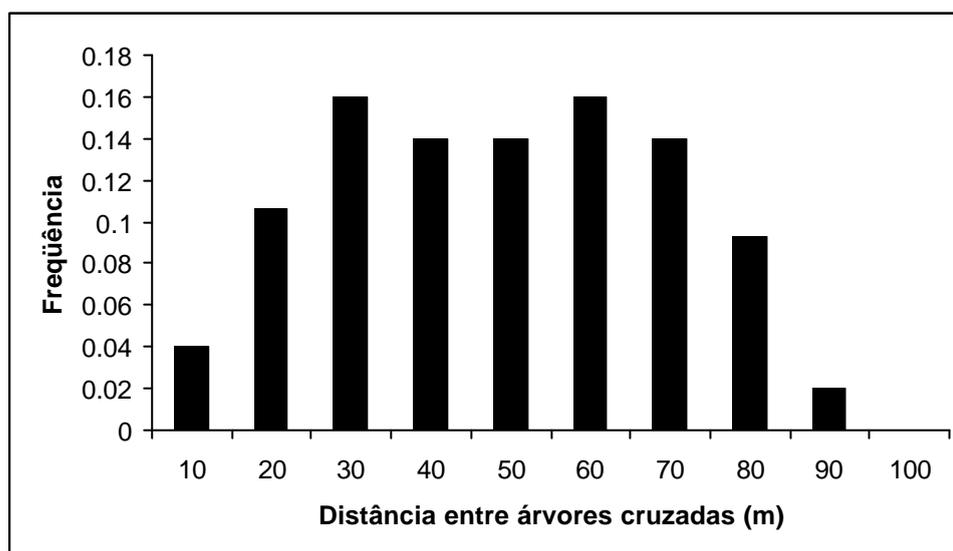
calculadas com base na análise de paternidade ($\hat{q}_{xy} = 0,170$) e no sistema de reprodução ($\hat{q}_{xy} = 0,186$) (Tabela 11) foram semelhantes. Contudo, todos os resultados foram superiores ao coeficiente de coancestria esperado em progênes de meios-irmãos ($\hat{q}_{xy} = 0,125$), confirmando a presença de cruzamentos biparentais na APS.

Os valores obtidos relativos ao tamanho efetivo de variância ($\hat{N}_{e(v)}$), obtidos pelo método de SQUILLACE (1974) e o de RITLAND (1989), foram diferentes: 1,94 e 2,58, respectivamente (Tabela 12). A estimativa de RITLAND (1989) foi superior à de SQUILLACE (1974), mas revelou-se próxima ao valor obtido mediante análise do sistema de reprodução, onde $\hat{N}_{e(v)}$ foi 2,53 (Tabela 11), constatando-se que realmente ocorreram desvios nas pressuposições que caracterizam uma população idealizada ($\hat{N}_{e(v)} = 4$). O menor tamanho efetivo de variância estimado, em relação ao esperado em uma população idealizada (população de tamanho infinito de cruzamentos aleatórios, sem seleção, mutação e migração), indica a presença de deriva genética no processo de reprodução, apontada pelos cruzamentos biparentais, devido ao número reduzido de árvores masculinas participando do processo de fecundação. As demais causas de desvio foram descartadas, visto que os locos usados são teoricamente neutros, portanto, não sofrem seleção; as mutações são bastante raras em locos isoenzimáticos e a APS encontra-se isolada, excluindo-se a possibilidade de migração.

Os resultados obtidos utilizando-se o método de RITLAND (1989), de parâmetros do sistema de reprodução e análise de paternidade, não foram muito divergentes. Contudo, observaram-se grandes diferenças entre os métodos de SQUILLACE (1974) e RITLAND (1989). Isto se deve ao fato de que nas estimativas obtidas pelo método de SQUILLACE (1974) foram computados os coeficientes de coancestria entre os parentais e no método de RITLAND (1989) a estimativa da coancestria não leva em conta a coancestria entre os parentais, explicando, desta forma, as diferenças entre os métodos. O método de SQUILLACE (1974), embora mais trabalhoso, é mais preciso para descrever o coeficiente de coancestria e o tamanho efetivo de variância.

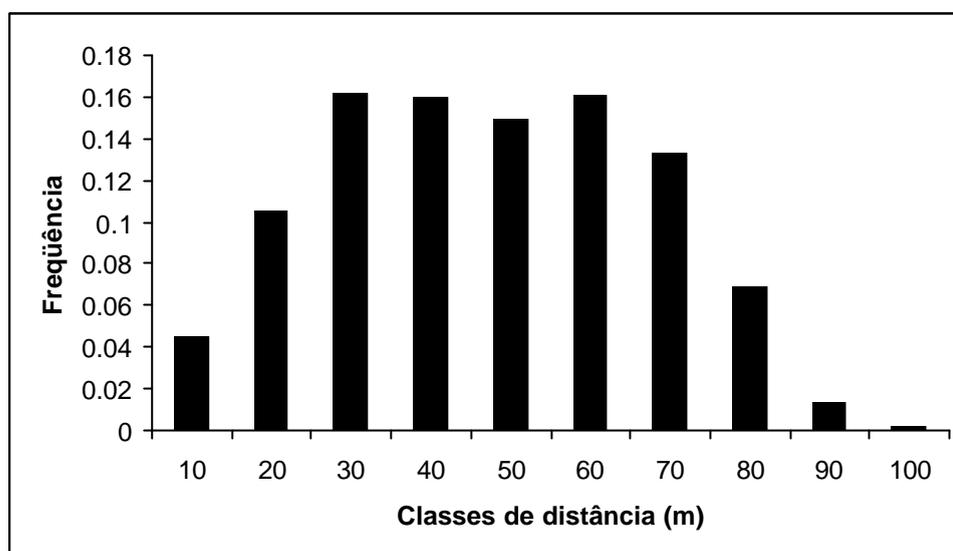
As distâncias médias entre as árvores masculinas polinizadoras e a planta matriz são apresentadas na Tabela 12. Verificou-se que a matriz C01 apresentou a menor distância média (26,90 m) e T78 a maior (67,93 m), com valor médio de 44,28 m. A Figura 9 representa graficamente as distâncias entre as árvores matrizes e os polinizadores, com variação entre 8 m e 84,9 m. Observou-se freqüências de cruzamentos superiores (16%) nas distâncias de 30 e 60 m e a menor freqüência (2%) a 90 m. Essas distâncias entre as árvores polinizadoras e a árvore matriz representam o movimento do pólen dentro da APS (fluxo gênico interno).

FIGURA 9. Freqüência de distância entre as árvores polinizadoras e as árvores maternas, na Área de Produção de Sementes (APS) de *I. paraguariensis*



A Figura 10 mostra a freqüência de distância entre as árvores masculinas da APS e as femininas que tiveram sementes coletadas. Observou-se um padrão de distribuição de freqüências semelhante ao gráfico anterior, sendo encontradas as maiores freqüências nas distâncias entre plantas de 30 a 70 metros. Os cruzamentos entre as árvores mais distantes podem ser devidos a assincronia de florescimento dos indivíduos mais próximos.

FIGURA 10. Freqüência de distância entre as árvores masculinas e as femininas que tiveram sementes coletadas, na Área de Produção de Sementes (APS) de *I. paraguariensis*



A APS está representada na Figura 11. Cabe ressaltar que, no croqui, as árvores foram identificadas somente pela numeração. Os cruzamentos entre as matrizes C01 (01), T78 (78), T27 (27) e C06 (06), e seus respectivos polinizadores, foram indicados através de linhas. Conforme a Tabela 12, as árvores C01 e T78 apresentaram a menor e a maior distância média entre os polinizadores e a matriz, respectivamente, sendo facilmente visualizado no croqui. A matriz T27 localiza-se na extremidade da Área de Produção de Sementes, possuindo vários machos ao redor, entretanto, verifica-se que a maioria dos cruzamentos ocorreram com os machos mais distantes. A matriz C06, embora situada na extremidade da área, foi polinizada por diversos machos (dez), tanto próximos, quanto distantes a mesma. Este padrão de polinização pode estar associado à fenologia de florescimento das árvores e ao comportamento dos polinizadores.

Na Figura 12 estão representadas as freqüências para o coeficiente de coancestria entre todos os pares de matrizes e polinizadores identificados como pais. Verifica-se que 70% dos pais e mães apresentam coancestria igual a zero. Dos 30% restantes, aparentemente, 15% eram meios-irmãos, o que explicaria a endogamia detectada nas progênies (0,105) e os outros 15% indicam que os parentais são irmãos-completos (0,25).

FIGURA 11. Esquema da Área de Produção de Sementes (APS) de *I. paraguariensis*. A linha indica o cruzamento entre a matriz e o polinizador

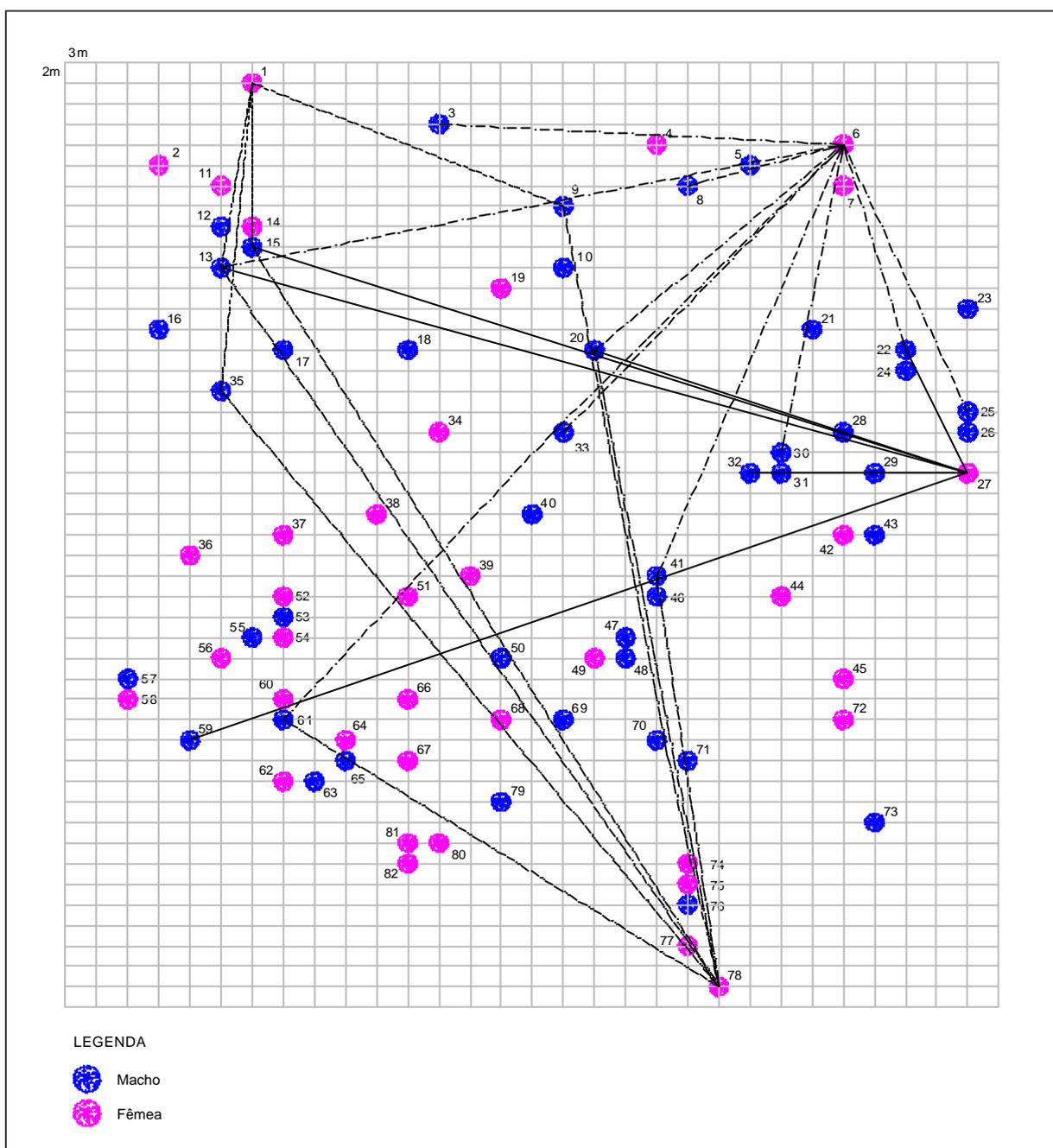
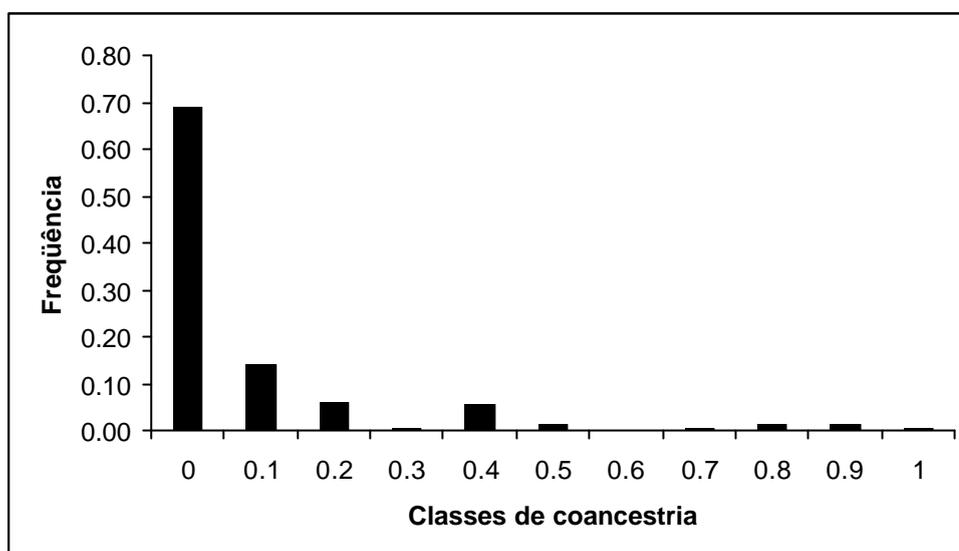


FIGURA 12. Distribuição de freqüência para o coeficiente de coancestria entre as matrizes e os pais identificados, na Área de Produção de Sementes (APS) de *I. paraguariensis*



Os valores de coancestria maiores que 0,25 podem resultar do cruzamento entre irmãos-completos. Contudo, outras explicações possíveis, para valores superiores a 0,25, seriam a presença de apomixia e o baixo polimorfismo dos locos usados.

Os valores maiores do que 0,7 podem ser resultantes de apomixia. Estudos para verificar a reprodução apomítica na espécie foram conduzidos isolando-se as flores femininas, e estas produziram sementes, sugerindo que a erva-mate pode se reproduzir por apomixia. Estes resultados serão confirmados com o auxílio de marcadores genéticos (SOUSA; DAROS, dados não publicados).

Considerando-se a ocorrência de apomixia, dois irmãos apomíticos representam um clone da mãe, de forma que o coeficiente de coancestria entre os dois irmãos é igual a 1,0. A diferença dos valores estimados (0,7 a 0,8) do esperado (1,0) poderia ser atribuída a erros de estimativas, causados pelo baixo polimorfismo observado nos locos usados (dois a quatro alelos por locos) e ao pequeno número de locos analisados (cinco). Outra explicação é, simplesmente, que os valores maiores que 0,5 seriam devido a erros de estimativas, baseadas em um número reduzido de locos, com baixo polimorfismo, excluindo-se a possibilidade de ter ocorrido apomixia.

4. CONCLUSÕES

1. Na Área de Produção de Sementes (APS) de *I. paraguariensis*, os cruzamentos entre indivíduos aparentados encontram-se acima do esperado para o modelo panmítico, gerando progênes de meios-irmãos e irmãos-completos, apesar de tratar-se de uma espécie dióica;
2. As progênes apresentaram maior endogamia que os indivíduos adultos, sugerindo ocorrência de seleção contra os homozigotos durante o desenvolvimento das plantas;
3. Embora grande número de pais tenham sido identificados, apenas três indivíduos contribuíram com a maioria dos cruzamentos;
4. As estimativas de coancestria entre os indivíduos da APS indicam ocorrência de cruzamentos entre irmãos-completos parentes e a possibilidade de presença de apomixia;
5. Pelos resultados obtidos na Área de Produção de Sementes (APS), aconselha-se a retirada de indivíduos aparentados e uma amostragem diferenciada, que envolva maior número de sementes e/ou coletas em anos sucessivos, para melhor representar a população.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. 1. Brasília: Embrapa/Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p.
- CASIVA, P. V.; VILARDI, J. C.; CIALDELLA, A. M.; SAIDMAN, B. Mating system and population structure of *Acacia aroma* and *A. macracantha* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 91, n.1, p. 58-64, 2004.
- COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, n. 23, p. 72-84, 1969.
- EL-KASSABY, A.; PARKINSON, J.; DEVITT, W. J. B. The effect of crown segment on the mating system in a Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziessi* (Mirb.) Franco) seed orchard. **Silvae Genetica**, v. 35, n. 4, p. 149-155, 1986.
- ELLSTRAND, N. C.; MARSHALL, D. L. Interpopulation gene flow by pollen in wild radish, *Raphanus sativus*. **American Naturalist**, v. 126, p. 606-616, 1985.
- FERREIRA, 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.
- FINKELDEY, R. **An Introduction to Tropical Forest Genetics**. Lecture Notes. Georg-August University Göttingen, Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, 1998. 241 p.
- FRANKEL, O. H.; SOULÉ, M. S. **Conservation and evolution**. Cambridge: University Press, Cambridge, 1981. 327 p.
- FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M.; MORAES, M. L. T.; LEMOS, E. G. M. Mating system of a population of *Myracrodruon urundeuva* F. F. & M. F. Allemão using the fAFLP molecular marker. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 425-431, 2004.
- GUSSON, E. **Uso e diversidade genética em populações naturais de biriba (*Eschweilera ovata* [Cambess.] Miers): subsídios ao manejo e conservação da espécie**. Piracicaba. 2003. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGEDI 1.1b. A program for spatial pattern analysis of genetic diversity. Version for Windows 95. <http://www.ulb.ac.be/sciences/ecoevol/software.html/>. 2003.
- LEE, S. W.; WICKNESWARI, R.; MAHANI, M. C.; ZAKRI, A. H. Mating system parameters in a tropical tree species *Shorea leprosula* Miq. (Dipterocarpaceae). from Malaysian lowland dipterocarp forest. **Biotropica**, v. 32, p. 693-702, 2000.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: versão 1.1 para Windows 95/NT**. 1999. Disponível: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>.

LIAN, C.; MIWA, M.; HOTETSU, T. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. **Heredity**, v. 87, p. 88-98, 2001.

LINDGREN, D.; GEA, L.; JEFFERSON, P. Loss of genetic diversity by status number. **Silvae Genetica**, v. 45, p. 52-59, 1996.

LLOYD, D. G.; WEBB, J. Secondary sex characters in plants. **Botanical Review**, v. 43, p. 177-216, 1977.

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

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUIK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639-635, 1998.

MILLAR, M. A.; BYRNE, M.; COATES, D. J.; STUKELY, M. J. C.; McCOM, J. A. Mating system studies in jarrah, *Eucalyptus marginata* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 48, p. 475-479, 2000.

MITTON, J. B. The dynamic mating systems of conifers. In: ADAMS, W. T.; STRAUSS, S. H.; COPEL, D. L.; GRIFFIN, A. R. (Ed.). **International symposium on population genetics of forest trees**, Dordrecht: Kluwer Verlag. 1992. p. 197-216.

MURAWSKI, D. A.; HAMRICK, J. L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, v. 67, p. 167-174, 1991.

NAMKOONG, G. Inbreed effects on estimation of genetic additive variance. **Forest Science**, v. 12, p. 8-13, 1966.

OBESO, J. R. Costs of reproduction in *Ilex aquifolium*: effects at tree, branch and leaf levels. **Journal of Ecology**, v. 85, p. 159-166, 1997.

OBESO, J. R.; ALVAREZ-SANTULLANO, M.; RETUERTO, R. Sex ratios, size distributions, and sexual dimorphism in the dioecious tree *Ilex aquifolium* (Aquifoliaceae). **American Journal of Botany**, v. 85, n. 11, p. 1602-1608, 1998.

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, D. de; ROSADO, S. C. S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 3, p. 331-338, 2002.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio grande do Sul**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues-HBR, 1988. p. 284-292.

RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Mating system in a neotropical tree species, *Senna multijuga* (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 418-424, 2004.

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer, *Mimulus guttatus*. **Evolution**, v. 43, p. 848-859, 1989.

RITLAND, K.; EL-KASSABY, Y. A. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas-fir as shown by an efficient multilocus model. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 71, p. 375-384, 1985.

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using *n* independent loci. **Heredity**, v. 88, p. 221-228, 2002.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, v. 47, p. 35-52, 1981.

ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; GIL, L. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. **Heredity**, v. 94, p. 13-22, 2005.

SEBBENN, A. M. Depressão por endogamia em jequitibá rosa. **Revista do Instituto Florestal**, v. 13, n. 1, p. 61-81, 2001.

SEBBENN, A. M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, v. 14, p. 115-132, 2002.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; ZANATTO, A. C. S. Mating system in populations of *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze: implications for genetic conservation and improvement. **Scientia Forestalis**, n. 58, p. 25-40, 2000a.

SOBIERAJSKI, G. R. **Estrutura genética em populações de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) por marcadores isoenzimáticos e caracteres quantitativos**. Piracicaba, 2004. 127 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo.

SOUSA, V. A.; DAROS, T. L.; STURION, J. A. Fenologia reprodutiva de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESSO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL, 9. 2003. Nova Prata/RS. **Anais...** Nova Prata: Prefeitura Municipal: Câmara Municipal de Vereadores: Câmara da Indústria e Comércio, 2003. CD ROM.

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* A. St. Hil. (Bombaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 113-121, 2003.

SQUILLACE, A. E. Average genetic correlations among offspring from open-pollinated forest trees. **Silvae Genetica**, v. 23, p. 149-156, 1974.

SUN, M.; RITLAND, K. Mating system of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*) a successful colonizer in North America. **Heredity**, v. 80, p. 225-232, 1998.

WANG, C. T.; LIN, T. P. Inheritance and linkage relationships of allozymes, and estimation of outcrossing rates in a seed orchard of *Cunninghamia konishii* Hay. **Silvae Genetica**, v. 47, n. 1, p. 33-37, 1998.

WANG, K. S. Gene flow in European beech (*Fagus sylvatica* L.). **Genetica**, v. 122, p. 105-113, 2004.

WORKMAN, P.; NISWANDER, J. L. Population studies on southwestern Indian Tribes, II, Local genetic differentiation in the Papago. **American Journal Human Genetic**, v. 22, p. 24-49, 1970.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, p. 395-420, 1965.

CAPÍTULO III. CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Ilex paraguariensis* St. Hil. UTILIZANDO MARCADORES ISOENZIMÁTICOS

1. INTRODUÇÃO

Os recursos genéticos florestais brasileiros vêm sendo, continuamente, ameaçados de extinção por diversas razões, como as ligadas à exploração florestal e ao avanço da fronteira agrícola. A situação agrava-se, não só pela rápida redução dos remanescentes, mas também, pela inexistência de estratégias efetivas de conservação, embasadas em parâmetros técnico-científicos pertinentes a cada espécie. A falta dessas informações é um dos principais entraves a serem solucionados para que programas de conservação de germoplasma florestal possam ser efetivamente implementados (IPGRI-FAO, 1996).

Estudos de genética de populações são necessários a fim de caracterizar a estrutura genética das populações remanescentes para que sejam estabelecidas estratégias para a conservação *in situ*, para o manejo sustentado e para a formação de áreas de coleta de sementes (PINTO; SOUZA; CARVALHO, 2004).

Dentre os métodos empregados para revelar variabilidade destacam-se os marcadores bioquímicos (isoenzimas), que detectam variabilidade ao nível de proteínas e apresentam como principal vantagem a natureza codominante, que permite estimar diversos parâmetros genéticos importantes.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é uma árvore perene que apresenta ampla distribuição natural, sendo encontrada desde a latitude de 21^o até 30^o S e longitudes de 48^o 30' até 56^o 10' W, abrangendo o Sul do Brasil, Paraguai e Argentina (OLIVEIRA; ROTTA, 1985). A espécie é historicamente utilizada como bebida, preparada pela infusão de folhas e ramos secos. Atualmente, o conhecimento das suas propriedades fitoquímicas tem despertado o interesse da indústria na fabricação de novos produtos (MACCARI JUNIOR, 2000; CANSIAN, 2003).

Apesar do aumento da área cultivada com erva-mate, a exploração predatória ainda é praticada. Este fato, associado ao desmatamento, aumenta o risco da perda de variabilidade genética da espécie. O Brasil possui mais de 80% da área de ocorrência natural (WINGE et al., 1995). Sendo assim, detém a maior responsabilidade no estudo e conservação dos recursos genéticos remanescentes.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a variação e a estrutura genética de populações naturais de *I. paraguariensis*, utilizando marcadores isoenzimáticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e amostragem

Para a análise genética empregaram-se seis populações naturais de *I. paraguariensis*, procedentes dos municípios de Barão de Cotegipe-RS, Três Barras-SC, Quatro Barras-PR, Jaguariaíva-PR, Caarapó-MS e Campos do Jordão-SP (Figura 13). A distância entre as localidades variou de 139 km, entre Quatro Barras e Jaguariaíva, a 659 km, entre Barão de Cotegipe e Caarapó.

Para o estabelecimento das áreas de coleta, considerou-se a ocorrência da espécie no Brasil e as variações edáficas e climáticas, que abrigam diversos biomas. A amostragem foi a mais representativa possível, abrangendo praticamente toda a área de ocorrência natural (RS, SC, PR, MS e SP), diferentes tipos climáticos e diversos ecossistemas, como: floresta com alto grau de fragmentação, floresta em bom estado de conservação, florestas em zonas de transição e floresta situada em área isolada.

Barão de Cotegipe-RS localiza-se a 27° 37' S, 52° 22' W e 683 m de altitude. O tipo climático, seguindo a classificação de Koeppen, é Cfa (temperado úmido, com temperatura média do mês mais quente superior a 22 °C), com temperatura média anual de 17 °C. A vegetação original desse local consistia na Floresta Ombrófila Mista que, atualmente, encontra-se em alto grau de fragmentação. A coleta foi realizada em árvores nativas que são exploradas comercialmente, rodeadas por plantas cultivadas de erva-mate, na Ervateira Barão de Cotegipe.

Três Barras-SC situa-se a 27° 30' S, 49° 34' W e 556 m de altitude. A classificação climática é Cfb (temperado úmido, com temperatura média do mês mais quente inferior a 22 °C), com temperatura média anual em torno de 16,7 °C. A coleta foi realizada na área de preservação florestal do Exército de Canoinhas. A vegetação original consistia na Floresta Ombrófila Mista, que ainda encontra-se em bom estado de conservação.

Quatro Barras-PR encontra-se a 25° 22' S, 49° 04' W e 904 m de altitude, no tipo climático Cfb. A região apresenta-se como zona de transição entre a Floresta Ombrófila Densa e a Floresta Ombrófila Mista, sendo também altamente

fragmentada. A coleta foi realizada em uma propriedade particular, cuja principal atividade é o plantio e a exploração de plantas medicinais.

Jaguariaíva-PR localiza-se a 24° 15' S, 49° 42' W e 827 m de altitude. A classificação climática é do tipo Cfb com temperatura média anual entre 18,3 e 19,7 °C. Esse local situa-se na zona de transição entre a Floresta Ombrófila Mista e o Cerrado. O material foi coletado em uma propriedade que explorava comercialmente a erva-mate, entretanto, essa atividade não é mais desenvolvida.

Caarapó-MS encontra-se a 22° 38' S, 54° 48' W e 445 m de altitude. O tipo climático da região é Cwa (temperado ou subtropical com período seco de inverno e temperatura média do mês mais quente superior a 22 °C). Coletou-se material vegetativo de uma área de preservação florestal na Fazenda Acampanário, que apresentava como atividade principal a exploração de erva-mate, porém, atualmente, a mesma foi substituída pelo cultivo da soja. O tipo de vegetação original era Floresta Estacional Semidecidual/Campos de altitude, encraves de cerrado, zonas de tensão ecológica, contatos.

Campos do Jordão-SP, localiza-se a 22° 44' S, 45° 35' W e 1736 m de altitude, apresentando tipo climático Cfb e com temperatura média anual inferior a 17 °C. Procedeu-se a coleta numa mancha isolada de ocorrência de erva-mate, no Parque Estadual de Campos do Jordão, pertencente ao Instituto Florestal de São Paulo, sendo a vegetação formada por Floresta Ombrófila Mista, com predominância de *Araucaria* e *Podocarpus*.

A Figura 13 indica a localização geográfica das populações naturais de *I. paraguariensis* amostradas e analisadas.

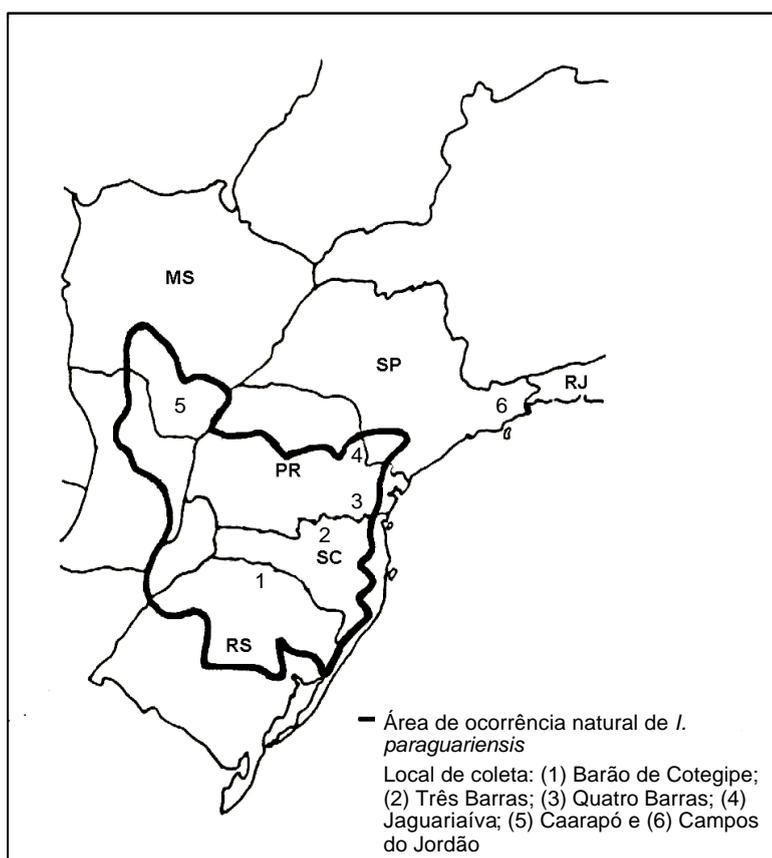
Amostraram-se, ao acaso, 50 indivíduos adultos por população (25 machos e 25 fêmeas) com uma distância mínima de 100 metros entre plantas, com exceção das populações de Jaguariaíva e de Campos do Jordão onde a distância entre indivíduos variou de 40 a 70 metros, devido à restrição no tamanho das populações.

As coletas das populações de Barão de Cotegipe, Jaguariaíva e Quatro Barras foram realizadas entre novembro de 2002 a fevereiro de 2003, enquanto as de Três Barras, Caarapó e Campos do Jordão, de novembro de 2003 a fevereiro de 2004. As coletas foram efetuadas no período de florescimento da erva-mate, fase em que é possível determinar o sexo das plantas.

Nessa ocasião, as árvores foram identificadas com uma placa de metal e georeferenciadas com aparelho de GPS. Nas populações de Barão de Cotegipe e Jaguariaíva não foi possível realizar o georeferenciamento.

Coletaram-se amostras dos tecidos foliares de cada planta e estas foram acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados, e mantidas em isopor com gelo para o transporte até o laboratório, onde foram armazenadas no refrigerador a 5 °C, para posterior utilização nas análises isoenzimáticas.

FIGURA 13. Localização geográfica das populações naturais de *I. paraguariensis* amostradas e analisadas. (1) Barão de Cotegipe; (2) Três Barras; (3) Quatro Barras; (4) Jaguariaíva; (5) Caarapó e (6) Campos do Jordão. (Adaptado de OLIVEIRA; ROTTA, 1985)



2.2. Extração das enzimas e eletroforese

A extração das enzimas e condução da eletroforese seguiram a metodologia descrita no item 2.2, do Capítulo I. Utilizaram-se as seguintes enzimas: PGI, PGM, GOT e MR, no tampão Lítio-borato pH 8,1; ADH, GDH, G-6PDH, IDH, MDH, NDH, SKDH e 6-PGDH, no tampão Tris-citrato pH 7,5.

Foram analisados os seguintes locos gênicos: *GOT-A*, *PGI-B*, *NDH-A*, *NDH-B*, *6-PGDH-A*, *6-PGDH-B* e *G-6PDH-A*.

2.3. Caracterização da estrutura e variação genética

Os dados obtidos foram analisados através dos programas BIOSYS (SWOFFORD; SELANDER, 1997) e GSED (GILLET, 1998). As árvores de distância genética (NEI, 1978 e GREGORIUS, 1974) foram construídas através do NTSYS (ROHLF, 1992). As análises também foram realizadas separando as fêmeas e os machos.

2.3.1. Medidas de parâmetros genéticos básicos

Freqüência alélica

A freqüência alélica foi obtida pela contagem direta do número de alelos por loco. Se existe N_i cópias de i -ésimo alelo na amostra, então a freqüência da amostra P_i , de i -ésimo alelo é:

$$P_i = \frac{N_i}{2N}$$

onde N é o número total de indivíduos na amostra.

Freqüência genotípica

As freqüências genotípicas foram calculadas com base no número de indivíduos homozigotos e heterozigotos presentes na amostra. Quando houver N_{ij} apresentando o genótipo $A_i A_j$, a freqüência, P_{ij} , do genótipo $A_i A_j$ é:

$$P_{ij} = \frac{N_{ij}}{N}$$

onde N é o número total de indivíduos na amostra.

2.3.2. Medidas de estrutura e variação genética dentro de populações

Número médio de alelos por locos (A/L)

O número médio de alelos por locos foi calculado por:

$$A/L = \frac{\sum(A)}{\sum(PL) + \sum(ML)}$$

onde $\sum(A)$ é o número de alelos detectados em todos os locos, $\sum(PL)$ o número de locos polimórficos e $\sum(ML)$ o número de locos monomórficos.

Percentagem de locos polimórficos

Um loco é considerado polimórfico se houver no mínimo dois alelos e a frequência do alelo mais comum for abaixo de 0,99 (LIENGSIRI; PIEWLUANG; BOYLE, 1990) ou abaixo de 0,95 (BERG; HAMRICK, 1977). A percentagem de locos polimórficos foi estimada por:

$$PPL = \frac{\sum(PL)}{\sum(PL) + \sum(ML)}$$

onde $\sum(PL)$ é o número de locos polimórficos e $\sum(ML)$ o número de locos monomórficos.

Diversidade alélica (v)

A diversidade alélica (v) de um loco corresponde ao número efetivo de alelos deste loco, sendo calculada pela expressão:

$$v = \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^{-1}$$

onde p_i é a frequência de i -ésimo alelo na população. O valor mínimo de v é 1,0, quando não existe variação no loco gênico e o valor mais elevado é igual ao número de alelos (n), se todos eles forem igualmente freqüentes.

Diversidade gamética (v_{gam})

A diversidade gamética (*output* gamético hipotético) é o conjunto de gametas que resultam da suposição da ausência de ligação entre locos, equilíbrio gamético (combinação ao acaso dos alelos em diferentes locos) e produção da mesma proporção de gametas por todos os membros da população.

A medida de v_{gam} representa o potencial da população para produzir gametas geneticamente diversos (GREGORIUS, 1978). A v_{gam} de uma população considerando L locos gênicos foi estimada por meio da expressão:

$$v_{gam} = \prod_{l=1}^L v_{(l)}$$

onde $v_{(l)}$ é a diversidade alélica l -ésimo locos.

Heterozigosidade observada e esperada (H_o e $H_e = d\tau$)

A medida de heterozigosidade é utilizada para caracterizar a estrutura genotípica. A heterozigosidade observada (H_o) é a proporção de genótipos presentes na população em estado heterozigoto. Pode ser calculada com base nos locos e a média de todos os locos.

A heterozigosidade esperada (H_e) consiste na probabilidade de dois alelos de um loco gênico, escolhidos ao acaso numa população infinita, diferirem entre si. A H_e (NEI, 1975) foi calculada por meio da expressão:

$$H_e = \left(1 - \sum_i p_i^2 \right)$$

onde p_i é a frequência de i -ésimo alelo em um dado loco gênico.

A medida de diferenciação genética total dentro de uma população efetivamente infinita (δ_T) (GREGORIUS, 1987), foi estimada por:

$$d_T = \frac{N}{N-1} \left(1 - \sum_i^n p_i^2\right)$$

onde p_i é a freqüência de i -ésimo alelo em um dado loco gênico; N é o tamanho da população.

Os valores de d_T e H_e convergem rapidamente quando N aumenta.

2.3.3. Medidas de estrutura e variação genética entre populações

Estatística-F (WRIGHT, 1965)

Permite não apenas caracterizar como é distribuída a variabilidade genética entre as populações (F_{ST}), mas também informa sobre os níveis médios de endogamia na população (F_{IS}) e na espécie (F_{IT}).

A estatística-F (WRIGHT, 1965) é baseada na medida de quanto as freqüências genotípicas observadas desviam da esperada, em três níveis hierárquicos: para espécie (T), população (S) e indivíduo (I). Os índices foram estimados por meio das seguintes expressões:

$$F_{IS} = 1 - \frac{H_I}{H_S} \qquad F_{ST} = 1 - \frac{H_S}{H_T} \qquad F_{IT} = 1 - \frac{H_I}{H_T}$$

onde H_I é a heterozigosidade média observada na população, H_S é a heterozigosidade média esperada entre populações e H_T é a heterozigosidade média esperada em nível de espécie.

F_{IS} representa a redução na freqüência de heterozigotos relativos a sua freqüência esperada, sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, causada pelo nível de fixação alélica dentro de populações; F_{ST} indica a redução na heterozigosidade devido a diferentes quantidades de fixação de alelos entre as populações e F_{IT}

mostra a redução na freqüência de heterozigotos relativos a sua freqüência esperada em equilíbrio, se a espécie não fosse subdividida em populações.

Quando há panmixia dentro de populações, $F_{IS} = 0$ e $F_{ST} = F_{IT}$ e quando as populações são geneticamente idênticas $F_{ST} = 0$ e $F_{IS} = F_{IT}$.

Distâncias genéticas entre populações

Várias medidas de distância genética têm sido utilizadas para quantificar a diferença de estrutura genética entre duas populações ou de uma única população contra todas as demais.

A distância genética D proposta por NEI (1978), foi calculada por:

$$D = -\ln I$$

A similaridade genética de I , entre duas populações (X e Y) é previamente calculada. O valor de I obtido em um dado loco foi estimado por:

$$I = \frac{(2n-1) \dot{j}_{xy}}{\sqrt{(2n \dot{j}_x - 1)(2n \dot{j}_y - 1)}}$$

onde \dot{j}_{xy} é a soma dos produtos das freqüências alélicas ($i = 1, \dots, n$) nas duas populações ($S(p_{i,x} \cdot p_{i,y})$), \dot{j}_x a soma dos quadrados das freqüências alélicas na população X, ($S(p_{i,x}^2)$), \dot{j}_y a soma dos quadrados das freqüências alélicas na população Y, ($S(p_{i,y}^2)$) e n o tamanho da amostra.

A distância genética d_o de GREGORIUS (1974) representa a proporção de tipos genéticos (alelos, gametas ou genótipos) que não são compartilhados por duas populações. A distância genética d_o será igual a 1,0 se duas populações não apresentarem tipos genéticos em comum e será igual a 0,0 se duas populações possuírem freqüências alélicas idênticas. A distância genética d_o entre duas populações foi calculada com a expressão:

$$d_o = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^n |p_k - p'_k|$$

onde p_k e p'_k representam as freqüências de k -ésimo tipo genético em cada população.

Diferenciação genética D_j e d

Quantidade de diferenciação genética D_j de uma população, comparada ao restante da coleção. Corresponde à proporção dos tipos genéticos (alelos, gametas ou genótipos) que são únicos nesta população (GREGORIUS, 1984). Então, a população menos diferenciada (que tem menor valor de D_j) é considerada a mais representativa da coleção. O valor de D_j para cada população (GREGORIUS; ROBERDS, 1986), foi obtido por:

$$D_j = d_o(p_j, \overline{p_j})$$

onde p_j é a distribuição da freqüência dos tipos genéticos na população j , $\overline{p_j}$ é a freqüência de distribuição desses tipos em todas as outras populações conjuntamente e d_o é a distância genética já definida. A diferenciação média da população foi estimada pela expressão:

$$d = \sum_j C_j D_j$$

onde C_j é padrão para pesos correspondentes à proporção de indivíduos presentes em cada população. Quando todas as populações são geneticamente idênticas, $\delta = 0,0$, e quando não há nenhum tipo em comum, $\delta = 1,0$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estrutura alélica

A base da variação genética é o número de alelos e a distribuição de suas freqüências na população. As freqüências alélicas dos sete locos analisados, nas seis populações naturais de erva-mate, são apresentadas na Tabela 13.

O loco *GOT-A* apresentou dois alelos, sendo A_1 o mais freqüente nas populações de Barão de Cotegipe, Três Barras, Quatro Barras e Jaguariaíva, e fixado em Caarapó e Campos do Jordão.

O loco gênico *PGI-B* foi o mais variável, apresentando maior número de alelos (cinco). B_2 foi o alelo predominante em todas as populações. O alelo B_1 também aparece em alta freqüência nas populações do Sul, entretanto, está ausente em Caarapó e Campos do Jordão. O alelo B_5 aparece somente em Barão de Cotegipe, Quatro Barras e Jaguariaíva, em freqüência relativamente baixa.

No loco *NDH-A*, o alelo com predominância é o A_2 , sendo fixado em Três Barras e Campos do Jordão. *NDH-B* revelou baixo polimorfismo, com o alelo B_2 fixado nas populações de Barão de Cotegipe, Três Barras e Caarapó, sendo predominante em Quatro Barras e Jaguariaíva.

No loco gênico *6-PGDH-A*, A_2 foi o alelo mais freqüente para todas as populações analisadas. Considerando-se o loco *6-PGDH-B*, verificou-se predominância do alelo B_1 , sendo fixado em Campos do Jordão. A população localizada mais ao sul (Barão de Cotegipe) apresentou maior freqüência do alelo B_2 com decréscimo de sua freqüência à medida que as populações avançavam em direção ao norte, estando ausente na população de Campos do Jordão.

O loco *G-6PDH-A* apresentou alto polimorfismo, ocorrendo oscilações nas freqüências alélicas entre as populações. O alelo A_1 foi predominante nas populações de Três Barras e Jaguariaíva, enquanto nas demais, o alelo mais freqüente foi o A_2 .

Em geral, as populações do Sul apresentaram maior diversidade alélica que as do Centro-oeste e Sudeste do Brasil. Verificaram-se oscilações nas freqüências alélicas entre populações, perdas e fixação de alelos em alguns locos gênicos, aumentando a homozigose, indicando deriva genética ou seleção. Diversos autores

comentam que as maiores probabilidades de perda alélica estão associadas aos alelos raros ou de baixa frequência, enquanto que os alelos comuns possuem maior probabilidade de serem fixados. O processo de deriva genética é causado pela redução no tamanho populacional, estando geralmente associado a eventos aleatórios de colonização ou isolamento das populações devido à fragmentação (CROW; KIMURA, 1970; NEI; MARUYAMA; CHAKRABORTY, 1975; SEOANE; KAGEYAMA; SEBBENN, 2000, SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN, 2004).

As populações estudadas encontram-se em ambientes distintos, portanto, tanto a deriva genética como a seleção natural podem estar influenciando as oscilações das frequências alélicas. A presença de alelos exclusivos, em algumas populações, como verificado nos locos *GOT-A*, *PGI-B*, *NDH-A* e *NDH-B*, é um indicativo de fluxo gênico restrito, que pode levar a um aumento na divergência genética entre populações (SEOANE; KAGEYAMA; SEBBENN, 2000).

TABELA 13. Estruturas alélicas em populações naturais de *I. paraguariensis* referentes a sete locos polimórficos

Loco gênico	Alelo	Barão de Cotegipe	Três Barras	Quatro Barras	Jaguariaíva	Caarapó	Campos do Jordão
<i>GOT-A</i>	1	0,969	0,898	0,966	0,884	1,000	1,000
	2	0,031	0,102	0,034	0,116	0,000	0,000
<i>PGI-B</i>	1	0,280	0,245	0,290	0,219	0,000	0,000
	2	0,350	0,612	0,370	0,563	0,811	0,489
	3	0,310	0,020	0,180	0,177	0,122	0,293
	4	0,020	0,122	0,070	0,031	0,067	0,217
	5	0,040	0,000	0,090	0,010	0,000	0,000
<i>NDH-A</i>	1	0,052	0,000	0,130	0,141	0,104	0,000
	2	0,948	1,000	0,870	0,859	0,896	1,000
<i>NDH-B</i>	1	0,000	0,000	0,102	0,061	0,000	0,000
	2	1,000	1,000	0,898	0,939	1,000	1,000
<i>6-PGDH-A</i>	1	0,120	0,309	0,234	0,050	0,090	0,010
	2	0,880	0,691	0,766	0,950	0,910	0,990
<i>6-PGDH-B</i>	1	0,840	0,847	0,929	0,920	0,990	1,000
	2	0,160	0,153	0,071	0,080	0,010	0,000
<i>G-6PDH-A</i>	1	0,256	0,722	0,196	0,674	0,219	0,053
	2	0,744	0,278	0,804	0,326	0,781	0,947

3.2. Diversidade alélica

As diversidades alélicas para cada loco e a média para todos locos gênicos, estão descritas na Tabela 14.

A maior diversidade alélica foi encontrada no loco *PGI-B*, para a maioria das populações (exceção de Caarapó), com a média mais elevada de todos os locos analisados ($n = 2,667$), sendo *G-6PDH-A* o loco com a segunda maior diversidade média ($n = 1,533$). Os menores valores foram obtidos no loco *NDH-B*, onde apenas duas populações, Quatro Barras e Jaguariaíva, apresentaram diversidade alélica, sendo o valor médio para todas as populações de 1,059.

Considerando a variabilidade alélica média dos sete locos gênicos, verificamos que Quatro Barras foi a população com maior diversidade ($n = 1,404$), seguida por Jaguariaíva ($n = 1,360$). Estas populações pertencem a zonas de transição entre a Floresta Ombrófila Densa e a Floresta Ombrófila Mista e entre Floresta Ombrófila Mista e o Cerrado, respectivamente. A maior variabilidade genética ocorre devido à necessidade de adaptação a diferentes ecossistemas, sendo que indivíduos com maior variabilidade, possuem maior capacidade adaptativa. A população de Campos do Jordão foi a que obteve menor diversidade alélica ($n = 1,137$), provavelmente por encontrar-se isolada, estando mais sujeita aos efeitos da deriva genética e/ou de seleção e reduzido fluxo gênico.

TABELA 14. Diversidade alélica (n) de populações naturais de *I. paraguariensis*

Origem	Loco gênico							Média
	<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>	
Barão de Cotegipe	1,064	3,344	1,110	1,000	1,268	1,368	1,615	1,326
Três Barras	1,225	2,221	1,000	1,000	1,744	1,324	1,664	1,347
Quatro Barras	1,071	3,754	1,293	1,224	1,559	1,153	1,459	1,404
Jaguariaíva	1,259	2,521	1,319	1,130	1,105	1,173	1,800	1,360
Caarapó	1,000	1,476	1,229	1,000	1,196	1,041	1,546	1,180
Campos do Jordão	1,000	2,684	1,000	1,000	1,128	1,000	1,112	1,137
Média	1,103	2,667	1,159	1,059	1,333	1,177	1,533	1,292

3.3. Variação genética dentro de populações

Dos 20 locos analisados, 13 foram polimórficos no critério de 95%: *GOT-A* (2 alelos), *GOT-B* (2 alelos), *GOT-C* (2 alelos), *PGI-A* (2 alelos), *PGI-B* (5 alelos), *MR-A* (2 alelos), *G-6PDH-A* (2 alelos), *MDH-A* (2 alelos), *MDH-B* (2 alelos), *NDH-A* (2 alelos), *NDH-B* (2 alelos), *6-PGDH-A* (2 alelos) e *6-PGDH-B* (2 alelos). Sete locos foram monomórficos, com um alelo cada (*PGM-A*, *ADH-A*, *GDH-A*, *GDH-B*, *IDH-A*, *MDH-C* e *SKDH-A*).

Os locos *GOT-B*, *GOT-C*, *PGI-A*, *MR-A*, *MDH-A* e *MDH-B* geraram zimogramas de difícil interpretação, devido à baixa resolução e/ou sobreposição de locos. Por esse motivo, não foram incluídos nas estimativas das medidas de variabilidade, sendo apenas relevantes para o cálculo da percentagem de locos polimórficos (*PPL*), número de alelos por loco (*A/L*) e número de alelos por loco polimórfico (*AP*).

Diversos estudos visando caracterizar geneticamente espécies arbóreas foram desenvolvidos, empregando marcadores isoenzimáticos. Entretanto, para erva-mate cabe destacar o trabalho realizado por PALMA-SILVA; WOLLHEIM; WINGE (2000), onde populações naturais foram analisadas utilizando somente os sistemas alfa e beta esterases. Por esse motivo, os resultados também serão comparados aos obtidos para outras arbóreas. As medidas de variação genéticas nas populações de erva-mate estão descritas na Tabela 15.

TABELA 15. Medidas de variabilidade genética nas populações naturais de *I. paraguariensis*

População	N	A/L	PPL	v	v_{gam}	H_o	H_e
Barão de Cotegipe	50	1,75	60	1,326	11,059	0,172	0,248
Três Barras	50	1,65	55	1,347	10,460	0,188	0,263
Quatro Barras	50	1,80	65	1,404	16,691	0,191	0,291
Jaguariaíva	50	1,80	65	1,360	11,026	0,216	0,267
Caarapó	50	1,60	55	1,180	3,494	0,110	0,149
Campos do Jordão	50	1,50	45	1,137	3,367	0,102	0,108

O loco é considerado polimórfico se a frequência do alelo mais comum não exceder 0,95.

Ao nível de espécie, 65% dos locos analisados foram polimórficos, com média de 1,80 alelos por loco e 2,23 alelos por loco polimórfico (em relação aos 20 locos). As populações de Quatro Barras e Jaguariaíva apresentaram superioridade em

relação ao número de locos polimórficos ($PPL = 65\%$) e número de alelos por loco ($A/L = 1,80$), enquanto Campos do Jordão foi a população que mostrou os valores inferiores ($PPL = 45\%$ e $A/L = 1,50$). A heterozigosidade média observada (H_o), para todas as populações, foi de 0,163, com valores variando de 0,102 a 0,216, nas populações de Campos do Jordão e Jaguariaíva, respectivamente. A heterozigosidade média esperada (H_e) foi de 0,221, variando de 0,108 a 0,291, nas populações de Campos do Jordão e Quatro Barras, respectivamente. Observou-se que a heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,221$) foi superior a observada ($H_o = 0,163$), considerando-se os sete locos gênicos, indicando um excesso de homozigotos. A endogamia pode ser causada por autofecundação ou cruzamento entre indivíduos aparentados, sendo a erva-mate uma espécie dióica, a primeira possibilidade é descartada.

No trabalho de PALMA-SILVA; WOLLHEIM; WINGE (2000), 100% dos locos analisados foram polimórficos (três locos), com número médio de alelos por loco de 3,79 e heterozigosidade média observada de 0,51. A heterozigosidade média esperada não foi estimada. Os valores superiores obtidos no referido trabalho são decorrentes dos sistemas enzimáticos empregados para revelar variabilidade, alfa e beta esterases, conhecidos por seu alto polimorfismo e inconsistência, além da utilização de somente locos polimórficos no cálculo dos parâmetros de multiplicidade.

Diversos estudos desenvolvidos com espécies arbóreas demonstraram grande variação nas medidas de diversidade. SEOANE; KAGEYAMA SEBBENN (2000) encontraram em *Esenbeckia leiocarpa*, 36,36% de locos polimórficos, com número médio de alelos por locos de 1,68, heterozigosidade média observada de 0,177 e esperada de 0,174; SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN (2004) em *Chorisia speciosa*, obtiveram 75% de locos polimórficos, número médio de alelos por locos de 2,38, heterozigosidade média observada de 0,252 e esperada de 0,344; SEBBENN et al. (2000b) em *Tabebuia cassinoides*, verificaram 84,6% de locos polimórficos, número médio de alelos por locos de 2,5, heterozigosidade média observada de 0,252 e esperada de 0,344.

No presente estudo, os resultados indicaram que as populações da região Sul apresentaram superioridade nos diversos parâmetros analisados e os valores não foram tão discrepantes entre essas populações. Quatro Barras e Jaguariaíva

apresentaram os maiores índices de multiplicidade genética ($PPL = 65\%$ e $A/L = 1,80$), diversidade alélica e gamética ($v = 1,404$ e $v_{gam} = 16,691$; $v = 1,360$ e $v_{gam} = 11,026$, para Quatro Barras e Jaguariaíva, respectivamente) e heterozigidade esperada e observada ($H_e = 0,291$ e $H_o = 0,191$; $H_e = 0,267$ e $H_o = 0,216$, para Quatro Barras e Jaguariaíva, respectivamente). Cabe ressaltar, que essas populações encontram-se em zonas de transição, devendo a sua maior variabilidade estar associada à necessidade de adaptação aos diferentes biomas, conferindo maior plasticidade à população. Com valores próximos, encontra-se a população de Três Barras ($PPL = 55\%$; $A/L = 1,65$; $v = 1,347$ e $v_{gam} = 10,460$; $H_e = 0,263$ e $H_o = 0,188$). Barão de Cotegipe apresentou valores intermediários em todos os parâmetros analisados ($PPL = 60\%$; $A/L = 1,75$; $v = 1,326$ e $v_{gam} = 11,059$; $H_e = 0,248$ e $H_o = 0,172$).

As populações do Centro-oeste (Caarapó) e Sudeste (Campos do Jordão) apresentaram os menores valores para todos os parâmetros analisados ($PPL = 55\%$ e 45% ; $A/L = 1,60$ e $1,50$; $v = 1,180$ e $1,137$; $v_{gam} = 3,494$ e $3,367$; $H_e = 0,149$ e $0,108$, $H_o = 0,110$ e $0,102$, para Caarapó e Campos do Jordão, respectivamente). Esses resultados podem ser explicados como consequência do isolamento destas populações, provocado pela fragmentação das florestas, ocasionando a deriva genética e reduzindo o fluxo gênico, causando a perda da diversidade.

3.4. Diferenciação genética entre populações

A diferenciação genética entre as seis populações naturais, com base nas estatísticas-F (WRIGHT, 1965), está descrita na Tabela 16.

Os valores estimados de F_{ST} para as populações estudadas indicaram pouca diferenciação genética entre as populações, variando de 0,22% (Caarapó) a 3,03% (Jaguariaíva). Em *Araucaria angustifolia*, os valores de F_{ST} entre as populações também foram considerados baixos, variando de 0,42% a 4,78%, nas populações de Campos do Jordão e Caçador, respectivamente (SOUSA; ROBINSON; HATTEMER, 2003). A diferenciação genética entre as populações de *I. paraguariensis* foi de 12,86% ($F_{ST} = 0,1286$). Portanto, a maior variabilidade genética encontra-se dentro de população (87,14%). Segundo sugestão de WRIGHT (1978) para interpretação

do índice F_{ST} , o valor obtido classifica-se como diferenciação genética moderada entre populações.

Maior diversidade genética dentro de populações, do que entre populações, tem sido observada nas pesquisas conduzidas com marcadores isoenzimáticos em espécies arbóreas, como: *Tabebuia cassinoides*, na qual a diferenciação genética entre as populações foi de 3,1% (SEBBENN et al., 2000b); em *Esenbeckia leiocarpa* foi de 12,1% (SEOANE; KAGEYAMA; SEBBENN, 2000); em *Chorisia speciosa* foi de 27,3% (SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN, 2004) e em *Copaifera langsdorffii* foi de 17,5% (PINTO; SOUZA; CARVALHO, 2004).

Estudos realizados com outros tipos de marcadores genéticos, em erva-mate, concordam com os resultados obtidos neste trabalho. GAUER; CAVALLI-MOLINA (2000), utilizando marcadores RAPD, revelaram que 85% da variabilidade genética encontra-se dentro das populações e 15% entre populações, CANSIAN et al. (2003a), empregando a mesma técnica, obtiveram o índice de similaridade de Jaccard entre populações de 0,908. GREGIANINI; WINGE (2000), analisando proteínas de reserva de sementes, verificaram variabilidade intrapopulacional de 85%, sendo a diversidade entre populações de 15%.

O índice F_{IS} confirma o excesso de homozigotos ($F_{IS} = 0,254$), ou seja, a endogamia na espécie, indicando ausência de panmixia.

TABELA 16. Estatísticas-F para os sete locos polimórficos nas populações naturais de *I. paraguariensis*, para machos e fêmeas

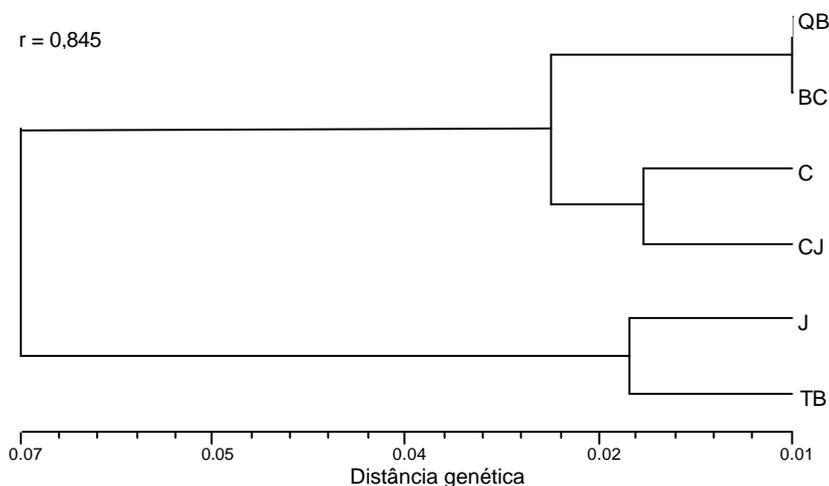
População	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
Barão de Cotegipe	0,2911	0,0109	0,2989
Três Barras	0,2561	0,0292	0,2778
Quatro Barras	0,3153	0,0303	0,3360
Jaguariaíva	0,1537	0,0307	0,1797
Caarapó	0,2556	0,0022	0,2572
Campos do Jordão	0,0311	0,0155	0,0462
Média	0,2540	0,1286	0,3499

As distâncias genéticas entre as populações foram estimadas através das equações D (NEI, 1978) e d_0 (GREGORIUS, 1974). Ambas estimativas apresentaram o mesmo padrão de agrupamento, representado através do dendrograma de NEI (1978) (Figura 14). Observa-se a formação de dois grupos. No primeiro, agruparam-se Quatro Barras com Barão de Cotegipe e Caarapó com

Campos do Jordão, no segundo, Jaguariaíva com Três Barras. Embora o dendrograma indique as populações geneticamente mais divergentes (Jaguariaíva e Três Barras), pode-se constatar, através da restrita escala de valores (0,01 a 0,07), que a amplitude dessa variação é bastante reduzida.

As medidas de variabilidade genética (Tabela 15), embora com valores muito próximos às demais populações, indicaram que Quatro Barras e Jaguariaíva apresentaram maior diversidade, levando a supor que essas populações seriam mais semelhantes e se agrupariam no dendrograma, porém, isso não ocorreu. Entretanto, devemos ressaltar que para o cálculo da distância genética, considera-se a frequência dos alelos na população. Podemos observar nos resultados de estrutura genética (Tabela 13), que as distribuições das frequências alélicas nos locos *PGI-B* e *G-6-PDH-A* foram semelhantes entre Jaguariaíva e Três Barras, principalmente no loco *G-6-PDH-A*, onde somente as duas populações tiveram o alelo A_7 em maior frequência. Com relação a Quatro Barras e Barão de Cotegipe, essas populações apresentaram superioridade na frequência do alelo A_5 do loco *PGI-B*, quando comparado as demais populações. Os locos *PGI-B* e *G-6-PDH-A* apresentaram as maiores estimativas de diferenciação alélica (Tabela 17), ou seja, são os locos que mais contribuíram na diferenciação genética das populações. Esses resultados podem justificar o agrupamento observado no dendrograma.

FIGURA 14. Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de NEI (1978), para as populações de Barão de Cotegipe (BC), Três Barras (TB), Quatro Barras (QB), Jaguariaíva (J), Caarapó (C) e Campos do Jordão (CJ)



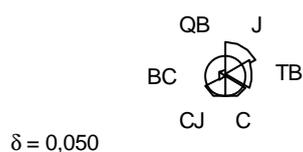
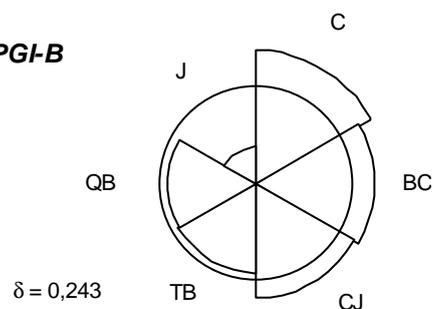
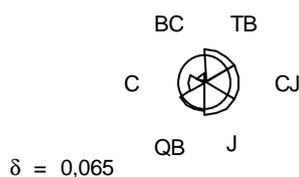
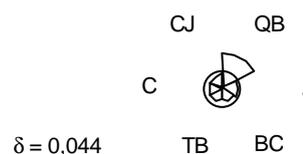
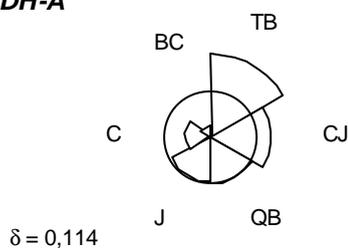
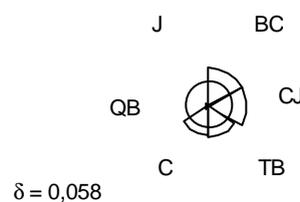
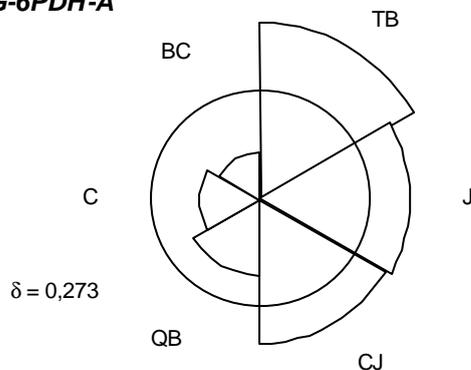
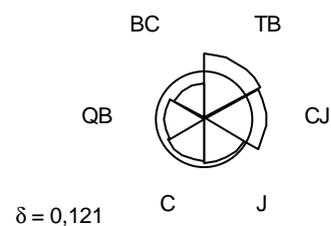
A diferenciação alélica (D_j) nos locos estudados, para cada uma das populações, é apresentada na Tabela 17. Os locos com maiores médias de diferenciação alélica, ou seja, maiores polimorfismos, foram *G-6PDH-A* ($\delta = 0,273$), seguido de *PGI-B* ($\delta = 0,243$) e o com menor média foi o *NDH-B* ($\delta = 0,044$). A população que apresentou maior diferenciação foi Três Barras ($D_j = 0,162$). Por outro lado, Barão de Cotegipe mostrou a menor valor, $D_j = 0,088$, indicando que esta população compartilha 91,2% dos seus elementos genéticos com as demais populações, sendo a população, dentre as analisadas, a que melhor representa a espécie. A diferenciação da espécie (δ), considerando-se as populações estudadas, foi de 0,121, valor semelhante ao F_{ST} ($F_{ST} = 0,1286$).

TABELA 17. Diferenciação alélica (D_j), diferenciação alélica média (δ) (GREGORIUS; ROBERDS, 1986) nas populações naturais de *I. paraguariensis*

Loco	D_j						δ
	Barão de Cotegipe	Três Barras	Quatro Barras	Jaguariaíva	Caarapó	Campos do Jordão	
<i>GOT-A</i>	0,019	0,066	0,016	0,083	0,057	0,057	0,050
<i>PGI-B</i>	0,301	0,224	0,221	0,092	0,334	0,287	0,243
<i>NDH-A</i>	0,023	0,085	0,071	0,083	0,040	0,085	0,065
<i>NDH-B</i>	0,033	0,033	0,090	0,041	0,033	0,033	0,044
<i>6-PGDH-A</i>	0,029	0,208	0,118	0,113	0,065	0,151	0,114
<i>6-PGDH-B</i>	0,097	0,077	0,009	0,001	0,071	0,095	0,058
<i>G-6PDH-A</i>	0,118	0,444	0,190	0,375	0,150	0,361	0,273
Média	0,088	0,162	0,102	0,112	0,107	0,153	0,121

A diferenciação de cada população, nos sete locos gênicos e no conjunto de todos os locos, está representada graficamente na Figura 15. No diagrama em caracol, as populações são representadas por setores e os comprimentos dos raios indicam os valores D_j e o raio do círculo corresponde ao δ .

FIGURA 15. Diferenciação alélica (D_j) entre as populações naturais de *I. paraguariensis* representadas pelos diagramas em caracol. Os comprimentos dos raios indicam D_j e o raio do círculo é igual a δ . As populações são denominadas por (BC) Barão de Cotegipe, (TB) Três Barras, (QB) Quatro Barras, (J) Jaguariaíva, (C) Caarapó e (CJ) Campos do Jordão

GOT-A**PGI-B****NDH-A****NDH-B****6-PGDH-A****6-PGDH-B****G-6PDH-A****CONJUNTO**

3.5. Diferenciação genética entre os sexos em *I. paraguariensis*

As freqüências alélicas dos sete locos analisados, nas seis populações, subdivididas em fêmeas e machos, são apresentadas na Tabela 18.

Os indivíduos femininos e masculinos apresentaram semelhantes distribuições das freqüências alélicas, na maioria das populações. Não foi constatada a presença de um alelo exclusivo em nenhum tipo sexual (fêmea ou macho), ou seja, no conjunto gênico analisado, não existe um marcador de sexo. Segundo a literatura, o loco *G-6PDH* encontra-se relacionado à expressão sexual em diversas plantas dióicas (SCHNABEL; HAMRICK, 1990). Esses autores encontraram ligação desse loco com a determinação do sexo em *Gleditsia triacanthos*. SOUSA; ROBINSON; HATTEMER (2003), verificaram diferenças significativas nas freqüências alélicas do loco *G-6PDH* entre os gametas femininos e masculinos em *Araucaria angustifolia*, indicando existir relação com o tipo sexual, mas também não encontrou um alelo exclusivo para sexo específico.

TABELA 18. Estruturas alélicas em populações naturais de *I. paraguariensis*, subdivididas em fêmeas (F) e machos (M), referentes a sete locos polimórficos

Loco gênico	Alelo	Barão de Cotejipe		Três Barras		Quatro Barras		Jaguariaíva		Caarapó		Campos do Jordão	
		F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
<i>GOT-A</i>	1	0,940	1,000	0,848	0,952	0,935	1,000	0,850	0,913	1,000	1,000	1,000	1,000
	2	0,060	0,000	0,152	0,048	0,065	0,000	0,150	0,087	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>PGI-B</i>	1	0,340	0,220	0,260	0,229	0,260	0,320	0,217	0,220	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,320	0,380	0,580	0,646	0,340	0,400	0,478	0,640	0,813	0,810	0,560	0,405
	3	0,280	0,340	0,040	0,000	0,220	0,140	0,261	0,100	0,125	0,119	0,240	0,357
	4	0,020	0,020	0,120	0,125	0,100	0,040	0,022	0,040	0,063	0,071	0,200	0,238
	5	0,040	0,040	0,000	0,000	0,080	0,100	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>NDH-A</i>	1	0,040	0,065	0,000	0,000	0,136	0,125	0,059	0,233	0,104	0,104	0,000	0,000
	2	0,960	0,935	1,000	1,000	0,864	0,875	0,941	0,767	0,896	0,896	1,000	1,000
<i>NDH-B</i>	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,080	0,040	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	1,000	1,000	1,000	1,000	0,875	0,920	0,960	0,917	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>6-PGDH-A</i>	1	0,140	0,100	0,420	0,182	0,208	0,261	0,000	0,100	0,120	0,060	0,021	0,000
	2	0,860	0,900	0,580	0,818	0,792	0,739	1,000	0,900	0,880	0,940	0,979	1,000
<i>6-PGDH-B</i>	1	0,900	0,780	0,854	0,840	0,940	0,917	0,920	0,920	1,000	0,980	1,000	1,000
	2	0,100	0,220	0,146	0,160	0,060	0,083	0,080	0,080	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>G-6PDH-A</i>	1	0,292	0,211	0,630	0,818	0,364	0,042	0,568	0,771	0,229	0,208	0,080	0,023
	2	0,708	0,789	0,370	0,182	0,636	0,958	0,432	0,229	0,771	0,792	0,920	0,977

As medidas de variação genética indicaram leve superioridade nas fêmeas em diversos parâmetros analisados (Tabela 19). Com relação à percentagem de locos polimórficos, os machos superaram as fêmeas somente nas populações de Jaguariaíva e Caarapó. O número médio de alelos por loco nas fêmeas foi de 1,67, com valores variando de 1,50 (Campos do Jordão) a 1,80 (Quatro Barras), e nos machos de 1,64, variando de 1,45 (Campos do Jordão) a 1,75 (Quatro Barras e Jaguariaíva). As fêmeas apresentaram maior diversidade alélica e gamética, com exceção de Jaguariaíva, onde os machos tiveram maior diversidade alélica. A heterozigosidade média observada (H_o) nas fêmeas foi de 0,169, com valores variando de 0,109 (Campos do Jordão) a 0,219 (Três Barras) e nos machos de 0,158, variando entre 0,095 (Campos do Jordão) a 0,247 (Jaguariaíva). A heterozigosidade média esperada (H_e) para as fêmeas foi de 0,233, variando de 0,113 (Campos do Jordão) a 0,326 (Quatro Barras) e para os machos de 0,204, variando de 0,102 (Campos do Jordão) a 0,275 (Jaguariaíva). Constatou-se que a heterozigosidade média esperada foi superior a observada, tanto nas fêmeas como nos machos, indicando excesso de homozigotos em ambos os sexos.

A maior diversidade observada nas fêmeas, em diversos parâmetros, poderia ser explicada pelo esforço reprodutivo, causando a morte prematura das árvores com menor vigor e capacidade adaptativa.

TABELA 19. Medidas de variabilidade genética nas populações naturais de *I. paraguariensis*, subdivididas em fêmeas (F) e machos (M)

População		N	A/L	PPL	n	v_{gam}	H_o	H_e
Barão de	F	25	1,75	60	1,327	11,200	0,166	0,252
Cotegipe	M	25	1,70	55	1,313	10,204	0,179	0,243
Três Barras	F	25	1,65	55	1,411	15,606	0,219	0,298
	M	25	1,60	55	1,259	6,049	0,153	0,215
Quatro Barras	F	25	1,80	65	1,469	24,075	0,206	0,326
	M	25	1,75	60	1,318	10,674	0,176	0,247
Jaguariaíva	F	25	1,75	60	1,350	12,362	0,188	0,254
	M	25	1,75	65	1,367	10,288	0,247	0,275
Caarapó	F	25	1,55	50	1,189	3,691	0,124	0,156
	M	25	1,60	55	1,165	3,190	0,096	0,145
Campos do Jordão	F	25	1,50	45	1,157	3,634	0,109	0,113
	M	25	1,45	40	1,110	3,007	0,095	0,102

O loco é considerado polimórfico se a freqüência do alelo mais comum não exceder 0,95.

As matrizes de distâncias genéticas de NEI (1978) e GREGORIUS (1974) geraram diferentes agrupamentos, representados através dos dendrogramas

(Figuras 16 e 17). Entretanto, observando-se o coeficiente de correlação (r), verifica-se que o dendrograma obtido a partir da matriz de distâncias de GREGORIUS (1974), possui maior confiabilidade ($r = 0,830$) que o de NEI (1978) ($r = 0,754$). Além disso, o dendrograma de Gregorius apresentou o mesmo padrão observado quando analisaram-se fêmeas e machos, conjuntamente.

FIGURA 16. Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de NEI (1978), para as populações de Barão de Cotegipe (BC), Três Barras (TB), Quatro Barras (QB), Jaguariaíva (J), Caarapó (C) e Campos do Jordão (CJ), subdivididas em fêmeas (F) e machos (M)

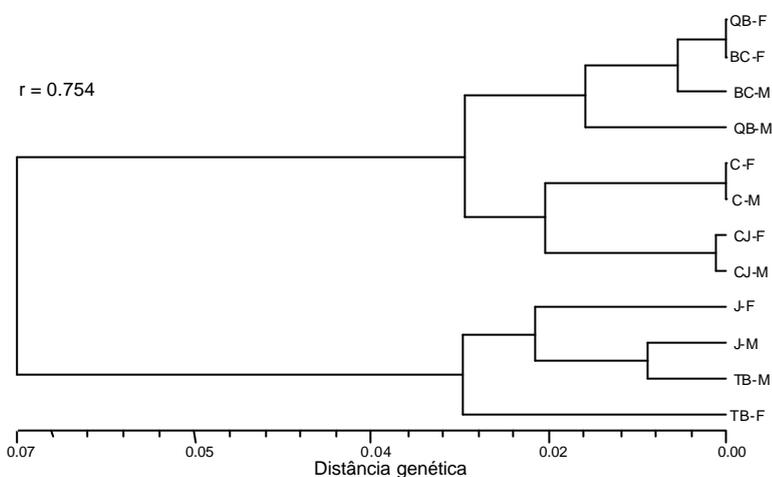
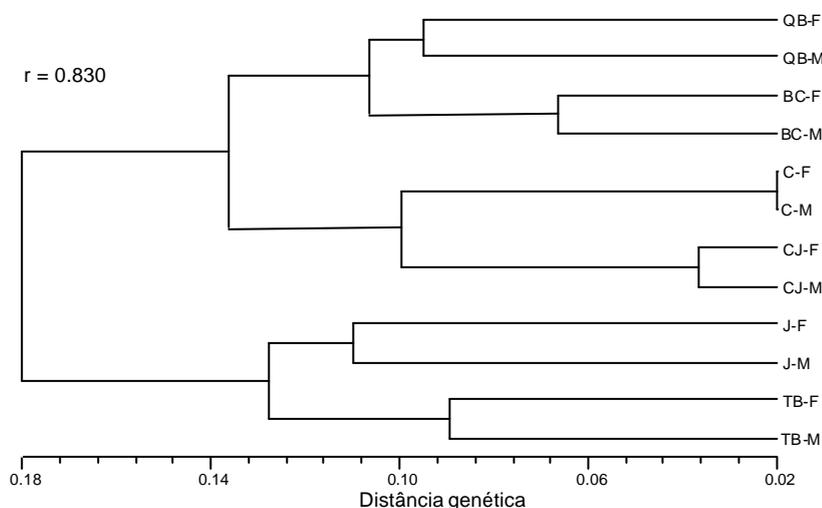


FIGURA 17. Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de GREGORIUS (1974), para as populações de Barão de Cotegipe (BC), Três Barras (TB), Quatro Barras (QB), Jaguariaíva (J), Caarapó (C) e Campos do Jordão (CJ), subdivididas em fêmeas (F) e machos (M)



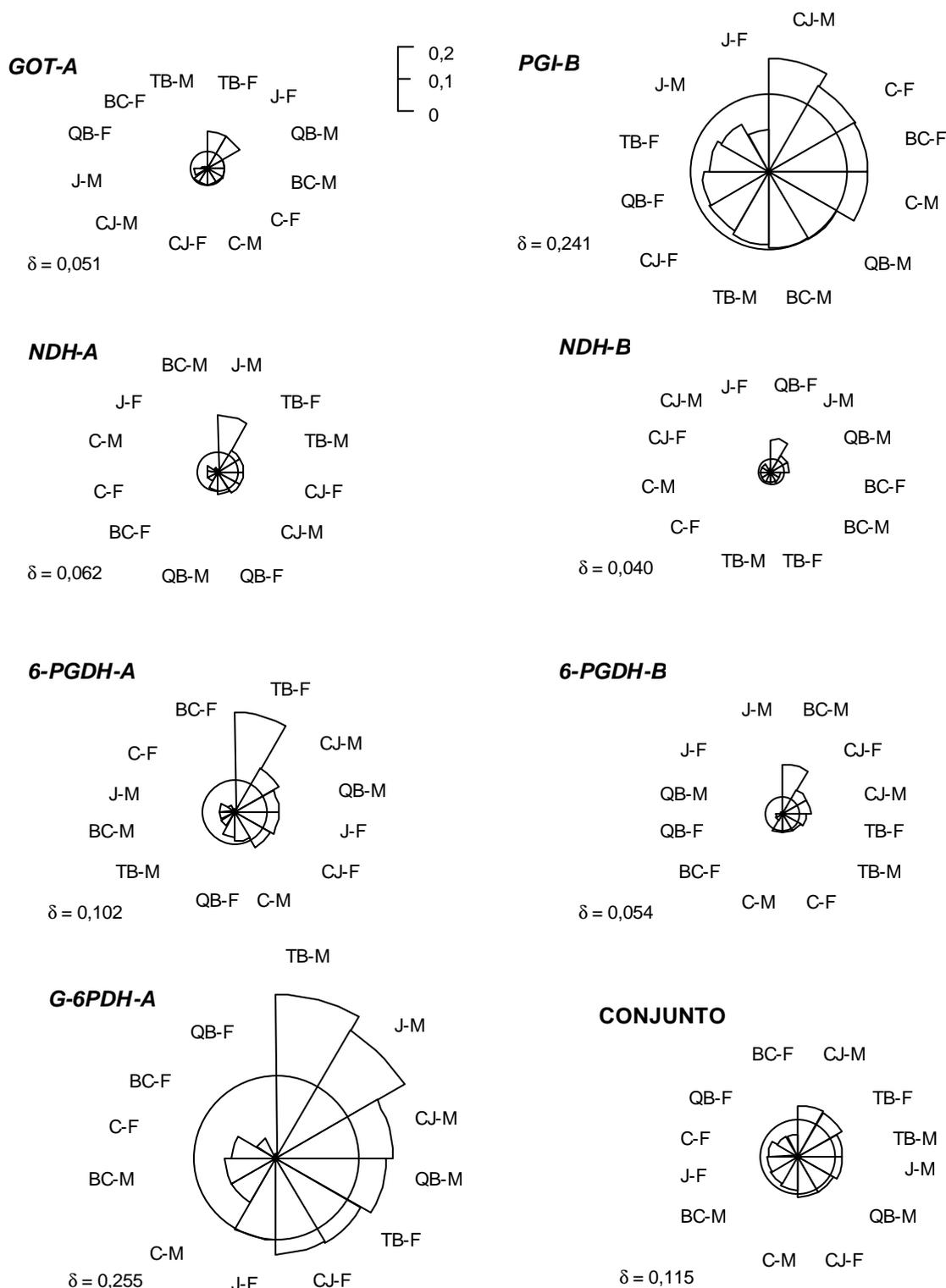
Os resultados de diferenciação alélica (D_j), foram semelhantes aos obtidos na análise anterior, onde não foi feita a subdivisão entre fêmeas e machos (Tabela 20). Os locos com maiores médias de diferenciação foram *G-6PDH-A* ($\delta = 0,255$) e *PGI-B* ($\delta = 0,241$) e com menor média o *NDH-B* ($\delta = 0,040$). Entretanto, a subpopulação que apresentou maior diferenciação foi Campos do Jordão - machos ($D_j = 0,159$), seguida de Três Barras - fêmeas ($D_j = 0,156$). As fêmeas de Barão de Cotegipe mostraram o menor valor médio de $D_j = 0,069$. A diferenciação da espécie (δ), considerando-se as subpopulações estudadas, foi de 0,115, levemente inferior ao valor obtido sem a subdivisão de fêmeas e machos ($\delta = 0,121$). A diferenciação de cada subpopulação, nos sete locos gênicos e no conjunto de todos os locos, pode ser melhor visualizada através do diagrama em caracol (Figura 18).

TABELA 20. Diferenciação alélica (D_j), diferenciação alélica média (δ) (GREGORIUS; ROBERDS, 1986) nas populações naturais de *I. paraguariensis*, subdivididas em fêmeas (F) e machos (M)

Loco	D_j												δ
	BC		TB		QB		J		C		CJ		
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	
GOT-A	0,014	0,051	0,115	0,001	0,020	0,051	0,113	0,044	0,051	0,051	0,051	0,051	0,051
<i>PGI-B</i>	0,305	0,239	0,184	0,228	0,208	0,245	0,132	0,171	0,307	0,304	0,213	0,351	0,241
<i>NDH-A</i>	0,035	0,008	0,079	0,079	0,070	0,058	0,015	0,176	0,035	0,035	0,079	0,079	0,062
<i>NDH-B</i>	0,030	0,030	0,030	0,030	0,107	0,057	0,014	0,061	0,030	0,030	0,030	0,030	0,040
<i>6-PGDH-A</i>	0,009	0,048	0,310	0,050	0,079	0,136	0,136	0,048	0,026	0,092	0,126	0,157	0,102
<i>6-PGDH-B</i>	0,023	0,154	0,073	0,066	0,021	0,005	0,001	0,001	0,064	0,064	0,086	0,086	0,054
<i>G-6PDH-A</i>	0,069	0,157	0,305	0,510	0,014	0,341	0,254	0,458	0,137	0,159	0,299	0,362	0,255
Média	0,069	0,098	0,156	0,138	0,074	0,128	0,095	0,137	0,093	0,105	0,126	0,159	0,115

Barão de Cotegipe (BC), Três Barras (TB), Quatro Barras (QB), Jaguariaíva (J), Caarapó (C) e Campos do Jordão (CJ).

FIGURA 18. Diferenciação alélica (D_j) entre as populações naturais de *I. paraguariensis* representadas pelos diagramas em caracol. Os comprimentos dos raios indicam D_j e o raio do círculo é igual a δ . As populações são denominadas por (BC) Barão de Cotegipe, (TB) Três Barras, (QB) Quatro Barras, (J) Jaguariaíva, (C) Caarapó e (CJ) Campos do Jordão. (F) fêmeas e (M) machos



Os resultados obtidos através de diferentes análises, permitiram constatar que, mesmo sendo a erva-mate uma espécie dióica, com ampla área de ocorrência natural, sua base genética é relativamente estreita. Além disso, existe endogamia, há indício de deriva genética e reduzido fluxo gênico, principalmente nas populações localizadas no Sudeste e Centro-oeste do Brasil. Essas informações, associadas à exploração contínua dos ervais nativos e à fragmentação das florestas, coloca *I. paraguariensis* como uma espécie com alto potencial de erosão genética e risco de extinção. Estratégias de conservação genética devem considerar a estrutura e a diversidade genética da espécie. Como em erva-mate verificou-se que a maior variabilidade encontra-se dentro das populações, recomenda-se conservar fragmentos maiores para a manutenção da variabilidade genética intrapopulacional. Contudo, como a diferenciação entre populações foi razoável (maior que 10%) é importante conservar um certo número de populações. Uma estratégia poderia ser conservar populações grandes, distribuídas em toda a área de ocorrência de *I. paraguariensis*, dando atenção especial a populações limítrofes, com variabilidade notável e localizadas em ambientes extremos.

4. CONCLUSÕES

1. As populações do Sul apresentaram maior diversidade alélica e superioridade nos diversos parâmetros analisados, que as do Centro-oeste e Sudeste do Brasil;
2. Quatro Barras e Jaguariaíva, localizadas em zonas de transição vegetacional, apresentaram os maiores índices de diversidade genética, sugerindo uma maior plasticidade da população para adaptação a distintos ambientes;
3. A população de Barão de Cotegipe-RS é a população que melhor representa a diversidade genética da espécie;
4. Oscilações nas frequências alélicas entre populações, perdas e fixação de alelos em alguns locos gênicos, indicam ocorrência de deriva genética ou seleção, decorrentes do processo de fragmentação das florestas;
5. A espécie apresenta endogamia, mesmo sendo dióica, o que sugere cruzamentos entre indivíduos aparentados;
6. As populações estudadas apresentam maior diversidade genética dentro de populações do que entre populações, sendo a variação entre populações classificada como moderada, para espécies arbóreas. Isso implica em conservar fragmentos maiores, para a manutenção da variabilidade genética intrapopulacional, e um número razoável de populações distribuídas por toda a área de ocorrência natural, para reter parte da variação existente entre populações;
7. As distâncias genéticas entre as populações analisadas foram restritas, independentemente da metodologia utilizada para o cálculo;
8. As fêmeas da população apresentaram maiores índices de diversidade que os machos, embora os valores sejam muito semelhantes;
9. Não foi possível encontrar associação entre tipo sexual e marcador isoenzimático.

5. 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. 1977.

CANSIAN R. L. **Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi-voláteis em populações nativas de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) do Brasil, visando a conservação da espécie**. São Carlos, 2003. 82 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.

CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J.; LEONTIEV-ORLOV, O. CECHET, M. L.; CARVALHO, A. Z.; ECHEVERRIGARAY, S. Diversidade genética de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) na área de distribuição da espécie no Brasil. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., 2003, Chapecó. **Anais...** [Chapecó]: EPAGRI, 2003a. 1 CD-ROM. Seção: Conservação, Melhoramento e Multiplicação. Feira do Agronegócio da Erva-mate, 1., 2003, Chapecó. Integrar para promover o agronegócio da erva-mate.

CROW, J. F.; KIMURA, M. A. **An introduction to population genetics theory**. London: Harper Row, 1970. 591 p.

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: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA MATE. 3. 2000, Encantado/RS. **Anais...** Porto Alegre: Edição dos Organizadores, 2000. p. 373-380.

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. Measurement of genetic differentiation in plant populations. In: GREGORIUS, H. R. (Ed.) **Populations Genetic in Forestry**. Springer-Verlag, berlin, Heidelberg, New York, Tokio, 1984, p. 276-285.

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, p. 397-401, 1987.

GREGORIUS, H. R.; ROBERDS, J. H. Measurement of genetical differentiation among subpopulations. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 71, p. 826-834, 1986.

IPGRI-FAO. Recommendations of the European Forest Genetic Resources Workshop, 21.,1995, Sopron, Hungary. In: IPGRI/FAO.1996. **International Technical Conference on Plant Genetic Resources. Preparatory Process for Europe**. IPGRI/FAO, Rome, Italy. 1996.

LIENGSIRI, C.; PIEWLUANG, C.; BOYLE, T. J. B. Starch gel eletrophoresis of tropical trees. **A Manual**. The ASEAN- Canada Forest Tree Seed Centre, Saraburi, 51 p., 1990.

MACCARI JUNIOR, A. **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. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.

NEI, M. Molecular population genetics and evolution In: NEUBERGER, A.; TATUM, E. L. (Ed.) **Frontiers of Biology**, v. 40. New York: American Elsevier, 1975.

NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottlenek effect and genetic variability in populations. **Evolution**, v. 29, p. 1-10, 1975.

OLIVEIRA, Y. M. M. de; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10: Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 1983, Curitiba. **Anais...**Curitiba: EMBRAPA-CNPFF, 1985. p.17-36. (EMBRAPA-CNPFF. Documentos, 15).

PALMA-SILVA, C.; WOLLHEIM, C.; WINGE, H. Variabilidade isoenzimática intra e interpopulacional em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA MATE. 3. 2000, Encantado/RS. **Anais...** Porto Alegre: Edição dos Organizadores, 2000. p. 381-385.

PINTO, S. I. C.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. Genetic variability by isozymes in populations of *Copaifera lansdorffii* desf. In two fragments of ripain forest. **Scientia Forestalis**, n. 65, p. 40-48, 2004.

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

SCHNABEL, A.; HAMRICK, J. L. Nonrandom associations between sex and 6-phosphogluconate dehydrogenase isozyme genotypes in *Gleditsia triacanthos* L. **The Journal of Heredity**, v. 81, p. 230-233, 1990.

SEBBENN, A. M.; SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Effects of the management on the genetic structure of caixeta (*Tabebuia cassinoides*) populations. **Scientia Forestalis**, n. 58, p. 127-143, 2000b.

SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Forest fragmentation effects in population genetic structure of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Forestalis**, n. 57, p. 123-139, 2000.

SOUSA, V. A.; ROBINSON, I. P.; HATTEMER, H. H. Variation and population structure at enzyme gene loci in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvae Genetica**, v. 53, n. 1, p. 12-19, 2003b.

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Genetic structure in fragmented populations *Chorisia speciosa* St. Hil. **Scientia Forestalis**, n. 65, p. 70-79, 2004.

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.

WINGE, H.; WOLLHEIM, C.; CAVALLI-MOLINA, S.; ASSMANN M.; BASSANI, K. L. B.; AMARAL, M. B.; COELHO, G. C.; FREITAS-SACCHET, A. M. de O.; BUTZKE, A.; VALDUGA, A. T.; MARIATH, J. E. de A. Variabilidade genética em populações nativas de erva-mate e a implantação de bancos de germoplasma. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. de A.; TARASCONI, L. C. (Org.). ERVA-MATE: BIOLOGIA E CULTURA NO CONE SUL, 1995, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1995. p. 322-345.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, p. 395-420, 1965.

**CAPÍTULO IV. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Ilex paraguariensis* St. Hil.
UTILIZANDO MARCADORES RAPD**

1. INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) apresenta grande importância sócioeconômica para a região Sul do Brasil, sendo produzida sob cultivo ou por extrativismo (SIMEÃO et al., 2002).

Os ervais cultivados apresentam baixa produtividade, devido à deficiência das técnicas de cultivo e de colheita, e também à baixa qualidade genética e fisiológica das sementes utilizadas nos plantios (RESENDE; STURION; MENDES, 1995).

Os programas de melhoramento genético de erva-mate objetivam obter clones e sementes geneticamente superiores. Para isso, realizam testes de procedências e progênies em diversos locais, formando as populações bases de melhoramento da espécie (RESENDE et al., 2000). Entretanto, até o momento, a única característica avaliada é a produção de massa foliar.

O conhecimento sobre a quantidade e distribuição da variabilidade genética dos materiais utilizados nos programas de melhoramento é de extrema importância para o delineamento de estratégias ideais para maximizar o ganho genético das características de interesse.

A técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) permite determinar a variabilidade molecular. Esta técnica utiliza *primers* aleatórios para amplificar segmentos de DNA ao acaso e assim revelar o polimorfismo entre indivíduos (WILLIAMS et al., 1990; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Devido a sua simplicidade, rapidez e custo relativamente baixo, tem sido empregada em programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos da espécie.

O objetivo deste trabalho foi determinar a variabilidade genética em um teste de procedências e progênies de *I. paraguariensis*, utilizando marcadores RAPD.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e amostragem

O material analisado pertence ao teste combinado de procedências e progênes de erva-mate, instalado no município de Ivaí-PR, situado a 25° 01' S, 50° 48' W e 600 m de altitude. Essa região encontra-se, segundo Koeppen, no tipo climático Cfb (temperado úmido, com temperatura média do mês mais quente inferior a 22 °C), com temperatura média anual entre 17 e 18 °C.

Para os estudos genéticos, foram selecionadas três procedências: duas mais produtivas, Ivaí-PR e Cascavel-PR, com produtividade média de 1755,38 kg/ha e 1666,5 kg/ha, respectivamente, e uma menos produtiva, Pinhão-PR, com média de 1155,44 kg/ha, sendo a avaliação realizada aos 28 meses de idade (SIMEÃO et al., 2002). Cascavel localiza-se a 24° 57' S, 53° 27' W e 750 m de altitude, com tipo climático Cfa/Cfb (temperado úmido, com temperatura média do mês mais quente superior/inferior a 22 °C) e temperatura média de 18-19 °C. Pinhão situa-se a 25° 41' S, 51° 40' W e 1050 m de altitude, no tipo climático Cfb, com temperatura média anual de 17-18 °C. Nas três regiões, o solo predominante é o latossolo vermelho distrófico, com textura argilosa.

De cada procedência, selecionou-se sete progênes, sendo cada uma representada por quatro indivíduos. Coletaram-se as folhas jovens de 84 árvores, sendo corretamente identificadas e armazenadas em freezer a – 80 °C.

2.2. Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico utilizou-se o protocolo CTAB, descrito por DOYLE; DOYLE (1988), modificado para a erva-mate. Macerou-se 200 mg de tecido foliar, com auxílio de nitrogênio líquido. Ressuspendeu-se o material em 750 µL de tampão de extração (0,1 mol.L⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0; 0,02 mol.L⁻¹ EDTA, pH 8,0; 1,4 mol.L⁻¹ NaCl; 2% CTAB; 1% PVP e 1% mercaptoetanol) e incubou-se em banho-maria a 65 °C por 20 min. Em seguida, realizou-se a extração com 650 µL de solvente orgânico, clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), centrifugou-se a suspensão e transferiu-se o sobrenadante para novo tubo (repetindo-se esse procedimento por

quatro vezes). Adicionou-se 260 μL de isopropanol para a precipitação do DNA. A seguir, lavou-se o *pellet* com etanol 70% e, finalmente, ressuspendeu-se o mesmo em 100 μL de tampão TE (0,01 mol.L^{-1} tris-HCl, pH 8,0 e 0,001 mol.L^{-1} EDTA). Quantificou-se o DNA mediante a leitura no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm.

2.3. Amplificação do DNA e eletroforese

As reações de amplificação foram realizadas conforme WILLIAMS et al. (1990), com algumas modificações para erva-mate. O volume final da reação foi 13 μL , contendo 13 ng de DNA, tampão de reação (50 mmol.L^{-1} Tris-HCl, 50 mmol.L^{-1} KCl), 2,5 mmol.L^{-1} de MgCl_2 ; 0,4 mmol.L^{-1} de cada dNTP (A, T, C, G); 0,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de *primer*, 1 unidade de enzima, sendo 90% Taq *polimerase* recombinante e 10% Platinum Taq *polimerase* e água de milli-Q autoclavada, para completar o volume.

Utilizou-se neste estudo 15 *primers* da Operon Technologies, descritos na Tabela 21.

TABELA 21. Relação dos *primers* e suas respectivas seqüências de nucleotídeos, utilizados em *I. paraguariensis*

<i>Primers</i>	Seqüência de oligonucleotídeos (5' \rightarrow 3')
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPF-01	ACGCATCCTG
OPF-03	CCTGATCACC
OPF-05	CCGAATTCCC
OPF-14	TGCTGCAGGT
OPH -03	AGACGTCCAC
OPH-04	GGAAGTCGCC
OPH-05	AGTCGTCCCC
OPH-08	GAAACACCCC
OPH-12	ACGCGCATGT
OPH-13	GACGCCACAC
OPH-15	AATGGCGCAG
OPH-18	GAATCGGCCA
OPH-19	CTGACCAGCC

Realizou-se a amplificação no termociclador Perkin Elmer 9600 em 40 ciclos repetidos de 15 segundos a 94 $^{\circ}\text{C}$ (desnaturação), 30 segundos a 35 $^{\circ}\text{C}$ (anelamento do *primer*), 60 segundos a 72 $^{\circ}\text{C}$ (extensão pela enzima e incorporação

dos nucleotídeos). Após os 40 ciclos, acrescentou-se um passo final de extensão de 7 minutos a 72 °C.

A separação dos produtos da amplificação ocorreu por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose 1,6% em tampão TBE 1X (0,089 mol.L⁻¹ tris base; 0,089 mol.L⁻¹ ácido bórico e 5 ml de 0,5 mol.L⁻¹ EDTA), corado com brometo de etídeo. Após a corrida de 3 horas a 150 Volts, visualizou-se os géis sobre um transiluminador de luz ultravioleta e estes foram fotografados com vídeo câmara.

2.4. Análise estatística

Para a análise dos marcadores RAPD, considerou-se os fragmentos amplificados de DNA de maior intensidade e reprodutibilidade.

Foi estimada a percentagem de polimorfismo total e de cada população. A análise da variância molecular (AMOVA) foi calculada para estimar a divergência genética entre as procedências (\hat{F}_{ST}) e progênies. As matrizes de distâncias genéticas entre as procedências e progênies foram calculadas com base em NEI (1978) e os dendrogramas construídos aplicando o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetical Averages), desenvolvido por SOKAL; MICHENER (1958). A consistência dos agrupamentos foi verificada por 5000 reamostragens *bootstraps*. Todas as estimativas foram realizadas utilizando o software TFPGA (Tools for Population Genetic Analysis) versão 1.3 (MILLER, 1997).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os quinze *primers* utilizados para análise molecular de erva-mate geraram 159 marcadores, com o número de fragmentos produzidos por *primer* entre 6 (OPH-19) e 13 (OPH-05), com média de 10,6 marcadores por *primer*. Os tamanhos dos fragmentos variaram de 110 a 1830 pb.

A percentagem de locos polimórficos total foi de 70,44%, considerando os locos cuja frequência do alelo mais comum não excedeu 0,95. A procedência que apresentou maior percentagem de locos polimórficos foi Ivaí (54,08%), seguida de Pinhão (50,94%) e, por último, Cascavel (44,65%).

O número de marcadores gerados pelos *primers* utilizados neste estudo estão descritos na Tabela 22. Os *primers* que apresentaram maiores números de bandas polimórficas (dez bandas) foram OPF-03 e OPH-04 e os *primers* OPF-05 e OPH-19 foram os menos polimórficos (cinco bandas).

TABELA 22. Relação dos *primers* utilizados em *I. paraguariensis* e o polimorfismo produzido

<i>Primers</i>	Marcadores polimórficos	Marcadores monomórficos	Total marcadores
OPA-01	7	4	11
OPA-02	9	4	12
OPF-01	7	5	12
OPF-03	10	1	11
OPF-05	5	6	11
OPF-14	8	2	10
OPH -03	8	4	12
OPH-04	10	2	12
OPH-05	8	5	13
OPH-08	8	2	10
OPH-12	6	4	10
OPH-13	9	0	9
OPH-15	7	2	9
OPH-18	7	4	11
OPH-19	5	1	6
Total	114	45	159

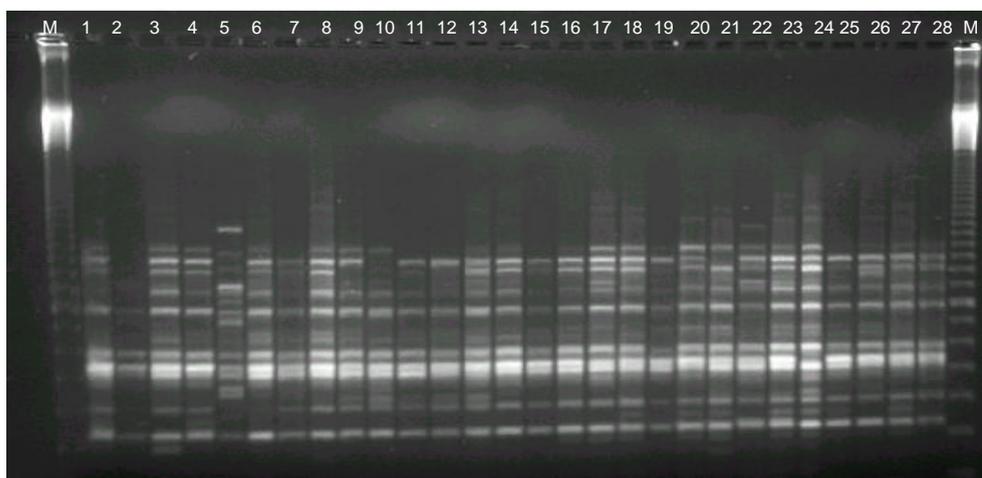
GAUER; CAVALLI-MOLINA (2000), utilizando os mesmos *primers* no estudo de populações naturais de erva-mate, selecionaram 341 marcadores e obtiveram um número médio de 22,7 fragmentos por *primer*, sendo todos os marcadores polimórficos para a espécie (100%). A divergência dos resultados nos dois trabalhos pode ser atribuída ao material alvo de estudo, às distintas condições de amplificação e ao critério de seleção na escolha dos marcadores para a análise. No presente

trabalho, selecionaram-se somente os marcadores mais estáveis. Segundo FERREIRA; GRATTAPAGLIA (1998) e HOELZEL; GREEN (1998), a técnica RAPD apresenta grande sensibilidade, sendo o perfil eletroforético (número e padrões de marcadores) influenciado pela qualidade e concentração do DNA utilizado e pelas condições de amplificação dos fragmentos.

CANSIAN (2003a), estudando 20 populações nativas de erva-mate, utilizou 24 *primers*, que geraram 291 marcadores, com média de 12,12 marcadores por *primer*. Dos 291, apenas 26,11% foram polimórficos. Segundo o autor, o baixo polimorfismo observado foi devido à utilização de *bulks* de dez plantas, que tendem a aumentar a similaridade das amostras. Porém, o mesmo autor realizou outro trabalho semelhante, sem a utilização de *bulks*, empregando 15 *primers* e também obteve polimorfismo reduzido, variando entre 24,9 e 36% nas três populações estudadas (CANSIAN, 2003).

A Figura 19 revela o padrão dos fragmentos amplificados com o *primer* OPH-12, em 28 indivíduos da procedência de Pinhão.

FIGURA 19. Produtos da amplificação por RAPD em 28 indivíduos da procedência Pinhão, usando o *primer* OPH-12. M = DNA Ladder 100 pb, 1-28 = indivíduos analisados



A análise da variância molecular (AMOVA) foi calculada para estimar a divergência genética entre as procedências (populações) e progênes (subpopulações). Constatou-se que maior variação genética encontra-se dentro das

procedências (88,28%), principalmente entre as progênies (55,53%), do que entre elas (11,72%) (Tabela 23).

TABELA 23. Análise de variância molecular (AMOVA) para procedências e progênies de *I. paraguariensis*

Origem da variação	Varição genética (%)
Entre procedências	11,72 *
Dentro de procedências	88,28
Entre progênies dentro de procedências	55,53 *
Entre indivíduos dentro de progênie	32,75

(*) $P < 0,05$

A matriz de distâncias genéticas entre as procedências permitiu a construção do dendrograma, representado na Figura 20, onde verificou-se que as procedências de Ivaí e Pinhão apresentaram maior similaridade genética, enquanto Cascavel está mais distante geneticamente. Entretanto, a distância genética entre as procedências foi pequena, conforme revela a escala de valores. Além disso, não houve relação da característica de maior produção da massa foliar com similaridade genética, pois as progênies mais produtivas, Ivaí e Cascavel, apresentaram maior divergência genética. A análise *bootstraps* apresentou baixa consistência no agrupamento (28,30%), indicando a necessidade de saturação com maior número de marcadores RAPD para aumentar a precisão dos resultados.

Como a maior parte da variação genética encontra-se dentro das procedências (88,28%), especialmente entre as progênies (55,53%), as distâncias genéticas entre as progênies também foram calculadas e os agrupamentos podem ser observados na Figura 21. Os números 1 a 7 são referentes as progênies procedentes de Ivaí, 8 a 14 de Pinhão e 15 a 21 de Cascavel. Constatou-se que, embora a análise AMOVA tenha revelado maior variação entre as progênies dentro das procedências, a distância genética entre as mesmas é bastante restrita e que existe uma tendência das progênies pertencentes à mesma procedência se agruparem, com exceção da número 7, que embora pertença a Ivaí, ficou mais próxima ao grupo de Pinhão. Os *bootstraps* dos agrupamentos formados no dendrograma, em geral, também apresentaram baixos valores, sugerindo a necessidade de empregar um maior número de marcadores genéticos.

Os marcadores RAPD mostraram-se eficientes para caracterizar as diferentes procedências e também as progênes de cada procedência. Entretanto, um maior número de marcadores deveriam ser empregados para a aumentar a consistência dos agrupamentos. É importante ressaltar que esse procedimento não implica na alteração dos agrupamentos, mas pode melhorar a confiabilidade dos nós do dendrograma.

FIGURA 20. Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de NEI (1978), entre as procedências Ivaí, Pinhão e Cascavel, de *I. paraguariensis*

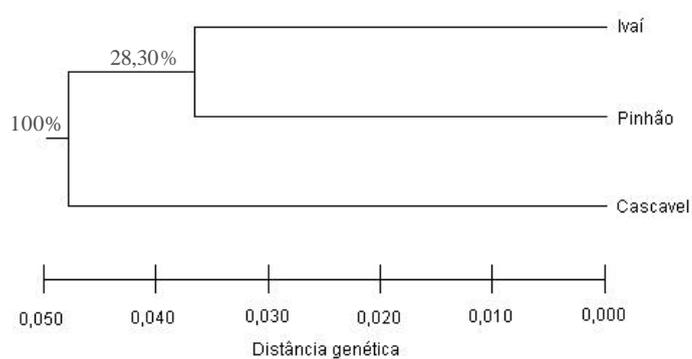
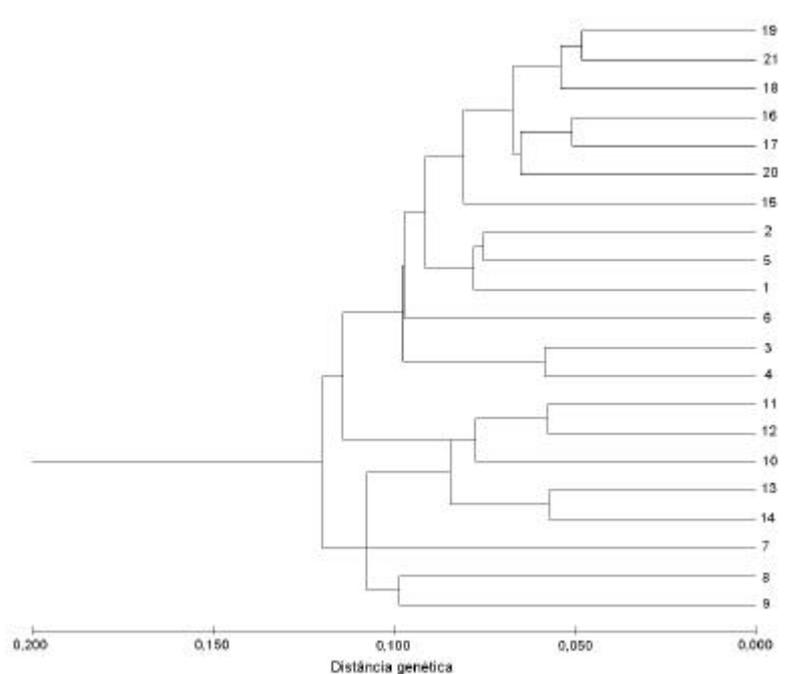


FIGURA 21. Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de NEI (1978), entre as progênes das procedências Ivaí (1 a 7), Pinhão (8 a 14) e Cascavel (15 a 21), de *I. paraguariensis*



Os resultados obtidos nesse trabalho concordaram com diversos estudos realizados em espécies arbóreas, utilizando marcadores RAPD, que relataram que a maior diversidade genética encontra-se dentro de populações. Em *Coffea arabica*, verificou-se 61,5% da diversidade dentro de populações (SILVEIRA et al., 2003); em *Plathymenia reticulata* este índice foi de 87,7% (LACERDA et al., 2001); em *Cynara scolymus* foi de 71,8% (LANTERI et al., 2001) e em *Trichilia pallida* foi de 87,5% (ZIMBACK et al., 2004).

Alguns estudos foram desenvolvidos com *I. paraguariensis*: GAUER; CAVALLI-MOLINA (2000), estudando populações naturais, verificaram 85% da variabilidade genética dentro das populações e 15% entre populações. CANSIAN (2003), também caracterizando populações naturais, e VIDOR et al. (2002a), analisando um ensaio de progênies, estimaram que as variâncias intrapopulacionais foram maiores que as interpopulacionais. Outros marcadores genéticos também foram empregados nos estudos de variabilidade em erva-mate: GREGIANINI; WINGE (2000), analisando proteínas de reserva de sementes, constataram que 85% da variabilidade encontra-se dentro de populações e 15% entre populações. Os resultados obtidos com marcadores isoenzimáticos (item 3.4 do Capítulo III) detectaram que a diferenciação genética entre as populações foi de 12,86%, verificando-se maior variabilidade dentro das populações (87,14%).

Portanto, os resultados revelados pelos marcadores RAPD foram coerentes com os observados pelos locos isoenzimáticos e com os resultados observados por outros autores para a espécie, indicando pequenas diferenças entre as procedências, e maior variação dentro de procedências, mais especificamente, neste caso, entre progênies. Tais resultados, em termos de contribuição aos programas de melhoramento, indicam que deve ser avaliado um menor número de procedências por região ecogeográfica e maior número de progênies por procedências.

4. CONCLUSÕES

1. Marcadores RAPD são eficientes para caracterizar as procedências e progênies de *I. paraguariensis*;
2. As procedências estudadas apresentaram maior diversidade genética dentro de procedência, principalmente entre as progênies dentro da procedência, do que entre procedências. Portanto, sugere-se que os programas de melhoramento devem considerar, além das procedências suas respectivas progênies;
3. As distâncias genéticas entre as procedências e entre as progênies dentro das procedências foram restritas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CANSIAN R. L. **Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi-voláteis em populações nativas de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) do Brasil, visando a conservação da espécie.** São Carlos, 2003. 82 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.

CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J.; LEONTIEV-ORLOV, O. CECHET, M. L.; CARVALHO, A. Z.; ECHEVERRIGARAY, S. Diversidade genética de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) na área de distribuição da espécie no Brasil. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., 2003, Chapecó. **Anais...** [Chapecó]: EPAGRI, 2003a. 1 CD-ROM. Seção: Conservação, Melhoramento e Multiplicação. Feira do Agronegócio da Erva-mate, 1., 2003, Chapecó. Integrar para promover o agronegócio da erva-mate.

DOYLE J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1988.

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

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.

GREGIANINI, T. S.; WINGE, H. Variabilidade de proteínas de reserva em populações naturais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae). In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA MATE. 3. 2000, Encantado/RS. **Anais...** Porto Alegre: Edição dos Organizadores, 2000. p. 373-380.

HOEZEL, A. R.; GREEN, A. PCR protocols and population analysis by direct DNA sequencing and PCR-based DNA fingerprinting. In: HOELZEL, A. R. (Ed.) **Molecular genetic analysis of populations – A practical approach.** 2. ed. New York: Oxford University Press, 1998. p. 201-235.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 1143-1152, 2001.

LANTERI, S., DI LEO, I., LEDDA, L.; MAMELI, M. G.; PORTIS, E. RAPD variation within and among populations of globe artichoke cultivar “Spinoso sardo”. **Plant Breeding**, v. 120, p. 243-246, 2001.

MILLER, M. P. **TFPGA**: Tools for population genetics analysis. Version 1.3. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997. <http://www.marksgeneticsoftware.net>

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.

RESENDE, M. D. V. de; STURION, J. A., MENDES, S. Genética e melhoramento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Colombo: EMBRAPA - CNPF, 1995. 33 p. (EMBRAPA - CNPF. Documentos 25).

RESENDE, M. D. V. de; STURION, J. A.; CARVALHO, A. P. DE; SIMEÃO, R. M.; FERNANDES, J. S. C. Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 66 p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 43).

SILVEIRA, S. R.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; SERA, T., CARVALHO, V. P., COELHO, A. S. G. Assessment of genetic variability within and among coffee progenies and cultivars using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 3, p. 329-336, 2003.

SIMEÃO, R. M.; STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V. de; FERNANDES, J. S. C.; NEIVERTH, D. D.; ULBRICH, A. L. Avaliação genética em erva-mate pelo procedimento BLUP individual multivariado sob interação genótipo x ambiente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1589-1596, nov. 2002.

SOKAL, R. R.; MICHENER, D. A statistical method for evaluation systematic relationships. **University of Kansas Scientific Bulletin**, v. 38, p. 1409-1438, 1958.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V.; FLOSS, P. A. Genetic variability in a trial of erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies. **Ciência Rural**, v. 32, p. 584-587, 2002a.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

ZIMBACK, L.; MORI, E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; VEIGA, R. F. A.; MELLO JUNIOR, J. R. S. M. Genetic structure of *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) populations by RAPD markers. **Scientia Forestalis**, n. 65, p. 114-119, 2004.

4. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

A técnica isoenzimática mostrou-se eficiente para estudar o sistema de reprodução, determinar a paternidade e caracterizar a estrutura genética em *I. paraguariensis*.

Quatro sistemas enzimáticos podem ser utilizados para estudos genéticos da espécie: GOT, PGI, 6-PGDH e G-6PDH. A análise de herança mostrou que os locos estão em equilíbrio de segregação Mendeliana, embora tenham sido verificados desvios em algumas árvores. Indícios de ligação em alguns pares de locos foram constatados, mas esses resultados devem ser confirmados com maior número de indivíduos. A enzima NDH apresenta potencial para ser utilizada, mas recomenda-se o estudo de herança.

Na Área de Produção de Sementes (APS), verificou-se que os cruzamentos entre indivíduos aparentados encontram-se acima do esperado para o modelo panmítico; que embora a espécie seja dióica criptica, as progênies são formadas por meios-irmãos e irmãos-completos; e pode estar ocorrendo uma seleção contra indivíduos endogâmicos, entre a fase de plântula e a fase adulta, favorecendo os heterozigotos. Os marcadores isoenzimáticos permitiram identificar grande número de polinizadores. Todavia, os que contribuíram efetivamente foram reduzidos; este fato pode estar associado ao assincronismo no período de florescimento. As análises de coancestria revelaram ocorrência de cruzamentos entre irmãos-completos parentes e a possibilidade de apomixia. Com base nesses resultados, aconselha-se eliminar os indivíduos aparentados, amostrar um maior número de sementes e/ou realizar coletas em anos sucessivos para melhor representar a população da APS.

Na análise da estrutura genética de populações naturais constatou-se que as do Sul do Brasil possuem maior diversidade que as do Centro-oeste e Sudeste. Verificou-se endogamia na espécie, sugerindo cruzamento entre indivíduos aparentados. A maior diversidade genética concentra-se mais dentro de populações do que entre populações, sendo classificada como moderada, para espécies arbóreas. A diferença entre as populações encontra-se associada ao processo de fragmentação das florestas. Com base nestas observações, recomenda-se conservar fragmentos maiores, para reter a variabilidade intrapopulacional, e

conservar um certo número de populações em toda área de ocorrência de *I. paraguariensis*. Também verificou-se que, em geral, as fêmeas apresentaram maiores índices de diversidade que os machos, embora os valores não sejam tão discrepantes. Não detectou-se associação entre tipo sexual e marcador isoenzimático, característica que seria muito interessante aos programas de melhoramento e conservação da espécie, visando a seleção precoce.

Os marcadores RAPD não estimam com grande precisão diversos parâmetros genéticos, devido a sua natureza dominante. Entretanto, mostraram-se eficientes para caracterizar as procedências e progênies estudadas. Constatou-se que a maior variabilidade genética encontra-se dentro da procedência, especialmente entre as progênies, sugerindo que os melhoristas devem avaliar um maior número de progênies por procedência.

Como perspectivas, sugere-se testar novos tampões e sistemas para a técnica de isoenzimas, visando obter maior número de marcadores genéticos, para permitir uma análise mais ampla do genoma. Além disso, conduzir análises de ligação com um maior número de progênies, para certificar os resultados de ligação de alguns locos isoenzimáticos.

Na APS, seria importante realizar novos estudos de fenologia (distribuição temporal e espacial), hábito dos polinizadores e a qualidade do pólen em relação a quantidade e teor de açúcar. Este conhecimento é fundamental para explicar os resultados obtidos nos estudos do sistema reprodutivo e determinação de paternidade. Especial atenção deve ser dispensada à confirmação da possibilidade de ocorrência de apomixia na espécie, pois este fato pode alterar as estratégias dos programas de melhoramento da cultura.

Para fins de conservação dos recursos genéticos, é interessante ampliar esses estudos para outras áreas de ocorrência natural da espécie. Por exemplo, populações do estado de Minas Gerais, Argentina e Paraguai, localizadas em biomas distintos aos analisados neste trabalho. Além disso, sugere-se coletar sementes das populações naturais, a fim de estudar o sistema de reprodução, determinar a paternidade e caracterizar a estrutura genética das progênies e dos adultos. Essas informações são imprescindíveis para nortear os programas de conservação dos recursos genéticos remanescentes e melhoramento da espécie.

E finalmente, o desenvolvimento de marcadores microssatélites para *I. paraguariensis*, representaria um grande avanço nos estudos genéticos da espécie, pois permitiria uma análise mais completa do genoma. Além disso, esses marcadores possuem como vantagens a expressão codominante e o multialelismo, que conferem o mais alto polimorfismo, quando comparados a outros marcadores bioquímicos e moleculares.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ALFENAS, C. A. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, p. 121-144, 1987.

AQUADRO, C. F.; NOON, W. A.; BEGUN, D. J.; DANFORTH, B. N. RFLP analysis using heterologous probes. In: HOELZEL, A. R. (Ed.) **Molecular genetic analysis of populations: a practical approach**. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 1998. p. 151-200.

BAWA, K. S. Breeding of tropical hardwoods: an evaluation of underlying bases, current status and future prospects. In: BURLEY, J.; STYLES, B. T. (Ed.). **Tropical trees: variation, breeding and conservation**. London: Academic Press, 1976. p. 43-59.

BAWA, K. S.; OPLER, P. A. Dioecism in tropical forest trees. **Evolution**, v. 29, p. 167-179, 1975.

BERGMANN, F.; HATTEMER, H. H. Isozymes in forest genetics research. In: MANDAL, A. K., GIBSON, G. L. (Ed.) **Forest Genetics and Tree Breeding**. New Dehli: CBS Publishers & Distributors, 1998. p. 227-238.

BOSHIER, D. H.; CHASE, M. R.; BAWA, K. S. Populations genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 2. Mating system. **American Journal of Botany**, v. 82, n. 4, p. 476-483, 1995.

BRAGAGNOLO, N.; PAN, W.; KLOSOVSKI FILHO, L. **Manual técnico da erva-mate**. Secretaria do Estado da Agricultura – Paraná (SEAG/PR). Curitiba, 1980. 40 p.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 816-827, 1998.

BROWN, S. M.; KRESOVICH, S. Molecular characterization for plant genetic resources conservation. In: PATERSON, A. H. (Ed.). **Genome Mapping in Plants**. Austin, USA: Academic Press, California and R. G. Landes Company, 1996. p. 85-93.

BURGESS, I. P.; WILLIAMS, E. R.; BELL, J. C.; HARWOOD, C. E.; OWEN, J. V. The effect of outcrossing rate on the growth of selected families of *Eucalyptus grandis*. **Silvae Genetica**, v. 45, p. 2-3, 1995.

BUSH, R. M.; SMOUSE, P. E. The impact of electrophoretic genotype on life history traits in *Pinus taeda*. **Evolution**, v. 45, n. 3, p. 481-498, 1991.

CANSIAN R. L. **Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi-voláteis em populações nativas de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) do Brasil, visando a conservação da espécie**. São Carlos, 2003. 82 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.

CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J.; LEONTIEV-ORLOV, O. CECHET, M. L.; CARVALHO, A. Z.; ECHEVERRIGARAY, S. Diversidade genética de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) na área de distribuição da espécie no Brasil. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., 2003, Chapecó. **Anais...** [Chapecó]: EPAGRI, 2003a. 1 CD-ROM. Seção: Conservação, Melhoramento e Multiplicação. Feira do Agronegócio da Erva-mate, 1., 2003, Chapecó. Integrar para promover o agronegócio da erva-mate.

CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J.; LEONTIEV-ORLOV, O. CECHET, M. L.; CARVALHO, A. Z.; ECHEVERRIGARAY, S.; CORREA, G. Identificação de polinizadores na progênie da matriz de erva-mate Cambona-4, usando marcadores RAPD. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., 2003, Chapecó. **Anais...** [Chapecó]: EPAGRI, 2003b. 1 CD-ROM. Seção: Conservação, Melhoramento e Multiplicação. Feira do Agronegócio da Erva-mate, 1., 2003, Chapecó. Integrar para promover o agronegócio da erva-mate.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. 1. Brasília: Embrapa/Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p.

CASIVA, P. V.; VILARDI, J. C.; CIALDELLA, A. M.; SAIDMAN, B. Mating system and population structure of *Acacia aroma* and *A. macracantha* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 91, n.1, p. 58-64, 2004.

CHAGALA, E. M. Inheritance and linkage of allozymes in *Pinus strobus* L. **Silvae Genetica**, v. 45, p. 181-187, 1996.

CHERNODUBOV, A. The structure of the *Pinus sylvestris* L. in the insular pine forest of the south Russian plain. **Silvae Genetica**, n. 43, p. 186-189, 1994.

CLEGG, M. T. Measuring plant mating systems. **Bioscience**, v. 30, n. 12, p. 814-818, 1980.

COSTA, P.; POT, D.; DUBOS, C.; FRIGERIO, J. M.; PIONNEAU, C.; BODENES, C.; BERTOCCHI, E.; CERVERA, M.-T.; RIMINGTON, D. L.; PLOMION, C. A genetic map of Maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 39-48, 2000.

COLLEVATTI, R. G.; GRATAPAGLIA, D.; HAY, J. D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental

inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, v. 86, p. 1-8, 2001.

CRUZ, R. P. C.; MILACH, S. C. K. Análise de RAPD. In: MILACH, S. C. K. (Ed.) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre:UFRGS, 1998. p.107-116.

DA CROCE, D. M.; FLOSS, P. A. **Cultura da erva-mate no Estado de Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 1999. 81 p. (EPAGRI, Boletim Técnico, n.100).

DONADUZZI, C. M.; COELHO, S. R. M.; CARDOZO JR., E. L.; GALLO, A. G.; HUPPES, G. K.; KUHN, I. M. V.; SCHICHEL, C. Teores de cafeína, polifenóis totais e taninos em amostras de erva mate comercializadas na região de Toledo, Paraná. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA MATE. 3. 2000, Encantado/RS. **Anais...** Porto Alegre: Edição dos Organizadores, 2000. p. 158-161.

EL-KASSABY, A.; PARKINSON, J.; DEVITT, W. J. B. The effect of crown segment on the mating system in a Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) seed orchard. **Silvae Genetica**, v. 35, n. 4, p. 149-155, 1986.

EL-KASSABY, A.; RITLAND, K.; FASHLER, A. M. K.; DEVITT, W. J. B. The role of reproductive phenology upon the mating system of a Douglas-Fir seed orchard. **Silvae Genetica**, v. 37, n. 2, p. 76-82, 1986.

ELLSTRAND, N. C.; MARSHALL, D. L. Interpopulation gene flow by pollen in wild radish, *Raphanus sativus*. **American Naturalist**, v. 126, p. 606-616, 1985.

ERLICH, H. A. PCR Technology: principle and applications for DNA regenerated from tissue culture. **Science**, v. 221, p. 949-951, 1989.

FERREIRA, 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.

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

FINKELDEY, R. **An Introduction to Tropical Forest Genetics**. Lecture Notes. Georg-August University Göttingen, Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, 1998. 241 p.

FINKELDEY, R.; GUZMAN, N. de; CHANGTRAGOON, S. Inheritance of isozyme phenotypes in *Pterocarpus indicus* Willd. **Forest Genetics**, v. 3, n. 3, p. 165-170, 1998.

FONT QUER, P. **Diccionario de Botânica**. Barcelona: Editorial Labor, 1953. 1244 p.

FORREST, G. I. Biochemical markers in tree improvement programmes. **Forestry Abstracts**, v. 55, p. 123-153, 1994.

FRANCESCHINELLI, E. V.; BAWA, K. S. The effect of ecological factors on the mating system of a South America shrub species (*Helicteres brevispira*). **Heredity**, v. 84, p. 116-123, 2000.

FRANCO, H. M. Erva-mate: o MERCOSUL dispõe dessa exclusividade. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 5, n. 4, p.34-31, 1992.

FRANKEL, O. H.; BROWN, H. D.; BURDON, J. J. **The conservation of plant biodiversity**. Cambridge: University Press, Cambridge, 1998. 299 p.

FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M.; MORAES, M. L. T.; LEMOS, E. G. M. Mating system of a population of *Myracrodruon urundeuva* F. F. & M. F. Allemão using the fAFLP molecular marker. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 425-431, 2004.

FRIEDMAN, S. T.; ADAMS, W. T. Leaves outcrossing in two Loblolly Pine seed orchards. **Silvae genetica**, v. 34, p. 157-161, 1985.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 678 p.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2 ed. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 2002. 631 p.

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.

GAZETA GRUPO DE COMUNICAÇÕES (Santa Cruz do Sul, RS). **Anuário brasileiro da erva-mate**. Santa Cruz do Sul, 1999. 63 p.

GIBERTI, G. C. Aspectos oscuros de la corologia de *Ilex paraguariensis* St. Hil. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. de A.; TARASCONI, L. C. (Org.). ERVA-MATE: BIOLOGIA E CULTURA NO CONE SUL, 1995, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1995b. p. 289-300.

GIBERTI, G. C. *Ilex* em sudamérica: florística, sistemática y potencialidades com relación a um banco de germoplasma para la yerba mate. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. de A.; TARASCONI, L. C. (Org.). ERVA-MATE: BIOLOGIA E CULTURA NO CONE SUL, 1995, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1995a. p. 303-312.

GILLESPIE, J. H.; KOJIMA, K. I. The degree of polymorphism in enzyme involve in energy production compared to that in nonspecific enzymes in two *Drosophila ananassae* populations. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 62, p. 582-585, 1968.

GILLESPIE, J. H.; LANGLEY, H. A general model to account for enzyme variation in natural populations. **Genetics**, v. 76, p. 837-844, 1974.

GILLET, E.; GREGORIUS, H. R. What can be inferred from open-pollination progenies about the source of observed segregation distortion? – A case study in *Castanea sativa* Mill. **Silvae Genetica**, v. 41, p. 82-87, 1992.

GILLET, E.; HATTEMER, H. H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, v. 63, p. 135-141, 1989.

GLAUBITZ, J. C.; MORAN, G. F. Genetic tools: the use of biochemical and molecular markers. In: YOUNG, A., BOSCHER, D.; BOYLE, T. (Ed.) **Forest Conservation Genetics: Principles and Practice**. New York: CABI Publishing, p. 39-59. 2000.

GOTTLIEB, L. D. Gel electrophoresis: new approach to the study of evolution. **Bioscience**, v. 21, n. 18, p. 939-944, 1971.

GREGIANINI, T. S.; WINGE, H. Variabilidade de proteínas de reserva em populações naturais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae). In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA MATE. 3. 2000, Encantado/RS. **Anais...** Porto Alegre: Edição dos Organizadores, 2000. p. 373-380.

HALLDÉN, C.; HANSEN, M.; NILSSON, N. O.; HJERDIN, A. Competition as a source of errors in RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 1185-1192, 1996.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. H.; MacBYDE, B.; THOMAS, L. (Ed.). **Genetics and conservation**. Menlo Park: Benjamin Cummings, 1983. p. 335-348.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. Allozyme diversity in plants. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L., WEIR, B. S. (Ed.). **Population genetics, breeding and germplasm resources in crop improvement**. Sunderland: Sinauer Press, 1989. p. 43-63.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; SHERMAN-BROYLES. Factors influencing levels of genetic in woody plant species. **New Forest**, v. 6, p. 95-124, 1992.

HAMRICK, J. L.; LINHART, Y. B.; MITTON, J. B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 10, p. 173-200, 1979.

HARTL, D. L. **Genetics**. 3. ed. London: Jones and Bartlett Publishers, 1994. 584 p.

HARTL, D. L.; CLARK, A. C. **Principles of Population Genetics**. 3. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 1997. 542 p.

HATTEMER, H. H. Genetic analysis and population genetics. In: FINESCHI, S.; MALVOLTI, M. E.; CANNATA, F.; HATTEMER, H. H. (Ed.) **Biochemical markers in the population genetics of forest trees**. SPB Academic Publishing, The Hague, 1991. p. 5-22.

HATTEMER, H. H.; BERGMANN, F.; ZIEHE, M. Einführung in die Genetik für Studierende der Forstwissenschaft. 2 Auflage. J. D. Sauerländer's verlag, Frankfurt am Main, 1993. 492 p.

HATTEMER, H. H.; MÜLLER-STARCK, G. Evolution von Baumpopulationen als Folge des Waldsterbens? In: HATTEMER, H. H. (Hsg.) **Erhaltung forstlicher Genressourcen**. Verth. 6. Arbeitstagung Forum Genetik-Wald-forstwirtschaft. Schriften aus der Forstl. Fak. D. Univ. Göttingen und der Niedersächs. Forstl. Versuchsanstalt, Band 98, p. 34-45. 1990.

HOEZEL, A. R.; GREEN, A. PCR protocols and population analysis by direct DNA sequencing and PCR-based DNA fingerprinting. In: HOELZEL, A. R. (Ed.) **Molecular genetic analysis of populations – A practical approach**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1998. p. 201-235.

IMBESI, A. **Indici della pianta – Index plantarum**. Messina, Instituto di Farmacognosia dell' Università de Messina, 1964.

KERTADIKARA, W. S.; PRAT, D. Genetic structure and mating system in teak (*Tectona grandis* L. F.) provenances. **Silvae Genetica**, v. 44, p. 2-3, 1995.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoidea), a tropical tree from the Brazil Cerrado. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 1143-1152, 2001.

LEE, S. L. Mating system parameters of *Dryobalanops aromatica* Gaertn. F. (Dipterocarpaceae) in three different forest types and a seed orchard. **Heredity**, v. 85, p. 338-345, 2000.

LESSA, L. C. B. **História do chimarrão**. 3 ed. Porto Alegre: Sulina, 1986.

LEWANDOWSKI, A.; BURCZYK, J.; MEJNARTOWICZ, L. Inheritance and linkage of some allozymes in *Taxus baccata* L. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 41, p. 342-347, 1992.

LIAN, C.; MIWA, M.; HOTETSU, T. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. **Heredity**, v. 87, p. 88-98, 2001.

LIENGSIRI, C.; PIEWLUANG, C.; BOYLE, T. J. B. Starch gel eletrophoresis of tropical trees. **A Manual**. The ASEAN- Canada Forest Tree Seed Centre, Saraburi, 51 p., 1990.

LINHARES, T. **História econômica do mate**. Rio de Janeiro: Editora José Olympio, 1969. 522 p.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 65-95, 1984.

MACCARI JUNIOR, A. **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)

MARIATH, J. E. A.; COELHO, G. C.; SANTOS, R. P.; HEUSE, E. D.; AYUB, D. M.; COCUCI, A. E. Aspectos anatômicos e embriológicos em espécies do gênero *Ilex*. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. DE A.; TARASCONI, L. C. (Org). ERVA-MATE: BIOLOGIA E CULTURA NO CONE SUL, 1995, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1995. p.263-280.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639-635, 1998.

MATTOS, N. F. Revisão taxonômica da erva-mate. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10: Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 1985, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1985. p.37-46. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 15).

MAZUCHOWSKI, J. Z. **A cultura da erva-mate**. Curitiba: EMATER, 1989. 36 p.

MILACH, S. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. (Ed.) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R. Taxas de cruzamento em um população natural de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). **Biota Neotropica**, v. 2, n. 2, 2002. Disponível: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v2n2/pt/abstract?article+BN01102022002>> Acesso em: 18 jan. 2005.

MOSS, D. W. **Isoenzymes**. London & New York: Capman & Hall, 1982. 200 p.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.

MUONA, O.; YAZDANI, R.; RUDIN, D. Genetic change between life stages in *Pinus sylvestris*: allozyme variation in seeds and planted seedlings. **Silvae Genetica**, v. 36, n. 1, p. 39-41, 1987.

MURAWSKI, D. A.; DAYANANDAN, B.; BAWA, K. S. Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lankan tropical rain forest. **Biotropica**, v. 26, n. 1, p. 23-29, 1994.

MURAWSKI, D. A.; HAMRICK, J. L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, v. 67, p. 167-174, 1991.

MURILLO, O.; HATTEMER, H. H. Inheritance of isozyme variants in *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (Schlectendal) Furlow. **Silvae Genetica**, v. 46, n. 1, p. 51-55, 1997.

O'CONNEL, L. M.; VIARD, F.; RUSSEL, J.; RITLAND, K. The mating system in natural populations of western redcedar (*Thuja plicata*). **Canadian Journal of Botany**, v. 79, p. 753-756, 2001.

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, D. de; ROSADO, S. C. S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 3, p. 331-338, 2002.

OLIVEIRA, Y. M. M. de; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10: Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 1983, Curitiba. **Anais....**Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1985. p.17-36. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 15).

PAIVA, J. R.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Genetic of rubber tree (trees (*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. de Juss.) Müeller Arg.). 2. Mating system. **Silvae Genetica**, v. 43, p. 373-376, 1994.

PAIVA, J. R.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Outcrossing rates and inbreeding coefficients in rubber trees (*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. de Juss.) Müeller Arg.). **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p. 1003-1011, 1993.

PALMA-SILVA, C.; WOLLHEIM, C.; WINGE, H. Variabilidade isoenzimática intra e interpopulacional em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA MATE. 3. 2000, Encantado/RS. **Anais...** Porto Alegre: Edição dos Organizadores, 2000. p. 381-385.

PAPAGEORGIU, A. C.; PANETSOS, K. P.; HATTEMER, H. H. Genetic differentiation of natural Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.) in Greece. **Forest Genetics**, v. 1, p. 1-12, 1994.

PASTORINO, M. J. **Genetic variation and reproduction system of *Austrocedrus chilensis* (D. DON) Florin et Boutelje, a cypress endemic to the Andean-Patagonian Forest.** Göttingen, 2000. 166 f. Dissertation (Doctor of Forestry Science) - University of Göttingen.

PASTORINO, M. J.; GALLO, L. A. Inheritance of isozyme variants in *Austrocedrus chilensis* (D. Don) Florin et Boutelje. **Silvae Genetica**, v. 47, n. 1, p. 15-20, 1998.

PÓVOA, J. S. R. **Distribuição da variação genética de *Cedrela fissilis* Vell., em fragmentos florestais, no sul de Minas Gerais, por meio de isoenzimas.** Lavras,

2002. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras.

PRAT KRICUN, S. D. Principales aspectos de la producción e investigación yerbatera Argentina. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 3., 1990, Erechim. **Anais...** Erechim: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 1990. p.17-30.

PRAT KRICUN, S. D.; BELINGHERI, L. D. Disposición, distanciamiento y densidade de plantación de yerba mate en las provincias de Misiones y Corrientes, Argentina. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E. DE A.; TARASCONI, L.C. (Org.) ERVA-MATE: BIOLOGIA E CULTURA NO CONE SUL, 1995, Porto Alegre. **Anais...**Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1995. p.73-79.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.; SANTOS, J. B. Melhoramento de espécies autógamias. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 201-230.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2001. 906 p.

REDIG, A. P. L. A importância econômica atual da erva-mate. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10: Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 1985, Curitiba. **Anais...**Curitiba: EMBRAPA-CNPF, 1985. p.37-46. (EMBRAPA-CNPF. Documentos, 15).

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio grande do Sul**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues-HBR, 1988. p. 284-292.

RESENDE, M. D. V. de; STURION, J. A., MENDES, S. Genética e melhoramento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Colombo: EMBRAPA - CNPF, 1995. 33 p. (EMBRAPA - CNPF. Documentos 25).

RESENDE, M. D. V. de; STURION, J. A.; CARVALHO, A. P. DE; SIMEÃO, R. M.; FERNADES, J. S. C. Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 66 p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 43).

RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Mating system in a neotropical tree species, *Senna multijuga* (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 418-424, 2004.

RITLAND, K.; EL-KASSABY, Y. A. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas-fir as shown by an efficient multilocus model. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 71, p. 375-384, 1985.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, v. 47, p. 35-52, 1981.

ROBINSON, L. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p. 329-380.

ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; GIL, L. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. **Heredity**, v. 94, p. 13-22, 2005.

ROGERS, D. L. Inheritance of allozymes from seed tissues of the hexaploid gymnosperm, *Sequoia sempervirens* (D Don) Endl (Coast redwood). **Heredity**, v. 78, p. 166-175, 1997.

ROUTLEY, M. B.; MAVRAGANIS, K.; ECKERT, C. G. Effect of population size on the mating system in a self-compatible, autogamous plant, *Aquilegia canadensis* (Ranunculaceae). **Heredity**, v. 82, p. 518-528, 1999.

RUDIN, D.; EKBERG, I. Linkage studies in *Pinus sylvestris* L. – using macro gametophyte allozymes. **Silvae Genetica**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 1978.

SALLES, G.; BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. de C.; AMARAL, Z. P. de S. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 11 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 20).

SCANDALIOS, J. G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. **Biochemical Genetics**, v. 3, p. 37-79, 1969.

SCHERER, R. A. **Early selection of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Bonn: Rheinischen friedrich-Wilhelms-Universit, 1997. 58 p.

SCHLÖTTERER, C. Microsatellites. In: HOELZEL, A. R. (Ed.) **Molecular genetic analysis of population: a practical approach**. Oxford:University of Durham, 1998. p. 237-261.

SCHOEMBERG, M. M.; DINOUTTI, L. A. Ontogênese do fruto de *Ilex paraguariensis* St. Hil.- morfologia externa e interna da flor. **Estudos de Biologia**: Curitiba, v. 22, p. 5-35, 1989.

SEBBENN, A. M. Herança e desequilíbrio gamético em algumas isoenzimas polimórficas em *Genipa americana* L. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 65-72, 2004.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; ZANATTO, A. C. S. Mating system in populations of *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze: implications for genetic conservation and improvement. **Scientia Forestalis**, n. 58, p. 25-40, 2000a.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOSVKY, R. Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética espacial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. **Scientia Florestalis**, v. 53, p. 15-30, 1998.

SEOANE, C. E. C.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema reprodutivo em populações *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal**, v. 13, n. 1, p. 19-26, 2001.

SILVEIRA, S. R.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; SERA, T.; CARVALHO, V. P.; COELHO, A. S. G. Assessment of genetic variability within and among coffee progenies and cultivars using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 3, p. 329-336, 2003.

SOBIERAJSKI, G. R. **Estrutura genética em populações de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) por marcadores isoenzimáticos e caracteres quantitativos**. Piracicaba, 2004. 127 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo.

SOUSA, V. A. **Population genetic studies in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. Göttingen, 2000. 161 f. Dissertation (Doctor of Forestry Science) - University of Göttingen.

SOUSA, V. A.; DAROS, T. L.; STURION, J. A. Fenologia reprodutiva de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESSO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL, 9. 2003. Nova Prata/RS. **Anais...** Nova Prata: Prefeitura Municipal: Câmara Municipal de Vereadores: Câmara da Indústria e Comércio, 2003. CD ROM.

SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H.; ROBINSON, I. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvae Genetica**, v. 51, n. 5-6, p. 191-196, 2002.

SOUZA JÚNIOR, C. L. Melhoramento de espécies alógamas. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.159-200.

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* A. St. Hil. (Bombaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 113-121, 2003.

STEFFAN, R. J.; ATLAS, R. M. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, p. 137-161, 1991.

THORSÉN, J.; JORDE, P. E.; ARAVANOPOULOS, F. A.; GULLBERG, U.; ZSUFFA, L. Inheritance and linkage of isozyme loci in the basket willow (*Salix viminalis* L.). **The Journal of Heredity**, v. 88, n. 2, p. 144-150, 1997.

TIMERJANOV, A. S. Lack of allozyme variation in *Larix sukaczewii* Dyl. from the southern Ural. **Silvae Genetica**, n. 46, p. 61-61, 1997.

TIMMERMAN, G. M.; McCALLUM, J. A. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in plant biology. **International Grassland Congress**, v. 17, p. 1025-1031, 1993.

TRIEST, L.; GREEF, B. de; D'HAESELEER, M.; ECHCHGADDA, G.; VAN SLYCKEN, J.; COART, E. Variation and heritance of isozyme loci in controlled crosses of *Salix alba* and *Salix fragilis*. **Silvae Genetica**, v. 47, n. 2-3, p. 88-94, 1998.

VALOIS, A. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. **Glossário de recursos genéticos florestais**. Brasília: Embrapa CENARGEM: SPI, 1996. 62 p.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V.; FLOSS, P. A. Genetic variability in a trial of erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies. **Ciência Rural**, v. 32, p. 584-587, 2002a.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V.; FLOSS, P. A. Molecular markers in erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) characterization studies: the taste. **Ciência Rural**, v. 32, p. 415-420, 2002b.

WADT, L. H. O.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética e sistema de acasalamento de *Piper hispidinervum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 2, p.151-157, 2004.

WANG, C. T.; LIN, T. P. Inheritance and linkage relationships of allozymes, and estimation of outcrossing rates in a seed orchard of *Cunninghamia konishii* Hay. **Silvae Genetica**, v. 47, n. 1, p. 33-37, 1998.

WANG, K. S. Gene flow in European beech (*Fagus sylvatica* L.). **Genetica**, v. 122, p. 105-113, 2004.

WAUGH, R. RAPD Analysis: use for genome characterization tagging traits and mapping. In: CLARK, M. S. (Ed.). **Plat molecular biology: a laboratory manual**. Germany: Springer-Verlag, 1997. p. 305-333.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data**. North Caroline State University, Sinauer Ass. Inc. Pub., Massachusetts, 1996. 445 p.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WINGE, H.; WOLLHEIM, C.; CAVALLI-MOLINA, S.; ASSMANN M.; BASSANI, K. L. B.; AMARAL, M. B.; COELHO, G. C.; FREITAS-SACCHET, A. M. de O.; BUTZKE, A.; VALDUGA, A. T.; MARIATH, J. E. de A. Variabilidade genética em populações nativas de erva-mate e a implantação de bancos de germoplasma. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. de A.; TARASCONI, L. C. (Org.). ERVA-MATE: BIOLOGIA E CULTURA NO CONE SUL, 1995, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1995. p. 322-345.

WINGE, H. Conservação genética da erva-mate no Brasil. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1.; REUNIAO TECNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997, Curitiba. **Anais...** Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1997. p.209-226. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 33).

WOLLHEIM, C. **Modificações dos padrões isoesterásicos ao longo do desenvolvimento de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae).** Porto Alegre, 1991. 136 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

WOLLHEIM, C.; WINGE, H. Análise de paternidade em populações de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae. In: REUNIÃO TÉCNICA DE CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 1, 1992, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 1992. 41 p.

WRIGHT, S. Systems of mating. **Genetics**, v. 6, p. 11-178, 1921.

ZANETTO, A.; KREMER, A.; MÜLLER-STARCK, G.; HATTEMER H. H. Inheritance of isozymes in pedunculate oak (*Quercus robur* L.). **Heredity**, v. 87, p. 364-370, 1996.

ZANON, A. **Produção de sementes de erva-mate.** Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1988. 7 p. (EMBRAPA-CNPQ. Circular Técnica, 16).

ZHIVOTOVSKY, L. A. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 907-913, 1999.

ZIMBACK, L.; MORI, E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; VEIGA, R. F. A.; MELLO JUNIOR, J. R. S. Genetic structure of *Trichilla pallida* Swartz (Meliaceae) populations by RAPD markers. **Scientia Forestalis**, v. 65, p. 114-119, 2004.