

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**VARIABILIDADE GENÉTICA E DE COMPOSTOS
VOLÁTEIS E SEMI-VOLÁTEIS EM POPULAÇÕES NATIVAS
DE *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) DO BRASIL, VISANDO A
CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE**

ROGÉRIO LUIS CANSIAN

São Carlos-SP, 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**VARIABILIDADE GENÉTICA E DE COMPOSTOS
VOLÁTEIS E SEMI-VOLÁTEIS EM POPULAÇÕES NATIVAS
DE *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) DO BRASIL, VISANDO A
CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

Doutorando: ROGÉRIO LUIS CANSIAN

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray

São Carlos-SP, 2003.

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C228vg

Cansian, Rogério Luis.

Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi-voláteis em populações nativas de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) do Brasil, visando a conservação da espécie / Rogério Luis Cansian. -- São Carlos : UFSCar, 2003.
82 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Conservação da natureza. 2. RAPD (Random Amplyfied Polymorphic DNA). 3. GC/MS. 4. Variabilidade genética. I. Título.

CDD: 574.5 (20^a)

Dedico esta tese aos meus pais Olívio Iracy e Maria Helena (*in memorium*), a minha mulher Natália Paroul e a minha filha Nicole.

AGRADECIMENTOS

Sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho. Em particular:

- Ao Dr. Sérgio Echeverrigaray, pela excelente orientação e constante preocupação na execução deste trabalho e, sobretudo, pela amizade e estímulo.
- Aos colegas da URI-Campus de Erechim, pela amizade e contribuições, as quais foram decisivas na elaboração deste trabalho.
- Ao colega de doutorado e amigo Altemir José Mossi, que contribuiu ativamente para a execução deste trabalho.
- Aos alunos, bolsistas de iniciação científica do Centro Tecnológico da URI, que participaram efetivamente em atividades ligadas a este trabalho.
- Ao CNPq, FAPERGS, Secretaria de Ciência e Tecnologia-RS (PIT-Norte) e URI, pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.
- Ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da UFSCar, que viabilizou a realização deste doutorado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 Aspectos Botânicos da Erva-mate	04
2.2 Variabilidade Genética em Erva-mate	08
2.3 Variabilidade Química em Erva-mate	11
2.4 Obtenção de Extratos com Fluidos Supercríticos	12
2.5 Análise de Extratos por GC/MS	15
3. VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATIVAS DE <i>Ilex paraguariensis</i> (St. Hil.) USANDO MARCADORES RAPD	17
Resumo	19
Abstract	20
Introdução	21
Material e Métodos	22
Resultados e Discussão	25
Referências Bibliográficas	30
4. DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Ilex paraguariensis</i> (St. Hil.) NA ÁREA DE DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE NO BRASIL	32
Resumo	34
Abstract	35

Introdução	36
Material e Métodos	37
Resultados e Discussão	39
Referências Bibliográficas	45
5. VARIÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E SEMI-VOLÁTEIS DE EXTRATOS DE POPULAÇÕES NATIVAS DE <i>Ilex paraguariensis</i> (St. Hil.) DO BRASIL	47
Resumo	49
Abstract	50
Introdução	51
Material e Métodos	52
Resultados e Discussão	54
Referências Bibliográficas	60
6. IDENTIFICAÇÃO DE POLINIZADORES NA PROGÊNIE DA MATRIZ DE ERVA-MATE CAMBONA-4, USANDO MARCADORES RAPD	62
Resumo	64
Abstract	65
Introdução	66
Material e Métodos	67
Resultados e Discussão	69
Referências Bibliográficas	71
7. DISCUSSÕES GERAIS	73
8. CONCLUSÕES	77
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES	79

LISTA DE TABELAS

3. VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATIVAS DE *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) USANDO MARCADORES RAPD

Tabela 1: Número total e número de fragmentos polimórficos obtidos em cada primer utilizado nas três populações analisadas	25
Tabela 2: Similaridades (S_j) intra e interpopulacional	26

4. DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) NA ÁREA DE DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE NO BRASIL

Tabela 1: Número total, número de fragmentos polimórficos e número de fragmentos espécie específicos obtidos em cada primer utilizado, nas populações analisadas	39
--	----

5. VARIAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E SEMI-VOLÁTEIS DE EXTRATOS DE POPULAÇÕES NATIVAS DE *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) DO BRASIL

Tabela 1: Composição química (média \pm desvio padrão em mg/g de extrato) das 20 populações de <i>I. paraguariensis</i> obtidos por CG-EM ^a	56
Tabela 2: Correlação (linear de Pearson) entre a composição química analisada e as características ambientais de cada local (Tr = tempo de retenção)	59

LISTA DE FIGURAS

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1: Área de distribuição da erva-mate (Da Croce e Floss, 1999) 6
- Figura 2: Diagrama Pc x Tc para uma substância pura (McHugh e Krukonis, 1994) 13
- Figura 3: Esquema representativo de um processo de extração supercrítica, composto por: (A) cilindro sifonado do solvente, (B) bomba de alta pressão, (C) extrator, (D) válvula de expansão e (E) tubo coletor 14

3. VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATIVAS DE *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) USANDO MARCADORES RAPD

- Figura 1: Gel de agarose demonstrativo, obtido com o primer OPF-12 na população Erechim (01 a 30). M = marcador de peso molecular Lambda, clivado com Hind III e Eco RI 26
- Figura 2: Dendrograma das três populações de erva-mate coletadas aleatoriamente, baseado em análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) por RAPD. Os números dentro do dendrograma referem-se aos limites de confiança dos agrupamentos 28
- Figura 3: Análise de Coordenadas Principais por distância Euclidiana de três populações de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.), mostrando total separação entre as três populações e maior dispersão na população Áurea em relação às demais 29

4. DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) NA ÁREA DE DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE NO BRASIL

- Figura 1: Locais de coleta e área de distribuição natural da erva-mate (Da Croce e Floss, 1999) 37
- Figura 2: Gel de agarose demonstrativo, obtido com o primer OPF-12, mostrando o perfil de amplificação em *I. paraguariensis* (01 a 20) e fragmentos específicos de *I. dumosa* (21) e *I. theezans* (22). M= marcador de peso

molecular Lambda, clivado com HindIII e Eco RI	40
Figura 3: Dendrograma das 20 populações de <i>I. paraguariensis</i> determinado por RAPD, usando coeficiente de Jaccard e agrupamento UPGMA	41
Figura 4: Dendrograma de três espécies de <i>Ilex</i> , determinado por RAPD, usando coeficiente de Jaccard e agrupamento UPGMA	43
Figura 5: Análise de Coordenadas Principais por distância Euclidiana das 20 populações de <i>I. paraguariensis</i> analisadas, <i>I. dumosa</i> e <i>I. theezans</i> , mostrando a separação da população de Ponta Porã e das três espécies	43
Figura 6: Agrupamento UPGMA com distâncias Euclidianas das 20 populações analisadas, com base em características ambientais de cada local (latitude, longitude, altitude, temperatura média anual, vegetação, classificação climática de Koppen, geomorfologia e tipo de solo)	44

5. VARIAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E SEMI-VOLÁTEIS DE EXTRATOS DE POPULAÇÕES NATIVAS DE *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) DO BRASIL

Figura 1: Locais de coleta e área de distribuição natural da erva-mate (Da Croce e Floss, 1999)	52
Figura 2: Unidade experimental de extração de alta pressão. (A) cilindro de CO ₂ ; (B,H) banhos termostáticos (Quimis); (C) bomba de alta pressão (ISCO 500 D); (D) extrator encamisado com volume interno aproximado de 100 mL; (E) tubo coletor de vidro; (F) válvula micrométrica	53
Figura 3: Cromatograma da população de Chapecó, mostrando os picos analisados neste trabalho, seus tempos de retenção (minutos), além do pico de bifenila (20,117) usada como padrão interno	55
Figura 4: Agrupamento UPGMA com distâncias Euclidianas de três bulks de 10 plantas de cada uma das 20 populações, com base diferenças químicas entre as populações para os compostos analisados (normalizados).....	57
Figura 5: Agrupamento UPGMA com distâncias Euclidianas das 20 populações analisadas, com base em características ambientais de cada local (latitude, longitude, altitude, temperatura média anual, vegetação, classificação climática de Koppen, geomorfologia e tipo de solo)	58

6. IDENTIFICAÇÃO DE POLINIZADORES NA PROGÊNIE DA MATRIZ DE ERVA-MATE CAMBONA-4, USANDO MARCADORES RAPD

- Figura 1: Gel de agarose gerado por RAPD com o primer OPA-18, mostrando um fragmento específico do polinizador A, ausente nos demais progenitores e presente em diversas progênies (A,B,C e D = polinizadores; C4 = matriz Cambona-4; 50 a 71 = progênies; M = marcador de peso molecular Lambda, clivado com Hind III e Eco RI)..... 69
- Figura 2: Polinizadores da progênie da matriz Cambona-4 identificados através das análises de RAPD 70

RESUMO

Ilex paraguariensis, mais conhecida como erva-mate, é beneficiada por diversas formas e comercializada como chá, pó solúvel, essências e erva para chimarrão e tererê. Visando sua conservação, foram estudadas sua variabilidade genética intra e interpopulacional e sua composição química em 20 populações na área de ocorrência da espécie no Brasil. Também foram realizados testes de paternidade para identificação de um cruzamento favorável à obtenção de progênies com características de interesse, objetivando reduzir o impacto sobre ervais nativos causados pelo extrativismo. A variabilidade genética analisada por marcadores moleculares RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) em *I. paraguariensis* é inferior à variabilidade reportada em outras espécies arbóreas dióicas. A variabilidade intrapopulacional é maior que a variabilidade interpopulacional nesta espécie. Em estudos intra e interpopulacionais identificaram-se alelos com mesma frequência alélica e alelos com frequências bastante distintas, evidenciando a ocorrência de fluxo gênico entre populações próximas geograficamente, porém com alelos característicos de cada população. As diferenças ambientais consideradas não foram suficientes para explicar as diferenças genéticas e químicas encontradas entre as populações, demonstrando a possibilidade de haver interferências micro-ambientais e de genes ainda não analisados, influenciando na composição química da erva-mate. A população de Ponta Porã, separada geograficamente das demais, mostrou-se distinta geneticamente. Fragmentos espécie específicos foram obtidos para *I. paraguariensis*, *I. dumosa* e *I. theezans*, porém requerendo mais estudos neste sentido para confirmação e utilização destes. As diferenças nas análises dos compostos voláteis e semi-voláteis entre as populações, permitiram a separação destas e podem ser úteis para a identificação e inclusão de genótipos superiores em determinados compostos em bancos de germoplasma. Para a conservação desta espécie em bancos de germoplasma *ex situ* a coleta de materiais deve ser baseada em análises genéticas, além da distribuição geográfica, devido à maior variabilidade intrapopulacional e ocorrência de alelos raros na espécie. A técnica de RAPD pode ser utilizada para a identificação de paternidade, principalmente em espécies arbóreas, podendo-se obter ganhos genéticos com a condução de cruzamentos controlados. Os resultados obtidos embasaram discussões sobre aspectos de conservação desta espécie.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, RAPD, variabilidade.

ABSTRACT

Genetic and the volatiles and semi-volatiles compounds variability in native populations of *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) in Brazil, for species conservation. *Ilex paraguariensis*, known as mate tea, is processed in many ways and commercialized as tea, soluble powder, essences, and processed leaves for preparation of mate tea without sugar (“chimarrão” and “tererê”). Aiming the conservation of this species, this work studied the intra- and interpopulational genetic variabilities of *I. paraguariensis* and its volatiles and semi-volatiles composition in 20 populations inside the area of incidence of this species in Brazil. Paternity tests were also performed to identify a favorable crossing for obtaining lineages with the characteristics of interest, reducing then the impact of extractive harvest on the native plants. Genetic variability of *I. paraguariensis* analyzed by RAPD markers (Random Amplified Polymorphic DNA) is lower to the reported variability in other dioic arboreal species. Intrapopulational variability is higher than interpopulational in this species. In intra and interpopulational studies alleles with the same allele sequence were identified, as well as alleles with very different sequences, what evidences the incidence of genetic flux among populations that are close geographically, but with alleles specific of each population. The environmental differences taken into account were not enough to explain genetic and chemical differences found among the populations. These results show the possibility of influences of microenvironmental factors and non-analyzed genes in the analyzed chemical composition of mate tea leaves. The population of Ponta Porã, geographically separated from the others, proved to be genetically distinct. Species-specific fragments were obtained for *I. paraguariensis*, *I. dumosa* and *I. theezans*. However, more studies for confirmation and utilization of such fragments must be carried out. The differences in the volatiles and semi-volatiles composition among the populations turned their separation possible, and may be useful for identification and inclusion of genotypes, superior in specific compounds, in germoplasm collections. For conservation of this species in germoplasm collections *ex situ*, material collecting must be based on genetic analysis, as well as on geographical distribution, due to the higher intrapopulational variability and occurrence of rare alleles in the species. The RAPD technique may be used for paternity identification, mainly in arboreal species, making possible to obtain genetic improvement by performing controlled crossings. Based on these results, it was possible the discussion concerning the conservation aspects of this species.

Key-words: *Ilex paraguariensis*, RAPD, variability.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Ilex paraguariensis*, mais conhecida como erva-mate, pertence à família *Aquifoliaceae*, sendo uma das 68 espécies conhecidas do gênero *Ilex* conhecidas no Brasil (Gilberti, 1995). Foi descrita por Auguste Saint Hilaire em 1822. A área de distribuição da espécie ocupa cerca de 3% do território da América do Sul e 5% do território do Brasil, sendo que mais de 80% de sua área de distribuição encontra-se no Brasil (Oliveira e Rotta, 1985). No Brasil, ocorre principalmente nos Estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Envolve também o leste do Paraguai e nordeste da Argentina. A espécie é arbórea, podendo atingir 12 a 30 metros de altura, e de vida relativamente longa, havendo relatos de árvores centenárias.

A existência de acentuada variabilidade morfológica, especialmente na morfologia foliar, é referida por diversos autores (Edwin e Reitz, 1967; Gilberti, 1979; Mattos, 1985; Wollheim *et al.*, 1987). Variação também foi observada por morfometria floral (Winge *et al.*, 1995). Estudos de variabilidade genética têm sido desenvolvidos por alguns grupos de pesquisadores, limitando-se a materiais coletados em regiões específicas, com diferentes resultados (Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Vidor *et al.*, 2002a; Vidor *et al.*, 2002b).

O extrativismo, ainda praticado em alta frequência no caso da erva-mate, associado a técnicas errôneas de poda e manejo, a redução de áreas naturais como consequência do aumento das fronteiras agrícolas, principalmente no Brasil, e a pressão para a ocupação de áreas muitas vezes consideradas “improdutivas”, tornam urgente a implantação de programas de conservação de recursos genéticos. A Convenção sobre a Diversidade Biológica, assinada durante a reunião mundial sobre meio ambiente e desenvolvimento, realizada em 1992 (Eco92), enfatizou a importância da criação simultânea de bancos de germoplasma *in situ* e *ex situ* das espécies de interesse econômico.

A implantação de bancos de germoplasma de erva-mate deve ser encarada como uma responsabilidade principalmente do Brasil, onde se encontra a maior parte da variabilidade genética. Se a espécie possuir árvores portadoras de genes raros ou combinações genéticas especiais como, por exemplo, resistência a doenças atuais ou futuras, é muito provável que as mesmas sejam encontradas nas populações com maior variabilidade genética. O mesmo vale

para outros genes, tais como os que controlam a formação de compostos químicos potencialmente úteis.

Entretanto, conservar e utilizar racionalmente o potencial oferecido pela natureza é um desafio científico-tecnológico atual. Machado (1995) alerta para o perigo das posições extremas em relação à constituição de bancos de germoplasma. Por um lado há os que defendem a idéia de que a preservação deva ser do tipo “intocável” ou coleta e preservação em bancos de germoplasma, e no extremo oposto, estão os que argumentam que apenas as características agrônômicas de interesse devam ser mantidas, devendo as demais ser descartadas. Conforme o referido autor, o melhoramento moderno sofre as conseqüências de uma visão imediatista sujeita às freqüentes mudanças nas exigências do mercado consumidor.

Considerando que a biologia molecular colocou à disposição dos pesquisadores novos métodos de uso e transferência rápida de genes, devem ser revistos os conceitos sobre “tipos desfavoráveis” e considerar que bancos de recursos genéticos amplos possam ter fundamental importância nos programas de melhoramento.

Independentemente dos objetivos da coleção, é sempre importante que se possa ter o máximo da variabilidade genética original em um baixo número de plantas. É recomendado que se procure organizar as coleções de germoplasma de forma a ter de 70 a 80% da variabilidade do reservatório genético da população original, concentrada em cerca de 10 a 15% do total de plantas ou acessos, com baixos níveis de duplicação de genótipos. Essas coleções concentradas são conhecidas como “core collections” ou coleções nucleares (Morales, 1995).

Assim, um banco de germoplasma que, em última análise é uma coleção de genes organizada nos genótipos das plantas, pressupõe o conhecimento prévio da população natural quanto a sua composição genética e/ou quanto a sua variabilidade em características morfológicas, fisiológicas, químicas, etc.

Apesar da importância econômica para a região Sul do Brasil e também para o estado do Mato Grosso do Sul, a erva-mate não tem merecido grande atenção quanto à conservação de seu germoplasma. Atualmente, alguns esforços têm sido feitos, principalmente, pela EMBRAPA-Florestas no Paraná, EPAGRI em Santa Catarina, UFRGS, UNIJUÍ e URI no Rio Grande do Sul, mas a carência sobre estudos genéticos e de melhoramento em erva-mate, dificultam esta tarefa.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivos estudar a variabilidade genética intra e interpopulacional com marcadores RAPD, correlacionar diversidade de compostos voláteis e semi-voláteis, genética e ambiental e contribuir para o desenvolvimento

de uma cultivar de erva-mate que possa minimizar o impacto sobre ervais nativos através da identificação de polinizadores e seleção dentro de progênies.

O trabalho consta de uma revisão bibliográfica sobre a erva-mate e sobre as técnicas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho (RAPD, obtenção de extratos com CO₂ supercrítico, cromatografia gasosa) e quatro capítulos correspondentes aos diferentes objetivos, colocados na forma de artigos, os quais foram enviados para publicação. Em seguida, é apresentada uma discussão geral embasada nos resultados obtidos neste trabalho, as conclusões gerais possíveis de serem extraídas e as referências bibliográficas das citações contidas na introdução e na revisão bibliográfica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos Botânicos da Erva-Mate

Cerca de 550 a 660 espécies representam a família *Aquifoliaceae*, à qual pertence à erva-mate, sendo a maioria do gênero *Ilex*. No Brasil se estima que ocorram 60 espécies (Edwin e Reitz, 1967). Dentre estas estão: *Ilex dumosa* (Reisseck), popularmente conhecida como caúna dos capões ou congonha pequena por seu menor tamanho de folhas, sendo que sua infusão resulta em sabor doce-amargo, e não contém cafeína; *Ilex theezans* (Mart. ex Reisseck), conhecida por caúna amargosa, caúna de folhas grandes ou congonha do mato, possuindo sabor amargo e presença de cafeína, ambas consideradas adulterantes quando usadas na produção de erva-mate; e *Ilex paraguariensis* (St. Hil.), sendo a espécie melhor conhecida deste gênero, com propriedades, principalmente, estimulante, diurética e digestiva, onde sua cafeína solúvel atua em casos de fadigas cerebrais, facilitando o trabalho intelectual (Prat Kricun e Belingheri, 1995).

O aspecto e o porte da árvore de erva-mate (*I. paraguariensis*) se assemelham à laranjeira. O caule é um tronco de cor acinzentada, geralmente com 20 a 25 cm de diâmetro, podendo chegar a 50 cm. Apresenta os ramos cilíndricos ou subcilíndricos, cinzentos e os ramos terminais são densamente lenticelados, possuindo lenticelas pequenas. A altura é variável dependendo da idade e do índice de sítio. Podem atingir até 15 m de altura, mas geralmente, quando podadas, não passam de 7 metros. Porém em sistemas agrícolas atuais, com adensamento e podas, a altura não ultrapassa a 2 m.

As folhas (a parte mais importante do vegetal) são alternas, subcoriáceas até coriáceas, e mostram-se estreitas na base e ligeiramente obtusas no vértice. Suas bordas são providas de pequenos dentes, visíveis, principalmente da metade do limbo à extremidade. O pecíolo é relativamente curto, medindo mais ou menos 15 mm de comprimento e mostra-se um tanto retorcido. A folha interna mede de 8 a 10 cm de comprimento por 4 ou 5 cm de largura.

As flores são hermafroditas, pequenas, pedunculadas e dispostas na axila das folhas superiores. Elas são unissexuais por aborto. Em cada flor nota-se um cálice gamossépalo com quatro sépalas de cor verde clara e uma corola branca formada por quatro pétalas. Aparecem entre estas pétalas, em número de quatro, os estames largos (Font Quer, 1953).

Em relação ao comportamento das flores, pode-se considerar a erva-mate como planta dióica, onde nas plantas femininas encontram-se estames não funcionais e, nas plantas masculinas o pistilo se deprime e aborta. O florescimento ocorre entre os meses de setembro e dezembro e a frutificação no período de janeiro a março, tendo um período produtivo entre 6 e 30 anos. A polinização da erva-mate é basicamente entomófila, embora alguma transferência de pólen pelo vento não deva ser descartada (Ferreira *et al.*, 1983).

O fruto é tetralocular, tetraespermico com mesocarpo carnoso ou coriáceo, com endocarpo endurecido e geralmente lenhoso, medindo 6 a 8 mm (Font Quer, 1953). É de cor verde quando novo, passando a vermelho arroxeadado em sua maturidade. Nesta fase os frutos atraem os pássaros que deles se alimentam, expelindo as sementes envolvidas em dejeções, favorecendo a disseminação das plantas (Mazuchowski, 1989).

A área de dispersão natural do gênero *Ilex*, geralmente distribuído nas zonas tropicais e temperadas, exceto em regiões desérticas, dentre elas a *Ilex paraguayensis* (erva-mate) abrange, aproximadamente, 540.000 km², compreendendo territórios do Brasil, Argentina e Paraguai. Só no Brasil estão situados 450.000 Km² do total (83,3%). Ocorre também em regiões subtropicais e temperadas da América do Sul. No Brasil sua área de dispersão inclui a região centro-norte do Rio Grande do Sul, quase todo o Estado de Santa Catarina, centro-sul e sudoeste do Paraná, sul de Mato Grosso do Sul e manchas em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, associadas à mata de araucária.

A superfície de abrangência geográfica com a presença da *Ilex paraguayensis* estende-se desde a latitude de 21° até 30°S, e longitudes de 48°30' até 56°10'W, em altitudes variáveis entre 500 e 1500 m, podendo ser encontrada em regiões situadas acima ou abaixo destes limites de maneira mais esparsa. O clima predominante é o subtropical temperado úmido, sem estação seca, com temperatura média do mês mais quente inferior a 22°C (cfb de acordo com a classificação de Koeppen). A espécie também ocorre nos tipos climáticos Cfa (clima úmido, com temperatura superior a 22°C no mês mais quente) e Cwa (temperado ou subtropical com período seco de inverno). A precipitação pluviométrica média anual está em torno de 1500 mm. Ocorre mais freqüentemente em solos profundos, bem drenados, com

baixo teor de nutrientes intercambiáveis e altos teores de alumínio (Oliveira e Rotta, 1985). A Figura 1 mostra a área de distribuição natural da erva-mate (Da Croce e Floss, 1999).



Figura 1 - Área de distribuição da erva-mate (Da Croce e Floss, 1999).

A erva-mate já era consumida pelos aborígenes da América do Sul antes do processo de colonização. A matéria-prima *in natura*, folhas e ramos verdes é beneficiada em diversas formas pela indústria e comercializada como chás, pó solúvel, essências e erva para chimarrão e tererê. O chimarrão é uma infusão da erva seca e triturada em água quente, enquanto o tererê é preparado com água fria (ANVISA, 2002).

A atividade ervateira é muito difundida no Paraguai, Argentina e nos estados do Sul do Brasil. A produção de erva-mate nos principais países produtores oscila em torno de 1 milhão e 400 mil toneladas anuais. O Brasil produz cerca de 550 mil toneladas por ano, sendo a produção de erva-mate a principal atividade econômica de muitos municípios. No aspecto social, destaca-se que, no Brasil, esta atividade está comumente associada aos cultivos em

pequenas propriedades rurais, representando uma fonte de trabalho e de geração de renda socialmente importantes, envolvendo aproximadamente 750 empresas, com mais de 700 mil empregos diretos e indiretos (Da Croce, 2000).

Embora a principal forma de consumo da erva-mate seja através do chimarrão e do chá, busca-se ampliar a sua utilização para outros produtos como bebidas, cosméticos e produtos farmacológicos.

O interesse terapêutico com relação à erva-mate é expressivo. Existem evidências, em várias investigações, de que as substâncias contidas na erva tais como: xantinas, cafeína, teobromina, substâncias tânicas, flavonóides e vitaminas, exercem ações sobre o sistema cardiovascular, respiratório, tecido muscular, trato gastrintestinal e também apresentam propriedades estimulantes sobre o sistema nervoso central, anti-reumática e diurética.

O mate é primeiramente uma bebida estimulante, elimina a fadiga, estimulando a atividade física e mental, atuando benéficamente sobre os nervos e músculos, favorecendo o trabalho intelectual. Pelo efeito estimulante central da cafeína junto com a ativação de substâncias de reserva, o trabalho cardíaco e a circulação do sangue, reforçam o organismo. A cafeína exerce um efeito conhecido sobre o sistema nervoso central, estimulando o vigor mental. Com vitaminas do complexo B, o mate participa do aproveitamento do açúcar nos músculos, nervos e atividade cerebral do homem, e com vitaminas C e E como defesa orgânica e como benefício sobre os tecidos do organismo. Com sais minerais, juntamente com a cafeína, ajudam o trabalho cardíaco e a circulação do sangue, diminuindo a tensão arterial, pois a cafeína atua como vaso dilatador. Em tais situações também pode ser suprida a sensação de fome. O mate favorece a diurese, sendo de grande utilidade nas moléstias de bexiga (Bassani e Campos, 1997).

Dada essa utilização medicinal, a erva-mate foi incorporada em várias farmacopéias, como as Francesas em 1866 e 1884, a Portuguesa em 1876, a Argentina em 1898, a Brasileira em 1929, as Venezuelanas em 1898, 1910, 1927 e 1939, as Mexicanas em 1904, 1925 e 1952 e a Paraguaia em 1944, (Imbesi, 1964).

No início de sua exploração, a maior parte do mate produzido no Sul do Brasil, provinha de ervais nativos. Paralelamente à queda de sua produção, pela exploração contínua e avanço da agricultura, houve um aumento na demanda do produto, tanto no mercado interno como no externo. Desse modo, tornou-se prática comum o plantio dessa espécie. Entretanto, o plantio em áreas adensadas (monocultura) e a não seleção de matrizes para a coleta de sementes, têm gerado problemas para a industrialização do mate como, por exemplo, a intensificação do sabor amargo, quando utilizado em infusão. Este problema levou as

indústrias a preferirem a erva-mate nativa, pois segundo os industriais gera chimarrão menos amargo, havendo pagamento diferencial para a erva-mate nativa em relação à cultivada.

O Rio Grande do Sul, no início da década de 70, consistia no principal produtor, respondendo por cerca de 50% da produção do País, diminuindo sua participação para 25% em 1989. No mesmo período, o Paraná aumentou em 10% sua participação na produção nacional, sendo hoje o principal produtor, produzindo 55 mil toneladas de erva/ano, correspondendo a cerca de 37% do total do país. O Estado de Santa Catarina, segundo produtor nacional, participando com cerca de 36%, sempre teve uma produção próxima da paranaense. Enquanto ocorreu uma redução da oferta de erva-mate no Rio Grande do Sul, da ordem de 65% no período de 1970/89, verificou-se em contrapartida que o Mato Grosso do Sul apresentou um incremento de 270% (Mosele, 1998).

2.2 Variabilidade Genética em Erva-Mate

A caracterização molecular da diversidade genética do germoplasma pode fornecer dados úteis para auxiliar o geneticista na seleção de progenitores de populações básicas ao estabelecer programas de melhoramento. Estes dados são especialmente úteis quando associados a dados fenotípicos, tais como, resistência a doenças e pragas, requerimento de nutrientes, qualidade do produto e composição química, dentre outros. A diversidade genética, estimada através de parâmetros fenotípicos ou genéticos, permite também estipular quais os genótipos que podem determinar, quando presentes num programa, ganhos de seleção superiores, dado que existe uma alta correlação entre nível de diversidade e ganho de seleção para a característica de interesse (Allard, 1971). Para tanto, características morfo-fisiológicas podem ser utilizadas (Rangel *et al.*, 1990). Entretanto, marcadores moleculares geram uma grande quantidade de caracteres adicionais que, combinados com características fenotípicas, fornecem um quadro mais completo para o agrupamento de genótipos superiores.

A tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR-Polymerase Chain Reaction), foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80 e envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA (ácido desoxiribonucleico) na presença da enzima DNA polimerase (Saiki *et al.*, 1985; Mullis e Faloona, 1987).

A reação de PCR baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores

(primers) que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes “primers” são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região alvo. Um ciclo de PCR envolve desnaturação da fita dupla de DNA, anelamento do “primer” com as sequências complementares por hibridização DNA-DNA, e extensão a partir de cada terminal 3’ do “primer” pela adição de nucleotídeos, utilizando como molde a sequência alvo, de maneira que uma cópia desta sequência é feita a cada processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes, ocorrendo amplificação em forma de progressão geométrica, sendo que após 20 ciclos são produzidos mais de um milhão de vezes a quantidade inicial da sequência alvo. Esse DNA em grande quantidade pode ser facilmente detectado a olho nu, diretamente em gel de eletroforese através de corantes específicos para DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, ao serem utilizados “primers” mais curtos e de sequência arbitrária, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio da sequência a ser amplificada. Williams *et al.* (1990) patentearam a tecnologia com o nome de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), DNA polimórfico amplificado ao acaso, com um estudo demonstrando a identificação de marcadores genéticos para mapeamento.

A tecnologia RAPD permitiu uma grande expansão da análise de polimorfismo molecular, ao permitir a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas. As aplicações incluem obtenção de “fingerprints” genômicos (impressões digitais) de indivíduos, variedades e populações; análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; estabelecimento de relações filogenéticas entre diferentes espécies; construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e a localização de genes de interesse agrônomico (Rafalski *et al.*, 1991; Caetano-Annóles *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1993; Tingey e Deltufo, 1992).

Em termos de análises filogenéticas, os marcadores moleculares apresentam a vantagem de não serem afetados por fatores ambientais, permitindo assim a determinação de relações filogenéticas entre materiais de distintas origens, grande número de genes avaliáveis e independência, até certo ponto, da pressão de seleção (Swofford *et al.*, 1996).

Estudos envolvendo marcadores moleculares na estimativa de variabilidade genética, associados a dados geográficos e ecológicos, têm permitido estabelecer relações de grande valor tanto para a manutenção de bancos de germoplasma *ex-situ* como *in situ*. Dentre os

trabalhos nesta área, podem ser citados aqueles desenvolvidos entre populações e espécies do gênero *Melaleuca* (Aiken *et al.*, 1998), em *Salvia fruticosa* (Skoula *et al.*, 1999), em *Artemisia annua* (Sangwan *et al.*, 1999) em duas espécies de eucaliptos (Byrne, 1999), em *Ocimum gratissimum* (Vieira *et al.*, 2001) e em *Tymus vulgaris* (Echeverrigaray *et al.*, 2001).

Apesar do interesse econômico pela erva-mate ter aumentado nos últimos anos, ainda são raros os estudos sobre a biologia da espécie. A inexistência de programas de melhoramento genético desta cultura deve-se, entre outros fatores, à falta de conhecimento sobre a variabilidade genética em populações nativas e mesmo cultivadas, conhecimentos essenciais para qualquer projeto de melhoramento.

De acordo com o tamanho, forma e textura da folha e pela coloração das hastes ou talos, os ervateiros costumam fazer uma classificação empírica das ervas que colhem e comercializam, diferenciando qualidades do sabor do chimarrão (Mattos, 1985). Desta forma são classificadas diversas “variedades” em erva-mate como talo roxo, talo branco e piriquita. Entretanto, essa afirmação é questionada por diversos autores (inclusive Mattos), industriais e agricultores. Winge *et al.*, (1995) realizaram um estudo visando examinar o significado biológico das “variedades” referidas pelos agricultores. Plantas das três “variedades” foram comparadas quanto à morfometria foliar, nervação foliar, morfometria floral e similaridade genética baseada nos padrões isoenzimáticos. Os resultados deste estudo mostram não haver correlação entre as variáveis analisadas e as referidas “variedades”. Entretanto, as análises revelaram diferenças significativas entre plantas de mesma “variedade”, nas três “variedades”, para quase todas as medidas. Assim, embora vários autores tenham referido a existência de “variedades” ou “formas” diferentes nas populações de erva-mate, não existem trabalhos visando esclarecer o significado taxonômico dessa variação.

Plântulas F_1 de erva-mate de três populações, Pinhão – PR, Catanduvas – SC, e Erechim – RS, foram analisadas quanto a sua variabilidade intra e interpopulacional, usando marcadores isoenzimáticos esterásicos e fosfatases ácidas (Winge *et al.*, 1995). Os resultados mostram uma maior variabilidade genética intrapopulacional, havendo diferenciação entre as três populações analisadas, com índice de identidade genética variando de 0,766 a 0,793 entre as populações.

Cavalli-Molina *et al.* (2000) estudaram a variabilidade genética de quatro populações naturais de *I. paraguariensis* usando RAPD e proteínas de reserva da semente. A maioria das bandas analisadas para os dois marcadores (51,6% para RAPD e 75% para proteínas de reserva) foram comuns a todas as populações, mas com frequências diferentes em cada uma. Todas as bandas de RAPD foram polimórficas na espécie. A variabilidade intrapopulacional

medida pela distância de Nei e Li (D) teve o coeficiente intrapopulacional médio de $D = 0,392$. Já o índice de similaridade de Jaccard (S_J) teve valor intrapopulacional médio de $S_J = 0,343$ para os dados de RAPD e $S_J = 0,374$ para os das proteínas de reserva, indicando haver alta variabilidade dentro das populações. A distância média entre as populações, avaliadas pelos padrões de RAPD foi de $D = 0,433$ e o $S_J = 0,320$. Para as proteínas de reserva foi obtido um $S_J = 0,308$. Uma análise de partição da variabilidade, feita com índice de Shannon, mostrou que 85% da variabilidade detectada por RAPD e 95% da variabilidade observada nas proteínas de reserva ocorrem dentro das populações, e apenas 15% (RAPD) e 5% (proteínas de reserva) entre as mesmas.

2.3 Variabilidade Química em Erva-Mate

Desde a constatação da presença de metilxantinas em *I. paraguariensis* muitos relatos têm sido publicados a respeito dos teores desses metabólitos secundários, tanto nas folhas, talos ou frutos, como no produto erva-mate, utilizando diversas metodologias para sua extração e quantificação. Entretanto existem poucos trabalhos sobre a variabilidade de populações de erva-mate no que se refere à concentração de metilxantinas, e menos ainda utilizando uma abrangência maior de compostos químicos.

Mazzafera (1994) verificou que, comparando-se folhas de uma mesma planta, as folhas mais sombreadas apresentaram teores mais elevados de teobromina e cafeína. Em condições de estresse, algumas plantas produtoras de alcalóides aumentam o teor dessas substâncias (Hoft *et al.*, 1996). Adicionalmente, em plantas tolerantes à sombra, verifica-se uma tendência de aumento de alcalóides conforme o grau de sombreamento (Hoft *et al.*, 1998). O aumento de substâncias de defesa contra insetos desfoliadores e fungos, tais como a cafeína e teobromina, pode ser uma forma de garantir maior longevidade às folhas nos ambientes sombreados, compensando o investimento biológico necessário para a construção destes órgãos (Coelho, 2000).

Diferenças nas concentrações de cafeína, teobromina e teofilina foram encontradas entre folhas jovens e velhas e entre folhas de plantas em frutificação e sem frutificação, em *I. paraguariensis*, mostrando variações na composição química mesmo em uma única planta (Mazzafera, 1994).

Mazzafera (1997), estudando a concentração de cafeína e ácidos fenólicos na infusão de erva-mate (chimarrão) de plantas de diferentes locais no RS, SC e PR, encontrou variações entre 0,29 e 0,79 mg/mL de cafeína e 0,70 a 1,60 mg/mL de fenóis solúveis, porém sem haver agrupamento destes de acordo com as localidades.

Na comparação entre plantas de mesma origem em tratamentos diferenciados de intensidade solar, tanto em condições naturais como em condições artificiais (sombrite), verificou-se um aumento de metilxantinas nas situações de sombreamento (Coelho *et al.*, 2000). Athayde e Schenkel (2000) estudaram metilxantinas e saponinas em quatro populações (MS, PR, SC e RS) de *I. paraguariensis* coletadas em duas épocas do ano, verão e primavera. Nas coletas de verão, a população do Mato Grosso do Sul apresentou conteúdo médio de cafeína significativamente superior aos demais, porém sem diferenças no teor de teobromina. Já na coleta de primavera, não houve diferenças significativas para os teores de cafeína e verificou-se maior teor de teobromina nas populações do PR e RS. Em relação à análise qualitativa de saponinas, foi possível a identificação de todas as saponinas descritas em *I. paraguariensis* somente na população do MS, observando-se variações sazonais nesta.

2.4 Obtenção de Extratos com Fluidos Supercríticos

A utilização de fluidos supercríticos (FSC) foi descrita pela primeira vez no pioneiro trabalho de Hannay e Hogarth (1879) no encontro da Royal Society of London, no qual foi descrita uma de suas habilidades: dissolver materiais sólidos de baixa volatilidade. Porém, somente a partir da década de 70, os FSC tornaram-se alvo de um maior interesse por parte da comunidade científica.

Os FSC encontram aplicações nos mais variados campos da Ciência e Tecnologia, tais como: processamento de alimentos, polímeros, surfactantes, fármacos e efluentes.

Os pesquisadores apontam a extração com fluido supercrítico (ESC) como um dos processos de separação do século XXI, pois o processo combina características de destilação (separação baseada em diferenças de volatilidade entre os componentes) e de extração com solventes (separação utilizada para componentes com pequena diferença de volatilidade ou que sejam termolábeis) (McHugh e Krukoniš, 1994).

Observando o diagrama $P_c \times T_c$ de uma substância pura, apresentado na Figura 2, pode-se visualizar três partes distintas: a linha que corresponde à sublimação, que vai até o

ponto comum entre as três fases (ponto triplo); a bifurcação a partir deste ponto origina a linha de fusão e a linha de vaporização. O avanço na linha de vaporização conduz a existência de um outro ponto, conhecido como ponto crítico.

Uma substância, que esteja a uma temperatura superior a T_c , encontra-se num estado denominado supercrítico e nesta condição, por maior que seja a pressão imposta à substância, não é possível liquefazê-la. A região de fluido supercrítico no diagrama $P_c \times T_c$ representa a região de interesse da ESC.

Um fluido supercrítico apresenta valores das propriedades numa posição intermediária entre um gás e um líquido.

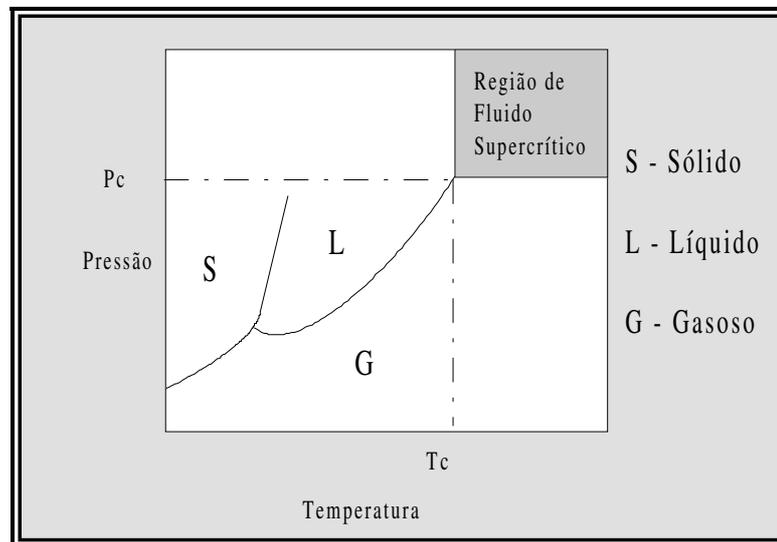


Figura 2: Diagrama $P_c \times T_c$ para uma substância pura (McHugh e Krukoni, 1994).

A densidade é mais próxima à de líquidos e 1000 vezes maior que a de gases, a difusividade é intermediária e a viscosidade é próxima a de gases. A combinação destas propriedades proporciona um maior poder de penetração em matrizes porosas e a conseqüente solubilização de solutos, bem como maior facilidade para o transporte de massa devido à característica de difusividade.

Uma característica peculiar aos fluidos supercríticos é que pequenas variações na temperatura e/ou pressão nas proximidades do ponto crítico causam grandes variações em densidade e, conseqüentemente, no poder solvente do fluido supercrítico, permitindo desta maneira extrair seletivamente compostos de interesse.

A escolha do solvente consiste num passo fundamental na extração supercrítica, a qual é um processo de separação que basicamente manipula a densidade e através desta pode ser seletiva e promover maiores rendimentos.

Em se tratando de produtos naturais o solvente necessita ser não tóxico, evitando contaminações do produto, de fácil separação, inerte e possuir uma temperatura crítica amena para evitar degradação da amostra. O dióxido de carbono atende aos itens acima e tem sido eleito pelos pesquisadores para aplicações na indústria alimentícia.

Uma típica unidade de extração supercrítica é esquematicamente apresentada na Figura 3, contendo os seguintes componentes básicos: um extrator, uma bomba de alta pressão, uma válvula de expansão e um vaso separador.

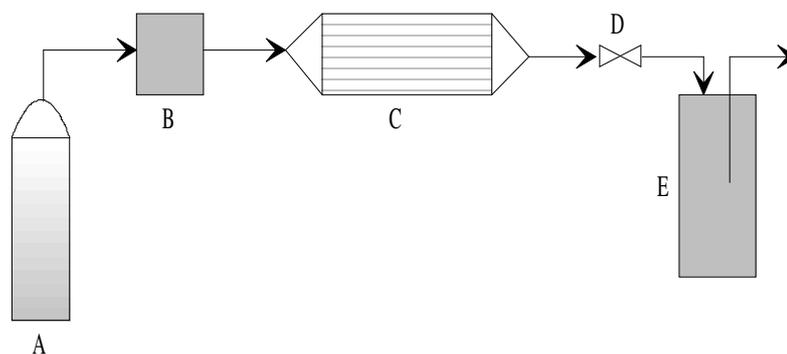


Figura 3: Esquema representativo de um processo de extração supercrítica, composto por: (A) cilindro sifonado do solvente, (B) bomba de alta pressão, (C) extrator, (D) válvula de expansão e (E) tubo coletor.

O processo, simplificado, consiste em bombear o solvente ao extrator numa pressão estabelecida, permitindo que o mesmo entre em contato com a matriz porosa e ocorra o processo de solubilização. Retira-se a mistura (soluto e solvente) do extrator, que passa por uma válvula de expansão, sendo coletada num vaso separador normalmente à temperatura ambiente, onde o soluto se deposita e o solvente separa-se naturalmente, podendo o último ser reaproveitado. Este processo é interrompido quando não se nota mais alteração da massa de soluto no vaso separador.

Em erva-mate, fluido de CO₂ supercrítico foi utilizado para extração de alcalóides purínicos onde a solubilidade da cafeína, teobromina e teofilina a este solvente é discutida (Saldaña *et al.*, 1999). Dariva *et al.* (2001) estudaram o efeito das variáveis do processamento industrial da erva-mate usando CO₂ a altas pressões, determinando que a etapa de secagem é a

maior responsável pela redução no rendimento da extração. Também foram determinadas as condições ótimas de extração que foram: temperatura de 35°C, pressão de 200 atm e fluxo de 2 g/min de CO₂.

Já, Kawakami e Kobayashi (1991), estudando os constituintes voláteis de erva-mate verde e tostada, utilizaram hidrodestilação com água e éter etílico (SDE) para obtenção do extrato o qual foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) considerando mais de 250 compostos para erva-mate. Porém a análise dos resultados foi somente qualitativa pelos baixos rendimentos obtidos e considerou todos os picos identificados pela biblioteca do sistema CG/EM, sem confirmação dos mesmos.

2.5 Análise de Extratos por CG/EM

A cromatografia a gás (CG), amplamente utilizada para a análise de compostos voláteis, é uma técnica de separação que fornece um meio rápido e fácil para determinar o número de componentes de uma mistura, a presença de impurezas em uma substância e, muitas vezes, o esclarecimento em uma primeira aproximação, sobre a identidade de um composto, sendo extremamente sensível e de aplicabilidade praticamente universal.

A espectrometria de massas (EM) é basicamente uma técnica em que os íons obtidos de uma substância, em geral orgânica, se separam segundo sua relação de massa e carga iônica, dando lugar, uma vez registrados de forma adequada, ao espectro de massas característico da substância. Os resultados registrados, em geral por um multiplicador eletrônico, são visualizados como um “espectro de massas” representado graficamente em função de seus valores respectivos de massa e carga. Estes resultados podem ser calculados como as relações da abundância e intensidade de cada massa/carga, em função do pico mais alto, atribuindo-lhe o valor arbitrário de 100, ou como percentual da soma total das intensidades de todos os íons a partir de um valor também arbitrário de massa/carga.

A utilização da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), transforma o conjunto das duas técnicas na melhor ferramenta de separação e identificação dos constituintes de uma mistura complexa. Nesta técnica, a amostra é injetada no cromatógrafo a gás e o material eluído é continuamente bombardeado por um feixe de elétrons, obtendo-se assim, o espectro de massas de cada pico cromatográfico, o qual

comparado com uma biblioteca de espectros, permite a identificação do composto (Nascimento Filho, 2002).

A utilização do CG/EM é amplamente difundida para a caracterização da composição química de óleos essenciais de diversas plantas, sendo também utilizada em erva-mate (Kawakami e Kobayashi, 1991; Dariva *et al.*, 2001).

3. VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATIVAS DE *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) USANDO MARCADORES RAPD

VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATIVAS DE *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) USANDO MARCADORES RAPD

Rogério Luis Cansian^{a*}, Altemir José Mossi^a, Oleg Leontiev-Orlov^a, Michel Luis Cechet^a,
Alexandre Zanardo de Carvalho^a, Sérgio Echeverrigaray^b

^a Departamento de Ciências Agrárias, URI-Campus de Erechim, Av. 7 de setembro, 1621.
CEP 99700-000 Erechim - RS, Brasil.

E-mail: cansian@uricer.edu.br

^b Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul – RS, Brasil. E-mail: selaguna@yahoo.com

* Para quem a correspondência deve ser enviada.

Telefone: 55-54-520-9000

Fax: 55-54-520-9090

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem ao CNPq, FAPERGS e SCT - RS pelo apoio financeiro.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a variabilidade genética intrapopulacional em três populações de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) visando a conservação genética desta espécie. Foram utilizados marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) em 30 amostras de plantas de cada população (Erechim, Barão de Cotegipe e Áurea, RS, Brasil) coletadas aleatoriamente. Um total de 189, 181 e 175 fragmentos foram gerados nas populações Erechim, Barão de Cotegipe e Áurea, respectivamente. O polimorfismo encontrado variou entre 24,9 e 36% nas três populações. O índice de similaridade médio variou entre 0,848 na população Áurea, 0,88 para Erechim e 0,934 na população Barão de Cotegipe, demonstrando diferenças na variabilidade genética nas populações estudadas. Foi observada uma maior variância intrapopulacional (0,0703 – 0,1277) em relação à variância interpopulacional (0,0420 – 0,0467), porém com distinção na distribuição das frequências alélicas. Análise de agrupamento (UPGMA) e análise de coordenadas principais permitiram separar claramente as três populações mostrando que, apesar da sua proximidade geográfica, as mesmas apresentam diferenças genéticas significativas. A separação das populações em três grupos distintos aponta para a necessidade de conservação do maior número de fragmentos de mata possível para garantir a manutenção da variabilidade genética de *Ilex paraguariensis*.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, RAPD, Variabilidade Genética.

ABSTRACT

Genetic variability of native populations of *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) as assessed using RAPD markers. The objective of this study was to determine the intrapopulational genetic variation in three populations of *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) with the view to conserve genetic diversity in this species. The populations studied were from sites near the towns of Erechim, Barão de Cotegipe and Áurea in the southern Brazilian state of Rio Grande do Sul, the sites being separated by about 30 Km. We used random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from 30 plants from each site, with 189 fragments being generated from the Erechim plants, 181 from the Barão de Cotegipe plants and 175 from the Áurea plants. The intrapopulational polymorphism of the three populations was 36% for Erechim, 33.7% for Áurea and 24.9% for Barão de Cotegipe while the Jacquard similarity (S_J) value was 0.848 for Áurea, 0.88 for Erechim and 0.934 for Barão de Cotegipe, demonstrating differences in genetic variability between the populations studied. There was also more intrapopulational (0.0703 – 0.1277) than interpopulational variance (0.0420 – 0.0467), although this was principally in regard to allele frequency. Analysis using the UPGMA and principal coordinate (PCO) analysis allowed the clear separation of the three populations showing that although the populations were geographically close they still showed significant genetic differences. The separation of these populations into three distinct groups point to the necessity of conserving the highest possible number of forest fragments in order to guarantee the maintenance of the genetic variability of *I. paraguariensis*.

Keywords: *Ilex paraguariensis*, RAPD, Genetic variability.

INTRODUÇÃO

Segundo Medrado (1996), cerca de 600 espécies representam a família Aquifoliaceae, das quais 60 ocorrem no Brasil e à qual pertence a erva-mate *Ilex paraguariensis* (St. Hil.). A erva-mate ocorre naturalmente em parte do Brasil, Argentina e Paraguai, entre as latitudes 21° e 30° S, longitudes de 48° 30' e 56° 10' W e altitudes variáveis entre 500 e 1500m. O clima predominante é subtropical temperado úmido, sem estação seca, com temperatura média do mês mais quente inferior a 22°C. A precipitação pluviométrica média anual está em torno de 1500mm. Ocorre mais freqüentemente em solos profundos, bem drenados, com baixo teor de nutrientes intercambiáveis e altos teores de alumínio (Oliveira e Rotta, 1985).

Quanto a sua botânica, esta espécie é arbórea e umbrófila. Quando adultas as árvores podem atingir de 12 a 30 metros de altura. São plantas perenes de vida relativamente longa. Trata-se de uma espécie diplóide, com 40 cromossomos (Gauer, 1999). Bonner e Holly (1974) descrevem a espécie como dióica e entomófila. O florescimento ocorre entre os meses de setembro e dezembro e a frutificação no período de janeiro a março, sendo o período produtivo entre seis e trinta anos (Da Croce *et al.*, 1994).

Através da industrialização de suas folhas e ramos, obtém-se o produto destinado à preparação de bebidas tônicas e estimulantes como chá de mate, chimarrão e tererê. Entre as qualidades medicinais e nutricionais são citados seus efeitos diuréticos e estimulantes.

A importância sócio-econômica da erva-mate para o Estado do Rio Grande do Sul é grande. Segundo dados do IBGE-1995, o Rio Grande do Sul é responsável por 53% da produção nacional de erva-mate e a Região Noroeste do Estado, dentro da qual está inserida a microrregião de Erechim, foi responsável por 15% da produção brasileira, sendo que a área plantada nesta região corresponde a 53% do total estadual.

Apesar do aumento da área cultivada com erva-mate, a produção é ainda insuficiente para atender o mercado. Assim sendo, continua a ocorrer a coleta indiscriminada de plantas nativas colocando em risco as populações naturais de *Ilex paraguariensis*. Este fato, associado ao aumento acelerado da ocupação das áreas e conseqüente redução e fracionamento das matas nativas, aumenta o risco da perda da variabilidade genética da erva-mate. Neste sentido, cabe ao Brasil a maior responsabilidade no estudo e manutenção da biodiversidade, uma vez que mais de 80% da área de distribuição da espécie *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) encontra-se em território brasileiro (Winge *et al.*, 1995). Entretanto, até agora praticamente nenhuma iniciativa oficial foi realizada, contando-se apenas com iniciativas isoladas para o estudo e

manutenção desta espécie, fator que tem contribuído para a inclusão da erva-mate entre as espécies em risco de extinção.

O melhoramento genético da erva mate é relativamente novo, sendo realizado na Argentina desde 1970 e no Brasil desde 1990 (Prat Kricun e Belingheri, 1990). Assim inúmeras informações básicas para o andamento do programa, tais como controle genético dos caracteres de importância econômica, número de medições necessárias em cada indivíduo para inferir com segurança a respeito de seu valor genotípico e superioridade de cultivares clonais sobre cultivares biparentais, não estão ainda disponíveis.

Pesquisas sobre variabilidade em erva-mate no Brasil têm sido feitas esporadicamente por diferentes grupos de pesquisa, limitando-se a materiais coletados em regiões específicas (Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Vidor *et al.*, 2002a; Vidor *et al.*, 2002b). A escassez de dados sobre a variabilidade genética desta espécie limita a possibilidade de planejamento e escolha de materiais para formação de bancos genéticos, sejam estes *in situ* e *ex situ*, limitando também a escolha de materiais para programas de melhoramento.

O presente estudo teve por objetivo determinar a variabilidade intra e interpopulacional em três populações nativas de erva-mate, geograficamente próximas da microrregião de Erechim, Rio Grande do Sul, uma das principais áreas de produção desta planta.

MATERIAL E MÉTODOS:

Material biológico. No presente trabalho foram analisadas três populações nativas de erva mate, oriundas de Barão de Cotegipe, Erechim e Áurea, RS, Brasil. Para fins deste trabalho foi considerada como população o grupo de plantas presentes numa mata contínua. Cada população foi representada por 30 plantas coletadas aleatoriamente e representando toda a área de mata amostrada. A distância mínima entre duas plantas foi de vinte metros. As folhas coletadas foram imediatamente colocadas em nitrogênio líquido, e posteriormente, armazenadas em freezer à - 80°C até a extração do DNA.

Extração de DNA. Para o isolamento de DNA total de cada planta foi utilizado o método descrito por Doyle e Doyle (1988) modificado para uso em erva-mate. O processo básico consiste em: maceração de aproximadamente 150 mg de folhas em nitrogênio líquido; adição de 750µl de tampão de extração (2% CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2% 2-Mercaptoetanol, 0,01% Proteinase K, 5mM Ácido Ascórbico, 1% PVP) e

manutenção em banho-maria por 30 min. à 65°C; desproteção com 1 volume clorofórmio - álcool isoamílico (24:1) até limpeza total do DNA; precipitação com 2/3 volume de isopropanol e lavagem com 200µl etanol 70%; ressuspensão em 150µl de TE (Trisma:EDTA - 10:1); quantificação em espectrofotômetro UV a 260nm e confirmação da integridade e pureza em espectrofotômetro UV a 280nm e em gel de agarose 0,8%.

Reação de amplificação de RAPD. Foi utilizada a reação descrita por Williams *et al.* (1991), com algumas modificações previamente testadas em erva-mate, com volume final de 25 µl: Tampão de reação (50 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl), dNTPs (200mM de cada), 0,2 mM de primer, 3 mM de MgCl₂, 0,25 mM de TRITON e 1,5 U de Taq DNA polimerase Gibco BRL (Life Technologies, São Paulo, Brazil) e aproximadamente 40ng de DNA.

Primers de RAPD. Foram utilizados os kits OPW, OPH, OPF, OPA, OPB e OPY da Operon Technologies, com 20 primers cada um, visando identificar os que apresentam os melhores resultados em erva-mate, avaliando-se a quantidade de bandas produzidas, a intensidade destas, a sua reprodutibilidade e o polimorfismo gerado pelas mesmas. Com base nos critérios descritos acima foram selecionados 15 (Tabela 1) dos 120 primers decâmicos, os quais mostraram-se adequados para a avaliação da variação inter e intrapopulacional em *I. paraguariensis*. Foram usados somente os fragmentos que apresentaram alta intensidade e reprodutibilidade em três repetições, pois a amplificação pode ser afetada por fatores como concentração de reagentes e condições de reação e amplificação (Kresovich *et al.*, 1992; Weeden *et al.*, 1992).

Amplificação de RAPD. A amplificação foi realizada em termociclador (modelo PTC 100, MJ Research INC., Watertown, MA). O processo de amplificação foi baseado na seguinte seqüência: 3 min a 92°C, 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 35°C e 2 min a 72°C. Após, 3 min a 72°C e resfriamento a 4°C até a retirada das amostras.

Análise eletroforética dos fragmentos amplificados. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,4% em tampão TBE 1X (0,089M Trisma, 0,089M Ácido bórico e 0,008M EDTA) em cuba de eletroforese horizontal. A corrida foi efetuada com voltagem constante de 90Volts. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA Ladder 100bp da Gibco BRL. A visualização dos fragmentos foi realizada com brometo de etídio e a observação feita sob luz ultravioleta. Os géis foram fotografados pelo sistema fotográfico digital GEL-PRO (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Análise dos dados. Na determinação da variabilidade genética, os dados obtidos através da determinação da presença ou ausência de bandas formaram uma matriz que foi analisada com auxílio do programa computacional NTSYS versão 1.7 (Rohlf, 1992). Os dendrogramas

foram construídos pelo algoritmo UPGMA desenvolvido por Sokal e Michener (1958), utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard. Os limites de confiança dos agrupamentos formados foram calculados pela randomização de 100 amostragens dos resultados usando o programa Winboot (Yap e Nelson, 1996). A frequência alélica foi determinada pelo percentual de fragmentos presentes em relação ao total das 30 plantas analisadas em cada população, comparando-se cada alelo nas três populações. As análises de Coordenadas Principais intra e interpopulacional foram feitas com o Pacote Estatístico Multivariado (MVSP).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando as 30 plantas representantes de cada população, foram considerados para fins de análise 189 fragmentos para a população Erechim, 181 para Barão de Cotegipe e 175 para Áurea (Tabela 1). Os fragmentos amplificados variaram entre 50 e 2200 bp. O número médio de fragmentos por primer foi de 11,7, 12,1 e 12,6 nas plantas das populações oriundas de Erechim, Barão de Cotegipe e Áurea, respectivamente, sendo relativamente baixo se comparado com o obtido por Gauer e Cavalli-Molina, 2000. Esta diferença pode ser atribuída a condições laboratoriais distintas, aos primers utilizados e, fundamentalmente, ao rigor estabelecido pelos autores na escolha dos fragmentos para análise.

O polimorfismo encontrado dentro de cada população analisada pode ser considerado baixo (36% para Erechim, 33,7% para Áurea e apenas 24,9% de polimorfismo para Barão de Cotegipe) quando comparado com outras espécies (Shrestha *et al.*, 2002; Freitas e Brehm, 2001).

Em erva-mate diferentes resultados têm sido descritos (Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Vidor *et al.*, 2002a; Vidor *et al.*, 2002b). Na Figura 1 encontra-se um gel demonstrativo do padrão de amplificação obtido nestas populações.

Tabela 1: Número total e número de fragmentos polimórficos obtidos em cada primer utilizado nas três populações analisadas.

Primer	Seqüência (5' para 3')	Total de fragmentos			Fragmentos polimórficos		
		Erechim	Barão	Áurea	Erechim	Barão	Áurea
OPA-10	GTGATCGCAG	10	13	11	3	4	6
OPA-18	AGGTGACCGT	10	10	13	2	2	5
OPB-06	TGCTCTGCCC	11	12	14	5	5	5
OPD-20	ACCCGGTCAC	14	13	8	7	4	3
OPF-04	GGTGATCAGG	18	11	14	9	3	4
OPF-12	ACGGTACCAG	13	13	13	5	4	5
OPW-06	AGGCCCGATG	13	12	10	7	4	5
OPY-04	GGCTGCAATG	13	13	12	2	3	0
OPY-07	AGAGCCGTCA	12	11	13	5	4	7
OPY-08	AGGCAGAGCA	13	14	15	2	3	2
OPY-09	AGCACCGCAC	12	12	16	3	2	4
OPY-10	CAAACGTGGG	11	12	9	2	1	4
OPY-11	AGACGATGGG	10	12	7	3	1	2
OPY-14	GGTCGATCTG	15	14	11	7	4	5
OPY-15	AGTCGCGCTT	14	9	9	6	1	2
Total		189	181	175	68	45	59
		12,6%	12,1%	11,7%	36%	24,9%	33,7%

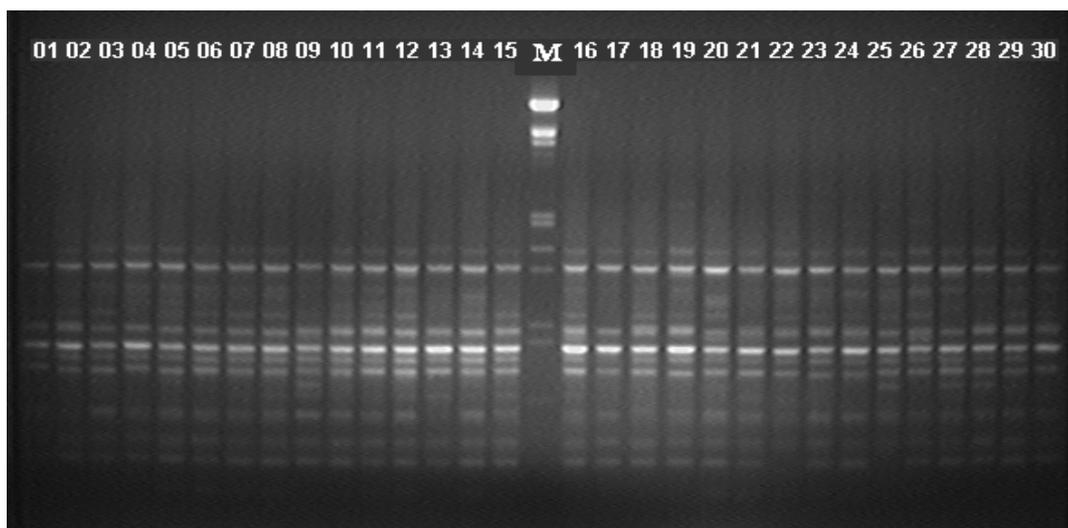


Figura 1: Gel de agarose demonstrativo, obtido com o primer OPF 12 na população Erechim (01 a 30). M = marcador de peso molecular Lambda, clivado com Hind III e Eco RI.

A similaridade (coeficiente de Jaccard) entre as 30 plantas representantes da população Erechim variou entre 0,81 e 0,98 com média de 0,880. A população de Barão de Cotegipe apresentou similaridade média de 0,934 (0,85 a 0,98). Já a população de Áurea teve similaridade média de 0,848 (0,76 a 0,98) (Tabela 2).

Tabela 2: Similaridades (S_j) intra e interpopulacional.

População	S_j	S_j	S_j	Variância	Desvio Padrão	CV %
	Médio	Mínimo	Máximo			
Erechim	0,880	0,81	0,98	0,0703	0,026	2,95
Barão de Cotegipe	0,934	0,85	0,98	0,0772	0,027	2,89
Áurea	0,848	0,76	0,98	0,1277	0,035	4,13
Barão de Cotegipe - Áurea	0,779	0,708	0,848	0,0469	0,022	2,82
Barão de Cotegipe - Erechim	0,786	0,724	0,847	0,0420	0,021	2,67
Erechim - Áurea	0,784	0,712	0,849	0,0467	0,022	2,81

Estes dados são semelhantes aos encontrados por Vidor *et al.* (2002b) na avaliação de variabilidade em ensaio de progênies de erva-mate oriundas de duas populações, os quais determinaram similaridade superior a 90% entre a maioria dos materiais analisados e entre 81 e 98,5%, considerando todos as plantas analisadas das duas populações. Porém discordam dos encontrados por Gauer e Cavalli-Molina (2000), que encontraram similaridade intrapopulacional média de $SJ = 0,343$ também utilizando marcadores RAPD. Esta divergência pode ser explicada parcialmente pela forma de amostragem de cada população nos dois estudos. O trabalho citado considerou como população, diferentes plantas distribuídas em fragmentos de matas distintos em um determinado Município. Já, no presente estudo, cada população foi amostrada em apenas um fragmento de mata de um determinado Município, o que pressupõe intercruzamentos entre as plantas da população. Quando foram analisadas conjuntamente, as 90 plantas das três populações apresentaram similaridade média de 0,818 (0,71 a 0,98), inferior à similaridade encontrada nas análises intrapopulacionais.

A análise de agrupamentos através do algoritmo UPGMA (Figura 2) permitiu separar as 90 plantas analisadas em três grupos correspondentes a cada uma das populações avaliadas. Esta separação foi confirmada pelos altos valores de significância (>94%) obtidos através de análise de “bootstrap” (Yap e Nelson, 1996). Os índices de confiança internos de cada grupo formado (dados não mostrados) foram inferiores a 50% demonstrando não haver formação de subgrupos dentro de cada uma das populações.

Uma comparação entre as variâncias, usando a matriz de similaridade, foi realizada utilizando o programa Statistica 6.0, para cada uma das populações e entre as populações (Tabela 2). Os resultados mostram que as variâncias intrapopulacionais (0,0703 a 0,1277) são maiores que as variâncias entre as populações, embora existam alelos presentes de forma diferencial nas distintas populações que permitem a separação destas. Este resultado é esperado em espécies dióicas como a erva-mate, onde a taxa de recombinação é alta pela fecundação cruzada obrigatória (Hamrick et al, 1992).

A variância calculada entre as populações, mostrou maior proximidade entre Erechim e Barão de Cotegipe (0,0420) quando comparado com Erechim e Áurea (0,0467) e Barão de Cotegipe e Áurea (0,0469). Este resultado concorda com a distribuição geográfica, uma vez que a população Erechim está a 12 Km de Barão de Cotegipe e a 20 Km de Áurea, enquanto Áurea está a 30 Km de Barão de Cotegipe.

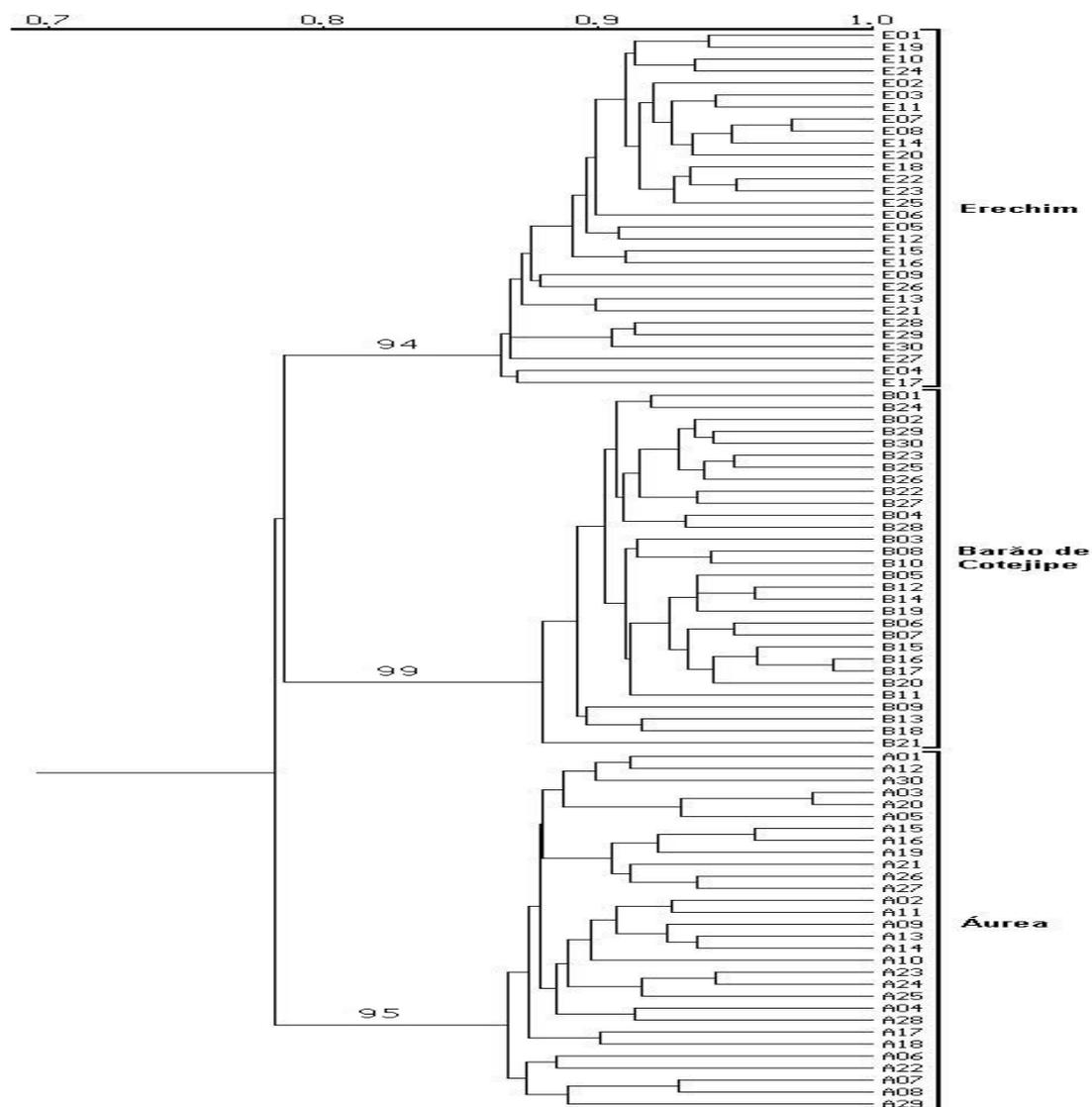


Figura 2: Dendrograma das três populações de erva-mate coletadas aleatoriamente, baseado em análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) por RAPD. Os números dentro do dendrograma referem-se aos limites de confiança dos agrupamentos.

Uma análise de coordenadas principais (PCO) usando distâncias euclidianas foi realizada para determinar agrupamentos dentro e entre populações. Esta análise mostrou separação entre as três populações, onde 23,99% do total da variação foi determinada pela coordenada 1 e 20,59%, pela coordenada 2 (Figura 3). Pode ser observada também, uma maior dispersão entre os indivíduos de Áurea em relação aos indivíduos das outras populações.

Considerando a frequência alélica das populações, 28,5% tiveram diferença de frequência superior a 50% e 56,3% foram idênticos para as três populações.

Estes resultados indicam que as plantas amostradas em cada uma das regiões apresentam fluxo gênico entre elas, ainda que com alelos em frequências distintas. Por outro lado, cabe ressaltar que a fragmentação das matas na região de estudo ocorreu somente nos últimos 100 anos, o que pode explicar a alta frequência de alelos comuns às três populações estudadas. Porém alterações ambientais ou antrópicas seguidas de seleções não intencionais ou induzidas podem alterar as frequências alélicas levando ao desaparecimento eventual de alelos de interesse agrícola ou comercial, ou que afetem direta ou indiretamente a sobrevivência da espécie (Allard, 1971).

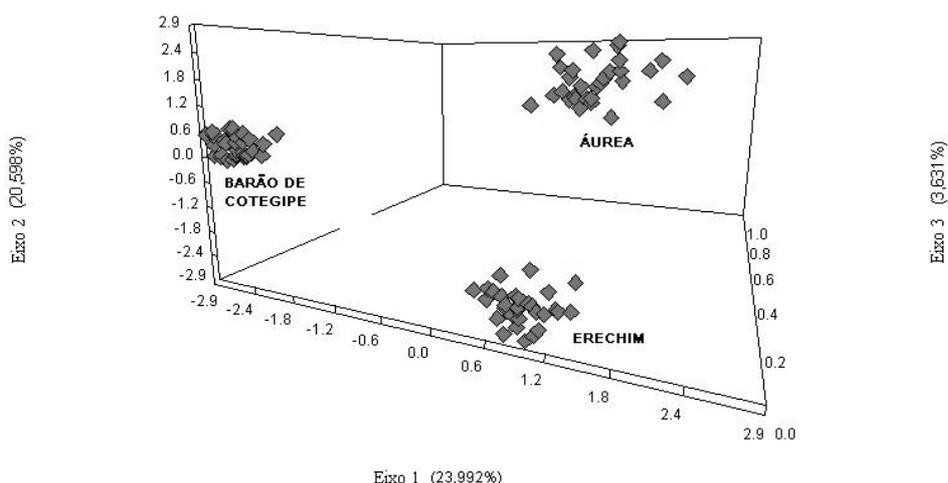


Figura 3: Análise de Coordenadas Principais por distância Euclidiana de três populações de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.), mostrando total separação entre as três populações e maior dispersão na população Áurea em relação às demais.

Assim sendo, os resultados obtidos apontam para algumas considerações no que diz respeito à conservação da base genética de *Ilex paraguariensis*. A separação genética entre as populações estudadas, levando em consideração a proximidade geográfica e a conseqüente possibilidade de fluxo gênico, indica a necessidade de conservação de um máximo possível de fragmentos de mata com a presença de erva-mate nativa para manutenção da variabilidade *in situ*, ou a coleta de um grande número de populações, definidas não pela distância geográfica, mas através de critérios genéticos, para a formação de bancos de germoplasma *ex situ*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allard, R.W., 1971. *Princípios do Melhoramento Genético das Plantas*. Edgard Brucher, Rio de Janeiro, 1971, 585p.
- Bonner, F.T.; Holly, I.L., 1974. *Seeds of woody plants in the United States*. Washington, D.C.: U.S. Forest Service/Department of Agriculture, (Handbook, 450).
- Da Croce, D.M.; Higa, A.R.; Floss, P.A., 1994. *Escolha de fontes de sementes de erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hil.) para Santa Catarina*. EPAGRI, Boletim Técnico, 23p.
- Doyle, J.; Doyle, J.L., 1988. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Am J Bot.* **75**:1238.
- Freitas, H.; Brehm, A., 2001. Genetic diversity of the Macaronesian Leafy Liverwort *Porella canariensis* inferred from RAPD markers. *J. Heredity.* **92**:339-345.
- Gauer, L., 1999. Variabilidade genética em populações naturais de erva-mate usando marcadores RAPD. MSc thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
- Gauer, L.; Cavalli-Molina, S., 2000. Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil. Aquifoliaceae) using RAPD markers. *Heredity.* **84**:647-656.
- Hamrick, J.L.; Godt, M.J.W.; Scherman-Broyles, S.L., 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests.* **6**:95-124.
- Kresovich, S.; Williams, J.G.K.; McFerson, J.R.; Routman, E.J.; Schaal, B.A., 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theor. Appl. Genet.* **85**:190-196.
- Medrado, M.J.S., 1996. Caracterização de sistemas de uso da terra e propostas de ação para o desenvolvimento dos sistemas agroflorestais no Município de Áurea RS. EMBRAPA/CNPQ, 40p.
- Oliveira Y.M.M, Rotta E., 1985. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: X Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais: silvicultura da erva-mate, Curitiba, EMBRAPA-CNPQ documentos, 15. 17-36.
- Prat Kricun, S.D.; Belingheri, L.D., 1990. Identificación y recolección de germoplasma de especies del género *Ilex* L. *Plant Genetic Resources Newsl.* **83/84**:23-24.
- Rholf, F.J., 1992. *NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Exeter Software: New York.
- Shrestha, M.K.; Golan-Goldhirsh, A.; Ward, D., 2002. Population genetic structure and the conservation of isolated populations of *Acacia raddiana* in the Negev Desert. *Biological Conservation.* **108**:119-127.

- Sokal, R.R.; Michener, C.D., 1958. *A statistical method for evaluating systematic relationships*. Univ. Sci. Bull. **38**:1409-1438.
- Vidor, M.A.; Ruiz, C.P.; Moreno, S.V.; Floss, P.A., 2002a. Molecular markers in erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) characterization studies the taste. *Ciência Rural*. **32**:415-420.
- Vidor, M.A.; Ruiz, C.P.; Moreno, S.V.; Floss, P.A., 2002b. Genetic variability in a trial of erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies. *Ciência Rural*. **32**:583-587.
- Weeden, N.F.; Muehlbauer, F.J.; Ladizinski, G., 1992. Extensive conservation of linkage relationships between pea and lentil genetic maps. *J. Heredity*. **83**:123-129.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V., 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**:6531-6535.
- Winge, H.; Wollheim, C.; Cavalli-Molina, S.; Assmann, E.M.; Bassani, K.L.L.; Amaral, M.B.; Coelho, G.C.; Freitas-Sacchet, A.M.O.; Butzke, A.; Valduga, A.T.; Mariath, J.E.A., 1995. Variabilidade genética em populações nativas de erva-mate e a implantação de bancos de germoplasma. In: *Erva-mate: Biologia e Cultura no Cone Sul*. Ed.Universidade/UFRGS Porto Alegre, RS, Brasil, 323-345.
- Yap, I.; Nelson, R.J., 1996. *Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendograms*. International Rice Research Institute. Manila, Philippines. Discussion Paper series nº 14.

**4. DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Ilex paraguariensis* (St. HIL.) NA
ÁREA DE DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE NO BRASIL.**

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Ilex paraguariensis* (St. HIL.) NA ÁREA DE DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE NO BRASIL.

Rogério Luis Cansian^{a*}, Altemir José Mossi^a, Oleg Leontiev-Orlov^a, Michel Luis Cechet^a,
Alexandre Zanardo de Carvalho^a, Sérgio Echeverrigaray^b

^a Departamento de Ciências Agrárias, URI-Campus de Erechim, Av. 7 de setembro, 1621. CEP 99700-000 Erechim - RS, Brasil.

E-mail: cansian@uricer.edu.br

^b Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul – RS, Brasil. E-mail: selaguna@yahoo.com

* Para quem a correspondência deve ser enviada.

Telefone: 55-54-520-9000

Fax: 55-54-520-9090

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem ao CNPq, FAPERGS e SCT - RS pelo apoio financeiro.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a variabilidade genética através de marcadores de RAPD em 20 populações nativas de *Ilex paraguariensis*, coletadas nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Brasil, e representantes de outras duas espécies do gênero, *I. dumosa* e *I. theezans*, visando a conservação genética desta espécie. Em comparações dentro de *I. paraguariensis*, os 24 primers selecionados geraram 291 fragmentos, dos quais 76 (26,11%) foram polimórficos, com média de 12,12 fragmentos por primer. O índice de similaridade usando coeficiente de Jaccard (S_J) variou entre 0,845 e 0,972 com média de 0,908. A análise de agrupamentos UPGMA e análise de coordenadas principais permitiram separar unicamente a população de Ponta Porã, MS das demais. O índice de polimorfismo entre as três espécies estudadas foi de 75,51% de um total de 392 fragmentos analisados. Encontraram-se 37 fragmentos específicos para *I. dumosa*, 21 para *I. theezans* e 76 para *I. paraguariensis*, os quais podem ser utilizados no controle de qualidade de erva-mate. O S_J médio entre *I. paraguariensis* e as demais espécies foi de 0,396. Os resultados indicam que a base genética de *I. paraguariensis* é relativamente estreita, colocando-a como uma espécie potencialmente em risco de extinção, apontando a necessidade de conservação em bancos de germoplasma *ex situ* definidos por critérios genéticos e a conservação de um máximo possível de fragmentos de mata com presença de erva-mate nativa para manutenção da variabilidade *in situ*.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, RAPD, diversidade genética.

ABSTRACT

Genetic diversity of *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) in the area of distribution of the specie in Brazil. The objective of this study was to determine the genetic variability using RAPD molecular markers in 20 native populations of *Ilex paraguariensis*, collected in the States of Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul, Brazil, and representatives of others two species of the genus, *I. dumosa* and *I. theezans*, aiming at the genetic conservation of this species. In comparisons inside of *I. paraguariensis*, the 24 primers selected had generated 291 fragments, of which 76 (26,11%) had been polymorphics, with average of 12,12 fragments for primer. The similarity index using the coefficient of Jaccard (S_J) varied between 0,845 and 0,972 with average of 0,908. The analysis of groupings UPGMA and principal coordinates analysis had allowed to only separate the population of Ponta Porã, MS of the remain. The index of polymorfism between the three studied species was of 75,51% of a total of 392 analyzed fragments. Had been gotten 37 specific fragments for *I. dumosa*, 21 for *I. theezans* and 76 for *I. paraguariensis*, which can be used in the quality control of maté. The average S_J between *I. paraguariensis* and the other species were of 0,396. The results indicate that the genetic base of *I. paraguariensis* is relatively narrow, placing it as a specie potentially in extinguishing risk, pointing the necessity of conservation of a possible maximum of fragments of forest with presence of native maté with respect to the maintenance of the variability *in situ*.

Key-words: *Ilex paraguariensis*, RAPD, genetic diversity.

INTRODUÇÃO

Ilex paraguariensis (St. Hil.) é uma árvore perene nativa da América do Sul, pertencente à família *Aquifoliaceae*. Ela é historicamente usada como bebida estimulante, diurética e digestiva, preparada pela infusão de folhas e ramos secos em água quente (chimarrão) ou fria (tererê). A área de dispersão natural de *Ilex Paraguarensis* (erva-mate) abrange aproximadamente 540.000 km², compreendendo territórios do Brasil, Argentina e Paraguai. Só no Brasil estão situados 450.000 Km² do total. No Brasil sua área de dispersão inclui a região centro-norte do Rio Grande do Sul, quase todo o Estado de Santa Catarina, centro-sul e sudoeste do Paraná, sul de Mato Grosso do Sul e manchas em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, associada à mata de araucária.

Na antiguidade, a maior parte do mate produzido no Sul do Brasil, provinha de ervais nativos. Paralelamente à queda de sua produção, pela exploração contínua e avanço da agricultura, houve um aumento na demanda do produto, tanto no mercado interno como no externo. Desse modo, tornou-se prática comum o plantio dessa espécie. Entretanto, o plantio em áreas adensadas (monocultura) e a não seleção de matrizes para a coleta de sementes, têm gerado problemas para a industrialização do mate como, por exemplo, à intensificação do sabor amargo, quando utilizado em infusão. Este problema levou as indústrias a preferirem a erva-mate nativa, pois segundo os industriais gera chimarrão menos amargo. Além disso, apesar do aumento da área cultivada com erva-mate, a produção ainda é insuficiente para atender o mercado. Este fato, associado ao processo de desmatamento aumenta o risco de perda da variabilidade genética da erva-mate. O Brasil, com mais de 80% da área de distribuição da espécie (Winge *et al.*, 1995), tem a maior responsabilidade no estudo e manutenção da biodiversidade de *Ilex paraguariensis*. Pesquisas sobre variabilidade em erva-mate no Brasil têm sido desenvolvidas esporadicamente por alguns grupos de pesquisadores, em materiais coletados em regiões específicas (Winge *et al.*, 1995; Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Vidor *et al.*, 2002a; Vidor *et al.*, 2002b).

Assim sendo, o presente estudo teve por objetivo determinar a variabilidade genética de diferentes populações nativas de *Ilex paraguariensis* coletadas em diferentes regiões de ocorrência da espécie no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS:

Material biológico: Foram analisadas vinte populações nativas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil), oriundas de quatro diferentes Estados, abrangendo toda a área de ocorrência da espécie no Brasil (Figura 1).

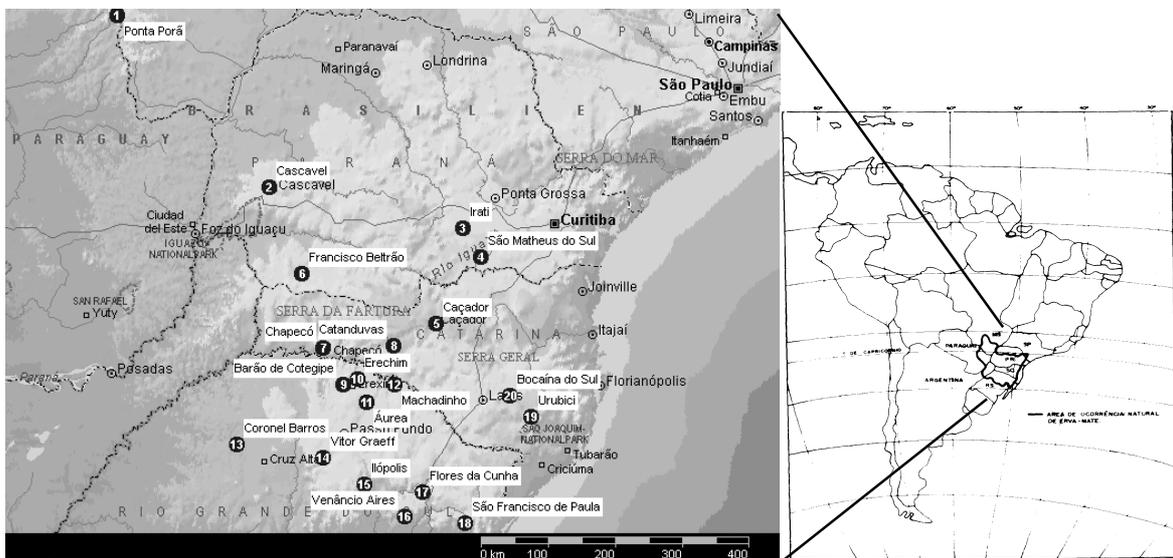


Figura 1: Locais de coleta e área de distribuição natural da erva-mate (Da Croce e Floss, 1999).

Foi considerada como população o grupo de plantas presentes numa mata contínua e isoladas geograficamente. Cada população foi representada por 30 plantas adultas coletadas aleatoriamente e representando toda a área de coleta. A distância mínima entre duas plantas foi de vinte metros. Além destas, para uma comparação genética interespecífica, foram coletadas uma população de *Ilex dumosa* e outra de *Ilex theezans*, ambas em Erechim RS, usando os mesmos critérios. As folhas coletadas foram identificadas e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido, e posteriormente, armazenadas em freezer à -80°C até a extração do DNA.

Extração de DNA: A extração do DNA foi realizada com quantidades iguais (0,1 g por planta) de tecido foliar de 10 plantas da cada população, formando-se três “bulks” por população analisada. Para o isolamento de DNA total de cada planta foi utilizado o método descrito por Doyle e Doyle (1988) modificado para uso em erva-mate. O processo básico consiste em: maceração de aproximadamente 150 mg de folhas em nitrogênio líquido; adição de 750µl de tampão de extração (2% CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2% 2-Mercaptoetanol, 0,01% Proteinase K, 5mM Ácido Ascórbico, 1% PVP) e manutenção em banho-maria por 30 min. à 65°C ; desproteínização com 1 volume clorofórmio - álcool isoamílico (24:1) até limpeza total do DNA; precipitação com 2/3 volume de

isopropanol e lavagem com 200µl etanol 70%; ressuspensão em 150µl de TE (Trisma:EDTA - 10:1); quantificação em espectrofotômetro UV a 260nm e confirmação da integridade e pureza em espectrofotômetro UV a 280nm e em gel de agarose 0,8%.

Reação de amplificação de RAPD. Foi utilizada a reação descrita por Williams *et al.* (1991), com algumas modificações previamente testadas em erva-mate com um volume total de 25 µl por reação: Tampão de reação (50 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl), dNTPs (200mM de cada), 0,2 mM de primer, 3 mM de MgCl₂, 0,25 mM de TRITON e 1,5 U de Taq DNA polimerase Gibco BRL (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e 40ng de DNA.

Primers de RAPD. Foram utilizados os kits OPA, OPB, OPD, OPF, OPH, OPW e OPY (Operon Technologies, Inc. Alameda, CA) com 20 primers cada um. Os 24 primers utilizados foram selecionados de um total de 140 primers decaméricos, baseando-se nos resultados em *Ilex paraguariensis* (Cansian *et al.*, 2003) tendo sido avaliados a quantidade, intensidade, reprodutibilidade e o polimorfismo gerado pelos mesmos. Para fins de avaliação, foram considerados somente os fragmentos amplificados que apresentaram alta intensidade e reprodutibilidade, determinados por três repetições de amplificação.

Amplificação de RAPD. A amplificação foi realizada em termociclador (modelo PTC 100, MJ Research INC., Watertown, MA). O processo de amplificação foi baseado na seguinte seqüência: 3 min a 92°C, 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 35°C e 2 min a 72°C. Após, 3 min a 72°C e resfriamento a 4°C até a retirada das amostras.

Análise eletroforética dos fragmentos amplificados. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,4% em tampão TBE 1X (0,089M Trisma, 0,089M Ácido bórico e 0,008M EDTA) em cuba de eletroforese horizontal. A corrida foi efetuada com voltagem constante de 90Volts. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA Ladder 100bp da Gibco BRL e DNA Lambda clivado com Hind III e Eco RI. A visualização dos fragmentos foi realizada com brometo de etídio e a observação feita sob luz ultravioleta. Os géis foram fotografados pelo sistema fotográfico digital GEL-PRO (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Para cada primer selecionado foram feitos três géis, cada um com uma repetição de cada população amostrando 10 plantas.

Análise dos dados. Na determinação da variabilidade genética, os dados obtidos através da determinação da presença ou ausência de bandas formaram uma matriz que foi analisada com auxílio do Pacote Estatístico Multivariado (MVSP). Os dendrogramas foram construídos pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), desenvolvido por Sokal e Michener (1958), utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard. Os limites de confiança dos agrupamentos formados foram calculados pela randomização de 100 amostragens

dos resultados usando o programa Winboot (Yap e Nelson, 1996). A análise de coordenadas principais intra e interespecífica foi feita pelo programa MVSP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 24 primers decaméricos selecionados para avaliar a variabilidade genética entre as 20 populações de *Ilex paraguariensis* estudadas geraram um total de 291 fragmentos, dos quais 76 (26,11%) foram polimórficos. Os fragmentos avaliados variaram entre 100 e 2200 bp. O número médio de fragmentos por primer foi de 12,12 (Tabela 1). O nível de polimorfismo encontrado está abaixo do esperado para plantas obrigatoriamente alógamas como a erva-mate que é uma espécie dióica (Weinsing *et al.*, 1995). Em erva-mate, diferentes resultados têm sido descritos (Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Vidor *et al.*, 2002a; Vidor *et al.*, 2002b).

Tabela 1: Número total, número de fragmentos polimórficos e número de fragmentos espécie específicos obtidos em cada primer utilizado, nas populações analisadas.

Primer	Seqüência (5' para 3')	<i>I. paraguariensis</i>			<i>I. dumosa</i>	<i>I. theezans</i>
		Total de fragmentos	Fragmentos polimórficos	Fragmentos específicos	Fragmentos específicos	Fragmentos específicos
OPA-06	GGTCCCTGAC	8	4	3	1	1
OPA-15	TTCCGAACCC	13	6	-	-	1
OPB-04	GGACTGGAGT	14	2	3	2	1
OPB-05	TGCGCCCTTC	12	2	5	3	3
OPB-06	TGCTCTGCCC	12	2	3	2	1
OPB-10	CTGCTGGGAC	12	5	4	-	1
OPB-15	GGAGGGTGTT	12	2	5	4	1
OPB-17	AGGGAACGAG	8	2	-	2	1
OPD-20	ACCCGGTCAC	12	2	2	1	1
OPF-04	GGTGATCAGG	8	1	4	1	1
OPF-12	ACGGTACCAG	12	4	2	1	1
OPF-16	GGAGTACTGG	15	4	4	1	2
OPH-11	CTTCCGCAGT	11	4	2	-	-
OPW-10	TCGCATCCCT	11	1	3	2	1
OPW-17	GTCCTGGGTT	13	6	2	-	-
OPW-18	TTCAGGGCAC	17	3	5	2	-
OPW-20	TGTGGCAGCA	8	1	1	1	1
OPY-04	GGCTGCAATG	11	1	4	5	1
OPY-07	AGAGCCGTCA	17	9	2	-	-
OPY-10	CAAACGTGGG	15	6	4	1	-
OPY-12	AAGCCTGCGA	8	3	2	-	-
OPY-14	GGTCGATCTG	15	2	2	2	-
OPY-15	AGTCGCGCTT	13	2	6	4	2
OPY-20	AGCCGTGGAA	14	2	5	2	1
Total		291	76	73	37	21
		(12,12)	(26,11%)			

Cabe salientar que no presente estudo foram utilizados “bulks” de 10 plantas de cada acesso. O uso de bulks, amostras agrupadas pela mistura de quantidades iguais de DNA de indivíduos de uma população, tem grande potencial no estudo de diversidade e parentesco genético entre populações, quando se selecionam indivíduos ao acaso na população a fim de representar todos os genes em segregação nesta, permitindo-se assim estimar que polimorfismos encontrados representem diferenças entre as populações e reduzindo a possibilidade de ter-se polimorfismos de apenas uma planta que se encontre segregando na população (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Kraft e Säll, 1999). Este sistema tem uma tendência de aumentar a similaridade detectada, pelo mesmo motivo. Cansian (1999) estudando populações de brássica determinou que bulks com 10 plantas são seguramente representativos da população em espécies alógamas. Na figura 2 encontra-se um gel demonstrativo do padrão de amplificação obtido nestas populações.

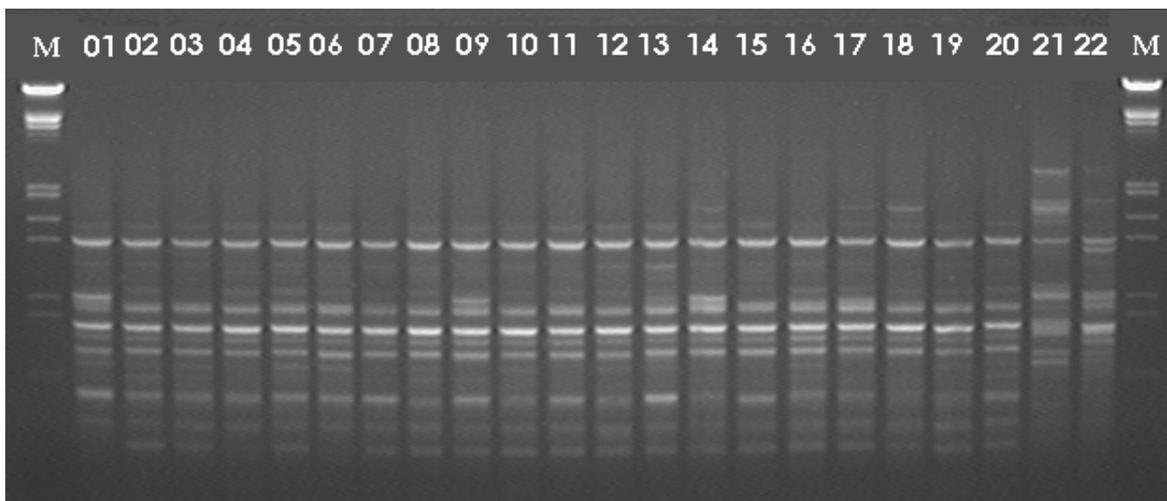


Figura 2: Gel de agarose demonstrativo, obtido com o primer OPF-12, mostrando o perfil de amplificação em *I. paraguariensis* (01 a 20) e fragmentos específicos de *I. dumosa* (21) e *I. theezans* (22). M = marcador de peso molecular Lambda, clivado com Hind III e Eco RI.

A similaridade (Coeficiente de Jaccard) entre as 20 populações de *I. paraguariensis* estudadas variou entre 0,845 e 0,972 com média de 0,908. Estes dados são semelhantes aos encontrados por Vidor *et al.* (2002b), que encontraram similaridade superior a 90% entre a maioria dos materiais analisados de um ensaio de progênies de duas populações de erva-mate.

A análise de agrupamentos através do algoritmo UPGMA (Figura 3) permitiu separar as 20 populações analisadas em dois grupos. O primeiro formado pela população de Ponta Porã no Mato Grosso do Sul e o segundo pelas demais populações da Região Sul do Brasil. Esta separação foi confirmada pelo alto índice de significância (98%) obtido através da

análise de “bootstrap” pelo programa Winboot. Os índices de confiança entre os agrupamentos das demais populações foram inferiores a 40%, demonstrando não haver formação de subgrupos dentro de cada uma das populações. As três repetições formadas por 10 diferentes plantas de cada população analisada agruparam-se em todas as populações analisadas, com índice de similaridade entre 0,949 e 0,996, mostrando haver similaridade entre estas. Evidenciou-se também a sensibilidade da análise de RAPD para separar todas as populações.

Cansian *et al.* (2003), estudando a variabilidade intrapopulacional de três populações também utilizadas neste estudo (Áurea, Barão de Cotegipe e Erechim), determinaram que as variâncias intrapopulacionais são maiores que as variâncias interpopulacionais, concordando com os resultados obtidos por Cavalli-Molina *et al.* (2000).

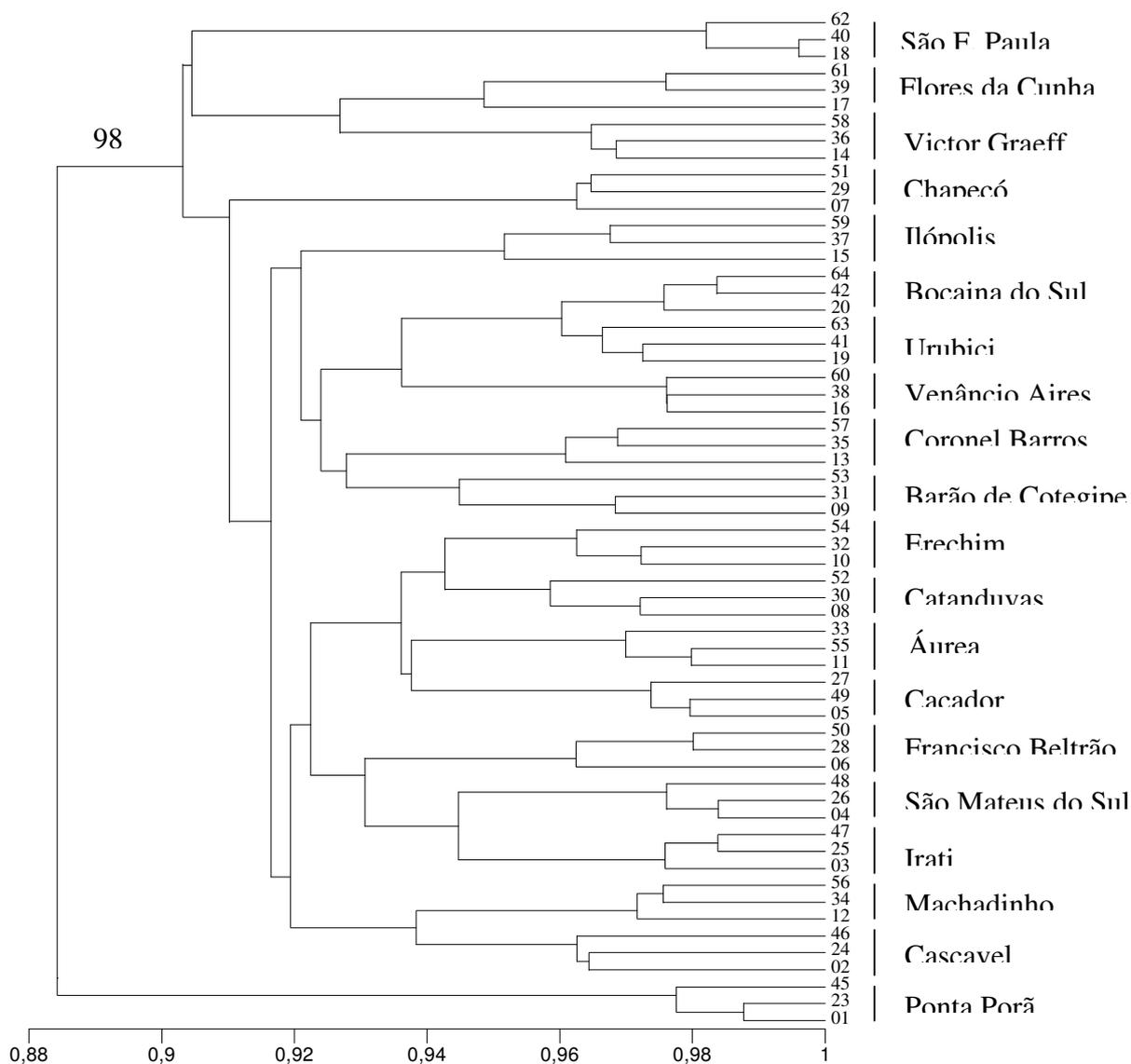


Figura 3: Dendrograma das 20 populações de *I. paraguariensis* determinado por RAPD, usando coeficiente de Jaccard e agrupamento UPGMA.

Uma análise de coordenadas principais (PCO) usando distâncias euclidianas foi realizada para determinar o agrupamento entre as populações. Esta análise confirmou a separação da população de Ponta Porã das demais populações, onde apenas 11,96% da variação foi determinada pela coordenada 1, 9,04% pela coordenada 2 e 8,74% pela coordenada 3, mostrando não haver fatores preponderantes que expliquem esta separação.

Segundo Joly *et al.*, (1999), gravações palinológicas do Sudeste do Brasil, provam que as trocas climáticas do Pleistoceno tiveram um grande impacto na distribuição da fisionomia florestal, bem como na composição e distribuição das espécies. Até 7.000 anos atrás, espécies das famílias *Poaceae* e *Asteraceae* dominavam as áreas hoje ocupadas pela floresta de araucária, na qual ocorre a erva-mate. A expansão da floresta de araucária para a região Sul do Brasil ocorreu somente no final do período frio, mas já úmido, à aproximadamente 4000 anos, sendo que em regiões mais frias, a menos de 2500 anos. Assim, pode-se supor que o baixo polimorfismo encontrado em erva-mate ocorra pelo estreitamento da base genética desta espécie, onde somente genótipos mais adaptados às condições climáticas da época, foram favorecidos no processo de expansão da espécie para a região Sul do Brasil. Outra possibilidade é que a presença de erva-mate nas atuais áreas de ocorrência seja bastante recente, diminuindo a possibilidade de variabilidade genética causada por cruzamentos.

As populações de *I. paraguariensis* foram comparadas com duas outras espécies do mesmo gênero, *I. dumosa* e *I. theezans* (Figura 4). O índice de polimorfismo entre as espécies foi de 75,51%, de um total de 392 fragmentos analisados. Encontraram-se 37 fragmentos específicos para *I. dumosa* e 21 para *I. theezans*. Outros 40 fragmentos estavam presentes somente nestas duas espécies. A presença de 76 fragmentos monomórficos para *I. paraguariensis* e ausentes nos dois outros gêneros estudados indica a possibilidade de construção de primers de PCR específicos, os quais poderiam ser utilizados para identificação desta espécie, como já realizado em outras espécies (Weising *et al.*, 1995) e, eventualmente, testagem da presença de plantas adulterantes no produto chimarrão. Estes resultados mostram a eficiência da técnica de RAPD para a distinção entre espécies, embora mais estudos, com um maior número de representantes de cada espécie, sejam necessários para a confirmação de fragmentos espécie específicos.

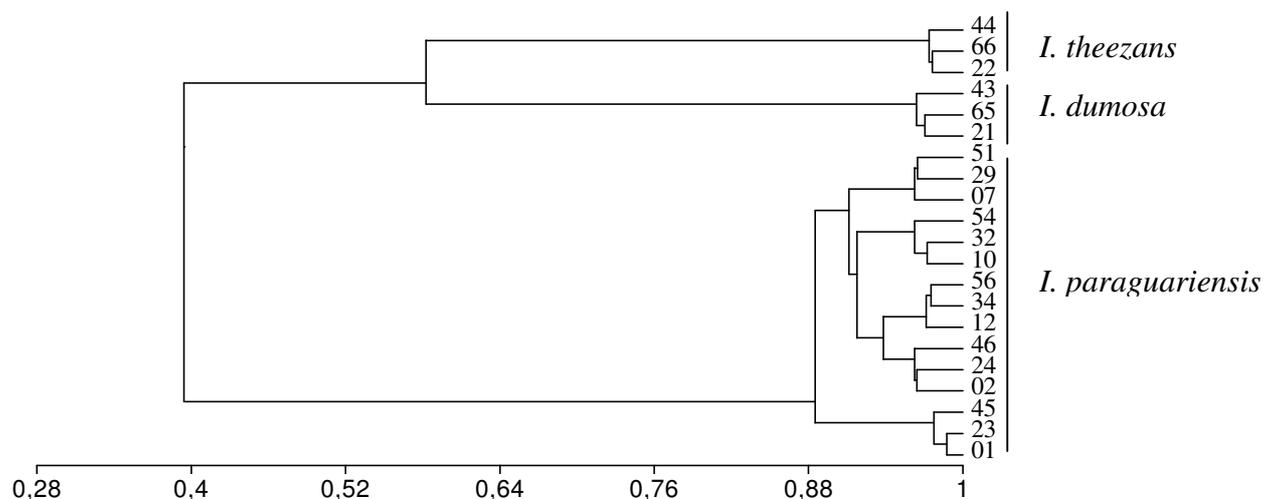


Figura 4: Dendrograma de três espécies de *Ilex*, determinado por RAPD, usando coeficiente de Jaccard e agrupamento UPGMA.

O índice de similaridade médio entre *I. paraguariensis* e as demais espécies foi de 0,396, enquanto que a similaridade média entre *I. dumosa* e *I. theezans* foi de 0,583. A análise de coordenadas principais (PCO) entre as populações de *I. paraguariensis* e as duas outras espécies (Figura 5) confirmou a separação das três espécies, além da separação da população de Ponta Porã das demais populações de erva-mate, com 51,48% da variação determinada pela coordenada 1, 9,76% pela coordenada 2 e 4,55% pela coordenada 3.

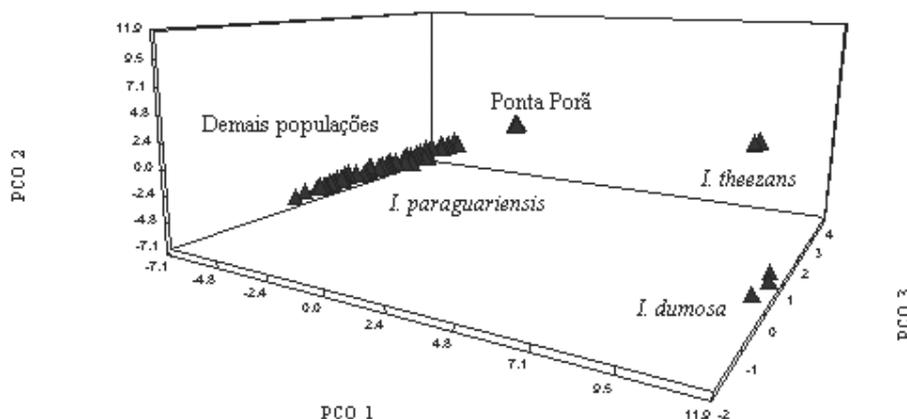


Figura 5: Análise de Coordenadas Principais por distância Euclidiana das 20 populações de *I. paraguariensis* analisadas, *I. dumosa* e *I. theezans*, mostrando a separação da população de Ponta Porã e das três espécies.

Um agrupamento dos diferentes locais de coleta de erva-mate, levando em consideração latitude, longitude, vegetação, temperatura média anual, clima (segundo classificação de Koppen), geomorfologia e tipos de solo encontra-se na Figura 6. Estes fatores combinados separam a região de Ponta Porã, MS das demais regiões, formando outros agrupamentos de acordo com a similaridade das regiões. Comparando-se este agrupamento com o dendrograma gerado por RAPD, observa-se que em ambos os dendrogramas a população Ponta Porã forma um grupo independente. Porém as demais populações não agruparam-se similarmente nos dois dendrogramas. As diferenças ambientais entre as demais regiões de coleta consideradas, não foram suficientes para explicar as diferenças genéticas encontradas.

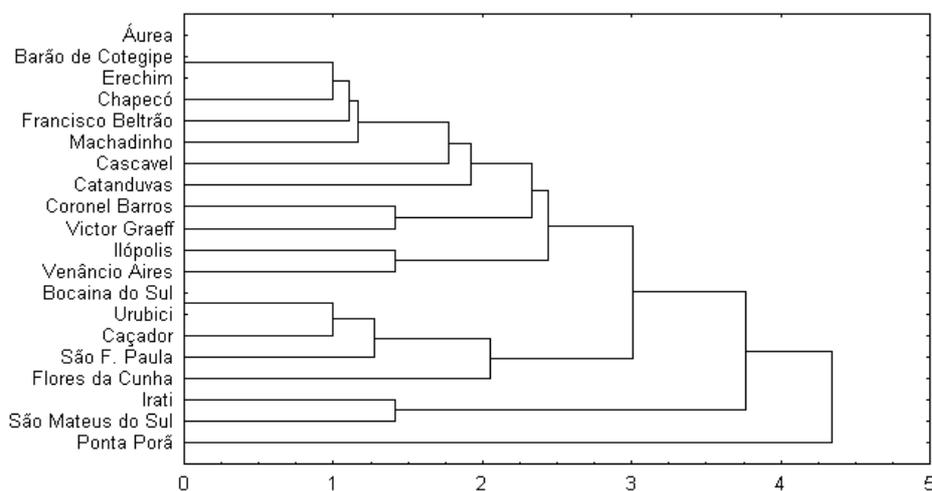


Figura 6: Agrupamento UPGMA com distâncias Euclidianas das 20 populações analisadas, com base em características ambientais de cada local (latitude, longitude, altitude, temperatura média anual, vegetação, classificação climática de Koppen, geomorfologia e tipo de solo).

Estes resultados levam a concluir que análises genéticas, baseadas em marcadores moleculares são necessárias para a conservação da variabilidade de *Ilex paraguariensis*. Por outro lado, os resultados mostraram que a base genética de *Ilex paraguariensis* é relativamente estreita, colocando-a como uma espécie potencialmente em risco de extinção, caso a exploração de ervais nativos permaneça no ritmo atual. Neste sentido, impõe-se a necessidade de conservação de um máximo possível de fragmentos de mata com presença de erva-mate nativa para manutenção da variabilidade *in situ*, ou a coleta de um grande número

de populações definidas por critérios genéticos, para a formação de bancos de germoplasma *ex situ* (Cansian *et al.*, 2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cansian, R.L., 1999. Análise de RAPD aplicada à identificação de cultivares e avaliação da variabilidade genética em *Brassica*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS.
- Cansian, R.L.; Mossi, A.J.; Leontiev-Orlov, O.; Cechet, M.L.; Carvalho, A. Z.; Echeverrigaray, S., 2003. Genetic variability of native populations of *Ilex paraguariensis* St. Hil as assessed using RAPD markers. *Heredity* (submetido).
- Cavalli-Molina, S.; Winge, H.; Gauer, L.; Gregianini, T.H., 2000. Variabilidade genética em populações naturais de erva-mate. In: Anais do 2º Congresso Sul-Americano da erva-mate. Encantado. 111-115.
- Da Croce, D.M.; Floss, P.A., 1999. Cultura da erva-mate no Estado de Santa Catarina. EPAGRI – Empresa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. Boletim Técnico nº 100. Florianópolis.
- Doyle, J.; Doyle, J. L., 1988. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Am J Bot.* **75**:1238.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D., 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220p.
- Gauer, L.; Cavalli-Molina, S., 2000. Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil, Aquifoliaceae) using RAPD markers. *Heredity*. **84**:647-656.
- Joly, C.A.; Aidar, M.P.M.; Klink, C.A.; McGrath, D.G.; Moreira, A.G.; Moutinho, P.; Nepstad, D.C.; Oliveira, A.A.; Pott, A.; Rodal, M.J.N.; Sampaio, E.V.S.B., 1999. Evolution of the Brazilian phytogeography classification systems: implications for biodiversity conservation. *Ciência e Cultura*. **51(5/6)**:331-348.
- Kraft, T.; Säll, T. 1999. An evaluation of the use of pooled samples in studies of genetic variation. *Heredity* **82**: 488-494.
- Sokal, R.R.; Michener, C.D., 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Sci. Bull.* **38**:1409-1438.
- Vidor, M.A.; Ruiz, C.P.; Moreno, S.V.; Floss, P.A., 2002a. Molecular markers in erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) characterization studies: the taste. *Ciência Rural*. **32**:415-420.
- Vidor, M.A.; Ruiz, C.P.; Moreno, S.V.; Floss, P.A., 2002b. Genetic variability in a trial of erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) progenies. *Ciência Rural*. **32**:583-587.

- Weising, K.; Nybom, H.; Wolff, K.; Meyer, W., 1995. DNA Fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V., 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**:6531-6535.
- Winge, H.; Ferreira, A.G.; Mariath, J.E.A.; Tarasconi, L.C., 1995. Variabilidade genética em populações nativas de erva-mate e a implantação de bancos de germoplasma. In: *Erva-mate: Biologia e Cultura no Cone Sul*. Ed.Universidade/UFRGS Porto Alegre, RS, Brasil, 1995, 323-345.
- Yap, I.; Nelson, R.J., 1996. Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendograms. International Rice Research Institute. Manila, Philippines. Discussion Paper series nº 14.

5. VARIAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E SEMI-VOLÁTEIS DE EXTRATOS DE POPULAÇÕES NATIVAS DE *Ilex paraguariensis* (St. HIL.) DO BRASIL.

VARIAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E SEMI-VOLÁTEIS DE EXTRATOS DE POPULAÇÕES NATIVAS DE *Ilex paraguariensis* (St. HIL.) DO BRASIL.

Rogério Luis Cansian^{a*}, Altemir José Mossi^a, Oleg Leontiev-Orlov^a, Michel Luis Cechet^a,
Marcelo Fernando Pinto^a, Márcio Mazutti^a, José Vladimir de Oliveira^a, Sérgio
Echeverrigaray^b

^a Departamento de Ciências Agrárias, URI-Campus de Erechim, Av. 7 de setembro, 1621.
CEP 99700-000 Erechim - RS, Brasil.

E-mail: cansian@uricer.edu.br

^b Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul – RS, Brasil.

E-mail: selaguna@yahoo.com

* Para quem a correspondência deve ser enviada.

Telefone: 55-54-520-9000

Fax: 55-54-520-9090

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem ao CNPq, FAPERGS e SCT - RS pelo apoio financeiro.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a variabilidade química dos compostos voláteis e semivoláteis em 20 populações nativas de *Ilex paraguariensis* coletadas nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Brasil. As análises foram feitas com quantidades iguais de folhas coletadas aleatoriamente de 30 plantas, formando-se três bulks de 10 plantas por população analisada. A análise química foi realizada com extrato obtido através de CO₂ supercrítico. O rendimento de extração por CO₂ supercrítico variou entre 0,589 e 0,858 g/100g de material seco, porém sem diferença estatística. As análises cromatográficas (GC-MS) dos extratos permitiram a identificação positiva de 7 compostos: cafeína, teobromina, fitol, esqualeno, vitamina-E, eicosano e stigmasterol, além de 5 hidrocarbonetos, 2 aldeídos, 2 álcoois, 1 composto cetônico e 1 aromático, identificados através da biblioteca do sistema CG/EM. As diferenças entre as médias de cada composto sugerem haver baixa variação química entre as populações para a maioria dos compostos analisados (Tukey $p = 0,05$). Um agrupamento usando distâncias euclidianas e UPGMA das diferenças químicas entre as populações para os compostos analisados, mostra uma maior similaridade entre as repetições de cada população, porém estes agrupamentos diferem do agrupamento ambiental. Estes resultados levam a concluir que para a formação de uma coleção visando manter a variabilidade da espécie, coletas baseadas na distribuição geográfica ou análise da composição química são insuficientes, sendo necessário à execução de análises genéticas. Por outro lado, as diferenças químicas encontradas entre as diversas populações sugerem que análises químicas podem ser usadas quando se busca plantas com determinadas características químicas para uso industrial, embora condições específicas do local de plantio possam ter influência nos resultados obtidos.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, variabilidade química, erva-mate.

ABSTRACT

On the volatiles and semi-volatiles composition of the extracts of native growing Brazilian *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) The main objective of this work was to determine the distribution of volatile and semi-volatile chemical components present in 20 native populations of *Ilex paraguariensis* collected from Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul states, Brazil. Samples were collected with equal amount of leaves, randomly from 30 plants, comprising then 3 bulks of 10 plants for each population analyzed. Chemical analyses were carried out in a GC/MS equipment using the extracts obtained from supercritical CO₂ (SCCO₂). The extraction yield from SCCO₂ varied in the range of 0.589 - 0.858 g/100g of dried material. Chemical analysis permitted to identify positively 7 major components: caffeine, teobromine, phytol, squalene, vitamin-E, eicosane, and stigmasterol, and 5 hydrocarbon substances, 2 aldeides, 2 alcohols, 1 ketone and 1 aromatic, identified from internal library equipment. For most components analysed, the differences observed in the mean for each compound suggest low chemical variation among populations (Tukey $p = 0.05$). The use of a group using Euclidian distances and UPGMA of chemical differences among populations for each compound shows a greater similarity among repetitions, but differing from the environmental grouping. These results allow us to conclude that to form a collection towards keeping the species variability, collect process based on the geographical distribution or chemical composition are not sufficient, arising the need of performing genetic analysis. On the other hand, chemical differences found in different populations suggest that chemical analysis might be useful when one looks for plants with certain chemical characteristics for industrial use, though one should take into account that specific conditions may affect the results obtained.

Key-words: *Ilex paraguariensis*, maté, chemical variability.

INTRODUÇÃO

Ilex paraguariensis (St. Hil.) é uma árvore perene nativa da América do Sul, pertencente à família *Aquifoliaceae*. Ela é historicamente usada como bebida estimulante, diurética e digestiva, preparada pela infusão de folhas e ramos secos em água quente (chimarrão) ou fria (tererê). A área de dispersão natural de *Ilex Paraguarensis* (erva-mate) abrange aproximadamente 540.000 km², compreendendo territórios do Brasil, Argentina e Paraguai. Só no Brasil estão situados 450.000 Km² do total. No Brasil sua área de dispersão inclui a região centro-norte do Rio Grande do Sul, quase todo o Estado de Santa Catarina, centro-sul e sudoeste do Paraná, sul de Mato Grosso do Sul e manchas em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, associadas à mata de araucária (Oliveira e Rotta, 1985).

O interesse terapêutico com relação à erva-mate é bastante expressivo, estando presente em várias farmacopéias (Imbesi, 1964). Existem evidências de que as substâncias contidas na erva como: xantinas, cafeína, teobromina, substâncias tânicas, flavonóides e vitaminas, exercem ações sobre o sistema cardiovascular, respiratório, tecido muscular e trato gastrintestinal apresentando também propriedades estimulantes sobre o sistema nervoso central, anti-reumática e diurética (Bassani e Campos, 1997).

Desde a constatação da presença de metilxantinas em *I. paraguariensis* muitos relatos têm sido publicados a respeito dos teores desses metabólitos secundários, tanto nas folhas, talos ou frutos, como no produto erva-mate, utilizando diversas metodologias para sua extração e quantificação. Entretanto existem poucos trabalhos sobre a variabilidade de populações de erva-mate no que se refere à concentração de metilxantinas e, menos ainda, utilizando um espectro maior de compostos químicos.

Athayde e Schenkel (2000), estudando cafeína e teobromina em quatro populações (MS, PR, SC e RS) de *I. paraguariensis*, verificaram diferenças entre as plantas do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul no que se refere ao teor destas substâncias. As plantas do MS apresentaram um teor médio de cafeína mais elevado, e as plantas do RS apresentaram valores menores. Por outro lado, na soma dos valores de teobromina e cafeína, não foram detectadas diferenças significativas.

Em erva-mate, fluido de CO₂ supercrítico foi utilizado para extração de alcalóides purínicos onde a solubilidade da cafeína, teobromina e teofilina neste solvente é discutida (Saldaña *et al.*, 1999). Dariva *et al.* (2001) estudaram o efeito das variáveis do processamento industrial da erva-mate usando CO₂ a altas pressões, determinando que a etapa de secagem é a maior responsável pela redução no rendimento da extração.

Com relação à conservação, o Brasil, com mais de 80% da área de distribuição da espécie (Winge *et al.*, 1995), tem a maior responsabilidade no estudo e manutenção da biodiversidade de *Ilex paraguariensis*.

Assim sendo, o presente estudo teve por objetivo determinar a variabilidade química de diferentes populações nativas de *Ilex paraguariensis* coletadas em diferentes regiões de ocorrência da espécie no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS:

Material biológico: Foram analisadas vinte populações nativas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), oriundas de quatro diferentes Estados, abrangendo toda a área de ocorrência da espécie no Brasil (Figura 1). Os locais de coleta foram: Áurea, Barão de Cotequipe, Coronel Barros, Erechim, Flores da Cunha, Ilópolis, Machadinho, São Francisco de Paula, Venâncio Aires e Victor Graeff no Rio Grande do Sul; Bocaina do Sul, Caçador, Catanduvas, Chapecó e Urubici em Santa Catarina; Cascavel, Irati, Francisco Beltrão e São Mateus do Sul no Paraná; e Ponta Porã no Mato Grosso do Sul.

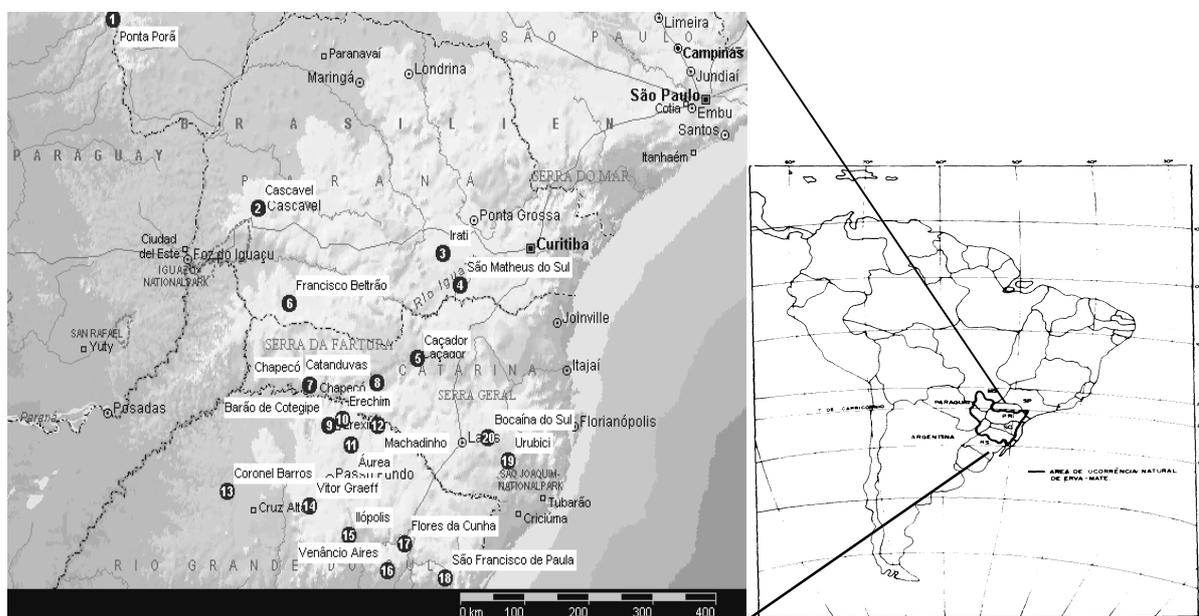


Figura 1: Locais de coleta e área de distribuição natural da erva-mate (Da Croce e Floss, 1999).

Foi considerada como população o grupo de plantas presentes numa mata contínua e separadas geograficamente. Cada população foi representada por 30 plantas adultas coletadas aleatoriamente e representando toda a área de coleta. A distância mínima entre duas plantas foi de vinte metros. Todas as coletas foram feitas no período de inverno. As folhas coletadas foram identificadas e secas em temperatura ambiente à sombra. Após secas, foram preparadas três amostras das plantas 1 a 10, 11 a 20 e 21 a 30, por população. Cada amostra conteve 25 g de folhas pesadas proporcionalmente de cada planta, que foram moídas em moinho de facas, homogeneizadas e peneiradas (série Tyler) retirando-se as partículas com mesh superior a 200.

Extração em Fluido Supercrítico (EFS): As extrações foram realizadas em uma unidade experimental de bancada, utilizando CO₂ (White & Martins com 99,9% de pureza) como solvente. A unidade experimental consiste, basicamente, de um cilindro de CO₂, dois banhos termostáticos (Quimis), uma bomba de alta pressão (ISCO 500 D), um extrator encamisado com volume interno aproximado de 100mL, um tubo coletor de vidro, uma válvula micrométrica e um transdutor absoluto de pressão (Smar LD 301), conforme esquematizado na Figura 2. A extração foi realizada nas condições de 175 bar, 50°C e vazão de 2 g de CO₂/min durante 90 minutos (Dariva *et al.*, 2001). O extrato foi coletado em uma única fração permanecendo conservadas em ambiente inerte até o momento das análises.

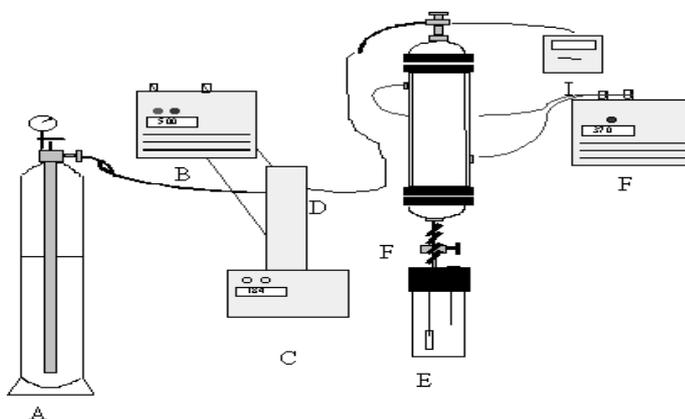


Figura 2: Unidade experimental de extração de alta pressão. (A) cilindro de CO₂; (B,H) banhos termostáticos (Quimis); (C) bomba de alta pressão (ISCO 500 D); (D) extrator encamisado com volume interno aproximado de 100mL; (E) tubo coletor de vidro; (F) válvula micrométrica.

Análise Instrumental: Os extratos foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas CG-EM (Shimadzu, Modelo QP 5050A). Foi empregada uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm e espessura do filme); vazão do

gás de arraste (hélio) de 0,8 mL/min; detector em 1,0 Kv; modo split (1:20); injetor a 290°C e interface em 300°C; programação de temperatura: inicial de 70°C (3 min); primeira rampa de aquecimento: 4°C/min até 260°C; segunda rampa de aquecimento: 2,5°C/min até a temperatura final de 300°C (23,5 min); tempo de corte do solvente: 4 min e tempo total de 90 min para análise. As amostras foram levadas a 40.000 mg/L em diclorometano (merck, bidestilado) sendo injetado um volume padrão de 1 µL. Como padrão interno foi utilizado bifenila na concentração de 100 mg/L. Os picos selecionados foram integrados no modo manual. A determinação de concentração foi realizada comparando-se a área dos picos em relação ao padrão interno (bifenila) para os compostos que não foram identificados com padrão (semiquantitativa), permanecendo o resultado na relação em área, ou através de análise quantitativa pela área média dos picos, com relação ao padrão interno multiplicado pelo fator de resposta de cada composto, obtido com a injeção de uma determinada concentração de seu padrão e de bifenila, expresso em miligramas do composto por grama de extrato.

A identificação dos compostos foi feita pela comparação dos tempos de retenção dos padrões (Sigma-Aldrich Co), com aqueles presentes na amostra e comparação dos espectros das amostras com espectros e resultados da biblioteca do equipamento (Wiley), com aproximadamente 170.000 espectros. Alguns compostos foram identificados exclusivamente através da biblioteca do sistema CG-EM, sendo considerados os compostos com índice de similaridade superior a 90% e classificados de acordo com o grupo químico.

Análise estatística: As amostras foram injetadas em triplicata e a análise estatística foi realizada através de ANOVA (Tukey $p = 0,05$) no programa Statistica 5.0. Os agrupamentos das populações foram feitos com base nos compostos químicos selecionados (Tabela 2) e com base em características ambientais (latitude, longitude, vegetação, temperatura média anual, clima segundo classificação de Koppen, geomorfologia e tipos de solo) empregando-se o programa Statistica 5.0. As correlações entre cada composto químico analisado e características ambientais foram feitas empregando-se o mesmo programa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento de extração nas 20 populações analisadas variou entre 0,5892 e 0,858 gramas/100g de material seco, entretanto sem diferença estatística (Tukey $p = 0,05$). Estes resultados são similares aos obtidos por Dariva *et al.* (2001).

As análises cromatográficas (CG-EM) dos extratos das populações de erva-mate obtidos por CO₂ Supercrítico permitiram selecionar os seguintes compostos: cafeína (34,375 min.), teobromina (34,658 min.), fitol (40,842 min.), eicosano (53,258 min.), esqualeno (56,075 min.), vitamina-E (62,800 min.), e stigmasterol (67,083 min.), todos confirmados por padrões. Além destes, 5 hidrocarbonetos, 2 aldeídos, 2 álcoois, 1 composto cetônico e 1 composto aromático, não confirmados por padrões, foram utilizados na análise química. Na figura 3 encontra-se um cromatograma de íon total da população de Chapecó. Outros compostos presentes nos extratos não foram considerados por falta de padrões e pelo baixo percentual de identificação fornecido pela biblioteca do equipamento.

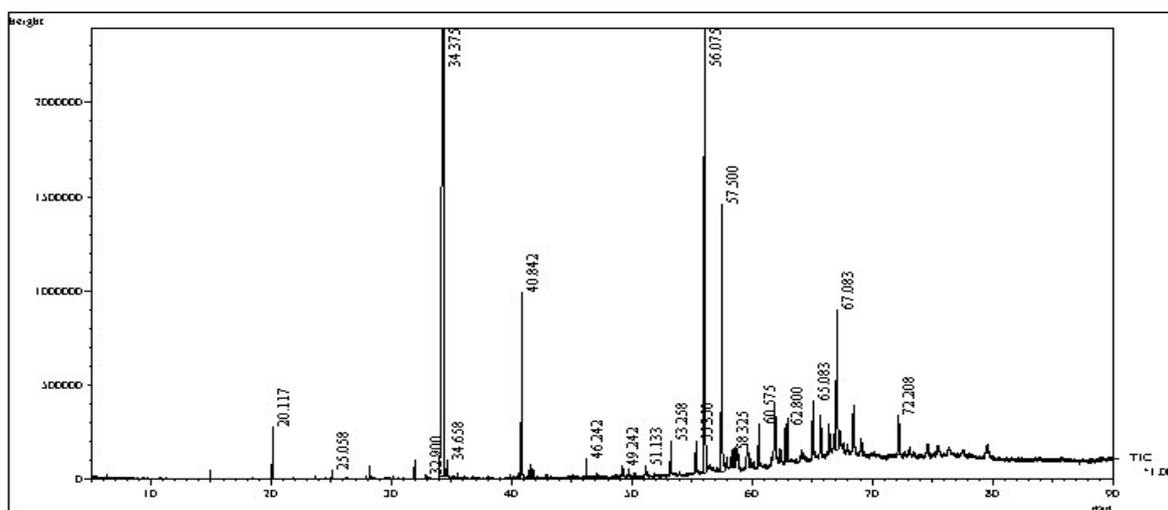


Figura 3: Cromatograma da população de Chapecó, mostrando os picos analisados neste trabalho, seus tempos de retenção em minutos, além do pico de bifenila (20,117 min.) usada como padrão interno.

As diferenças entre as médias das concentrações de cada composto, analisadas pelo teste de Tukey ($p=0,05$), sugerem haver baixa variação química entre as populações para a maioria dos compostos analisados (Tabela 1). O alto desvio padrão encontrado nas três repetições de extração de cada população para a maioria dos compostos analisados pode explicar esta tendência, porém sugerem a existência de uma expressiva variação dentro de cada população.

Tabela 1: Compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis (média \pm desvio padrão em mg/g de extrato) das 20 populações de *I. paraguariensis* obtidos por CG-EM^a.

Populações	Cafeína	Teobromina	Fitol	Esqualeno	Vitamina E	Eicosane	Stigmast
Áurea	279,88 \pm 105,90 ^{ab}	0,24 \pm 0,03 ^{abc}	2,54 \pm 0,33 ^{cd}	36,32 \pm 2,83 ^b	12,35 \pm 1,07 ^b	9,57 \pm 1,11 ^a	22,79 \pm 19,80 ^{abc}
Barão Cotegipe	172,62 \pm 32,59 ^{bc}	0,07 \pm 0,03 ^c	1,70 \pm 0,40 ^{cd}	28,29 \pm 8,06 ^b	8,92 \pm 4,97 ^{bcd}	2,06 \pm 1,42 ^{cd}	19,91 \pm 5,85 ^{bc}
Coronel Barros	334,93 \pm 59,28 ^a	0,13 \pm 0,07 ^c	3,44 \pm 0,64 ^{cd}	15,13 \pm 3,70 ^c	3,05 \pm 1,75 ^{cd}	1,59 \pm 0,53 ^{cd}	36,33 \pm 4,92 ^{ab}
Erechim	104,61 \pm 6,82 ^{cd}	0,47 \pm 0,18 ^a	2,87 \pm 0,50 ^{cd}	25,13 \pm 4,73 ^{bc}	6,41 \pm 0,78 ^{cd}	5,17 \pm 1,39 ^b	34,82 \pm 2,60 ^{abc}
Flores da Cunha	131,76 \pm 3,95 ^{bcd}	0,11 \pm 0,01 ^c	25,50 \pm 0,81 ^a	21,29 \pm 0,54 ^{bc}	7,81 \pm 0,14 ^{bcd}	1,70 \pm 0,30 ^{cd}	39,07 \pm 2,61 ^{ab}
Ilópolis	213,10 \pm 22,59 ^{bc}	0,16 \pm 0,01 ^{bc}	5,64 \pm 0,62 ^{cd}	53,18 \pm 21,27 ^b	7,35 \pm 4,17 ^{bcd}	1,40 \pm 0,25 ^{cd}	34,66 \pm 5,97 ^{abc}
Machadinho	119,27 \pm 64,15 ^{bcd}	0,04 \pm 0,02 ^c	0,31 \pm 0,54 ^{cd}	26,34 \pm 18,76 ^{bc}	4,44 \pm 3,15 ^{cd}	0,43 \pm 0,21 ^d	14,49 \pm 6,78 ^c
São F. Paula	180,47 \pm 12,11 ^{bc}	0,10 \pm 0,04 ^c	4,51 \pm 0,51 ^{cd}	13,14 \pm 0,85 ^c	6,23 \pm 1,35 ^{cd}	2,05 \pm 0,25 ^{cd}	30,27 \pm 6,55 ^{abc}
Venâncio Aires	194,09 \pm 23,76 ^{bc}	0,12 \pm 0,04 ^c	2,27 \pm 1,07 ^{cd}	20,16 \pm 10,07 ^{bc}	3,97 \pm 3,28 ^{cd}	1,06 \pm 0,54 ^d	24,97 \pm 9,76 ^{abc}
Victor Graeff	127,88 \pm 10,29 ^{bcd}	0,39 \pm 0,14 ^{ab}	2,06 \pm 0,79 ^{cd}	4,08 \pm 1,69 ^c	4,00 \pm 2,39 ^{cd}	1,17 \pm 0,19 ^{cd}	25,87 \pm 5,14 ^{abc}
Bocaina do Sul	123,05 \pm 30,49 ^{bcd}	0,07 \pm 0,02 ^c	0,85 \pm 0,14 ^d	11,69 \pm 1,95 ^c	2,30 \pm 0,75 ^d	1,44 \pm 0,38 ^{cd}	18,44 \pm 2,89 ^{bc}
Caçador	58,64 \pm 12,92 ^d	0,20 \pm 0,04 ^{bc}	1,46 \pm 0,15 ^{cd}	3,98 \pm 0,93 ^c	3,24 \pm 0,48 ^{cd}	2,22 \pm 0,36 ^{cd}	32,30 \pm 3,97 ^{abc}
Catanduvas	165,72 \pm 14,83 ^{bcd}	0,19 \pm 0,17 ^{bc}	6,18 \pm 5,35 ^c	21,97 \pm 7,96 ^{bc}	5,01 \pm 1,13 ^{cd}	2,46 \pm 0,87 ^{cd}	24,28 \pm 4,10 ^{abc}
Chapecó	316,49 \pm 27,88 ^{ab}	0,32 \pm 0,13 ^{abc}	15,64 \pm 3,13 ^b	18,13 \pm 3,06 ^c	4,17 \pm 0,62 ^{cd}	2,12 \pm 0,19 ^{cd}	43,00 \pm 3,83 ^a
Urubici	43,13 \pm 7,79 ^d	0,29 \pm 0,05 ^{abc}	1,07 \pm 0,14 ^d	7,67 \pm 1,14 ^c	1,67 \pm 0,35 ^d	1,12 \pm 0,07 ^{cd}	15,35 \pm 3,24 ^c
Cascavel	225,97 \pm 48,83 ^{ab}	0,11 \pm 0,08 ^c	2,06 \pm 0,61 ^{cd}	21,91 \pm 8,72 ^{bc}	4,71 \pm 2,17 ^{cd}	2,91 \pm 1,12 ^{cd}	31,03 \pm 8,10 ^{abc}
Franciso Beltrão	172,24 \pm 7,79 ^{bc}	0,20 \pm 0,05 ^{bc}	2,59 \pm 0,17 ^{cd}	95,06 \pm 21,96 ^a	47,02 \pm 9,04 ^a	3,23 \pm 0,49 ^{bc}	30,59 \pm 1,78 ^{abc}
Irati	237,60 \pm 45,54 ^{ab}	0,22 \pm 0,08 ^{abc}	1,93 \pm 0,20 ^{cd}	19,98 \pm 0,98 ^{bc}	6,53 \pm 2,89 ^{cd}	1,25 \pm 0,31 ^{cd}	22,27 \pm 0,57 ^{abc}
São Mateus Sul	134,88 \pm 21,46 ^{bcd}	0,17 \pm 0,01 ^{bc}	1,24 \pm 0,11 ^d	96,66 \pm 26,57 ^a	16,44 \pm 1,78 ^b	1,86 \pm 0,36 ^{cd}	17,95 \pm 3,35 ^c
Ponta Porã	221,24 \pm 18,53 ^b	0,11 \pm 0,02 ^c	6,09 \pm 2,07 ^{cd}	24,21 \pm 15,29 ^{bc}	7,97 \pm 3,45 ^{bcd}	2,59 \pm 0,59 ^{cd}	36,57 \pm 8,01 ^{ab}

^a Médias obtidas de 3 repetições de extração (CO₂ Supercrítico) e 3 repetições de injeção. Médias seguidas de diferentes letras em cada coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).

Considerando-se a média das populações por estado, foi observada uma tendência para maiores concentrações de cafeína no MS, seguido do PR, RS e SC, ocorrendo o inverso para a teobromina, embora ambas sem diferença estatística pelo teste de Tukey ($p = 0,05$). Porém, a variação entre as populações em cada estado é muita elevada, mostrando que condições específicas de cada local de coleta são mais importantes na produção destes compostos.

Athayde e Schenkel (2000) estudaram metilxantinas (cafeína e teobromina) em quatro populações (MS, PR, SC e RS) de *I. paraguariensis* coletadas em duas épocas do ano, verão e primavera. Nas coletas de verão, a população do Mato Grosso do Sul apresentou conteúdo médio de cafeína significativamente superior aos demais, porém sem diferenças no teor de teobromina. Já na coleta de primavera, não houve diferenças significativas para os teores de

caféina, embora mantendo a mesma tendência, verificando-se maior teor de teobromina nas populações do PR e RS. Em relação à análise qualitativa de saponinas, foi possível a identificação de todas as saponinas descritas em *I. paraguariensis* somente na população do MS, observando-se variações sazonais nesta.

O agrupamento das populações, através do algoritmo UPGMA e distâncias Euclidianas, das diferenças químicas entre as populações para os compostos analisados (normalizados), permitiu separar todas as populações, mostrando uma maior similaridade entre as repetições de cada população (Figura 4). Este resultado mostra diferenças consistentes entre as populações analisadas, havendo uma forte tendência para uma maior similaridade química entre as plantas de cada população em relação a diferentes populações.

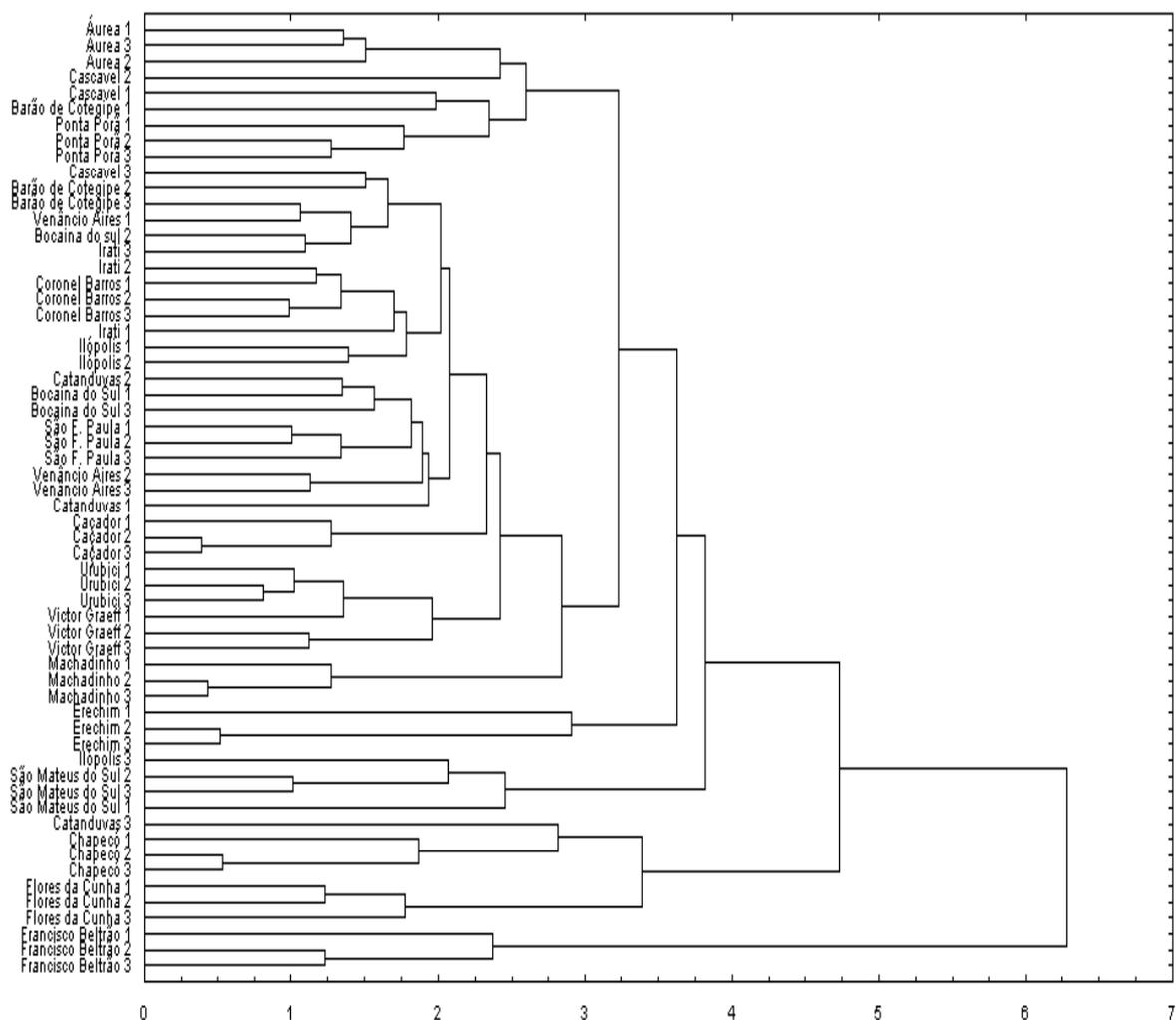


Figura 4: Agrupamento UPGMA com distâncias Euclidianas de três bulks de 10 plantas de cada uma das 20 populações, com base diferenças químicas entre as populações para os compostos analisados (normalizados).

Um agrupamento dos diferentes locais de coleta de erva-mate, levando em consideração latitude, longitude, vegetação, temperatura média anual, clima (segundo classificação de Koppen), geomorfologia e tipos de solo encontra-se na Figura 5. Estes fatores combinados separam a região de Ponta Porã, MS das demais regiões, formando outros agrupamentos de acordo com a similaridade das regiões.

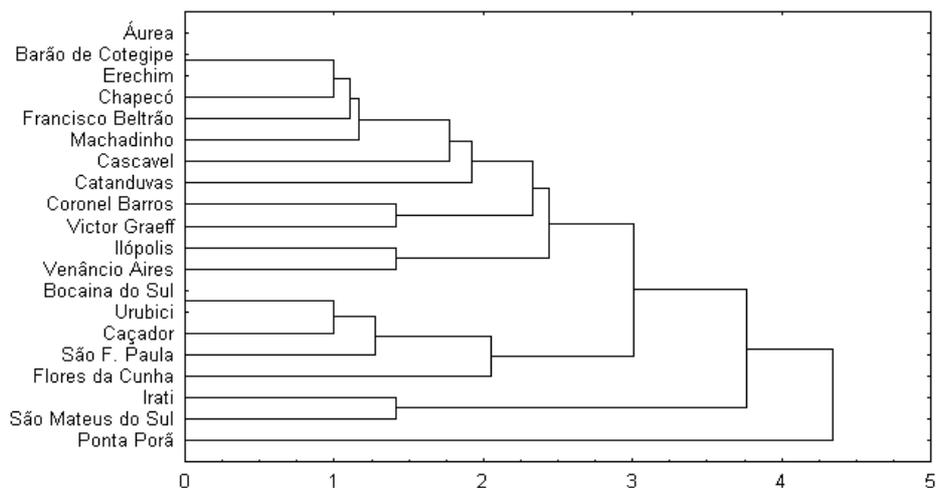


Figura 5: Agrupamento UPGMA com distâncias Euclidianas das 20 populações analisadas, com base em características ambientais de cada local (latitude, longitude, altitude, temperatura média anual, vegetação, classificação climática de Koppen, geomorfologia e tipo de solo).

Porém, observa-se que os agrupamentos químicos (Figura 4) diferem deste agrupamento ambiental e dos agrupamentos genéticos obtidos por Cansian *et al.* (2003) utilizando o mesmo material vegetal.

Uma análise de correlação (linear de Pearson) entre a composição química e as diferentes características ambientais de cada população, mostrou inexistência de correlação entre estes fatores, apenas com uma fraca correlação entre a cafeína e longitude, altitude e temperatura (Tabela 2).

Tabela 2: Correlação (linear de Pearson) entre a composição química analisada e as características ambientais de cada local. (Tr = tempo de retenção).

	Tr (min)	Latitude	Longitude	Vegetação	Altitude	Temperatura	Clima (koppen)	Geo- morfologia	Tipo Solo
Cafeína	34,40	-0,0299	0,6056	0,339	0,4522	-0,559	0,4133	0,0366	0,362
Teobromina	34,70	0,0603	0,0503	-0,0973	0,111	-0,127	0,0442	0,0288	0,0479
Fitol	40,80	0,2298	0,1259	0,2846	0,0605	0,119	-0,13	-0,1669	-0,1397
Eicosane	53,25	-0,1484	0,414	0,2501	-0,0633	0,1042	0,2129	-0,1409	-0,1206
Esqualeno	56,20	-0,2192	0,2627	0,1479	-0,0902	0,1385	0,337	0,4014	0,4434
Vitamina E	62,85	-0,1263	0,289	0,1894	-0,2397	0,0761	0,2284	0,1155	0,0793
Stigmast	67,15	0,1462	0,5933	0,2949	0,1814	0,386	0,2341	-0,3148	-0,0956
Aromático	25,06	0,3348	-0,3679	-0,3271	-0,0059	-0,199	-0,4554	-0,0533	-0,0049
Hidrocarboneto	32,90	0,0077	-0,1457	0,116	0,0613	-0,0003	0,0975	-0,0825	-0,0731
Cetona	46,24	-0,3877	0,2684	0,4594	0,0903	0,3803	0,1008	0,1629	0,2522
Hidrocarboneto	49,24	-0,3539	0,2479	0,4506	-0,0738	0,3658	0,1595	-0,1494	0,0206
Álcool	51,14	0,0735	-0,0712	-0,0537	-0,2505	-0,1014	-0,2553	-0,0946	-0,244
Hidrocarboneto	55,35	-0,103	0,2491	0,1729	-0,0637	0,134	0,0118	-0,1303	0,035
Hidrocarboneto	57,50	-0,0299	0,3574	0,2829	-0,0706	0,12	0,0637	-0,1612	-0,0517
Álcool	58,33	-0,2714	0,3282	0,2794	-0,0361	0,3497	0,0876	0,2774	0,2361
Aldeído	60,57	-0,3817	0,492	0,3939	-0,2017	0,2881	0,2454	-0,2096	-0,1822
Aldeído	65,07	-0,2094	0,3927	0,2068	-0,0755	0,1015	0,2333	-0,0131	-0,0453
Hidrocarboneto	72,20	-0,0232	0,2507	0,0574	-0,119	-0,0025	-0,2027	-0,1379	-0,2562

Estes resultados supõem haver outras variáveis influenciando na composição química das diferentes populações, dependentes de fatores como microclima, desenvolvimento da planta, sombreamento, idade da folha, nível nutricional do solo, dentre outros, os quais não foram considerados no presente estudo. A dificuldade de discriminação entre acessos, além da baixa reprodutibilidade das análises de metabólitos secundários de diferentes locais é discutida por Vieira *et al.* (2001), embora correlações entre agrupamentos químicos e genéticos tenham sido demonstrados em outras espécies (Skoula *et al.*, 1999; Echeverrigaray *et al.*, 2001). Mazzafera (1997), estudando a concentração de cafeína e ácidos fenólicos na infusão de erva-mate (chimarrão) de plantas de diferentes locais no RS, SC e PR, encontrou variações entre 0,29 e 0,79 mg/mL de cafeína e 0,70 a 1,60 mg/mL de fenóis solúveis, porém sem haver agrupamento destes de acordo com as localidades. Diferenças nas concentrações de cafeína, teobromina e teofilina foram encontradas entre folhas jovens e folhas velhas e entre

folhas de plantas em frutificação e sem frutificação, em *Ilex paraguariensis* (Mazzafera, 1994), mostrando variações na composição química mesmo em uma única planta.

Estes resultados levam a concluir que para a formação de uma coleção visando a manutenção de variabilidade da espécie, uma análise de composição química destas é insuficiente para garantir a variabilidade da espécie. Análises genéticas, baseadas em marcadores moleculares são necessários para a conservação da variabilidade de *Ilex paraguariensis*. Por outro lado, as diferenças químicas encontradas entre as diferentes populações sugerem que análises químicas podem ser usadas quando se buscam plantas com determinadas características químicas para uso industrial, como, por exemplo, altos ou baixos teores de cafeína, dependendo do mercado a que se destina. Desta forma pode-se pensar em cultivos de erva-mate com características específicas, porém não se esquecendo que condições específicas do local de plantio poderão ter influência nos resultados obtidos.

Cabe salientar que embora os resultados de composição química sejam diferentes dos resultados genéticos (Cansian *et al.*, 2003), a influência genética não pode ser descartada, uma vez que os genes específicos para a produção destes metabólitos analisados podem não ter sido amostrados na análise genética realizada, uma vez que os locos de amplificação de DNA por RAPD são aleatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Athayde, M.L.; Schenkel, E.P., 2000. Metilxantinas e saponinas em quatro populações de *Ilex paraguariensis* St. Hil. In: Anais do 2º Congresso Sul-Americano da erva-mate. Encantado. 121-124.
- Bassani, V.L.; Campos, A.M., 1997. Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil, aquifoliácea (erva-mate) visando a exploração do potencial do vegetal como fonte de produtos. Anais do I Congresso Sul-Americano da Erva-mate, EMBRAPA-CNPF, Curitiba PR. 69-83.
- Cansian, R.L.; Mossi, A.J.; Leontiev-Orlov, O.; Cechet, M.L.; Carvalho, A. Z.; Echeverrigaray, S., 2003. Genetic variability of native populations of *Ilex paraguariensis* St. Hil as assessed using RAPD markers. *Heredity* (submetido).
- Da Croce, D.M.; Floss, P.A., 1999. Cultura da erva-mate no Estado de Santa Catarina. EPAGRI – Empresa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. Boletim Técnico nº 100. Florianópolis.

- Dariva, C.; Oliveira, D.; Toniazzo, G.; Esmelindro, M.C., 2001. Assessment of the influence of manufacturing steps on the characteristics of the extracts obtained from SCFE of mate tea leaves. IV Encontro Brasileiro de Fluídos Supercríticos. Salvador, Ba. 340-345.
- Echeverrigaray, S.; Agostini, G.; Atti-Serafini, L.; Paroul, N.; Pauletti, G.F.; Atti dos Santos, A.C., 2001. Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial Thyme cultivars. *J. Agricult. Food Chem.* **49**: 4220-4223.
- Imbesi, A. Indici della pianta – Index plantarum. Messina, Instituto di Farmacognosia dell' Université de Messina, 1964.
- Mazzafera, P., 1994. Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis*. *R. Bras. Fisiol. Veg.* **6**:149-151.
- Mazzafera, P., 1997. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. *Food Chemistry.* **60(1)**:67-71.
- Oliveira, Y.M.M.; Rotta, E., 1985. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais, 10. Curitiba, EMBRAPA-CNPQ documentos, 15. 17-36.
- Saldaña, M.D.A.; Mohamed, R.S.; Baer, M.G.; Mazzafera, P., 1999. Extraction of purine alkaloids from mate (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO₂. *J. Agric. Food Chem.* **47**:3804-3808.
- Skoula, M.; Hilali, I.; Makris, A.M., 1999. Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. *Biochemical Systematics and Ecology.* **27**:559-568.
- Vieira, R.F.; Grayer, R.J.; Paton, A.; Simon, J.E., 2001. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology.* **29**:287-304.
- Winge, H.; Ferreira, A.G.; Mariath, J.E.A.; Tarasconi, L.C., 1995. Variabilidade genética em populações nativas de erva-mate e a implantação de bancos de germoplasma. In: *Erva-mate: Biologia e Cultura no Cone Sul*. Ed.Universidade/UFRGS Porto Alegre, RS, Brasil, 1995, 323-345.

**6. IDENTIFICAÇÃO DE POLINIZADORES NA PROGÊNIE DA
MATRIZ DE ERVA-MATE CAMBONA-4, USANDO MARCADORES
RAPD.**

IDENTIFICAÇÃO DE POLINIZADORES NA PROGÊNIE DA MATRIZ DE ERVA-MATE CAMBONA-4, USANDO MARCADORES RAPD.

Rogério Luis Cansian^{a*}, Altemir José Mossi^a, Oleg Leontiev-Orlov^a, Michel Luis Cechet^a, Alexandre Zanardo de Carvalho^a, Marcelo Fernando Pinto^a, Sérgio Echeverrigaray^b

^a Departamento de Ciências Agrárias, URI-Campus de Erechim, Av. 7 de setembro, 1621. CEP 99700-000 Erechim - RS, Brasil.

E-mail: cansian@uricer.edu.br

^b Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul – RS, Brasil. E-mail: selaguna@yahoo.com

* Para quem a correspondência deve ser enviada.

Telefone: 55-54-520-9000

Fax: 55-54-520-9090

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem ao CNPq, FAPERGS e SCT - RS pelo apoio financeiro.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo determinar a paternidade de uma progênie de erva-mate da matriz Cambona-4 e quatro possíveis polinizadores (A,B,C e D). O mesmo visa a produção de mudas por sementes com a manutenção das características agronômicas e principalmente suavidade no sabor, inerentes à matriz Cambona-4. Para tanto, foram utilizados marcadores RAPD identificando-se fragmentos presentes em apenas um dos polinizadores e na progênie e, obrigatoriamente, ausentes nos demais polinizadores e na matriz. Um mínimo de seis fragmentos com estas características foram usados para determinação de cada paternidade. Obteve-se a confirmação de 83,3% de filhos oriundos do cruzamento com o polinizador A, 11,9% com o polinizador B, 4,8% com o polinizador C. Nenhuma planta da progênie confirmou ser filha do cruzamento com o polinizador D. De um total de 107 progênies testadas, 23 não foram possíveis de determinar sua paternidade com os primers utilizados. A determinação da paternidade preferencialmente pelo polinizador A permitirá o direcionamento de cruzamentos a fim de obter-se sementes e mudas com uma variabilidade baixa e características próximas à da matriz Cambona-4, uma vez que as plantas da progênie confirmadas como Cambona-4/polinizador A apresentaram características próximas à planta matriz, com 90% das plantas semelhantes quanto à cor da folha e 84% quanto ao brilho da folha. Testes preliminares de degustação mostram que a característica de suavidade no sabor está mantida nesta progênie, embora ensaios sensoriais estejam em fase de programação.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, erva-mate, RAPD, paternidade.

ABSTRACT

Identification of pollinators in the lineage of Cambona-4 matrix of maté, using RAPD markers. The present work objective to determine the paternity of a lineage of maté of the Cambona-4 matrix and four possible pollinators (A, B, C and D). The same it aims at the production of changes for seeds with the maintenance of the agronomic characteristics and mainly smoothness in the flavor, inherent the Cambona-4 matrix. For in such way, fragments gifts in only one of the pollinators and the lineage had been used RAPD markers identifying itself, and obligatorily absent in the too much pollinators and the matrix. A minimum of six fragments with these characteristics had been used for determination of each paternity. It was gotten confirmation of 83,3% of deriving plants of the crossing with the pollinator A, 11,9% with the pollinator B, and 4,8% with pollinator C. No plant of the lineage confirmed to be son of the crossing with pollinator D. Of a total of 107 tested lineages, 23 had not been possible to determine its paternity with primers used. The determination of the paternity preferential for pollinator A will allow the aiming of crossings in order to get seeds and plants with a low variability and characteristic similar to the Cambona-4, a time that the confirmed plants of the lineage as Cambona-4/pollinator A had presented similar characteristics to the matrix, with 90% of the similar plants in relation to the color of leaf and 84% in relation to the brightness of the leaf.

Key-words: *Ilex paraguariensis*, maté, RAPD, paternity.

INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) já era consumida pelos aborígenes da América do Sul antes do processo de colonização. A matéria-prima *in natura*, folhas e ramos verdes, é beneficiada de diversas formas pela indústria e comercializada como chás, pó solúvel, essências e erva para chimarrão e tererê. O chimarrão é uma infusão da erva seca e triturada em água quente, enquanto o tererê é preparado com água fria (ANVISA, 2002). Além destas aplicações busca-se ampliar a sua utilização para outros produtos como bebidas, cosméticos e produtos farmacológicos.

A atividade ervateira e o consumo de erva-mate são muito difundidos no Paraguai, Argentina e nos estados do Sul do Brasil. Nos últimos anos, Estados Unidos, Alemanha e Japão começaram a importar erva-mate numa taxa de 1000 toneladas por ano (Tormen, 1995). A produção de erva-mate apresenta-se em crescimento constante situando-se em aproximadamente um milhão e quatrocentas mil toneladas anuais, das quais 550 mil toneladas são produzidas no Brasil. No aspecto social, destaca-se que, no Brasil, esta atividade está comumente associada aos cultivos em pequenas propriedades rurais, representando uma fonte de trabalho e de geração de renda socialmente importantes, envolvendo aproximadamente 750 empresas, com mais de 700 mil empregos diretos e indiretos (Da Croce, 2000).

No início de sua exploração, a maior parte do mate produzido no Sul do Brasil, provinha de ervais nativos. Paralelamente à queda de sua produção, pela exploração contínua e avanço da fronteiras agrícola, houve um aumento na demanda do produto, tanto no mercado interno como no externo. Desse modo, tornou-se prática comum o plantio dessa espécie. O plantio em áreas adensadas e a não seleção de matrizes para a coleta de sementes, têm gerado problemas para a industrialização da erva-mate como a intensificação do sabor amargo, quando utilizado em infusão. Este fato tem levado as indústrias a preferirem a erva-mate nativa, considerada menos amarga. O extrativismo atualmente freqüente devido a esta preferência, associado a técnicas errôneas de poda e manejo, põe em risco a conservação *in situ* da erva-mate. Para fazer frente a esta situação, pesquisadores, produtores e indústrias têm-se unido na perspectiva do desenvolvimento de novos cultivares que atendam às exigências do mercado.

Por ter fecundação cruzada, as plantas de erva-mate oriundas de sementes sempre apresentam apenas 50% do genótipo da planta matriz. Assim, para a manutenção das características da matriz é necessário o uso de métodos de propagação vegetativa ou a

condução de cruzamentos entre parentais selecionados visando a obtenção de populações com as características desejadas.

Este trabalho teve por finalidade identificar os parentais polinizadores de uma progênie da matriz de erva-mate Cambona-4 (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) através de marcadores moleculares RAPD. É interesse ressaltar que a matriz Cambona-4 possui excelentes características agrônômicas, alta produtividade e sabor suave. Plantios comerciais oriundos desta planta ou de descendentes que mantenham as suas características básicas poderiam reduzir o impacto provocado pelo extrativismo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico: Nesta pesquisa foram analisadas 107 plantas da progênie de Cambona-4, a matriz Cambona-4 e quatro supostos machos fertilizadores (A,B,C e D) situados a menos de 25 metros da planta matriz. Cabe salientar que além destes, a planta polinizadora mais próxima se encontra a mais de 200 metros. Para realização do trabalho, folhas foram coletadas, identificadas e transportadas em nitrogênio líquido, sendo a seguir armazenadas a -80°C até a extração do DNA.

Extração de DNA: Para o isolamento de DNA total de cada planta foi utilizado o método descrito por Doyle e Doyle (1988) modificado para uso em erva-mate. O processo básico consiste em: maceração de aproximadamente 150 mg de folhas em nitrogênio líquido; adição de 750µl de tampão de extração (2% CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2% 2-Mercaptoetanol, 0,01% Proteinase K, 5mM Ácido Ascórbico, 1% PVP); manutenção em banho-maria por 30 min. à 65°C; desproteínização com 1 volume clorofórmio - álcool isoamílico (24:1) até limpeza total do DNA; precipitação com 2/3 volume de isopropanol e lavagem com 200µl etanol 70%; ressuspensão em 150µl de TE (Trisma:EDTA - 10:1); quantificação em espectrofotômetro UV a 260nm e confirmação da integridade e pureza em espectrofotômetro UV a 280nm e em gel de agarose 0,8%.

Reação de amplificação de RAPD: Foi utilizada a reação descrita por Williams et al. (1991), com algumas modificações previamente testadas em erva-mate, com volume final de 25µL: Tampão de reação (50 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl), dNTPs (200mM de cada), 0,2 mM de primer, 3 mM de MgCl₂, 0,25 mM de TRITON e 1,5 U de Taq DNA polimerase Gibco BRL (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e aproximadamente 40ng de DNA.

Primers de RAPD: Foram utilizados os kits de primers da Operon Technologies Inc. (Alameda, CA), OPA, OPB, OPF, OPH, OPY e OPW, com 20 primers decaméricos cada um, visando identificar os que apresentam os melhores resultados em *Ilex paraguariensis*, avaliando-se a quantidade de bandas produzidas, a intensidade destas e sua reprodutibilidade para serem visualizadas as diferenças genéticas entre as plantas da progênie e identificar os seus parentais polinizadores. A reprodutibilidade da análise foi confirmada pelo padrão de fragmentos obtidos com a matriz Cambona-4 e os fertilizadores (A,B,C e D), pois um mesmo primer foi utilizado em seis diferentes géis para testar as progênies.

Amplificação de RAPD: A amplificação foi realizada em termociclador (modelo PTC 100, MJ Research INC., Watertown, MA). O processo de amplificação foi baseado na seguinte seqüência: 3 min a 92°C, 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 35°C e 2 min a 72°C. Após, 3 min a 72°C e resfriamento a 4°C até a retirada das amostras.

Análise eletroforética dos fragmentos amplificados: A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,4% em tampão TBE 1X (0,089M Trisma, 0,089M Ácido bórico e 0,008M EDTA) em cuba de eletroforese horizontal. A corrida foi efetuada com voltagem constante de 90Volts. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA de fago Lambda clivado com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI. A visualização dos fragmentos foi realizada com brometo de etídio e a observação feita sob luz ultravioleta. Os géis foram fotografados pelo sistema fotográfico digital GEL-PRO (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Análise dos dados: A identificação de plantas foi realizada através da determinação da presença ou ausência de bandas sendo consideradas as bandas presentes em plantas da progênie e em apenas um dos progenitores masculinos, devendo estar obrigatoriamente ausentes nos demais progenitores masculinos e na planta matriz (Figura 1). As progênies foram consideradas oriundas de um polinizador quando pelo menos seis fragmentos característicos deste estavam presentes nos perfis da progênie.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primers selecionados para a identificação das progênies e o respectivo peso molecular do fragmento analisado foram: OPA-18_(850 bp), OPB-06_(500 bp), OPF-06_(950 bp), OPF-08_(900 bp), OPF-09_(830 bp), OPH08_(400 bp), OPH-14_(790 bp) e OPW-03_(540 bp) com fragmento identificador do polinizador A; OPA-10_(2000 bp), OPB-17_(1800 bp), OPF-07_(1150 bp), OPF-08_(860 bp),

OPW-18_(700 bp) e OPY-08_(280 bp) com fragmento identificador do polinizador B; OPF-02_(1300 bp), OPF-03_(1050 bp), OPF-05_(880 bp), OPF-16_(500 bp), OPW-17_(240 bp) e OPW-18_(770 bp) com fragmento identificador do polinizador C; OPF-07_(200 bp), OPF-20_(1200 bp), OPH-17_(320 bp), OPW-07_(840 bp), OPW-13_(1400 bp) e OPW-15_(1550 bp) com fragmento identificador do polinizador D.

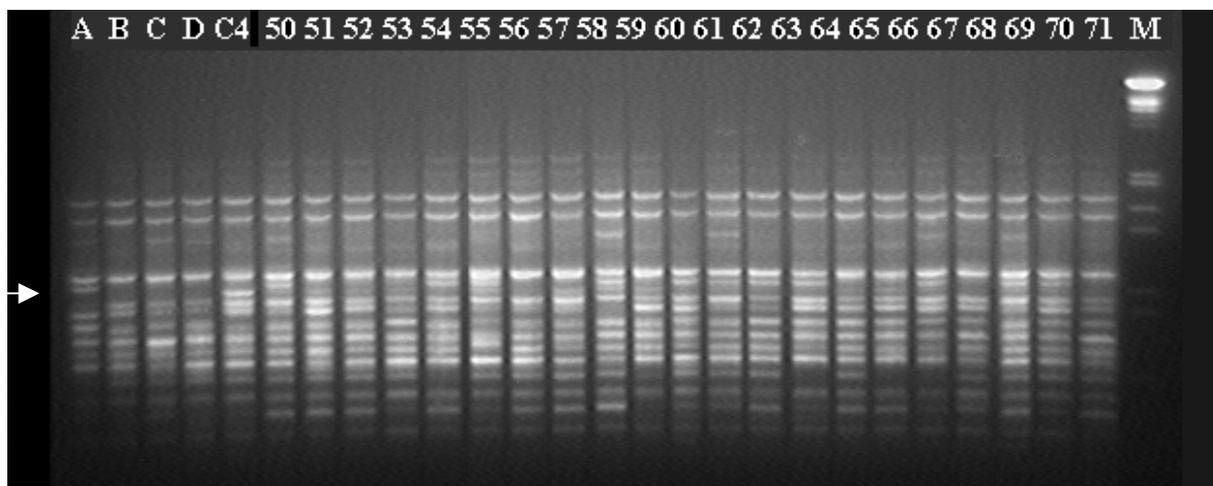


Figura 1: Gel de agarose gerado por RAPD com o primer OPA-18, mostrando um fragmento específico do polinizador A, ausente nos demais progenitores e presente em diversas progênies. (A, B, C e D = polinizadores; C4 = matriz Cambona-4; 50 a 71 = progênies; M = marcador de peso molecular Lambda, clivado com Hind III e Eco RI).

De um total de 107 progênies analisadas foram confirmadas a paternidade de 84 indivíduos (78,5%) dos quais, 83,3% (70) foram identificados como filhos do polinizador A, 11,9% (10) do polinizador B e apenas 4,8% (4) do polinizador C. Nenhuma progênie foi encontrada com bandas características do polinizador D, o que indica que esta planta, apesar de estar situada a somente 21 metros da matriz, não participou como polinizador (Figura 2).

As 23 progênies restantes (21,5%), apesar de apresentarem algumas bandas características de um ou outro parental, não tiveram confirmação para nenhum dos quatro polinizadores próximos à matriz Cambona-4, o que pode ser tomado como indicativo de que em determinadas situações pode ser necessária a utilização de um maior número de marcadores, ou de que polinizadores mais distantes também estão envolvidos.

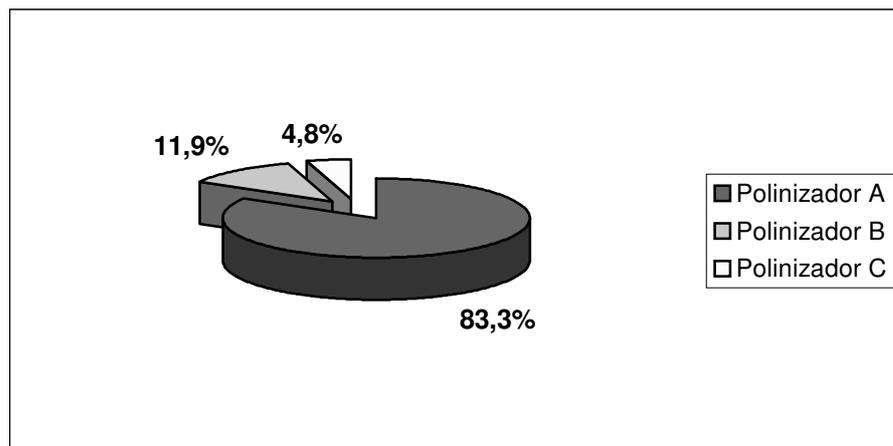


Figura 2. Polinizadores da progênie da matriz Cambona-4 identificados através das análises de RAPD.

Considerando que as plantas polinizadoras A, B, C e D se encontram a 12, 15, 18 e 21 metros da matriz Cambona-4, 78,4% da progênie analisada teve origem de polinizadores a uma distância inferior a 18 metros, sendo que os demais 21,6% não identificados podem ter tido origem em plantas mais afastadas da matriz (pelo menos 200 metros).

A polinização da erva-mate é basicamente entomófila, embora alguma transferência de pólen pelo vento não possa ser descartada (Ferreira *et al.*, 1983). Os dados obtidos confirmam as estimativas de fluxo de pólen em populações de erva-mate realizadas por Wollheim e Winge (1992), através de estudos de paternidade e usando padrões de isoenzimas como marcadores, que mostraram que 81% dos polens migraram de uma distância inferior a 30 metros. Porém 3% dos genótipos podem ter origem de plantas a uma distância superior a 600 metros.

O estudo do fluxo gênico em populações naturais permite obter informações sobre a estrutura genética dessas populações e sobre os processos evolutivos atuantes (Winge, 1997). Assim, pode-se estimar o raio médio de dispersão da espécie e o número de genótipos diferentes que contribuem para a constituição genética da próxima geração.

A determinação da paternidade preferencialmente pelo polinizador A é um importante resultado para o direcionamento de cruzamentos a fim de obter-se sementes e mudas com uma variabilidade baixa e características próximas a da matriz Cambona-4, uma vez que as plantas da progênie confirmadas como Cambona-4/polinizador A apresentaram características próximas à planta matriz, sendo que 90% das plantas foram semelhantes quanto à cor da folha e 84% quanto ao brilho da folha. Estudos de degustação para determinação das características organolépticas, e principalmente o amargor, estão programados para um futuro próximo,

ainda que testes preliminares mostrem que a característica de suavidade no sabor esteja mantida nesta progênie.

Resende *et al.*, (1997) afirmam que a realização de cruzamentos controlados selecionando-se plantas machos e fêmeas com base em testes de progênie e a avaliação de cruzamentos específicos visando o estabelecimento de pomares biclonais, é uma importante estratégia de ganho genético em erva-mate em função de sua dioicidia. Porém, como as pesquisas com melhoramento genético em erva-mate são recentes e com um pequeno volume de trabalhos gerados (Resende *et al.*, 1993), o uso de elaborados e onerosos delineamentos de cruzamento ainda não oferece grandes vantagens nesta espécie.

Neste sentido, a seleção de matrizes, mesmo que com base em informações empíricas como no caso da Cambona-4, e estudo de sua progênie, tornam-se interessantes para fixar características desejáveis em uma população.

O presente trabalho se vincula ao projeto da APROMATE – Associação dos Produtores de Erva-Mate de Machadinho – RS, que através de 80 pequenos produtores, implantará no período 2002/2004, um sistema agroflorestal de erva mate orgânica, destinada prioritariamente ao mercado externo, com uso exclusivo de mudas oriundas da matriz Cambona-4, que consiste em material genético selecionado naquele município.

O relatório de impacto ambiental, da Barragem de Machadinho-RS evidenciou que se deve plantar 1,5 milhões de mudas de árvores, compensatório do que foi inundado pela barragem. A Secretaria do Meio Ambiente (RS), que fiscaliza a reposição, autorizou o repovoamento da erva-mate a partir da progênie da matriz Cambona-4 em uma área de 105 hectares (Bertoletti, 1997, Corrêa 2001). Na faixa ciliar do lago estão sendo plantadas 376.000 mudas de árvores nativas (74 espécies encontradas na região, das quais 30 são árvores frutíferas). O reflorestamento com erva-mate, contemplando 279.930 plantas, na região adjacente a faixa ciliar, correspondem a 74% do número de plantas desta última, o que é bastante expressivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA, 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br> (acesso em 20 de maio de 2002).
- Bertoletti, J.J., 1997. Relatório de Impacto Ambiental – RIMA. Usina Hidrelétrica Machadinho. Centrais Elétricas do Sul do Brasil S.A. ed. MCT.UBEA-PUC RS, 131p.
- Corrêa, G. Sistema Agroflorestal com Erva-mate para Reposição da MAESA. Projeto Operativo. Comunicação Pessoal. Machadinho RS, 2001.

- Da Croce, D.M., 2000. Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: Erva-mate. EPAGRI – Empresa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. – Boletim Técnico nº 112, Florianópolis.
- Doyle, J.; Doyle, J. L., 1988. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Am J Bot.* **75**:1238.
- Ferreira, A.G.; Kaspary, R.; Ferreira, H.B.; Rosa, L.M., 1983. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Brasil Florestal.* 53.
- Resende, M.V.D.; Sturion, J.A.; Carpanezzi, A.A.; Mendes, S., 1993. Genética e melhoramento da erva-mate para produção de massa verde na região de Curitiba. EMBRAPA-CNPQ. Subprojeto 08.0.94.501.02. Colombo, PR. 10p.
- Resende, M.D.V.; Sturion, J.A.; Simeão, R.M., 1997. Estratégias para o melhoramento genético da erva-mate. I Congresso Sul-Americano da erva-mate. Curitiba PR, 243-266.
- Tormen, M.J., 1995. Economia ervateira brasileira. In: *Erva-mate: Biologia e Cultura no Cone Sul*. Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 27-40.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V., 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**:6531-6535.
- Winge, H., 1997. Conservação genética da erva-mate no Brasil. I Congresso Sul-Americano da erva-mate. Curitiba PR, 209-226.
- Wollheim, C.; Winge, H., 1992. Análise de paternidade em populações de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil, Aquifoliaceae. Reunião Técnica do Cone Sul sobre a cultura da erva-mate, 1. Porto Alegre, p.41.

7. DISCUSSÕES GERAIS

Com o objetivo de determinar a base genética de *Ilex paraguariensis* visando a implantação de programas de conservação de recursos genéticos, desenvolveram-se estudos da variabilidade genética intra e interpopulacional em três populações próximas geograficamente, diversidade genética entre populações nativas de toda a região de ocorrência no Brasil, variação na composição química de extratos destas populações e identificação de polinizadores na progênie de uma matriz de erva-mate chamada Cambona-4, contribuindo para o desenvolvimento de uma cultivar de erva-mate que possa minimizar o impacto sobre ervais nativos.

Embora a existência de acentuada variabilidade morfológica seja descrita por vários autores, o polimorfismo genético, avaliado por marcadores moleculares baseados em RAPD, variou entre 24,9 e 36% e a similaridade, calculada pelo coeficiente de Jaccard (S_J), entre 0,76 e 0,98, no estudo intrapopulacional. Estes resultados mostram uma baixa diversidade genética quando comparada com outros estudos em erva-mate e com outras espécies arbóreas dióicas. Esta divergência pode ser parcialmente explicada pela forma de amostragem das populações, onde cada população foi coletada de um único fragmento de mata com distância igual ou superior a vinte metros entre cada planta, diferentemente da forma de amostragem nos outros trabalhos com erva-mate. Foi utilizada esta metodologia por considerar-se que um grupo de plantas para ser considerada uma população, necessita apresentar intercruzamentos.

Considerando-se a frequência alélica, os resultados indicam que as plantas amostradas em cada uma das populações apresentam fluxo gênico entre elas, ainda que com muitos alelos em frequências distintas. Observou-se também que a variância intrapopulacional é superior a variância interpopulacional, resultado este que concorda com os resultados obtidos por outros pesquisadores em erva-mate. Ainda assim, tanto a análise de agrupamentos como a análise de coordenadas principais permitiu separar claramente as três populações.

Para estudar a diversidade genética da erva-mate do Brasil, foram usadas vinte populações nativas de *I. paraguariensis*, oriundas de diferentes Estados, abrangendo toda a área de ocorrência da espécie no Brasil, e representou-se cada população com 30 plantas

agrupadas em três bulks de 10 plantas, visando minimizar o efeito da variabilidade intrapopulacional.

Neste estudo observou-se um polimorfismo de 26,11% e S_J entre 0,845 e 0,972. Estes resultados confirmam a baixa diversidade genética de *I. paraguariensis* quando comparado com outras espécies arbóreas e dióicas. Uma possibilidade para o entendimento deste resultado é a expansão relativamente recente da floresta de araucária para a atual região de ocorrência. Como *I. paraguariensis* ocorre associada a esta floresta, possivelmente tenha havido um estreitamento da base genética desta espécie, onde somente genótipos mais adaptados às condições climáticas da época tenham sido favorecidos no processo de expansão da espécie para a região Sul do Brasil. Outra possibilidade levantada é que por ser de ocorrência recente nas atuais áreas, esta espécie tenha tido menor quantidade de cruzamentos, diminuindo a variabilidade genética.

Um agrupamento dos diferentes locais de coleta, levando em consideração diferenças ambientais, foi comparado ao agrupamento genético obtido por RAPD, observando-se que em ambos os dendrogramas, a população de Ponta Porã forma um grupo independente. Porém as demais populações não agrupam-se similarmente nos dois dendrogramas. Estes resultados indicam que as diferenças ambientais analisadas não são suficientes para explicar as diferenças genéticas encontradas.

Estes resultados levam a concluir que análises genéticas, baseadas em marcadores moleculares são necessários para a conservação da variabilidade de *Ilex paraguariensis*. Por outro lado, os resultados mostraram que a base genética de *Ilex paraguariensis* é relativamente estreita, colocando-a como uma espécie potencialmente em risco de extinção, caso a exploração de ervais nativos permaneça no ritmo atual. Neste sentido, impõe-se a necessidade de conservação de um máximo possível de fragmentos de mata com presença de erva-mate nativa para manutenção da variabilidade *in situ*, ou a coleta de um grande número de populações definidas por critérios genéticos, para a formação de bancos de germoplasma *ex situ*.

As populações de *I. paraguariensis* foram também comparadas com duas outras espécies do mesmo gênero, *I. dumosa* e *I. theezans*. Foi encontrado um alto polimorfismo entre as espécies, permitindo sua total separação, além da ocorrência de fragmentos específicos para as três espécies analisadas, indicando a possibilidade de construção de primers de PCR específicos, os quais poderiam ser utilizados para identificação desta espécie, como já realizado em outras espécies e eventualmente testagem da presença de plantas adulterantes no produto chimarrão.

Utilizando as mesmas plantas de erva-mate coletadas para o estudo genético, analisou-se a variação em compostos voláteis e semi-voláteis de extratos obtidos por CO₂ supercrítico. As análises cromatográficas permitiram selecionar 7 compostos identificados com padrões e outros 11 compostos identificados pela biblioteca do sistema CG/EM.

As diferenças entre as médias de concentração de cada composto sugerem haver baixa variação química entre as populações para a maioria dos compostos analisados, porém o alto desvio padrão entre as repetições pode estar influenciando esta tendência, além de sugerir a existência de uma expressiva variação dentro de cada população.

O agrupamento das populações pelas diferenças químicas entre estas para os compostos analisados, permitiu separar todas as populações mostrando uma maior similaridade entre as repetições de cada população. Entretanto, este agrupamento difere do agrupamento ambiental dos diferentes locais de coleta, com baixa correlação entre os compostos químicos e as características ambientais, e do agrupamento genético, obtido com o mesmo material. Estes resultados supõem haver outras variáveis como microclima, desenvolvimento da planta, idade da folha, nível nutricional do solo, entre outras, influenciando na composição química das diferentes populações. Entretanto, a influência genética não pode ser descartada, uma vez que os genes específicos para a produção destes metabólitos analisados podem não ter sido amostrados na análise genética realizada, pois os locos de amplificação de DNA por RAPD são aleatórios.

As diferenças químicas encontradas entre as diferentes populações sugerem que análises químicas podem ser usadas quando se buscam plantas com determinadas características químicas para uso industrial como, por exemplo, altos ou baixos teores de cafeína, dependendo do mercado a que se destina, não se esquecendo que condições específicas do local de plantio poderão ter influência nos resultados obtidos.

Para a formação de uma coleção visando a manutenção da variabilidade da espécie, uma análise de composição química destas é insuficiente, sendo necessário análises genéticas. Entretanto, análises da composição química podem ser úteis para a inclusão de genótipos superiores para determinados compostos de interesse nestas coleções.

A baixa variabilidade encontrada em erva-mate aumenta o risco de extinção desta espécie, tornando-se urgente a manutenção de um máximo possível de fragmentos de mata com presença de *I. paraguariensis* para a conservação *in situ* e a coleta de materiais baseados em análises genéticas, além da distribuição geográfica, para a conservação em bancos de germoplasma *ex situ*.

Por outro lado, a intensificação do extrativismo, pois segundo os industriais este material gera um chimarrão menos amargo, associado a técnicas errôneas de poda e manejo, está colocando em risco a conservação *in situ* desta espécie. O desenvolvimento de uma cultivar de erva-mate que mantenha as características de suavidade no sabor, sem detrimento a outras características agrônômicas torna-se bastante interessante, tanto para as indústrias que podem conduzir cultivos, aumentando a produtividade e reduzindo a mão-de-obra, quanto para a conservação desta espécie, pela redução da pressão sobre ervais nativos.

Assim, numa parceria entre Embrapa Florestas, Associação dos Produtores de Erva-mate de Machadinho-RS (APROMATE) e URI, desenvolveu-se um trabalho de identificação dos machos fertilizadores parentais de uma progênie de erva-mate denominada Cambona-4, a qual associa características agrônômicas interessantes e suavidade no sabor.

Utilizando-se pelo menos seis fragmentos presentes em apenas um dos polinizadores para identificação da paternidade da progênie, foi possível confirmar a paternidade de 84 indivíduos dos 107 testados, sendo 83,3% filhos do polinizador A, 11,9% filhos do polinizador B e apenas 4,8% filhos do polinizador C. Observou-se que 78,4% da progênie teve origem de polinizadores a uma distância inferior a 18 metros, enquanto que 21,6% tiveram origem de polinizadores a mais de 200 metros. A determinação da paternidade preferencialmente pelo polinizador A está permitindo direcionar os cruzamentos obtendo-se sementes e mudas com uma variabilidade baixa e características próximas a da matriz Cambona-4, uma vez que as características da progênie estudada são semelhantes às da matriz.

Estes resultados já estão sendo utilizados pela APROMATE para um plantio de erva-mate orgânica em 80 produtores associados, usando progênies do cruzamento entre Cambona-4 e o polinizador A.

Além disso, o relatório de impacto ambiental da Barragem de Machadinho-RS evidenciou a necessidade de se plantar 1,5 milhões de mudas de árvores, compensatório do que foi inundado pela barragem. A Secretaria do Meio Ambiente do Rio Grande do Sul autorizou o repovoamento com erva-mate da progênie de Cambona-4 em 105 hectares na região adjacente a faixa ciliar, perfazendo 74% do número total de árvores a serem implantadas.

Espera-se que iniciativas como esta, usando outras matrizes identificadas em diferentes locais e com características de interesse mercadológico, possam ser transformadas em plantios que dêem às indústrias produtos com identidade própria, diferenciando-os no mercado e reduzindo assim o impacto causado pelo extrativismo, colaborando para a manutenção da espécie *in situ*.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

1. Marcadores moleculares RAPD são eficientes para a identificação de paternidade e avaliação de diversidade dentro e entre populações de *Ilex paraguariensis*, e entre espécies de *Ilex*.
2. A variabilidade genética avaliada por RAPD em *I. paraguariensis* é inferior à variabilidade de outras espécies arbóreas dióicas.
3. A variabilidade intrapopulacional é maior que a variabilidade interpopulacional.
4. Existe fluxo gênico entre populações próximas geograficamente, mas também alelos característicos de cada população, o que permite individualizá-las.
5. As diferenças ambientais consideradas não foram suficientes para explicar as diferenças genéticas e químicas encontradas entre as populações.
6. A população de Ponta Porã, MS, separada geograficamente das demais, configurou-se como um grupo geneticamente distinto.
7. Usando-se marcadores RAPD pode-se obter fragmentos espécie específicos em *Ilex*, permitindo a utilização desta técnica na identificação de espécies e controle de qualidade.

8. As diferenças dos compostos voláteis e semi-voláteis analisados entre as populações permitiu a separação destas, o que deve permitir a inclusão de populações ou matrizes superiores para determinados compostos em bancos de germoplasma e programas de melhoramento.

9. Para a conservação desta espécie em bancos de germoplasma *ex situ* a coleta de materiais deve ser baseada em análises genéticas, além da distribuição geográfica.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

- ANVISA, 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br> (acesso em 20 de maio de 2002).
- Aitken, K.; Botero, J.; Zwart, R.; Teasdale, R., 1998. Detection of genetic diversity using RAPD markers in the genus *Melaleuca*. *Acta Horticulturae*. **461**:209-217.
- Allard R.W., 1971. *Princípios do Melhoramento Genético das Plantas*. Edgard Brucher, Rio de Janeiro, 585p.
- Athayde, M.L.; Schenkel, E.P., 2000. Metilxantinas e saponinas em quatro populações de *Ilex paraguariensis* St. Hil. In: Anais do 2º Congresso Sul-Americano da erva-mate. Encantado. 121-124.
- Bassani, V.L.; Campos, A.M., 1997. Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil, aquíifoliácea (erva-mate) visando a exploração do potencial do vegetal como fonte de produtos. Anais do I Congresso Sul-Americano da Erva-mate, EMBRAPA-CNPF, Curitiba PR. 69-83.
- Byrne, M., 1999. High genetic identities between three oil mallee taxa, *Eucalyptus kochii* ssp. *Kochii*, ssp. *pleníssima* and *E. Horistes*, based on nuclear RFLP analysis. *Heredity*. **82(2)**:205-211.
- Caetano-Annóles, G.; Bassam, B.J.; Gresshoff, P.M., 1991b. DNA Amplification Fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* **4**:294-307.
- Cavalli-Molina, S.; Winge, H.; Gauer, L.; Gregianini, T.H., 2000. Variabilidade genética em populações naturais de erva-mate. In: Anais do 2º Congresso Sul-Americano da erva-mate. Encantado. 111-115.
- Coelho, G.C., 2000. Variabilidade morfológica e química da erva-mate. In: Anais do 2º Congresso Sul-Americano da erva-mate. Encantado. 125-128.
- Coelho, G.C.; Rachwal, M.; Schnorrenberger, E.; Schenkel, E.P., 2000. Efeito do sombreamento sobre a sobrevivência, morfologia e química da erva-mate. In: Anais do 2º Congresso Sul-Americano da erva-mate. Encantado. 396-399.
- Da Croce, D.M.; Floss, P.A., 1999. Cultura da erva-mate no Estado de Santa Catarina. EPAGRI – Empresa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. Boletim Técnico nº 100. Florianópolis.

- Da Croce, D.M., 2000. Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: Erva-mate. EPAGRI – Empresa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. – Boletim Técnico nº 112, Florianópolis.
- Dariva, C.; Oliveira, D.; Toniazzo, G.; Esmelindro, M.C., 2001. Assessment of the influence of manufacturing steps on the characteristics of the extracts obtained from SCFE of mate tea leaves. IV Encontro Brasileiro de Fluídos Supercríticos. Salvador, Ba. 340-345.
- Echeverrigaray, S.; Agostini, G.; Atti-Serafini, L.; Paroul, N.; Pauletti, G.F.; Atti dos Santos, A.C., 2001. Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial Thyme cultivars. *J. Agricult. Food Chem.* **49**: 4220-4223.
- Edwin, G.; Reitz, P.R., 1967. *Flora ilustrada Catarinense: Aquifoliaceae*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí-SC.
- Ferreira, A.G.; Kaspary, R.; Ferreira, A.H.B.; Rosa, L.M.G., 1983. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Brasil Florestal*. **53**:29-33.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D., 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220p.
- Font Quer, P., 1953. *Diccionario de Botânica*. Barcelona: Editorial Labor. 1244p.
- Gauer L, Cavalli-Molina S (2000). Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil, Aquifoliaceae) using RAPD markers. *Heredity*. **84**:647-656.
- Gilberti, G.C., 1979. Las espécies argentinas del género *Ilex* (Aquifoliaceae). *Darwiniana*. **22**:217-240.
- Gilberti, G.C., 1995. *Ilex* em Sudamérica: florística, sistemática y potencialidades com relación a um banco de germoplasma para la yerba mate. In: *Erva-mate: Biologia e Cultura no Cone Sul*. Ed.Universidade/UFRGS Porto Alegre, RS, Brasil, 303-312.
- Hannay, J.B. and Hogarth, J., 1879. *Proc. R. Soc.*, London, **29**:324.
- Hoft, M.; Verpoorte, R.; Beck, E., 1996. Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. *Ecologia* **107**:160-169.
- Hoft, M.; Verpoorte, R.; Beck, E., 1998. Growth and alkaloid patterns of roots of *Tabernaemontana pachysiphon* and *Rauvolfia mombasiana* as influenced by environmental factors. *Acta Botânica*. **111**:222-230.
- Imbesi, A., 1964. Indici della pianta – Index plantarum. Messina, Instituto di Farmacognosia dell' Université de Messina.
- Kawakami, M.; Kobayashi, A., 1991. Volatile constituents of green and roasted mate. *J. Agric. Food Chem.* **39**:1275-1279.

- Machado, J.A., 1995. Recursos genéticos vegetais e a empresa de sementes. Simpósio Nacional de Recursos Genéticos Vegetais. IAC/EMBRAPA-CENARGEN. Campinas, p.13.
- Mattos, N.F., 1985. Revisão taxonômica da erva-mate. In: X Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais: silvicultura da erva-mate, Curitiba, EMBRAPA-CNPQ documentos, 15. 37-46.
- Mazzafera, P., 1994. Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis*. *R. Bras. Fisiol. Veg.* **6**:149-151.
- Mazzafera, P., 1997. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. *Food Chemistry*. **60(1)**:67-71.
- Mazuchowski, J.Z., 1989. A cultura da erva-mate. EMATER-Paraná. Curitiba, 36p.
- McHugh, M.A.; Krukonis, V.J., 1994. *Supercritical and Fluid Extraction: principles and practice*. Boston: Butterworth Publishers, 2nd edition.
- Morales, E.A.V., 1995. “Genepools” e “core collections” como estratégias para conservação e uso dos recursos genéticos. Simpósio Nacional de Recursos Genéticos Vegetais. IAC/EMBRAPA-CENARGEN. Campinas, p.7-8.
- Mosele, S.H., 1998. Análise de desempenho técnico e econômico de sistemas agroflorestais com a erva-mate no município de Áurea-RS. Monografia de Especialização de Agronegócios. URI-Campus de Erechim, Erechim, RS.
- Mullis, K.; Faloona, F., 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* **55**: 335-350.
- Nascimento Filho, I., 2002. Estudo de compostos orgânicos em lixiviado de aterro sanitário. Tese doutorado. UFRGS, Porto Alegre, RS.
- Oliveira Y.M.M, Rotta E., 1985. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). In: X Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais: silvicultura da erva-mate, Curitiba, EMBRAPA-CNPQ documentos, 15. 17-36.
- Prat Kricun, S.D.; Belingheri, L.D., 1995. Recolección de especies silvestres y cultivadas del genero *Ilex* en las provincias de Misiones y Tucumán (Argentina) y en los estados de Paraná, Santa Catarina y Rio Grande do Sul (Brasil). Periodo 1988-1992. In: *Erva-mate: Biologia e Cultura no Cone Sul*. Ed.Universidade/UFRGS Porto Alegre, RS, Brasil, 313-321.
- Rafalski, J.A.; Tingey, S.V.; Williams, J.G.K., 1991. RAPD markers - a new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech News and Information* **3**:645-648.
- Rangel, P.H.N.; Cruz, C.D.; Vencovsky, R.; Ferreira, R.P., 1990. Selection of local lowland rice cultivars based on multivariate genetic divergence. *Brazil.J. Genetics*. **14(2)**:437-453.

- Saiki, R.K.; Scharf, S.J.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354.
- Saldaña, M.D.A.; Mohamed, R.S.; Baer, M.G.; Mazzafera, P., 1999. Extraction of purine alkaloids from mate (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO₂. *J. Agric. Food Chem.* **47**:3804-3808.
- Sangwan, R.S.; Sangwan, N.S.; Jain, D.C.; Kumar, S.; Ranade, S.A., 1999. RAPD profile based genetic characterization of chemotype variants of *Artemisia annua* L. *Biochemistry and Molecular Biology International* **47(6)**:935-945.
- Skoula, M.; Hilali, I.; Makris, A.M., 1999. Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. *Biochemical Systematics and Ecology.* **27**:559-568.
- Swoford, D.L.; Olsen, G.J.; Waddell, P.J.; Hillis, D.M., 1996. Phylogenetic Interference. In: *Molecular Systematics*. 2^a ed. 655p.
- Tingey, S.V.; Deltufo, J.P., 1992. Genetic analysis with Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Plant Physiol.* **101**:349-352.
- Vidor, M.A.; Ruiz, C.P.; Moreno, S.V.; Floss, P.A., 2002a. Molecular markers in erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) characterization studies: the taste. *Ciência Rural.* **32**:415-420.
- Vidor, M.A.; Ruiz, C.P.; Moreno, S.V.; Floss, P.A., 2002b. Genetic variability in a trial of erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) progenies. *Ciência Rural.* **32**:583-587.
- Vieira, R.F.; Grayer, R.J.; Paton, A.; Simon, J.E., 2001. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology.* **29**:287-304.
- Williams, J.G.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, L.A.; Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**:6531-6535.
- Williams, J.G.K.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V., 1993. Genetic analysis using RAPD markers. *Methods Enzymol.* **218**:704-740.
- Winge, H.; Wollheim, C.; Cavalli-Molina, S.; Assmann, E.M.; Bassani, K.L.L.; Amaral, M.B.; Coelho, G.C.; Freitas-Sacchet, A.M.O.; Butzke, A.; Valduga, A.T.; Mariath, J.E.A., 1995. Variabilidade genética em populações nativas de erva-mate e a implantação de bancos de germoplasma. In: *Erva-mate: Biologia e Cultura no Cone Sul*. Ed. Universidade/UFRGS Porto Alegre, RS, Brasil, 323-345.
- Wollheim, C.; Coelho, G.C.; Mariath, J.E.A.; Winge, H., 1987. Morfometria foliar e floral da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae). Congresso Nacional de Botânica, 38. São Paulo, p.349.