

MARIANNE CHRISTINA SCHEFFER

**SISTEMA DE CRUZAMENTO E VARIAÇÃO GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES E
PROGÊNIES DE ESPINHEIRA-SANTA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciências Florestais.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José de Araujo

CURITIBA

2001

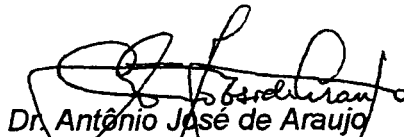


Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias - Centro de Ciências Florestais e da Madeira
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Av. Lothário Meissner, 3400 - Jardim Botânico - CAMPUS III
80210-170 - CURITIBA - Paraná
Tel. (41) 360.4212 - Fax (41) 360.4211 - <http://www.pgfloresta.ufpr.br>
e-mail: pinheiro@floresta.ufpr.br

PARECER


Defesa nº 421

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, após arguir a doutoranda **MARIANNE CRISTINA SCHEFFER** em relação ao seu trabalho de tese intitulado "SISTEMA DE CRUZAMENTO E VARIAÇÃO GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES E PROGÊNIES DE ESPINHEIRA-SANTA", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de *Doutor em Ciências Florestais*, na área de concentração em *Silvicultura*.




Dr. Antônio José de Araujo


Professor e pesquisador do Departamento de Ciências Florestais da UFPR
Orientador e presidente da banca examinadora



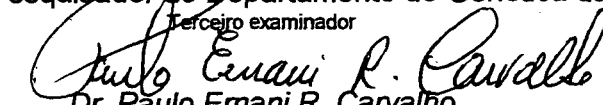
Dr. Vicente Wagner Dias Casali
Professor e pesquisador da UFV
Primeiro examinador



Dr. Jarbas Y. Shimizu
Pesquisador EMBRAPA-CNPFFloresta
Segundo examinador



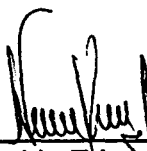
Dr. José Sebastião Cunha Fernandes
Professor e Pesquisador do Departamento de Genética da UFPR
Terceiro examinador



Dr. Paulo Emani R. Carvalho
Pesquisador EMBRAPA-CNPFFloresta
Quarto examinador



Curitiba, 09 de março de 2001.



Nivaldo Eduardo Rizzi
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Franklin Galvão
Vice-coordenador

Ao meu marido Roberto e aos
meus filhos Marion e Ricardo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio José de Araujo, por aceitar orientar este trabalho e pela amizade, estímulo e incentivo.

Ao Dr. Jarbas Shimizu, pela oportunidade e co-orientação na realização das pesquisas.

Ao Dr. Pedro Ronzelli Júnior, pela co-orientação, incentivo e amizade de sempre.

Ao Sr. Luiz Osório de Castro, cujo amor pelas plantas medicinais o tornou pioneiro na formação de uma coleção de cancorosa.

A Ingrid B.I. de Barros, pela amizade, generosidade e sugestões.

Ao Sr. Amauri, Sr. Orlandino, Sr. Dário, Sr. Bora, Sr. Nelço e Sr. Dranka pelo auxílio na coleta das sementes e ao Sr. Wivaldo Reksua pelo cuidado com as mudas.

Ao Luiz Ermínio Cavalet, Maria Isabel Radomski, Jaqueline Evangelista Dias, Walter Steenbock, Lutécia Canali, Alceu Hassmann pela amizade, apoio e auxílio.

Ao Dr. Gert Hatschbach pelo apoio na identificação botânica.

Aos bolsistas de iniciação científica Edemilson Pereira dos Santos, pelo auxílio nos trabalhos de campo; Ivana Spir, pelo auxílio no aperfeiçoamento do protocolo para os trabalhos de laboratório, Rodrigo Braga Michon, pelo auxílio nos trabalhos de laboratório e a Marcia Daniela Urbano pelo auxílio na tabulação dos dados.

A Simone Aparecida Sopchaki, pelo apoio e auxílio na realização dos trabalhos em laboratório e pela amizade.

Aos amigos Marli Perozin, Cirino Corrêa Júnior, Lin Chau Ming e Zilna Hoffmann Domingues, pela amizade, incentivo e solidariedade.

A Elisabete de Castro Oliveira pela amizade e pela cessão da imagem das maravilhosas aquarelas de espinheira-santa.

Ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À Embrapa Florestas pela cessão dos laboratórios e da área experimental para realização desse trabalho.

Ao meu marido Roberto e meus filhos Marion e Ricardo, pelo amor, estímulo e compreensão, e a meus pais, João e Mariza, e meus irmãos, pelo amor e incentivo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 ESPINHEIRA-SANTA.....	4
2.1.1 Descrição Botânica.....	6
2.1.2 Biologia Reprodutiva e Fenologia da Espinheira-Santa.....	8
2.1.3 Ocorrência Natural e Aspectos Ecológicos.....	12
2.1.4 Aspectos Silviculturais.....	12
2.1.5 Variação Genética em Espinheira-Santa.....	13
2.2 IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DO SISTEMA DE CRUZAMENTO.....	14
2.3 CONTEXTO ECOLÓGICO DOS SISTEMAS DE CRUZAMENTO.....	15
2.3.1 Uso de Isoenzimas na Estimativa de Taxa de Fecundação Cruzada.....	18
2.4 ISOENZIMAS NO ESTUDO DA VARIAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES.....	19
2.4.1 Índice de fixação.....	22
2.4.2 Coeficientes de Identidade e de Distância Genética.....	24
2.4.3 Importância do Tamanho Efetivo das Populações.....	25
2.4.4 Limitações do Uso de Isoenzimas.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 ÁREAS DE COLETA.....	29
3.2 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MÉDIO DE SEMENTES POR FRUTO.....	32
3.3 FASE DE VIVEIRO.....	32
3.4 FASE DE CAMPO.....	33
3.5 ANÁLISE DE ISOENZIMAS.....	35
3.5.1 Interpretação dos Géis.....	36
3.5.2 Sistema de Cruzamento.....	36
3.5.3 Diversidade Genética entre as Populações do Teste de Progenie.....	38
3.5.3.1 Frequência dos alelos.....	39
3.5.3.2 Número médio de alelos por loco (n_a).....	39
3.5.3.3 Porcentagem de locos polimórficos.....	40

3.5.3.4 Heterozigosidade.....	40
3.5.3.5 Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	42
3.5.3.6 Coeficiente F.....	42
3.5.3.7 Identidade genética.....	43
3.5.3.8 Análise de agrupamento.....	44
3.6 ANÁLISE DE VARIÂNCIA.....	44
3.6.1 Estimativas de Coeficientes de Herdabilidade.....	45
3.6.2 Coeficientes de Variação Genética e Experimental.....	46
3.6.3 Interação Genótipo X Ambiente.....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 INTERPRETAÇÃO DOS ZIMOGRAMAS.....	49
4.2 SISTEMA DE CRUZAMENTO.....	51
4.3 DIVERSIDADE GENÉTICA NAS POPULAÇÕES REPRESENTADAS NO TESTE DE PROGÊNIE.....	52
4.3.1 Freqüência dos Alelos.....	52
4.3.2 Heterozigosidade.....	54
4.3.3 Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	55
4.3.4 Índice de Fixação de Wright.....	57
4.3.5 Identidade Genética de NEI (1978) e Análise de Agrupamento.....	59
4.4 ASPECTOS SILVICULTURAIS E VARIAÇÃO GENÉTICA ENTRE PROGÊNIES.....	64
4.4.1 Número Médio de Sementes por Fruto.....	64
4.4.2 Fase de Viveiro.....	67
4.4.3 Testes de Progênie.....	68
4.4.3.1 Sobrevivência.....	68
4.4.3.2 Avaliação do crescimento.....	69
4.4.3.3 Estimativa de parâmetros genéticos.....	73
5 CONCLUSÕES.....	78
6 REFERÊNCIAS.....	79
APÊNDICES.....	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Dados geográficos e climáticos referentes aos locais de coleta de frutos de espinheira-santa e das áreas experimentais.....	31
TABELA 2 - Análise de solo (0 a 20 cm) das áreas experimentais dos testes de progênies de espinheira-santa (Ponta Grossa, PR e São José dos Pinhais, PR - 2000).....	34
TABELA 3 - Enzimas de espinheira-santa interpretadas em eletroforese (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1998).....	35
TABELA 4 - Esquema de análise de variância segundo o delineamento de blocos completos ao acaso.....	45
TABELA 5 - Esquema de análise de variância conjunta segundo o delineamento de blocos completos ao acaso.....	47
TABELA 6 - Sistema de cruzamento na população de espinheira-santa de Viamão, RS (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999).....	51
TABELA 7 - Frequência alélica em progênies de uma população antropogênica e de quatro populações de espinheira-santa representadas no teste de progênie em São José dos Pinhais, PR (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999).....	53
TABELA 8 - Variabilidade genética em cinco locos polimórficos em progênies espinheira-santa representadas no teste de progênies em São José dos Pinhais, PR (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999).....	55
TABELA 9 - Teste de χ^2 para desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg das classes de genótipos de cinco locos em quatro populações de espinheira-santa representadas no teste de progênies em São José dos Pinhais, PR (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999).....	56

TABELA 10 - Índice de fixação médio dos alelos (F_{IS}) nas populações de espinheira-santa representadas no teste de progênie em São José dos Pinhais, PR (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999).....	57
TABELA 11 - Índice de fixação de Wright em populações de espinheira-santa representadas no teste de progênies em São José dos Pinhais (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999).....	58
TABELA 12 - Média ponderada do índice de fixação dos alelos dentro da população (F_{IS}), na espécie (F_{IT}) e da medida de diferenciação entre populações (F_{ST}) para quatro populações de espinheira-santa representadas no teste de progênie em São José dos Pinhais, PR (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999).....	59
TABELA 13 - Matrizes dos coeficientes de identidade genética (NEI, 1978) entre as populações representadas no teste de progênie em São José dos Pinhais, PR (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999).....	60
TABELA 14 - Matriz cofenética de identidade entre as populações representadas no teste de progênie em São José dos Pinhais, PR, utilizando a média dos coeficientes de identidade genética de NEI (1978) (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999).....	63
TABELA 15 - Análise de variância do número médio de sementes por fruto de espinheira-santa (Escola de Florestas, UFPR, Curitiba, PR -1997).....	64
TABELA 16 - Número médio de sementes por fruto de espinheira-santa (Escola de Florestas, UFPR, Curitiba, PR - 1997).....	65
TABELA 17 - Análise de variância de aspectos silviculturais de espinheira-santa em viveiro (Escola de Florestas, UFPR, Curitiba, PR - 1998)	67
TABELA 18 - Número de falhas nos testes de progênie de espinheira-santa (Embrapa Negócios Tecnológicos, Ponta Grossa, PR e São José dos Pinhais, PR - dez. 1998 e mar. 2000).....	69

TABELA 19 - Análise de variância da altura da espinheira-santa em teste de progênies em dois locais (Embrapa Negócios Tecnológicos, Ponta Grossa, PR e São José dos Pinhais, PR - dez. 1998 e mar. 2000).....	70
TABELA 20 - Altura média das progênies (cm) de espinheira-santa nos dois locais de estudo (Embrapa Negócios Tecnológicos, Ponta Grossa, PR e São José dos Pinhais, PR - dez. 1998 e mar. 2000).....	72
TABELA 21 - Coeficientes de herdabilidade (método univariado) associados a diferentes efeitos para crescimento em altura de espinheira-santa, nos dois locais de estudo (Embrapa Negócios Tecnológicos, Ponta Grossa, PR e São José dos Pinhais, PR - dez. 1998 e mar. 2000).....	74
TABELA 22 - Análise de variância conjunta da altura das progênies de espinheira-santa nos dois locais (Embrapa Negócios Tecnológicos, Ponta Grossa, PR e São José dos Pinhais, PR - mar. 2000)	75
TABELA 23 - Ordenamento das progênies de espinheira-santa por altura média (cm) aos 38 meses nos dois locais (Embrapa Negócios Tecnológicos, Ponta Grossa, PR e São José dos Pinhais, PR, mar. 2000).....	76

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Partes de planta de espinheira-santa. No sentido anti-horário: detalhe do ramo, detalhe da inflorescência, botão floral fechado, flor aberta, corte longitudinal da flor (imagem cedida pela pesquisadora Elisabete de Castro Oliveira).....9
- FIGURA 2 - Partes de planta de espinheira-santa. No sentido anti-horário: detalhe do ramo, cápsula aberta com três sementes, cápsula aberta com quatro sementes (imagem cedida pela pesquisadora Elisabete de Castro Oliveira).....10
- FIGURA 3 - Esquema de interpretação de isoenzimas em espinheira-santa (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)....36
- FIGURA 4 - Dendrograma de similaridade genética entre as populações de espinheira-santa representadas no teste de progênes em São José dos Pinhais, PR (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999).....61
- FIGURA 5 - Regiões de coleta dos frutos de espinheira-santa representados no teste de progênes em São José dos Pinhais, PR.....62

RESUMO

SISTEMA DE CRUZAMENTO E VARIAÇÃO GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES E PROGÊNIES DE ESPINHEIRA-SANTA

Os objetivos deste trabalho foram obter informações sobre o sistema de cruzamento da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss - Celastraceae, a variação genética entre populações e progênies e sobre aspectos silviculturais. Foram coletados frutos de 105 árvores. Os municípios que contribuíram com maior número de matrizes foram Viamão, RS, Arroio dos Ratos, RS, Campos Novos, SC, Água Doce, SC, Laranjeiras do Sul, PR e Araucária, PR, todos na Região Sul do Brasil. Foi instalado um experimento em delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições e oito tubetes por parcela, para avaliar a germinação e desenvolvimento das mudas na fase de viveiro. Quinze progênies de Viamão, num total de 279 indivíduos, foram utilizadas para estimar a taxa de fecundação cruzada, com dados obtidos por eletroforese de isoenzimas e analisadas pelo programa MLTR. Foram instalados dois testes de progênie, um em Ponta Grossa, PR, com 44 progênies e outro em São José dos Pinhais, PR, com 32 progênies. O delineamento do experimento, em ambos os locais, foi em blocos ao acaso, com cinco repetições e quatro plantas por parcela. Aos 23 e aos 38 meses, foi avaliado o crescimento em altura. A variação genética entre quatro populações foi avaliada com base em dados obtidos por eletroforese em uma amostra tomada no teste de progênies em São José dos Pinhais. Os dados foram analisados utilizando-se o programa BIOSYS 1.7. As enzimas utilizadas para as estimativas da taxa de fecundação cruzada e da variação entre populações foram IDH, 6PGDH-2, GOT-1, MnR e PGI-2, todas polimórficas. A estimativa da taxa de fecundação cruzada em espinheira-santa foi 99,6%, indicando que é uma espécie alógama. Os resultados da análise de diversidade entre populações indicaram que a maior parte da variação genética concentra-se dentro das populações. A identidade genética entre as populações, com base no coeficiente de Nei (1978), diminui à medida em que aumenta a distância geográfica entre as populações amostradas. A menor identidade genética foi verificada entre a população antropogênica (Viamão, RS) e as populações naturais. Quanto aos aspectos silviculturais, os resultados demonstram que há variação genética significativa entre as progênies, com relação à germinação e ao crescimento inicial. Embora crescimento em altura das progênies tenha sido maior em São José dos Pinhais do que em Ponta Grossa, não houve interação genótipo x ambiente. A correlação genética entre os dois locais foi elevada. Como o número e o tamanho das famílias nos testes de progênies foram pequenos não foi possível conciliar a manutenção de um tamanho efetivo adequado (mínimo de 30 a 50 indivíduos) com ganhos genéticos acentuados em crescimento em altura.

Palavras-chave: *Maytenus ilicifolia*, Planta Medicinal

ABSTRACT

MATING SYSTEM AND GENETIC VARIATION AMONG AND WITHIN POPULATIONS AND PROGENIES OF ESPINHEIRA-SANTA

The objectives of this work were to obtain information on the mating system of espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss – Celastraceae), the genetic variation among populations and progenies and about silvicultural aspects. Fruits of 105 trees were collected. The municipal districts that contributed with the largest numbers of plants sampled were Viamão, RS, Arroio dos Ratos, RS, Campos Novos, SC, Água Doce, SC, Laranjeiras do Sul, PR and Araucária, PR, all in the Southern Region of Brazil. An experiment was installed in randomized complete blocks design, with four replications and eight plugs per plot, for the evaluation of the germination and the development of seedlings in the nursery. Fifteen progenies from Viamão, with a total of 279 individuals, were used to estimate outcrossing rate, using isozyme data and the MLTR software. Two progeny tests were installed, one in Ponta Grossa, PR, with 44 progenies and the other in São José dos Pinhais, PR, with 32 progenies. The experimental design, in both locations, was in randomized complete blocks with five replications and four plants per plot. When the plants were 23 and the 38 months old, the plant heights were measured. The genetic variation among the four populations was estimated based on isozyme data obtained from a sample taken from the progeny test in São José dos Pinhais. The data was analyzed using BIOSYS 1.7. software. The enzymes considered for the estimations of outcrossing rate and of variation among populations were IDH, 6PGDH-2, GOT-1, MnR and PGI-2, all polymorphic. The outcrossing rate in espinheira-santa was estimated at 99,6%, indicating that this species is alogamous. The genetic diversity analysis indicated that most of the variation is contained within populations. The genetic identity among populations, based on Nei's (1978) coefficient decreased as the physical distance among them increased. The smallest genetic identity was found between the antropogenic population in Viamão and natural populations. With regard to silvicultural aspects, the results revealed a significant genetic variation among progenies with regard to seed germination and the initial growth. Although height growth was faster in São José dos Pinhais than in Ponta Grossa, no genotype x environment interaction was found. The genetic correlation among these locations was high. As the number and sizes of the families in the present tests were small, it will not be possible to conciliate the maintenance of a desired minimum effective population size (between 30 and 50 individuals) with fast genetic improvement in growth.

Key-Words: *Maytenus ilicifolia*, medicinal herbs

1 INTRODUÇÃO

As folhas da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. - Celastraceae) são utilizadas, há muito tempo, pela população, no tratamento de problemas digestivos. Também, são atribuídas a esta espécie, propriedades curativas do câncer, motivo pelo qual um de seus nomes populares é 'cancerosa'. A espinheira-santa apresenta-se na forma arbustiva e arbórea e ocorre em toda a Região Sul do Brasil.

Em 1988, as propriedades curativas da espinheira-santa foram confirmadas por pesquisadores do Programa de Pesquisa em Plantas Mediciniais, coordenado por técnicos da Central de Medicamentos do Ministério da Saúde. Esta confirmação provocou aumento no extrativismo, pois a planta ainda não era cultivada. O aumento no extrativismo, associado à redução das áreas de sua ocorrência natural devido à expansão da agricultura, provocou rápida diminuição das populações naturais da espécie. Diante disso, os produtores de plantas medicinais passaram a buscar, junto aos órgãos de extensão e de pesquisa, informações para iniciar o seu cultivo. As experiências empíricas de cultivo foram bem sucedidas, mas não há como atender a demanda por sementes para ampliar as áreas de plantio. Para implementar um programa que permita atender essa demanda, são necessárias informações sobre o sistema reprodutivo da espécie, a estrutura genética e o tamanho efetivo das populações de forma que as sementes apresentem boa qualidade genética e fisiológica. Tal programa se justifica quando se leva em consideração que o cultivo e o manejo de plantas medicinais vêm se expandindo no Paraná e representam, hoje, uma fonte de renda adicional para muitas famílias. Além disso, a continuidade do extrativismo coloca a espécie em risco de tornar-se rara, como já foi verificado por técnicos da Secretaria Estadual de Meio Ambiente do Paraná. A preocupação com a preservação das plantas medicinais e do ambiente, também, foi manifestada pelos especialistas reunidos na Consultoria Internacional sobre Preservação de Plantas Mediciniais, realizada em 1988 na Tailândia. A Declaração de Chiang May, resultante desse evento, conclama a todos para que 'salvem vidas salvando plantas' (AKERELE; HEYWOOD; SYNGE, 1991, p. xix).

Este trabalho teve como objetivo geral gerar informações sobre a biologia reprodutiva e a distribuição de variação genética entre as populações e progênes de

espinheira-santa. Com estas informações, será possível definir estratégias de coleta de sementes tanto para o cultivo e o manejo quanto para a conservação do germoplasma. Os objetivos específicos foram:

a) estimar a taxa de fecundação cruzada da espécie, visando orientar futuros trabalhos de seleção e de conservação;

b) determinar a distribuição da variação genética entre populações oriundas de áreas de ocorrência natural da espécie;

c) avaliar as progênies quanto a características silviculturais como germinação, sobrevivência e crescimento inicial, visando ao futuro cultivo comercial da espécie;

d) estabelecer um teste de progênies visando dar continuidade à avaliação das progênies e sua futura transformação em pomar de sementes por mudas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A prática da medicina tradicional e, em especial, o uso de plantas medicinais, vêm recebendo atenção crescente dos organismos internacionais voltados à área de saúde, por sua importância nos cuidados primários da saúde de 80% da população mundial (FARNSWORTH et al., 1985). A 31ª Assembléia Mundial de Saúde, realizada em 1978, recomendou ao Diretor Geral da Organização Mundial da Saúde que designasse centros regionais de pesquisa e ensino para o estudo das plantas medicinais. A 40ª Assembléia Mundial de Saúde, realizada em maio de 1987, instou aos Estados Membros que empreendessem amplos programas de identificação, avaliação, elaboração, cultivo e conservação de plantas medicinais utilizadas na medicina tradicional (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1993).

No Brasil, técnicos do Ministério da Saúde elaboraram, em 1981, as “Diretrizes e Prioridades para Investigação em Saúde” (BRASIL, 1981), documento que incluiu o estudo de plantas medicinais. Técnicos da Central de Medicamentos (CEME) coordenaram, de 1983 a 1996, o Programa de Pesquisa em Plantas Medicinais, que envolveu 61 espécies em fase de pesquisa. Dentre essas, oito tiveram sua eficácia terapêutica comprovada, inclusive a espinheira-santa, para tratamento de gastrite e úlcera gástrica (CARLINI, 1988). Técnicos do Projeto de Fitoterapia do SUS/TECPAR incluíram a espinheira-santa entre as espécies prioritárias a serem estudadas, visando à produção de fitoterápicos para o Sistema Unico de Saúde. Eles enfatizaram a necessidade de pesquisas visando ao seu cultivo ou manejo, por ser uma espécie nativa sobre a qual se dispõe de poucas informações além de ser uma espécie que está ameaçada pelo extrativismo que vem sofrendo, em decorrência da comprovação científica das suas propriedades terapêuticas (PEROZIN, 1988). Isto resultou na sua inclusão na ‘Lista vermelha de plantas ameaçadas de Extinção no Estado do Paraná’ (PARANÁ, 1995).

Além de sua importância nos cuidados primários em saúde, o conjunto das espécies medicinais pode ser uma importante fonte de divisas para o País. A participação do Brasil no mercado internacional de plantas medicinais é expressiva. As exportações brasileiras, em 1984, foram equivalentes a US\$ 20 milhões em produtos naturais obtidos de plantas (VIEIRA, 1993). Em 1995, segundo a Secretaria

de Comércio Exterior (SECEX), o Brasil exportou produtos derivados de plantas aromáticas e medicinais no valor de US\$ 61,7 milhões (incluindo-se aí produtos desidratados, extratos vegetais e óleos essenciais). As importações, nesse mesmo ano, foram da ordem de US\$ 46,3 milhões, havendo um saldo positivo de US\$ 15,4 milhões. Entretanto, em 1997, as exportações somaram US\$ 59,1 milhões, enquanto que as importações foram de US\$ 64,7 milhões, gerando um saldo negativo de US\$ 5,6 milhões. A maior dificuldade está em descobrir o que está sendo importado e exportado, uma vez que muitos produtos estão enquadrados no item 'outros', dificultando a sua identificação. Essa dificuldade aumentou com a adoção, a partir de 1997, da Nomenclatura Comercial do MERCOSUL (NCM) que reduziu ainda mais as categorias de plantas (SCHEFFER, CORRÊA JÚNIOR, 1997).

Apesar da escassez de informações disponíveis, especialistas neste mercado estimam que as vendas, no varejo, de produtos derivados de plantas medicinais situam-se na ordem de US\$ 14 bilhões por ano. Destes, US\$ 7 bilhões são gerados na Europa, US\$ 2 bilhões nos Estados Unidos, US\$ 1 bilhão na América Latina e os restantes US\$ 4 bilhões na Ásia e na África. Estima-se, ainda, que o volume de vendas irá triplicar nos próximos dez anos. O maior crescimento é esperado nos Estados Unidos seguido da América Latina e da Europa (GRUNWALD, 1997).

2.1 A ESPINHEIRA-SANTA

O uso das folhas de espinheira-santa, com fins medicinais, foi referendado pelo médico paranaense Aluizio França, em 1922, em comunicação à Sociedade de Medicina do Paraná (STELLFELD, 1934). Tradicionalmente, as folhas da espinheira-santa são coletadas em áreas de ocorrência natural. Há poucos dados acerca dessa atividade, uma vez que os coletores agem clandestinamente. A clandestinidade é determinada pela ausência do registro no órgão de fiscalização ambiental devido a: (a) desconhecimento da legislação, (b) coleta realizada em áreas de propriedade de outros ou em áreas de preservação permanente (proibidas); e (c) ausência de informações necessárias para elaboração de plano de manejo, que é necessário para o registro de áreas de coleta.

Os coletores recebem, em geral, R\$ 0,40 por quilo de planta fresca (folhas com ramos finos). Após secagem, são comercializadas por R\$ 2,50 a 3,50 por quilo.

O preço das folhas secas de plantas cultivadas pode chegar a remunerar de R\$ 8,00 a 12,00 por quilo (só folhas secas). Ao chegar ao consumidor final, na forma de folhas rasuradas e embaladas, o preço varia entre R\$ 30,00 a 50,00 por quilo.

O cultivo, ainda em pequena escala, é praticado por produtores que vêm testando, empiricamente, espaçamentos e formas de manejo, sempre a pleno sol. A tendência é de ampliação das áreas de cultivo, uma vez que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária exige que o fabricante de fitoterápicos, para registro de seus produtos, comprove estar adquirindo matéria-prima de fornecedores em conformidade com a legislação ambiental. Essa legislação estabelece as normas para registro de pessoas físicas ou jurídicas que consomem, exploram ou comercializam matéria-prima florestal (BRASIL, 1985; BRASIL, 1995; BRASIL, 2000).

Para que o cultivo seja bem sucedido, é necessário, além de outros conhecimentos, um programa de produção ou coleta de sementes com boa qualidade genética e fisiológica. Isso exige conhecimento da biologia reprodutiva, da estrutura genética e do tamanho efetivo das populações da espécie (FERREIRA; ARAÚJO, 1981; KANASHIRO, 1992). No caso de espécies com poucas informações disponíveis, recomenda-se que a geração de informações e o desenvolvimento de materiais genéticos sejam feitos em várias etapas. Na ausência de informações suficientes sobre o comportamento silvicultural da espécie, a primeira etapa seria uma amostragem simples, ao acaso, de poucas populações dispersas em diferentes locais. Os dados obtidos nesta etapa serviriam para determinar as tendências do comportamento da espécie como um todo. Estes ensaios permitiriam ainda, avaliar a espécie em condições de cultivo, bem como obter informações sobre competidores, pragas e patógenos. A segunda etapa envolveria testes mais rigorosos envolvendo amostragens em áreas menores da região de distribuição natural da espécie visando estimar, com precisão, as médias e as variâncias das populações. As etapas subsequentes teriam por objetivo a seleção de árvores individuais, de uma ou mais populações, para assegurar que os melhores genótipos sejam utilizados. Tal recomendação é feita, dada a constatação de que, os procedimentos recomendados de coleta para teste de procedências e progênies, requereriam o envolvimento de um grande número de populações a serem ensaiadas. Isto tornaria o programa

extremamente grande e de difícil controle pela ausência de informações básicas (KANASHIRO, 1992).

Os métodos de melhoramento fundamentam-se na existência de variabilidade genética na população, na qual é aplicada a seleção para alterar a sua média. Esta seleção é feita com base no mérito genético dos indivíduos e, conforme o método adotado e possibilita combinar informações relativas às famílias e a outros caracteres para maximizar o ganho e a acurácia da seleção. A maneira tradicional para avaliar a variação genética entre indivíduos é o teste de progêniess. Este constitui o passo inicial para um programa de melhoramento. Uma vez que a avaliação é feita com base em valores genéticos deduzidos a partir das características fenotípicas, a repetição dos ensaios em diferentes locais é importante para avaliar, também, uma possível interação genótipo x ambiente (KANASHIRO, 1992).

2.1.1 Descrição Botânica

O gênero *Maytenus* Mol. é constituído por 225 espécies e está representado no Brasil, por 77 espécies e 14 variedades. Inclui representantes arbóreos, arbustivos e subarbustivos. As espécies da seção *Oxyphylla*, que inclui *M. ilicifolia*, têm porte variando entre 1,5 e 8,0 m de altura. Os ramos são geralmente eretos e simples e os internódios da maioria das espécies são expostos. Os ramos são considerados fortes indicadores taxonômicos pois apresentam variações na forma e no tipo de cobertura da superfície (CARVALHO-OKANO, 1992).

As folhas são extremamente variáveis no gênero e mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie, sendo insuficientes para distinção de espécies quando utilizadas isoladamente. No gênero, a filotaxia pode ser alterna ou oposta. O comprimento do limbo é variável entre espécies e entre indivíduos de uma mesma espécie, ocorrendo o mesmo com a forma e as dimensões da lâmina foliar, que é basicamente plana. O bordo é variável ao longo do gênero e é utilizado para delimitar a seção *Oxyphylla*. Nessa seção, as espécies apresentam folhas com margem sempre espinescente. O número e a disposição dos espinhos ao longo do bordo é variável entre as espécies. Algumas apresentam distribuição simétrica. A venação é do tipo pinado e as nervuras apresentam variações quanto à

proeminência em relação à superfície do limbo e quanto ao diâmetro e inclinação das nervuras secundárias em relação à principal. Estas características são utilizadas para distinguir espécies ou grupos de espécies dentro do gênero (CARVALHO-OKANO, 1992).

As inflorescências do gênero *Maytenus* são, geralmente, axilares e cimosas, do tipo dicásio. Na taxonomia do gênero, as inflorescências são excelente característica diagnóstica para espécies e grupos de espécies, dada a sua ampla variação e relativa fidelidade (CARVALHO-OKANO, 1992).

As flores são pequenas, com 3 a 5 mm de comprimento, e coloração branco-esverdeada. Embora os caracteres florais sejam excelentes características diagnósticas para o reconhecimento da família e mesmo dos gêneros, para categorias infragenéricas são pouco expressivas. O cálice é gamossépalo e a corola dialipétala. As flores apresentam um disco bem desenvolvido, de consistência carnosa; na antese, apresenta coloração verde e secreta néctar. Os cinco estames estão situados externamente à porção basal do disco, alternando-se com as pétalas. Seu comprimento e posição são variáveis em relação ao gineceu. O gênero apresenta um gineceu glabro, sincárpico, bicarpelar, bilocular, placentação axilar, com dois óvulos por lóculo, inseridos na base do eixo.

Segundo CARVALHO-OKANO (1992), *M. ilicifolia* está enquadrada na seção *Oxyphylla*, cuja característica é a presença de espinhos no bordo foliar. É um subarbusto ou árvore, ramificado desde a base, medindo até cinco metros de altura. Os ramos novos são glabros, angulosos, tetra ou multicarenados. As folhas são coriáceas e glabras, o pecíolo de 2 a 5 mm de comprimento, as estípulas inconspícuas, o limbo de 22 a 89 mm de comprimento e de 11 a 30 mm de largura e as nervuras proeminentes na face abaxial. A forma das folhas varia de elíptica a estreitamente elíptica, com base aguda a obtusa e ápice agudo a obtuso, mucronado ou aristado; podem ter a margem inteira ou com espinhos, em número variável, distribuídos regular ou irregularmente no bordo, geralmente concentrados na metade apical de um ou de ambos os semilimbos. As inflorescências são em fascículos multifloros, os pedicelos florais de 2 a 5 mm de comprimento, as sépalas semicirculares, ciliadas, com cerca de 1 mm de comprimento, as pétalas ovais, inteiras, com cerca de 2 mm de comprimento e 2 mm de largura. Os estames têm filetes achatados na base, o estigma é capitado, séssil ou com estilete distinto. O

ovário pode ser saliente ou totalmente imerso no disco carnosos (Figura 1). O fruto é uma cápsula bivalvar, orbicular; a coloração do epicarpo é vermelho-alaranjada (Figura 2) e suas dimensões variam de 7 a 10 mm. As sementes são eretas, suborbiculares, elipsoides ou obovais, às vezes angulosas, em número variável de um a quatro por fruto, sendo mais comumente duas ou três, envoltas inteiramente pelo arilo. A testa é rija, lisa e brilhante, em geral, com coloração castanha ou negra. O endosperma é abundante; o embrião é axial com cotilédones planos, membranáceos e eixo hipocótilo-radícula reto e curto. O arilo é suculento, de coloração branca, cobrindo toda a semente. As espécies extra-amazônicas deste gênero apresentam sementes com forma e cor homogêneas, de baixo valor diagnóstico taxonômico. Em geral, os arilos são atrativos para pássaros e estão relacionados à dispersão das sementes (CARVALHO-OKANO, 1992).

M. ilicifolia é facilmente distinguível das demais espécies da seção, pelos ramos angulosos tetra ou multicarenados e frutos orbiculares de coloração vermelho-alaranjada. Porém, é freqüentemente confundida com *M. aquifolia*, espécie-tipo da seção, cujo nome comum também é espinheira-santa.

2.1.2 Biologia Reprodutiva e Fenologia da Espinheira-Santa

As flores da espinheira-santa são, aparentemente, monoclinas. Porém, há fortes evidências de que muitas delas sejam funcionalmente diclinas. Foram observadas flores com estames praticamente sésseis, adpressos na parede ovariana. Supõe-se que esses sejam estéreis e as flores funcionalmente pistiladas. A posição do ovário em relação aos verticilos florais e ao disco é variável na espécie e, muitas vezes, na mesma planta; ocorre desde inteiramente súpero a ínfero, com passagem pelo semi-ínfero. É provável que as flores portadoras de ovário completamente ínfero sejam funcionalmente estaminadas (doadoras de pólen), ou estéreis, servindo como atrativos à polinização, uma vez que, na antese, o disco secreta néctar. Esta suposição é sustentada, primeiramente, pelo grande número de flores produzidas por planta e pelo pequeno número de frutos

FIGURA 1: Partes de planta de espinheira-santa. No sentido anti-horário: detalhe do ramo; detalhe da inflorescência; botão floral; flor aberta; corte longitudinal da flor (imagem cedida pela pesquisadora Elisabete de Castro Oliveira)



FIGURA 2: Partes de planta de espinheira-santa. No sentido anti-horário: detalhe do ramo; cápsula aberta com três sementes; cápsula aberta com quatro sementes (imagem cedida pela pesquisadora Elisabete de Castro Oliveira)



formados; em segundo lugar, pela ausência de vestígios do perianto na porção apical dos frutos (CARVALHO-OKANO, 1992).

Segundo as observações de CALAGO (1996), em uma população de cerca de 50 plantas, em condições de cultivo, é possível distinguir flores díclinas por aborto de um dos órgãos reprodutores. No campo, é marcante, a distinção entre plantas de flores pistiladas e estaminadas. As estaminadas nunca produzem sementes, produzem flores que secam aproximadamente dois dias após a floração, mais ou menos, mas não resultam em frutos. Já, as pistiladas, produzem grande quantidade de sementes. É possível distinguir flores estaminadas pela coloração dos estames. Os estames dessas flores apresentam coloração amarela forte e produzem pólen. O ovário é afundado no disco. As flores pistiladas possuem os estames de coloração amarelo pálido, não produzem pólen e o ovário é mais proeminente, com o estilete sobressaindo um pouco. Algumas plantas são marcadamente díclinas. Porém, existem outras que apresentam flores completas, estaminadas e pistiladas. No entanto, após isolar flores aparentemente completas, estas não desenvolvem frutos. Diante dessas observações, CALAGO (1996) supô que a presença de polinizadores é muito importante para a espécie, tendo observado a presença de pequenas vespas, não identificadas, além de formigas, que podem atuar como polinizadores ou como simples pilhadoras de néctar.

O florescimento de *M. ilicifolia* concentra-se nos meses de setembro a dezembro e a frutificação de outubro a fevereiro (ROTTA, 1981; CERVI et al., 1989; CARVALHO-OKANO, 1992). Os frutos apresentam síndrome de dispersão zoocórica, especialmente por aves (CARVALHO-OKANO, 1992; TABARELLI; VILLANI; MANTOVANI, 1993).

Com relação à frutificação, SCHEFFER e ARAUJO (1998) observaram (a) presença de frutos somente em árvores que recebem insolação direta durante pelo menos parte do dia; (b) mesmo recebendo luz direta, nem todos os indivíduos da população frutificam no mesmo ano; (c) a frutificação ocorre durante um período relativamente longo, iniciando no Estado do Rio Grande do Sul, seguindo por Santa Catarina e, por fim, por Paraná, concentrando-se, respectivamente, nos meses de novembro, dezembro/janeiro e janeiro/fevereiro; (d) os frutos, do tipo cápsula deiscente, concentram-se nos ramos do ano anterior; e (e) há grande variação no tamanho e peso das sementes.

2.1.3 Ocorrência Natural e Aspectos Ecológicos

No Brasil, a espinheira-santa ocorre, principalmente, nas Florestas Ombrófila Mista e Estacional Semidecidual e em capões e margens de rios das Estepes, nos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, especialmente nas áreas de influência fluvial (KLEIN, 1972; OCCHIONI; HATSCHBACH, 1972; CARVALHO, 1980; ROTTA, 1981; CERVI et al., 1989; CARVALHO-OKANO, 1992; SILVA; SALOMÃO; MARTINS NETTO, 1993; TABARELLI; VILLANI; MANTOVANI., 1993).

A espinheira-santa é encontrada em sub-bosques de florestas em fase de sucessão secundária tardia ou climácicas (MARTINEZ-CROVETTO, 1963; CARVALHO-OKANO, 1992; SILVA; SALOMAO; MARTINS NETTO, 1993; TABARELLI; VILLANI; MANTOVANI, 1993), mas ocorre, também, em capões (KLEIN, 1968; KLEIN, 1972; OCCHIONI; HATSCHBACH, 1972).

Esta espécie apresenta uma distribuição predominantemente subtropical (CARVALHO-OKANO, 1992). Sua ocorrência foi relatada em regiões com temperatura média do mês mais quente de 22 °C e temperatura média do mês mais frio superior a 10 °C e precipitação média anual de 1442 mm. Está presente em solos podzólico vermelho-amarelo distrófico (CARVALHO, 1980); cambissolo gleico distrófico epieutrófico, cambissolo profundo álico e solo litólico (RADOMSKI, 1998).

2.1.4 Aspectos Silviculturais

Os frutos devem ser colhidos quando as cápsulas se abrem, expondo o arilo branco. Neste ponto, as sementes estão com coloração marrom-escura e brilhante. A extração das sementes é feita removendo-se, manualmente, o arilo. Após a secagem, as sementes, com cerca de 6% de umidade, podem ser armazenadas em câmara fria. Com 44% de umidade, o número de sementes por quilo, é de 10.090 (ROSA; BARROS, 1999). Lotes de sementes, com cerca de 6% de umidade, oriundas de Castro, PR, Prudentópolis, PR e Agudos do Sul, PR apresentaram, respectivamente, 34.246, 36.496 e 23.397 sementes por quilo (SANTOS; ARAUJO; SCHEFFER, 1999). As sementes são de comportamento ortodoxo (EIRA; DIAS;

MELLO, 1993) e, quando armazenadas fora da câmara fria, perdem a viabilidade rapidamente (SCHEFFER; DONI FILHO, KOEHLER, 1994; ROSA; BARROS, 1999).

Para a propagação da espinheira-santa várias técnicas foram estudadas: micropropagação (PEREIRA, 1993), transplante de mudas obtidas em florestas nativas (MAGALHÃES et al., 1991) e produção de mudas a partir de sementes (MAGALHÃES et al., 1992).

Observou-se que o volume do recipiente tem influência decisiva sobre o desenvolvimento da muda. Num ensaio envolvendo seis tipos de recipiente e dois tipos de substrato, com ou sem condicionador de solo, as mudas se desenvolveram melhor em sacos de polietileno preto quando comparado com o desenvolvimento em tubetes de diferentes volumes. Quanto maior o volume de substrato disponível, maior o desenvolvimento da muda. A altura média das mudas produzidas em canteiro sobre o solo, em sacos de polietileno preto, com volumes de 240 ml, 670 ml e 1350 ml, foi de 21,1 cm, 24,4 e 25,3 cm, respectivamente (SANTOS; ARAUJO; SCHEFFER, 1999).

RADOMSKI (1998) verificou que há alta correlação positiva entre a luminosidade e os caracteres como peso foliar específico e teores de polifenóis totais, polifenóis não tanantes e de taninos. Por outro lado, não foi observada correlação significativa entre a disponibilidade de nutrientes no solo e esses mesmos caracteres, em quatro microambientes, exceto para o ferro.

2.1.5 Variação Genética em Espinheira-Santa

A forma de distribuição linear ao longo dos rios, a dispersão de sementes zoocórica e a baixa densidade populacional influem no padrão de distribuição da variação genética entre e dentro de populações (WRIGHT, 1976; KAGEYAMA; CASTRO; CARPANEZZI, 1989). Na espécie *M. boaria*, foi verificada variação clinal em relação à latitude na razão comprimento/largura das folhas e na capacidade de germinação das sementes (DONOSO; WENDLER, 1985).

Cinco populações de *M. aquifolia* analisadas por PERECIN (2000) apresentaram medidas de polimorfismo (número de alelos, heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada) comparáveis às encontradas na literatura para espécies com alta variabilidade genética. Porém, diversos alelos variaram em

freqüência dependendo da população considerada e algumas delas apresentaram alelos raros e exclusivos. As populações apresentaram elevada endogamia e alta diferenciação genética entre populações, aparentemente não relacionadas com a distância geográfica, com o tipo de floresta nem com o nível de interferência antrópica nas populações. Algumas populações distantes apresentaram maior similaridade genética do que outras mais próximas. A espécie *M. ilicifolia* compartilhou a presença de muitos alelos das populações de *M. aquifolia*, indicando que a primeira é muito próxima, filogeneticamente, a esta última. O fluxo gênico estimado entre espécies sugere a possibilidade destas não estarem completamente isoladas reprodutivamente ou, se estiverem, esse isolamento ocorreu em um espaço de tempo não muito distante.

O teor de taninos nas folhas de espinheira-santa, coletadas em diversos ambientes, revelou grande variação. Isso foi associada às características morfológicas e às condições de insolação (BERNARDI; WASICKY 1959). Porém, num experimento com *M. aquifolia*, com árvores originadas de sementes de mesma procedência, foi encontrada diferença significativa no teor de fenóis totais dos indivíduos (PEREIRA et al.; 1994). Não se pode desprezar a hipótese de haver, também, variação devido a fatores genéticos em relação ao teor de taninos nas folhas, pois não é raro que espécies medicinais apresentem raças químicas (BERNARDI, WASICKY, 1959).

2.2 IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DO SISTEMA DE CRUZAMENTO

Os sistemas de cruzamento determinam o padrão de transmissão genética e influem na organização da variação genética numa população. A autogamia restringe a heterozigose e a migração de genes pelo fluxo de pólen, reduzindo a variação dentro de populações e aumentando a variação entre populações. Em contraste, a alogamia favorece o fluxo de genes e reduz a probabilidade de diferenciação microgeográfica e subestruturamento de populações. Há cinco tipos básicos de sistemas de cruzamento: (a) predominantemente autógama; (b) predominantemente alógama; (c) sistema misto; (d) parcialmente apomítica; e (e) autogamia parcial de gametófitos (KEARNS; INOUYE, 1993).

Mesmo em populações alógamas, alguma autofecundação combinada com cruzamentos entre indivíduos aparentados e dispersão de sementes restrita pode levar ao isolamento reprodutivo e à formação de subpopulações. O estudo dos padrões de transmissão de genes, em populações naturais, é importante para se entender a evolução e a manutenção da autofecundação, da dioicia e de sistemas de cruzamento que restringem o número de reprodutores disponíveis. O conhecimento do sistema de cruzamento, também, tem aplicações práticas importantes em culturas agrícolas e florestais, no manejo de pomares de semente e no manejo de espécies raras ou ameaçadas para conservar sua variabilidade genética. Os planos de manejo de tais espécies devem estar fundamentadas nas avaliações quantitativas do tamanho da vizinhança, do tamanho efetivo da população e da migração de genes (KEARNS; INOUE, 1993).

2.3 CONTEXTO ECOLÓGICO DOS SISTEMAS DE CRUZAMENTO

Sistemas de cruzamento são influenciados por fatores ambientais e, por serem regulados por genes, são afetados pela seleção. Conseqüentemente, o sistema de cruzamento pode variar entre populações. Mesmo dentro de populações, pode haver diferenças entre indivíduos na taxa de fecundação cruzada. Por exemplo, as plantas que florescem na extremidade fenológica da floração podem ser predominantemente autógamas, enquanto que as do pico de floração, predominantemente alógamas. As plantas no centro de populações densas podem ser predominantemente alógamas, enquanto que as das margens, predominantemente, autógamas. Populações onde os polinizadores são abundantes podem apresentar padrões distintos daquelas onde os polinizadores são raros. Num mesmo indivíduo, as flores localizadas nas partes mais baixas da copa podem ter maior taxa de autofecundação do que as das partes mais altas. O modo de polinização, a complexidade arquitetônica das flores e das plantas, bem como o tamanho e a densidade das populações interagem com o controle genético do grau de auto-incompatibilidade para determinar a taxa de fecundação cruzada. (KEARNS; INOUE, 1993; BROWN; BURDON; JAROSZ., 1989).

Comparações entre espécies anemófilas e entomófilas demonstraram influência considerável do modo de polinização sobre a taxa de fecundação cruzada.

Espécies anemófilas tendem apresentar pouca variação na taxa de fecundação cruzada entre populações pois a taxa de fecundação cruzada é influenciada, principalmente, pela estrutura floral e grau de auto-incompatibilidade. Por outro lado, espécies entomófilas apresentam mais variação na taxa de fecundação cruzada, tanto dentro quanto entre espécies, bem como entre e dentro de populações. Isto porque os insetos são mais sensíveis às flutuações ambientais. Por exemplo, em condições climáticas adversas a alimentação dos insetos é reduzida (KEARNS; INOUE, 1993; BROWN; BURDON; JAROSZ., 1989). O grau de incompatibilidade determina a influência da atividade do polinizador sobre a taxa de fecundação cruzada. No caso de espécies auto-incompatíveis, a atividade do polinizador só influi na quantidade de sementes produzidas e não na taxa de fecundação cruzada. Em espécies auto-compatíveis, o padrão da atividade dos polinizadores determina a taxa de fecundação cruzada, uma vez que ocorre autofecundação na ausência de polinizadores (BROWN; BURDON; JAROSZ, 1989).

Os efeitos da dinâmica espacial da população na taxa de fecundação cruzada podem ser divididos em: (a) causadas por mudanças no tamanho da população; e (b) causadas por mudanças na densidade da população. Pouco se conhece sobre os efeitos do tamanho da população. Porém, um decréscimo marcante na taxa de fecundação cruzada foi detectado em *Clarkia exilis*, uma espécie ornamental herbácea, devido à redução no tamanho da população (KEARNS; INOUE, 1993; BROWN; BURDON; JAROSZ, 1989). O efeito da densidade populacional na taxa de fecundação cruzada pode ser complexo. É importante considerar a influência das diferenças em níveis de auto-incompatibilidade, modo de fornecimento de pólen e plasticidade da arquitetura das plantas. Esta última característica é ilustrada com dois exemplos. *Echium plantagineum*, uma herbácea nativa da Europa, é uma espécie entomófila e plástica em resposta à densidade populacional. Em situações de baixa densidade e competição, produz indivíduos com muitos caules e ramos. Embora cada ramo tenha poucas flores, o conjunto proporciona muitas flores receptivas, simultaneamente. Nestas circunstâncias, a distância média entre flores na mesma planta é menor do que entre plantas, fazendo com que um polinizador visite mais flores numa mesma planta, favorecendo a autopolinização. Em densidades maiores, os indivíduos tendem a ser menores, com poucas flores, favorecendo a fecundação cruzada. Por outro lado, há espécies como *Trillium*, uma

herbácea ornamental, cujas plantas produzem uma ou poucas flores por ano. Neste caso, a elevada densidade populacional resulta numa menor taxa de fecundação cruzada aparente, pois, as plantas vizinhas têm maior probabilidade de terem o mesmo genótipo por apresentarem, também, propagação vegetativa (BROWN; BURDON; JAROSZ, 1989).

Entre as características ecológicas, a densidade floral é, provavelmente, mais importante do que a densidade de plantas quanto à influência sobre o comportamento alimentar dos polinizadores e, conseqüentemente, sobre a taxa de fecundação cruzada. Porém, a fenologia reprodutiva e, em especial, a sincronia no momento da antese, influi significativamente no sistema de cruzamento, levando a uma maior quantidade de cruzamentos dentro da mesma classe fenológica. Uma vez que isto é uma característica com herdabilidade elevada, pode ocorrer maior número de cruzamentos entre indivíduos aparentados (PRAT; ARNAL, 1994). Assim, é relevante estudar a variação temporal na taxa de fecundação cruzada durante a estação. Embora a maioria das plantas apresente considerável variação intra-estacional na densidade de flores abertas, os efeitos desta variação raramente tem sido mensurados (KEARNS; INOUE, 1993; BROWN; BURDON; JAROSZ, 1989).

Nem todas as variações na taxa de fecundação cruzada ao longo da estação ou de estações consecutivas podem ser atribuídas a mudanças no comportamento dos polinizadores devido a variações ambientais. Num estudo sobre sistemas reprodutivos em *Eucalyptus* e *Pinus*, ao longo de várias estações, observou-se que as taxas de fecundação cruzada eram maiores nos indivíduos mais velhos. No caso da maioria das espécies de *Eucalyptus* poder-se-ia atribuir estas diferenças a alterações no comportamento dos polinizadores nos distintos anos, mas não em *Pinus*, que é anemófilo. Uma explicação mais provável é a da sobrevivência preferencial dos heterozigotos das progênies de ambos os gêneros (BROWN; BURDON; JAROSZ, 1989).

Destaca-se, ainda, a influência do cruzamento entre indivíduos aparentados na taxa de fecundação cruzada. Em girassol a taxa de fecundação cruzada em populações com alta densidade foi estimada em 54% enquanto que em populações de baixa densidade foi de 91%. Essa diferença foi atribuída à maior probabilidade de cruzamento entre indivíduos aparentados em populações com alta densidade (HAMRICK, 1989). Um outro estudo, em uma espécie havaiana ginodióica de

Bidens, revelou que a taxa de fecundação cruzada estimada em indivíduos hermafroditas, em oito populações, foi de 55%, enquanto que em indivíduos estritamente femininos, foi de 85%. Portanto, pelo menos 15% da endogamia nos indivíduos hermafroditas era devida a cruzamentos entre indivíduos aparentadas ao invés de autofecundação (HAMRICK, 1989).

2.3.1 Uso de Isoenzimas na Estimativa de Taxa de Fecundação Cruzada

A consciência crescente da diversidade nos sistemas de cruzamento e sua importância na determinação da biologia de populações de plantas é um dos fatores responsáveis pelo crescimento recente na pesquisa sobre o assunto. Nesse contexto, o estudo de polimorfismo isoenzimático proporciona algumas vantagens sobre os estudos morfológicos: (a) as variantes aloenzimáticas expressam-se de forma codominante; (b) muitos locos isoenzimáticos são polimórficos na maioria das populações; e (c) é improvável que as aloenzimas, por si, sejam submetidas a fortes pressões de seleção (BROWN; BURDON; JAROSZ, 1989).

Os estudos sobre sistemas de cruzamento podem ser abordados com: (a) avaliação (estimativa) de sistema da taxa de fecundação cruzada de indivíduos; e (b) estimativa de parâmetros de cruzamento em populações. Embora estas áreas tenham pontos em comum, elas diferem na abordagem estatística. Em estudos em nível de indivíduo, obtém-se maior precisão, aumentando a informação genética sobre cada indivíduo (ex. analisando mais locos). Por outro lado, procedimentos experimentais mais eficientes para problemas em nível de populações geralmente necessitam de análise de poucos locos e maior número de indivíduos (BROWN; BURDON; JAROSZ, 1989).

O modelo mais comumente empregado no estudo de populações de plantas é o modelo do sistema reprodutivo misto. Esse modelo parte do pressuposto de que há dois tipos de uniões de gametas. Cada zigoto é resultado de autofecundação, com uma probabilidade fixa 's', ou de fecundação por um grão de pólen proveniente aleatoriamente da população, com probabilidade de 't' ($t = 1 - s$). No modelo de sistema reprodutivo misto é possível estimar a taxa de fecundação cruzada com base somente na frequência de heterozigotos entre adultos ou progênes na população como um todo. O procedimento pressupõe, entretanto, que o sistema

reprodutivo é a única força atuante sobre as frequências genotípicas e que a população está em equilíbrio com o sistema reprodutivo. As estimativas quantitativas não são, portanto, confiáveis pois são totalmente dependentes deste pressuposto (BROWN; BURDON; JAROSZ, 1989).

A segunda opção experimental requer um número suficiente de descendentes de cada genitor materno, de modo que seu genótipo possa ser inferido com confiabilidade. Também, este modelo se baseia em uma série de pressupostos e características (BROWN; BURDON; JAROSZ, 1989).

Há modelos e procedimentos mais complexos. Dois procedimentos envolvendo vários locos utilizam o conceito de probabilidade de detecção. Cada descendente de uma determinada matriz pode ser classificado como sendo, ou não, resultado de fecundação cruzada. A probabilidade de um cruzamento ser detectado no genótipo maternal (G_i) depende do grão de pólen ser portador, ou não, de um alelo não-materno em algum dos locos analisados. O principal problema do método é que o cálculo da probabilidade de detecção (G_i) requer informações sobre a frequência dos genótipos multilocos do pólen (BROWN; BURDON; JAROSZ., 1989).

SHAW; KAHLER e ALLARD (1981) desenvolveram e simplificaram esta abordagem para tratar de muitos locos e genótipos maternos. O estimador proposto pressupõe que todos os cruzamentos têm a mesma probabilidade de detecção, independente do genótipo materno. RITLAND e JAIN (1981) apresentaram um procedimento formal, completo, de estimativa por máxima verossimilhança, baseado em muitos locos independentes. Demonstrou-se, numericamente, que estimativas multilocos são menos influenciadas por seleção e cruzamentos não-aleatórios do que estimativas em locos únicos. As análises destes autores indicaram que, na maioria dos casos, três a quatro locos aproximam-se da menor variância possível. A combinação de genótipos de vários locos é recomendada para aumentar o número de diferentes conjuntos possíveis, proporcionando maior número de graus de liberdade e maior precisão estatística.

2.4 ISOENZIMAS NO ESTUDO DA VARIAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES

Segundo ADAMS (1993), a análise de polimorfismo isoenzimático é, atualmente, o melhor método para avaliar a diversidade genética em espécies

florestais. Pode-se identificar dois componentes na diversidade genética. O primeiro refere-se à riqueza alélica, ou seja, o número de diferentes alelos encontrados em uma determinada amostra. O segundo componente é o de igualdade na distribuição das frequências alélicas, considerando-se, por exemplo, que uma amostra com três alelos de mesma frequência apresenta maior diversidade que uma amostra com um alelo predominante e dois alelos raros (BROWN; WEIR, 1983). O estudo dos padrões de variação isoenzimática em populações naturais pode servir de base para, por exemplo, se estimar o impacto da domesticação sobre os níveis de variabilidade genética. Os efeitos dos diversos métodos de regeneração sobre a manutenção da variabilidade genética devem ser investigados. O delineamento da estratégia mais eficiente para conservação de recursos genéticos requer informação sobre a distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações (ROBINSON, 1998).

Marcadores genéticos são características com herança mendeliana simples, facilmente reconhecidas, cuja expressão não é influenciada pelo ambiente. Os primeiros marcadores genéticos utilizados foram as características morfológicas. Entretanto, os marcadores morfológicos, freqüentemente, são controlados por genes dominantes, não permitindo distinguir plantas heterozigotas. Marcadores morfológicos, como a presença de pigmento nas flores ou características de frutos e sementes, são expressos somente na planta adulta, não sendo práticos quando se trabalha com espécies que levam muitos anos para atingir a fase reprodutiva. Esses marcadores podem ainda exercer influência sobre o valor adaptativo da planta. Por exemplo, a coloração das flores pode influenciar no comportamento dos insetos polinizadores. Isso não é desejável se essa característica for empregada na determinação dos sistemas de cruzamento. Marcadores genéticos bioquímicos e moleculares, além de serem identificáveis em qualquer idade da planta, não interferem no processo biológico que se deseja estudar. Por definição, os marcadores genéticos bioquímicos são produtos da expressão de genes (proteínas ou compostos secundários como os terpenos) (ROBINSON, 1998).

As isoenzimas são diferentes formas moleculares de uma enzima, catalisando a mesma reação na célula. Quando as isoenzimas são controladas por alelos de um único loco, elas são chamadas de aloenzimas. Estas representam a consequência bioquímica da substituição, deleção ou adição de um ou mais aminoácidos no

polipeptídeo, interferindo na sua carga elétrica e, conseqüentemente, na sua mobilidade durante a eletroforese. A mobilidade da molécula através do gel depende, também, do seu peso molecular e de sua conformação. Após a separação das isoenzimas por eletroforese, elas são identificadas por meio de reações químicas baseadas em suas atividades catalíticas específicas. O conjunto de bandas coloridas que uma enzima forma no gel é denominado zimograma. Quando se deseja examinar os processos evolutivos em uma população, os marcadores são necessariamente os locos e os respectivos alelos, identificados na interpretação de zimogramas. A interpretação de zimogramas baseia-se no conhecimento da estrutura química da enzima (monomérica, dimérica ou mais complexa) e no modo de herança dos padrões observados (número de locos e de alelos envolvidos) (ROBINSON, 1998).

Quando não se dispõe de informações prévias sobre o polimorfismo de isoenzimas na espécie em estudo, recomenda-se examinar amostras coletadas em vários locais dentro da área de distribuição geográfica da espécie, visando aumentar a probabilidade de encontrar maior número de alelos. Para determinar o mecanismo de herança nas enzimas polimórficas, é necessário examinar progênies, preferencialmente de cruzamentos controlados (progênie de autofecundação ou de irmãos germanos). Após estabelecida uma hipótese preliminar sobre o modo de herança da enzima, verifica-se se esta explica todos os zimogramas obtidos. Ao interpretar zimogramas, deve-se ter em mente que, em certos sistemas enzimáticos, formam-se bandas resultantes de interações entre locos, podendo ocorrer superposição de bandas de diferentes locos. Deve-se estar atento, também, à possível segregação de alelos nulos ou, ainda, de genes modificadores capazes de afetar a velocidade de migração de determinada enzima durante a eletroforese. A análise de progênies de cruzamentos controlados permite verificar o modo de segregação nos locos estudados (ROBINSON, 1998). Essa informação é necessária em procedimentos estatísticos, nos quais se utilizam vários locos simultaneamente, como na análise de sistemas de cruzamento ou da estrutura genética de populações (RITLAND; JAIN, 1981; ROBINSON, 1998), porque os modelos genéticos utilizados baseiam-se em marcadores independentes.

Segundo HAMRICK (1989), cerca de 50% dos locos de isoenzimas costumam ser polimórficos, dentro de espécies, e cerca de um terço deles é polimórfico na

população. Analisando os padrões isoenzimáticos em plantas, é possível relacionar o nível e a distribuição da variabilidade genética com a história natural das espécies. HAMRICK (1989) examinou a influência de características como o modo de reprodução, o sistema de cruzamento, os mecanismos de dispersão de sementes e de propágulos, a amplitude da distribuição geográfica e a fase de sucessão em que a espécie se enquadra, sobre a distribuição da variabilidade entre e dentro de populações de plantas.

2.4.1 Índice de Fixação

Um das medidas utilizadas para quantificar a variabilidade entre e dentro de populações é o índice de fixação de Wright. O coeficiente F , de Wright (1951¹), citado por ROBINSON (1993) é o parâmetro utilizado para medir o grau de fixação gênica resultante da endogamia biparental. Segundo ROBINSON (1993), o coeficiente F é definido como sendo a correlação entre os alelos nos gametas que formam um zigoto. Inicialmente utilizado para descrever endogamia sob diferentes esquemas de cruzamento, foi estendido para quantificar a diferenciação genética de populações segundo níveis hierárquicos de endogamia. Wright descreveu os seguintes coeficientes de endogamia, aplicáveis a uma população com subdivisão em níveis hierárquicos:

F = Desvio das frequências genóticas da população em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esses desvios são resultantes de cruzamentos não ao acaso (e.g. endogamia por autofecundação, ou endogamia biparental).

θ = Coeficiente de ancestralia, representando a probabilidade de que dois indivíduos pertencentes a subpopulações distintas possuam um alelo idêntico por descendência (proveniente de um ancestral comum).

f = Endogamia, em nível de indivíduo (a probabilidade de que dois alelos presentes no mesmo indivíduo sejam idênticos por descendência)

O coeficiente f apresenta as seguintes propriedades:

$$f = (F - \theta) / (1 - \theta) = (1 - t) / (1 + t)$$

¹ WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* V. 15, p. 313-354.

sendo t a taxa de fecundação cruzada na população. Como $t = 1 - s$, sendo s o coeficiente de autofecundação, pode-se demonstrar que $f = s / (2 - s)$.

Com esses coeficientes, Wright descreveu a variância genética das frequências alélicas na população para locos com dois alelos como

$$\text{Var}(p) = p(1-p) [\theta + (F - \theta) / N + (1 - F) / 2N]$$

Onde p é a frequência do alelo na população e N é o número de indivíduos na população.

A partir dos coeficientes f , F e θ , derivou-se a seguinte relação:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$$

em que os diferentes valores de F representam, respectivamente:

$$F_{IT} = F \qquad F_{IS} = f \qquad F_{ST} = \theta$$

Os valores F_{IT} e F_{IS} representam o índice de fixação de indivíduos em relação à população total e aos níveis hierárquicos analisados, respectivamente, enquanto que F_{ST} quantifica a razão entre a variância verificada entre os níveis hierárquicos analisados e o valor máximo possível esperado quando este nível hierárquico está totalmente isolado (SWOFFORD; SELANDER, 1989).

Os valores de F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} apresentam tendências diferentes, de acordo com a densidade, distribuição espacial e tamanho efetivo das populações, bem como com o sistema de cruzamento e o modo de dispersão do pólen e das sementes (WRIGHT, 1969). Além disso, em geral, a seleção e a deriva genética tendem a aumentar a diferença entre populações. Espécies com maior fluxo de pólen e sementes apresentam menor diferenciação entre progênies do que aquelas com fluxo restrito. A combinação do sistema de cruzamento com mecanismos de polinização é o que apresenta a melhor predição da variação nos padrões isoenzimáticos. Espécies anuais autógamas detêm mais de 50% de sua variação genética entre populações, enquanto que as alógamas anemófilas apresentam menos de 10% entre populações. Plantas polinizadas por animais têm variação entre populações ligeiramente maiores que àquelas polinizadas pelo vento. Os mecanismos de dispersão de sementes têm efeitos similares na distribuição da variação genética (HAMRICK, 1989). Porém, plantas polinizadas por insetos de vôo longo apresentam padrão de diversidade semelhante ao das plantas alógamas anemófilas (DIAS; KAGEYAMA, 1991).

2.4.2 Coeficientes de Identidade e de Distância Genética

Outras medidas de diversidade genética utilizadas são os coeficientes de identidade ou de distância genética. Segundo DIAS (1998), esses coeficientes combinam conceitos genéticos e geométricos e devem reunir um ou mais dos seguintes atributos: ser métrico, utilizar frequências alélicas para seu cálculo e refletir o predomínio dos fatores de natureza genética sobre os fatores ambientais que estão sendo avaliados.

As medidas de identidade e de distância genética de Nei têm sido as mais utilizadas. Segundo NEI (1972) o coeficiente de identidade genética pode ser utilizado para comparar quaisquer conjuntos de dados de populações, que não precisam, necessariamente, estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg, mas os coeficientes obtidos aplicam-se somente àquele conjunto de dados pois são influenciados pela amostragem. O coeficiente **D** proposto por NEI (1972) pressupõe uma medida de identidade genética (**I**), expressa pela probabilidade de que dado alelo de um loco, tomado ao acaso de duas diferentes populações, seja idêntico em relação à probabilidade de que dois alelos do mesmo loco, tomados também ao acaso em cada população sejam também idênticos (ROBINSON, 1998). Ou seja, o coeficiente mede a correlação entre as frequências alélicas em cada loco, em duas populações (X e Y, respectivamente) (ALFENAS et al., 1991). A estatística **D**, de Nei, é considerada uma medida robusta de distância genética pois leva em conta tanto os locos polimórficos quanto os monomórficos. Como os valores de **D** são calculados a partir de amostras das populações, eles variam entre amostras. Os fatores que influenciam os valores de **D** são a quantidade de divergência genética entre as populações, os tamanhos das amostras e o número de locais estudados.

As diferenças genéticas entre populações podem ser medidas por coeficientes de identidade ou de distância genética e estes utilizados em análises de agrupamento por métodos de análise multivariada. O princípio geral de todos os métodos de análise de agrupamento é o de maximizar a similaridade dentro de grupos e a dissimilaridade entre grupos, buscando detectar padrões na distribuição da diversidade. Os métodos hierárquicos aglomerativos são os mais utilizados em biologia. Tais métodos se processam por séries sucessivas de fusões. Os n itens são classificados em $n-1$, $n-2$ etc., grupos que, por sua vez, são gradualmente

fundidos até unir todos os itens em um único grupo. As fusões são baseadas em subdivisões hierárquicas operadas sobre uma matriz de distância, permitindo a geração de uma árvore de classificação bidimensional, denominada dendrograma. Em todos os métodos a distância entre itens é o critério aplicado para definir grupos. Em termos de melhoramento genético, o método das médias das distâncias (UPGMA - *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic averaging*) é considerado superior aos métodos do vizinho mais próximo e do vizinho mais distante (DIAS, 1998).

Outra forma de avaliação dos métodos de agrupamento é a análise do grau de concordância entre o dendrograma e a matriz de identidade genética *I*. Esta análise é feita a partir da matriz cofenética (*C*) formada com as distâncias entre os pares de itens (c_{ij}) que representam os níveis de fusão verificados no dendrograma. O coeficiente de correlação cofenética é obtido pela correlação dos elementos d_{ij} e c_{ij} das matrizes *I* e *C*, respectivamente, pelo coeficiente de correlação de Pearson (r_P). Valores de r_P acima de 0,80 indicam um bom ajuste entre as duas matrizes (DIAS, 1998).

2.4.3 Importância do Tamanho Efetivo das Populações

A fragmentação de áreas de florestas ocasionada pelo avanço da agricultura e de outras atividades antrópicas leva ao isolamento de subpopulações e, conseqüentemente, à deriva genética e à endogamia. Há forte correlação entre tamanho da população e os graus de variabilidade genética. Estas decrescem rapidamente quando há redução no tamanho das populações. Quando uma população é iniciada por poucos indivíduos, sua variabilidade dependerá da amostra de alelos trazida por estes fundadores. Esse efeito fundador pode causar diferenças significativas entre as freqüências alélicas na população original e na população recém-formada (ROBINSON, 1998).

As amostragens, visando à conservação dos recursos genéticos *ex situ* ou à sua utilização em programas de melhoramento, devem fundamentar-se no conceito do tamanho efetivo populacional (N_e), levando em consideração a representatividade genética das amostras (ROBINSON, 1998, RESENDE, STURION, MENDES, 1995). Quando pequeno número de indivíduos representa alguma população, o tamanho

reduzido do N_e não permite reter alelos raros. Neste caso, a reunião de diferentes populações em uma população composta é desejável em termos de tamanho efetivo pois havendo cruzamentos entre indivíduos de diferentes populações, resulta num aumento da base genética final. A amostra composta terá seu tamanho efetivo maximizado quando as amostras individuais tiverem tamanhos efetivos iguais ou, pelo menos semelhantes (VENCovsky, 1988).

As diferenças nas frequências alélicas entre e dentro de populações podem ser geradas pela deriva genética ou pela seleção. O grau dessa diferenciação dependerá do balanço entre o fluxo gênico e a intensidade das demais forças evolutivas. Se a troca de genes dentro de cada população for menor que o necessário para assegurar a panmixia em toda sua extensão, forma-se uma estrutura interna na qual cada indivíduo está cercado por uma 'vizinhança genética'. Uma vizinhança genética corresponde à área ao redor de um indivíduo dentro da qual todos os demais têm a mesma probabilidade de ser um de seus progenitores e seu tamanho depende do sistema de cruzamento, das distâncias cobertas pela dispersão do pólen e sementes, e da distância coberta pela propagação clonal (ROBINSON, 1998).

Na fase inicial de um programa de melhoramento, é fundamental que a eficiência genética do pomar de semente seja monitorada. Os pomares de semente são o principal meio pelo qual o melhoramento genético obtido pela seleção pode ser "embalado" para uso em plantios. No caso de espécies alógamas, quando os indivíduos, selecionados pelo elevado valor genético, que compõem o pomar de semente atingem a maturidade, pressupõe-se que eles se cruzarão ao acaso e produzirão sementes de elevada qualidade genética mantendo a variabilidade genética inerente ao método de seleção. Entretanto, quando os cruzamentos nos pomares decorrem de polinização pelo vento a eficiência genética pode não ser plena. Os fatores que reduzem a eficiência genética em pomares de semente de espécies anemófilas são: (a) elevados níveis de autofecundação (resultando em progênies com depressão endogâmica); (b) contaminação de pólen de indivíduos externos ao pomar (e, portanto, não selecionados); e (c) cruzamentos não aleatórios entre os indivíduos (ex. incompatibilidade cruzada, diferenças na produção de flores ou falta de sincronia na floração entre os indivíduos, dispersão de pólen restrita), resultando em menor número de fecundações cruzadas e, portanto, menor

variabilidade genética do que a esperada no pomar. Os marcadores genéticos isoenzimáticos têm se mostrado úteis nos estudos dos fatores atuantes na eficiência genética dos pomares de semente (ADAMS, 1983).

Isoenzimas têm sido, também, utilizadas para se estimar a proporção da progênie dos pomares de semente que resulta de autofecundação. Um procedimento de estimativa baseado em vários locos revelou que 8% da progênie viável produzida por um pomar de semente clonal de Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*), com 20 anos de idade, eram de autofecundação. Esta estimativa é consistente com estimativas feitas em populações naturais. Entretanto, os valores estimados variaram de zero a 16% entre seis indivíduos do pomar clonal. Assim, enquanto o número médio de descendentes resultantes de autofecundação não é maior do que a encontrada em populações naturais, alguns genitores parecem ter uma taxa de autofecundação superior à média. Removendo-se estes do pomar ou evitando a coleta de suas sementes a porcentagem das sementes resultantes de autofecundação pode ser reduzida significativamente (ADAMS, 1983).

As isoenzimas podem auxiliar, ainda, na seleção de caracteres economicamente importantes. Foi detectada correlação positiva, em alguns casos e para algumas espécies, entre heterozigose nos caracteres isoenzimáticos e taxa de crescimento. A correlação do coeficiente de regressão entre crescimento e heterozigose foi maior nas populações mais velhas, indicando que a superioridade dos heterozigotos só é expressa quando ocorre competição mais intensa quando aumenta a densidade populacional. Embora esta correlação possa auxiliar na seleção precoce, é importante investigar, primeiramente, o mecanismo que controla este comportamento, antes de aplicar as informações na seleção precoce (ADAMS, 1983).

2.4.4 Limitações do Uso de Isoenzimas

Os estudos envolvendo isoenzimas limitam-se às enzimas solúveis em água e somente são detectadas as substituições de aminoácidos que resultam em diferenças na mobilidade da proteína durante a eletroforese. A presença de alelos nulos pode causar dificuldades na interpretação de zimogramas e pode introduzir erros nas estimativas das frequências alélicas naquele loco (ROBINSON, 1998).

A duplicação de genes ocorre, também, dentro do genoma de espécies diplóides e seus produtos podem estar confinados em diferentes compartimentos da célula. O sistema enzimático da malato desidrogenase (MDH), por exemplo, inclui isoenzimas encontradas no citoplasma, nas mitocôndrias e nos microsossomos, o que pode resultar em zimogramas complexos (ROBINSON, 1998).

Outro fato a ser considerado é o nível de variabilidade genética em diferentes sistemas enzimáticos. As enzimas podem ser divididas em dois grupos: (a) enzimas do Grupo I que agem sobre um substrato fisiológico único e incluem enzimas reguladoras e a maioria das envolvidas no metabolismo intermediário, na glicólise e no Ciclo de Krebs; (b) enzimas do Grupo II, como as esterases, fosfatases, peroxidases, álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase que utilizam substratos múltiplos, freqüentemente de origem externa, e respondem diretamente à diversidade ambiental. Essas são menos numerosas que as do Grupo I, porque têm funções mais generalizadas na célula. A variabilidade genética das enzimas do Grupo I é mais baixa que a das enzimas do Grupo II (ROBINSON, 1998).

Um problema levantado por diversos pesquisadores é o fato de que as enzimas mais polimórficas tendem a ser mais freqüentemente escolhidas para quantificar a variabilidade genética. Dessa forma, não representam uma amostragem ao acaso da variabilidade contida no organismo examinado. Esse é um aspecto importante a ser considerado na escolha de marcadores em geral. Para se descrever a variabilidade genética em determinada espécie, é importante utilizar um grande número de locos, incluindo enzimas representativas de ambos os grupos (ROBINSON, 1998).

A validade da informação obtida por meio de isoenzimas para análise de processos evolutivos baseia-se na suposição de que essas sejam marcadores neutros, que conferem o mesmo valor adaptativo ao indivíduo (ROBINSON, 1998). Porém, há exemplos de respostas fisiológicas específicas associadas a certas isoenzimas. O mecanismo pelo qual formas alternativas de uma enzima interferem no valor adaptativo dos seus portadores implica num nível de atuação mais complexo ainda não devidamente esclarecido, nem nos casos mais evidentes desse tipo de associação (MITTON, 1989). Nesses casos, as informações devem ser interpretadas com cautela, no momento da tomada de decisões em programas de melhoramento (ADAMS, 1983).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta de sementes foi realizada de novembro de 1995 a março de 1996, nos três Estados da Região Sul, com o objetivo de instalar testes de progênies. As áreas de coleta do material foram definidas a partir de informações prévias sobre a localização das plantas, por parte de pessoas das comunidades locais.

3.1 ÁREAS DE COLETA

As coletas foram realizadas em seis locais distintos (tabela 1), tendo-se realizado as seguintes atividades em cada local:

a) Viamão, RS

A coleta de sementes foi realizada na Estação Experimental da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO). O local conta com uma coleção de árvores de espinheira-santa, transplantadas de diferentes regiões do Estado, em especial, da região conhecida como Depressão Central. Foram coletados frutos de 19 árvores. Para o estudo do sistema de cruzamento foram utilizadas as progênies desta população antropogênica, pelo fato desta conter o maior número de indivíduos em frutificação ao mesmo tempo e com boa produção de sementes, gerando numerosas progênies. Nos estudos sobre a variação genética entre populações, este grupo foi denominado Viamão Total. Parte das progênies desta população foi incluída no teste de progênies e é indicada por Viamão TP.

b) Arroio do Conde, RS.

A coleta foi realizada dentro do município de Arroio dos Ratos, RS, na região da Depressão Central do Rio Grande do Sul. Foram coletados frutos de oito indivíduos localizados em uma mata ciliar do rio Jacuí.

c) Campos Novos, SC

Município localizado no centro-oeste do Estado de Santa Catarina. Foram localizados oito indivíduos com frutos em uma mata ciliar do rio São João.

Foram coletados, também, frutos de três árvores na área urbana do município, totalizando 11 matrizes.

d) Água Doce, SC

No município Água Doce, distante cerca de 85 km de Campos Novos, a coleta foi feita na mata ciliar do rio Água Doce. Foram coletados frutos de 23 indivíduos, apesar da quantidade de frutos por árvore ter sido pequena (apêndice 1).

e) Laranjeiras do Sul, PR (Laranjeiras do Sul / Guarapuava)

Em Laranjeiras do Sul, foram coletados frutos de seis plantas localizadas em um pequeno capão, na área rural do município. Em Guarapuava, foram coletados frutos de duas árvores na área urbana, totalizando oito indivíduos.

f) Região Metropolitana de Curitiba, PR

(Campina Grande do Sul / Quatro Barras Pinhais / Araucária / Campo Largo)

No parte oeste da Região Metropolitana de Curitiba (RMC), Paraná, em Araucária e Campo Largo, foram coletados frutos de 17 indivíduos., Porém, o número de frutos obtido por árvore foi pequeno. Na região leste, Campina Grande do Sul e Quatro Barras, foram coletados frutos de cinco árvores, totalizando 22 matrizes na RMC.

Foram efetuados coleta, também, em Balsa Nova, Castro, Bom Sucesso, Reserva Indígena de Marrecas (próximo a Guarapuava) e em árvores localizadas na área urbana de Curitiba, totalizando 105 matrizes. Os frutos foram levados ao Laboratório de Genética e Melhoramento da Escola de Florestas da UFPR onde foram secos ao ambiente e, após a abertura das cápsulas, removeu-se, manualmente, o arilo que revestia as sementes.

TABELA 1 - Dados geográficos e climáticos referentes aos locais de coleta de frutos de espinheira-santa e das áreas experimentais

Local	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude m.s.n.m.	Temperatura (°C)			Precipitação (mm)
				média	mínima	máxima	
Viamão, RS ¹⁾	29°57'	51°06'	7	20,4	14	26	1397
Arroio do Conde, RS ¹⁾	29°48'	51°49'	76	20,1	14	25	1509
Campos Novos, SC ²⁾	27°24'	51°12'	920	16,5	11,6	22,8	1800
Água Doce, SC ²⁾	27°24'	51°12'	920	16,5	11,6	22,8	1800
Laranjeiras do Sul / Guarapuava, PR ³⁾	25°30'	51°30'	1058	17,0	12,6	23,5	1959
Região Metropolitana de Curitiba, PR ³⁾	25°25'	49°08'	930	16,7	12,5	22,5	1426
Ponta Grossa, PR ³⁾	25°13'	50°01'	880	17,8	13,3	24,1	1542
São José dos Pinhais, PR ³⁾	25°25'	49°08'	930	16,7	12,5	22,5	1426

FONTES: ¹⁾ Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Viamão, RS; ²⁾ Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Campos Novos, SC; e ³⁾ Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina, PR.

NOTA: m.s.n.m = metros sobre o nível do mar

As coordenadas geográficas referem-se à estação meteorológica mais próxima do local citado; respectivamente:

Cachoeirinha, RS para Viamão; Taquari, RS para Arroio do Conde; Campos Novos, SC para Campos Novos e Água Doce; Guarapuava, PR para Laranjeiras do Sul e Guarapuava; Pinhais, PR para Região metropolitana de Curitiba e São José dos Pinhais; e Ponta Grossa para Ponta Grossa.

Os dados referentes à temperatura e à precipitação são médias anuais.

3.2 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MÉDIO DE SEMENTES POR FRUTO

Foi determinado o número médio de sementes por fruto em 4 repetições de 25 frutos. Os critérios para a seleção de matrizes para essa avaliação foram:

- a) número suficiente de frutos para realizar a amostragem; e
- b) frutos suficientemente preservados que permitisse a contagem das sementes.

O peso de 1000 sementes foi determinado em oito amostras de 100 sementes cada (BRASIL, 1993), envolvendo 13 matrizes. Alternativamente, foi estimado o peso médio de 1000 sementes em uma amostra de 200 sementes de 43 matrizes (Apêndice 1) (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1985). Após essas determinações, as sementes foram armazenadas em geladeira, à temperatura de 5° C.

3.3 FASE DE VIVEIRO

Em novembro de 1996, foi instalado um teste de progênies, em viveiro, com sementes de 100 matrizes, em delineamento experimental de blocos completos ao acaso, com quatro repetições. Cada parcela foi composta de oito tubetes com capacidade para 370 ml e foram semeadas duas sementes em cada tubete. Como substrato, foi utilizada uma mistura de terra, vermicomposto e vermiculita (3:1:1). Nessa fase inicial, o ensaio foi coberto com tela de nylon preta, com redução de 70% da luminosidade. Durante toda a fase de viveiro, foram realizados, quando necessário, irrigação, retirada manual de ervas daninhas e controle de fungos, por meio de aplicação de solução de bicarbonato de sódio a 3%. Aos 45 dias, foi realizada a contagem de plântulas. Aos 11 meses, foram realizadas a contagem do número final de plantas por parcela e a medição da altura de plantas e do diâmetro do caule.

Paralelamente, foram produzidas mudas em sacos de polietileno preto para instalar os testes de progênies no campo e para estudos de polimorfismo isoenzimáticos. Nesta fase, foi utilizado o mesmo substrato, semeando-se três sementes por recipiente. Inicialmente, os recipientes foram cobertos com tela de sombreamento de 70%, e durante todo o período, foram realizados os mesmos tratamentos culturais mencionados anteriormente. No final do inverno, 8 meses após a

semeadura, foi retirada a tela de sombreamento, preparando-se as mudas para o plantio no campo.

3.4 FASE DE CAMPO

Aos 15 meses, 44 matrizes produziram pelo menos vinte mudas com altura maior que 20 cm, considerado necessário para integrar o estudo no campo. Destas matrizes, 19 eram do Rio Grande do Sul, 10 de Santa Catarina, e 15 do Paraná. Em abril de 1998, foi instalado um teste de progênies em Ponta Grossa, PR, na base física da Embrapa Negócios Tecnológicos. O delineamento experimental adotado foi em blocos completos ao acaso, com cinco repetições e quatro plantas por parcela. Foram plantadas as 20 maiores mudas dentre as produzidas em canteiros.

Os solos dos locais de instalação dos testes foram analisados (tabela2).

A área escolhida para instalação do teste foi riscada com sulcador a uma distância de 2,5 m entre linhas e as mudas foram plantadas a uma distância de 2,0 m, entre si, nas linhas, abrindo-se as covas com enxada. Para o plantio foi feita uma estratificação por altura, buscando-se reduzir a variação dentro das parcelas e, assim, o erro experimental. As mudas mais altas ficaram no primeiro bloco e as menores no último. Nos dias em que se realizou o plantio, choveu no final da tarde. Foram realizadas capinas para controle de plantas invasoras.

Em novembro de 1998, foi instalado um teste com 32 progênies em São José dos Pinhais, PR, em delineamento experimental semelhante ao anterior. Nesse teste foram selecionadas as 20 maiores mudas restantes (após o plantio em Ponta Grossa) dentre as produzidas em canteiros.

As mudas foram plantadas em covas de 40 cm x 40 cm x 40 cm. Dois meses antes do plantio, misturou-se à terra de cada cova, 1,5 kg de esterco curtido de galinha, 250 g de calcário e 24 g de hiperfosfato natural de Gafsa. Também neste teste de progênies, as mudas foram estratificadas por tamanho. Os tratos culturais realizados foram capina de plantas invasoras e adubação com adubo orgânico (varredura de cama de aviário). Em ambas as áreas experimentais, a altura das plantas foi medida em dezembro de 1998 e março de 2000.

TABELA 2 – Resultado da análise de solo (0 a 20 cm) das áreas experimentais dos testes de progênies de espinheira-santa (Ponta Grossa, PR e São José dos Pinhais, PR - 2000)

Identificação da amostra		pH		cmol _c /dm ³				g/dm ³		mg/dm ³	
Local	Bloco	CaCl ₂	Al ³⁺	H ⁺ + Al ³⁺	Ca ²⁺ + Mg ²⁺	Ca ²⁺	K ⁺	M.O.	P	Na	
SJP ¹⁾	1	3,82	1,30	5,35	6,70	5,05	0,16	40,21	133,0	38	
SJP	2	4,40	0,50	6,21	5,25	3,65	0,12	43,56	83,0	33	
SJP	3	4,66	0,50	5,15	6,00	3,65	0,09	40,21	102,0	32	
SJP	4	4,72	0,40	4,96	6,15	3,25	0,11	46,91	95,0	34	
SJP	5	4,36	0,50	4,96	4,85	2,90	0,08	38,20	55,0	21	
PG ²⁾	1	3,78	0,50	5,15	3,85	2,65	0,19	33,51	1,6	68	
PG	2	4,38	0,60	5,76	2,25	1,30	0,20	35,52	0,7	61	
PG	3	4,86	0,50	5,98	3,80	2,95	0,26	33,51	1,5	91	
PG	4	4,38	0,80	5,35	2,50	1,35	0,23	33,51	1,1	72	
PG	5	4,57	1,50	7,20	1,55	0,75	0,10	30,16	0,2	16	

¹⁾ SJP = São José dos Pinhais; ²⁾ PG = Ponta Grossa

NOTA: Análise realizada no Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas da Embrapa Florestas, Colombo, PR.

3.5 ANÁLISE DE ISOENZIMAS

Para a análise de isoenzimas por eletroforese foi utilizado tecido foliar de mudas. As folhas foram coletadas em casa e transportadas para o laboratório sob refrigeração para minimizar a perda da atividade enzimática. O período máximo entre a coleta e a extração foi de três dias. As eletroforeses foram realizadas sempre no mesmo dia da extração, em géis de amido de batata ou de milho, preparados conforme descrito por ALFENAS et al. (1991). O tampão de extração e as soluções de revelação das enzimas foram preparados conforme descrito por ALFENAS et al. (1991) com as modificações testadas por SPIR. (1998). Os géis foram submetidos à corrente elétrica com amperagem constante de 80 mA, com controle para o limite de 300 V. Quando, eventualmente, a voltagem chegava próximo ao limite, a amperagem era ligeiramente reduzida e a alteração e o horário eram anotados no livro de procedimentos do laboratório. As eletroforeses no sistema morfolina-citrato tiveram duração média de quatro horas e as no sistema lítio-borato, cinco horas. Foram testadas dez enzimas (tabela 3).

TABELA 3 - Enzimas de espinheira-santa interpretadas em eletroforese (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, 1998)

SISTEMA	SIGLA	CÓDIGO	NOME
MC 5,6 / 6,1 ¹⁾	PGM	5.4.2.2	Fosfoglucomutase
MC 5,6 / 6,1	MDH	1.1.1.37	Malato Desidrogenase
MC 5,6 / 6,1	F - EST	3.1.1.1	Esterase Fluorescente
MC 5,6 / 6,1	6PGDH	1.1.1.44	6 – Fosfogluconato Desidrogenase
MC 5,6 / 6,1	IDH	1.1.1.42	Isocitrato Desidrogenase
LB 8,1 / 8,6 ²⁾	GOT	2.6.1.1	Glutamato-Oxaloacetato Transaminase
LB 8,1 / 8,6	ACP	3.1.3.2	Fosfatase Ácida
LB 8,1 / 8,6	MnR	1.6.99.2	Menadiona Redutase
LB 8,1 / 8,6	PGI	5.3.1.9	Fosfoglucose Isomerase
LB 8,1 / 8,6	DIA	1.8.1.4	Diaforase

FONTE: BRUNE, ALFENAS, JUNGHANS, 1998.

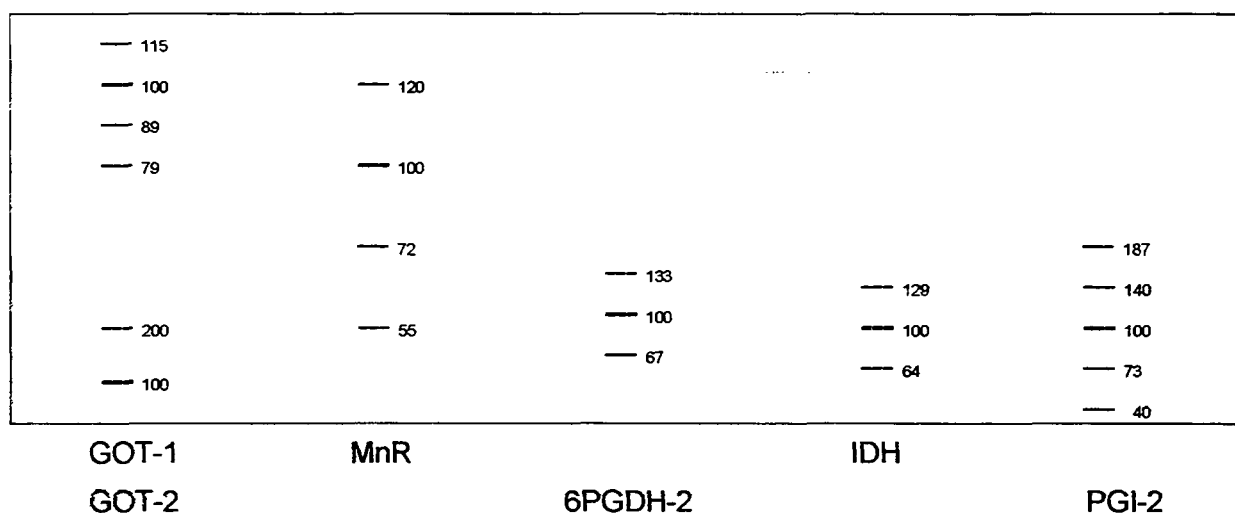
NOTA: ¹⁾ MC 5,6 / 6,1 = sistema morfolina-citrato, pH 5,6 no tampão do gel e 6,1 no tampão do eletrodo

²⁾ LB 8,1 / 8,6 = sistema o lítio-borato, pH 8,1 no tampão do gel e 8,6 no tampão do eletrodo

3.5.1 Interpretação dos Géis

Convencionou-se indicar os diferentes alelos numerando-os de acordo com a velocidade de migração no gel, onde o número 1 corresponde ao alelo de maior migração. À distância percorrida pelo alelo mais freqüente em cada loco, foi atribuído o valor 100 e a migração relativa dos demais alelos foi calculada dividindo-se a distância percorrida do alelo pela distância percorrida pelo alelo mais freqüente. Havendo mais de uma região de atividade essas foram numeradas a partir daquela com maior velocidade de migração, iniciando pelo numeral 1 (figura 3).

FIGURA 3 - Esquema de interpretação de bandas de isoenzimas em espinheira-santa (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR, 1999)



NOTA: As bandas em negrito representam a distância percorrida pelo alelo mais freqüente e são indicadas pelo valor 100; os demais valores representam a distância relativa percorrida pelos demais alelos

3.5.2 Sistema de Cruzamento

Para os estudos da taxa de fecundação cruzada, foram selecionadas 15 progênies da população coletada em Viamão, RS, que contava com maior número de famílias, totalizando 279 indivíduos. Extratos de folhas jovens foram submetidos à eletroforese e os zimogramas interpretados conforme descrito anteriormente. Os dados foram tabulados e submetidos à análise com o programa MLTR (*Multilocus Mating System Program*) (RITLAND, 1996).

A estimativa da taxa de taxa de fecundação cruzada, a partir desse procedimento foi baseada num algoritmo que permite estimar, simultaneamente, os valores de “**t**” (taxa de fecundação cruzada) e “**p**” (frequências dos alelos), usando genótipos compostos (RITLAND; JAIN, 1981). A progênie de cada planta representou uma família de meios-irmãos e irmãos germanos em proporções ditadas pela taxa de fecundação cruzada **t**. O algoritmo calculou as frequências alélicas no conjunto de famílias, bem como as frequências esperadas dos genótipos simples (um loco de cada vez) e dos genótipos compostos (todos os locos simultaneamente). Para dar início aos cálculos, foram fornecidos valores iniciais fictícios para **t** e **p**, a partir dos quais foram calculados os valores das frequências esperadas dos genótipos em cada família e comparados com os das frequências observadas. Em seguida os valores iniciais de **t** e **p** foram ajustados de modo a obter concordância entre as frequências observadas e as esperadas. Por meio de iteração, os cálculos foram repetidos até que fossem alcançados os valores de **t** e **p** que maximizassem a probabilidade da distribuição dos genótipos em cada família e na população como um todo. Este processo de ajuste simultâneo das estimativas é relatado por RITLAND (1986). Para as estimativas de **t**, feitas com base em genótipos simples (**t_s**), inicia-se da premissa de que os locos utilizados têm segregação independente. A estimativa de **t**, a partir dos genótipos compostos (**t_m**), baseou-se na distribuição da probabilidade de se obterem os diferentes genótipos compostos (ROBINSON, 1998). Neste programa utiliza-se o conceito de endogamia efetiva, considerando-se que, para uma determinada população, o grupo de indivíduos já acumulou endogamia em gerações anteriores e sua taxa de autofecundação é representada por **s_i**, enquanto que no grupo que não sofreu endogamia a taxa de autofecundação é representado por **s_o**. A endogamia efetiva é representada, então, pela expressão:

$$E = F s_i + (1-F) s_o ,$$

onde **F** é o índice de Sewall Wright (ROBINSON, 1998).

Quando não se tem os genótipos da plantas-mãe, as frequências de parentais masculinos e femininos são pressupostos como sendo iguais porque a endogamia efetiva é definida em termos de covariância gênica normalizada e, se a expectativa de duas variáveis de Bernoulli forem diferentes. a covariância do produto $p(1-p)$ não será normalizada (RITLAND, 1986).

As estimativas fornecidas foram:

T_m - taxa de fecundação cruzada da população com base em todos os locos

T_s - média da taxa de fecundação cruzada da população baseada em um único loco (variância mínima).

F - coeficiente de endogamia médio dos indivíduos maternais (variância mínima).

Foi estimado, também, a correlação de paternidade dos indivíduos formados por fecundação cruzada (r_p) que representa a probabilidade de que dois indivíduos tomados ao acaso, de uma mesma progênie, sejam irmãos germanos.

Utilizou-se o genótipo materno mais provável para as estimativas, pois a maioria das famílias contava com mais de oito indivíduos, seguindo-se as orientações de RITLAND (1996). Para solucionar a equação de máxima probabilidade (verossimilhança) utilizou-se o método de *Expectation-Maximization* (EM), recomendado nos casos em que há muitas falhas nos dados (tipagens não realizadas). As variâncias estatísticas foram estimadas pelo método de *bootstraps*, que implica em rearranjar as progênies, recalcular as estimativas e examinar a distribuição das estimativas de cada *bootstrap* (rodada de estimação), a qual se pressupõe ter distribuição estatística próxima da distribuição original (RITLAND, 1990). Foram realizados 100 *bootstraps*.

3.5.3 Diversidade Genética entre as Populações do Teste de progênies

As progênies componentes do teste instalado em São José dos Pinhais foram utilizadas para o estudo da diversidade entre as populações representadas, pois não há dados sobre variação genética entre populações de espinheira-santa com base em isoenzimas. Foram coletadas e analisadas amostras de cinco indivíduos de cada família (um em cada bloco). Foram analisadas 31 famílias oriundas de quatro populações (Viamão, Arroio do Conde, Campos Novos e Laranjeiras do Sul/Guarapuava). Os dados foram analisados com o programa BIOSYS-1.7 (*Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Population Genetics and Biochemical Systematics*) (SWOFFORD; SELANDER, 1989). Neste programa cada população foi representada pela frequência de cada um dos genótipos de cada loco enzimático e foram incluídos cinco locos polimórficos.

3.5.3.1 Freqüência dos alelos

Sendo P_{ii} a freqüência dos homozigotos A_1A_1 na população e $2 P_{ij}$ a dos heterozigotos e as freqüências genotípicas, indicadas pelo sinal gráfico ‘ \sim ’, consideradas estimativas das freqüências populacionais correspondentes, a freqüência do $i^{\text{nésimo}}$ alelo na população é definida como

$$P_i = \sum_j P_{ij}$$

e é estimada diretamente das freqüências dos genótipos observados, pela expressão:

$$\hat{P}_i = \sum_j \hat{P}_{ij} = \sum_j \tilde{P}_{ij} \quad (\text{BROWN; WEIR, 1983})$$

O símbolo do ‘ $\hat{}$ ’ é usado para indicar um estimador não-tendencioso (*unbiased*) do parâmetro de interesse. A variância de \hat{P}_i é estimada, sob as suposições anteriores, pela expressão:

$$\text{var}(\hat{P}_i) = \{1 + (k - 1) (1 + s)^2 / 4\} [P_i (1 - P_i) / n (2 - s)] \quad (\text{BROWN; WEIR, 1983})$$

onde s é a taxa de autofecundação, k é o número de indivíduos da progênie, e n é o número de progênies.

Nesta equação de variância da amostra, supõe-se que estimativas imparciais dos parâmetros serão utilizados na avaliação. A estrutura da equação ilustra como a complexidade do sistema de cruzamento e da amostragem interferem na variância. Destaca-se que, quando $s = 0$ e $k = 1$, que é o modelo mais simples e comumente pressuposto, a variância da freqüência dos genes torna-se binomial típica. De outra forma, a variância aumenta na medida em que se afasta do modelo simplificado (BROWN; WEIR, 1983)

3.5.3.2 Número médio de alelos por loco (n_a)

O número médio de alelos por loco representa a riqueza alélica, uma das expressões da diversidade genética. Porém, é desconsiderada a distribuição das freqüências dos alelos, tomando esse parâmetro dependente do número de indivíduos da amostra, na medida em que alelos raros requerem amostras maiores

para serem detectados. Esse parâmetro foi calculado dividindo-se o número total de alelos encontrados na população pelo número total de locos analisados (BROWN; WEIR, 1983).

3.5.3.3 Porcentagem de locos polimórficos

A porcentagem de locos polimórficos é considerada indicador do grau de polimorfismo genético, mas depende do tamanho da amostra, do número e do tipo de enzimas incluídas na pesquisa (BROWN; WEIR, 1983). No programa BIOSYS-1.7 este parâmetro é estimado usando-se três critérios de polimorfismo; o loco é considerado polimórfico quando:

- a) qualquer variação for observada na população;
- b) a freqüência do alelo mais comum foi ≤ 0.99 ; e
- c) a freqüência do alelo mais comum foi $\leq 0,95$ (SWOFFORD; SELANDER, 1989).

3.5.3.4 Heterozigosidade

A heterozigosidade esperada é uma das medidas mais comuns de diversidade aloenzimática, sendo considerada o equivalente genético do Índice de Diversidade Ecológica de Simpson (BROWN; WEIR, 1983). A transformação aplicada às freqüências dos alelos é a soma dos quadrados das freqüências dos alelos na amostra em um loco, subtraído de um, computando-se, em seguida, a média em relação aos locos amostrados, pela expressão:

$$\tilde{h} = 1 - \sum_i \sum_j^m \tilde{p}_{ij}^2 / m \quad (\text{BROWN; WEIR, 1983})$$

onde P_{ij} representa a freqüência do $i^{\text{ésimo}}$ alelo no $j^{\text{ésimo}}$ loco e m é o número de locos amostrados.

O valor obtido pode ser considerado a heterozigosidade média esperada por loco quando dois gametas escolhidos, aleatoriamente, da população são comparados (heterozigosidade panmítica ou em Equilíbrio de Hardy-Weinberg). O estimador não-tendencioso é:

$$\hat{h} = \tilde{h} (2 - s) n / \{(2 - s) n - [1 + (k - 1) (1 + s)^2 / 4]\}$$

e a variância desse parâmetro em um único loco é estimado por:

$$\text{var}(\tilde{h}) = [\sum P_i^3 - (\sum P_i^2)^2] [4 + (k - 1)(1 + s)^2] / n(2 - s)$$

(BROWN; WEIR, 1983)

Esta medida é relativamente independente do número de indivíduos da amostra, quando comparado à 'porcentagem de locos polimórficos' e ao 'número médio de alelos por loco'. Porém, a expressão é dependente da frequência dos dois alelos mais comuns. Além disso, seu valor torna-se menos sensível a alterações na frequência dos alelos na medida em que estas se aproximam da igualdade (BROWN; WEIR, 1983). Por outro lado, é uma medida independente de frequências genotípicas, adequando-se igualmente para espécies autógamas e alógamas. Em populações alógamas em equilíbrio de Hardy-Weinberg, a heterozigosidade equivale à frequência esperada de heterozigotos. Em caso de locos múltiplos, calcula-se a média aritmética dos valores h sobre todos os locos (ROBINSON, 1998). Neste trabalho, a heterozigosidade esperada foi indicada por H_e .

A heterozigosidade observada de um determinado loco foi calculada diretamente dos dados a partir da expressão:

$$\hat{H} = \tilde{H} = 1 - \sum_i \hat{P}_{ii} \quad (\text{BROWN; WEIR, 1983})$$

e a variância desse parâmetro, em um único loco, foi estimado com a expressão:

$$\text{Var}(\tilde{H}) = H(1 - H) / n + (k - 1) Q / n \quad (\text{BROWN; WEIR, 1983}),$$

onde

$$Q = (1 + s - 7s^2 / 4) H - (2 + 3s - s^2) H^2 / 4 - (1 - s)^2 (1 + 2s) (1 - \sum P_i^3) / (2 - s)$$

Neste trabalho, a heterozigosidade observada foi indicada por H_o .

A heterozigosidade média foi calculada de três maneiras:

- a) proporção dos indivíduos amostrados que efetivamente são heterozigotos (contagem direta = heterozigosidade observada);
- b) estimativa com base na frequência esperada pela lei de Hardy-Weinberg (heterozigosidade esperada); e
- c) estimativa não-tendenciosa com base na expectativa condicional conforme LEVENE¹, citado por SWOFFORD e SELANDER (1989).

¹ LEVENE, H. 1949. On a matching problem arising in genetics. *Ann. Math. Stat.*, v. 20, p. 91-94.

3.5.3.5 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Para verificar se a população analisada está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram realizados três testes:

(a) teste de χ^2

(b) teste de χ^2 com agrupamento dos genótipos em três classes:

Quando a frequência esperada para algumas classes é muito baixa, recomenda-se agrupar os genótipos em três classes: (i) homozigotos do alelo mais comum; (ii) heterozigotos do alelo mais comum e um dos outros alelos; (iii) todos os outros genótipos; e

(c) teste de significância exata das probabilidades, evitando as dificuldades encontradas no uso da distribuição do χ^2 para amostras pequenas. Nos locos com mais de dois alelos, o teste é realizado utilizando-se o agrupamento descrito em (b) (SWOFFORD; SELANDER, 1989).

3.5.3.6 Coeficiente F

O programa BIOSYS-1.7 calcula as seguintes estatísticas F:

a) por subpopulação:

F_{ISik} F_{IS} para o $k^{\text{ésimo}}$ alelo na $i^{\text{ésima}}$ subpopulação

F_{ISi} média ponderada de F_{IS} de todos os alelos do loco na $i^{\text{ésima}}$ subpopulação.

b) para cada alelo:

F_{ISk} Média ponderada (por subpopulação) dos valores F_{ISik} do $k^{\text{ésimo}}$ alelo (KIRBY², citado por SWOFFORD; SELANDER, 1989). Os pesos são $p_i (1 - p_i)$, onde p_i é a frequência do $k^{\text{ésimo}}$ alelo na $i^{\text{ésima}}$ subpopulação. A ponderação não é feita com base no tamanho da subpopulação porque o tamanho da população da qual foram extraídos os dados relativos à subpopulação raramente são conhecidos.

F_{ITk} F_{IT} para o $k^{\text{ésimo}}$ alelo.

F_{STk} F_{ST} para o $k^{\text{ésimo}}$ alelo.

c) para cada loco:

F_{IS} média ponderada dos valores de F_{ISk} por alelo

F_{IT} média ponderada dos valores de F_{ITk} por alelo

F_{ST} média ponderada dos valores de F_{STk} por alelo (equivalente numericamente ao coeficiente G_{ST} de Nei).

d) médias de F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} para todos os locos.

3.5.3.7 Identidade genética

A identidade genética foi estimada com a expressão:

$$I_{XY} = \frac{j_{XY}}{\sqrt{j_x j_y}} \quad (\text{NEI, 1978})$$

onde $j_x = \sum p_i^2$ $j_y = \sum p_j^2$ e $j_{XY} = \sum p_i p_j$, e

p_i = freqüência de um dado alelo na população i

p_j = freqüência de um dado alelo na população j.

Para vários locos considerados em conjunto, o índice foi definido por:

$$I_{XY} = \frac{J_{XY}}{\sqrt{J_x J_y}}$$

Sendo J_x , J_y e J_{XY} as médias dos valores j_x , j_y e j_{XY} , respectivamente. A distância genética entre duas populações é definida por

$$D = - \ln(I_{XY})$$

Os valores de I variam de 0 a 1, o de D variam de 0 a infinito.

Pelo programa BIOSYS-1.7, foram obtidas as matrizes dos coeficientes de identidade genética de NEI (1978³, citado por SWOFFORD; SELANDER, 1989). Essas mesmas matrizes foram utilizadas na análise de agrupamento.

³ KIRBY, G. C. 1975. Heterozygote frequencies in small populations. *Theor. Popul. Biol.* v. 8, p. 31-48.

3.5.3.8. Análise de agrupamento

Foi gerado, com o BIOSYS-1.7, um dendrograma baseado no método UPGMA, utilizando os coeficientes de identidade genética não tendenciosa (*unbiased genetic identity*) de NEI (1978⁴), citado por SWOFFORD; SELANDER (1989). Foi calculado, também, o respectivo coeficiente de correlação cofenética.

3.6 ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Para a análise de variância, os dados obtidos da fase de viveiro referentes ao número de plantas aos 45 dias (NP45d) e número de plantas aos 11 meses (NP11m) foram transformados para raiz quadrada de $(x + 0,5)$ para obter maior homogeneidade nas variâncias. A análise de variância dos dados coletados no teste de progênies na fase de viveiro foi realizada usando-se o programa MSTATC (*Microcomputer Program for the Design, Management, and Analysis of Agronomic Research Experiments*) (NISSEN, 1991).

A análise de variância dos dados dos testes de progênies em campo foi realizada usando-se programa SELEGEN (Seleção Genética Computadorizada) (RESENDE et al., 1994) que forneceu, também, as estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos.

O modelo matemático utilizado considerou todos os efeitos aleatórios conforme a expressão:

$$Y_{ijk} = \mu + p_i + b_j + e_{ij} + d_{ijk}$$

onde:

Y_{ijk} : observação relativa à planta k, da progênie i, no bloco j;

μ : média geral;

p_i : efeito da progênie i;

b_j : efeito do bloco j;

e_{ij} : erro experimental associado à parcela ij;

d_{ijk} : efeito do indivíduo k dentro da parcela ij.

³ NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, v. 89, p. 583-590.

⁴ *op. citada*

O esquema utilizado para se estimar as variâncias, ao nível de médias de parcelas, em cada local (tabela 4), é semelhante ao recomendado por VENCOVSKY e BARRIGA (1992).

As variâncias dentro das parcelas (σ_d^2) foram estimadas utilizando-se dados de plantas individuais e considerando-se a média ponderadas destas variâncias, como o respectivo quadrado médio. As estimativas dos demais componentes da variância foram obtidas equacionando-se a equação da esperança matemática dos quadrados médios aos quadrados médios dos respectivos efeitos.

TABELA 4 - Esquema de análise de variância segundo o delineamento de blocos completos ao acaso

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	E(Q.M.)
Blocos	r - 1	—	—
Progênes	p - 1	Q ₁	$\sigma_d^2 + n\sigma_e^2 + r n \sigma_p^2$
Erro	(r-1)(p-1)	Q ₂	$\sigma_d^2 + n\sigma_e^2$
Dentro	r p(n-1)	Q ₃	σ_d^2

onde:

σ_p^2 : variância genética entre médias de progênes;

σ_d^2 : variância genética entre plantas, dentro de parcela;

σ_e^2 : variância do erro experimental entre parcelas;

r, p : número de repetições e progênes, respectivamente; e

n : número de plantas por parcela (média harmônica);

3.6.1 Estimativas dos Coeficientes de Herdabilidade

Os coeficientes de herdabilidade associados aos diferentes efeitos do modelo linear, em cada local, foram estimados usando-se as seguintes equações (RESENDE; HIGA, 1994):

- a) Herdabilidade no sentido restrito referente ao efeito de indivíduo na parcela

$$h_{ip}^2 = \frac{(3/4)\sigma_A^2}{\sigma_d^2}$$

b) Herdabilidade no sentido restrito referente ao efeito de progênies

$$h_f^2 = \frac{[(3+nb)/(4nb)]\sigma_A^2}{\sigma_p^2 + \frac{\sigma_e^2}{b} + \frac{\sigma_d^2}{nb}}$$

sendo:

n = número de plantas/parcela

b = número de blocos

c) Herdabilidade no sentido restrito referente ao efeito de parcela

$$h_p^2 = \frac{[3/(4n)]\sigma_A^2}{\sigma_e^2 + \frac{\sigma_d^2}{n}}$$

d) Herdabilidade no sentido restrito para o efeito de indivíduo no bloco

$$h_{ib}^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_p^2 + \sigma_e^2 + \sigma_d^2}$$

e) Herdabilidade no sentido restrito referente ao efeito de plantas individuais no experimento

$$h_{ie}^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_p^2 + \sigma_e^2 + \sigma_d^2 + \sigma_b^2}$$

3.6.2 Coeficientes de Variação Genética e Experimental

Os coeficientes de variação genética ($CV_g\%$) e experimental ($CV_e\%$) foram estimados seguindo-se as equações apresentadas por VENCOSKY e BARRIGA (1992):

$$CV_g (\%) = \frac{\sqrt{\sigma_p^2}}{\bar{X}} \cdot 100$$

$$CV_e (\%) = \frac{\sqrt{\sigma_e^2 + \sigma_d^2}}{\bar{X}} \cdot 100$$

onde σ_p^2 é a variância genética total e σ_e^2 e σ_d^2 representam, respectivamente, as variâncias entre e dentro de parcelas.

3.6.3 Interação Genótipo X Ambiente

O esquema utilizado para se estimar a interação genótipo x ambiente (tabela 5), é semelhante ao recomendado por VENCOVSKY e BARRIGA (1992).

TABELA 5 - Esquema de análise de variância conjunta segundo o delineamento de blocos completos ao acaso

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	E(Q.M.)	
Blocos/locais	1(r-1)	Q ₁	$\sigma^2 + p\sigma_b^2$	Q ₁ / Q ₅
Locais	l - 1	Q ₂	$\sigma^2 + r\sigma_{pl}^2 + p\sigma_b^2 + pr\sigma_1^2$	(Q ₂ +Q ₅)/(Q ₁ +Q ₄)
Progênes	p - 1	Q ₃	$\sigma^2 + r\sigma_{pl}^2 + l r\sigma_p^2$	Q ₃ / Q ₄
Locais x Progênes	(l-1)(p-1)	Q ₄	$\sigma^2 + r\sigma_{pl}^2$	Q ₄ / Q ₅
Erro médio	1(r-1)(p-1)	Q ₅	σ^2	—

onde:

σ_p^2 : variância genética entre progênes;

σ_1^2 : variância entre locais;

σ_b^2 : variância entre blocos;

σ_{pl}^2 : variância da interação progênes x locais;

σ^2 : Σ QM Resíduo de cada local / número de locais

r : número de repetições dentro de cada local;

l : número de locais;

p : número de progênes;

A correlação genética foi estimada a partir da expressão proposta por RESENDE (1998).

$$\hat{r}_{gg} = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_g^2 + \hat{\sigma}_{ge}^2} = \frac{(F - 1)}{(F - 1) + L(1 - 1/F^*)}$$

Onde: F e F^* são as estatísticas F de Snedecor para os efeitos das fontes de variação progênie e interação genótipo x ambiente, e L é o número de locais incluídos na análise de variância conjunta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 INTERPRETAÇÃO DOS ZIMOGRAMAS

As enzimas PGM, F-EST e ACP apresentaram-se como monoméricas. No caso da F-EST, observou-se apenas uma região de atividade enzimática. A ACP e a F-EST foram muito irregulares, podendo ser visualizadas nitidamente apenas em alguns géis.

De acordo com o padrão de distribuição das bandas obtido em alguns zimogramas de PGM, aparentemente existem dois locos de atividade enzimática, parcialmente sobrepostos, com dois alelos em cada um deles. Entretanto, ISSHIKI; OKUBO e FUJIEDA (1994) relataram, também, a existência de duas regiões de atividade em PGM, com o aparecimento de bandas secundárias em PGM-1, na espécie *Solanum melongena*. Neste trabalho, outros zimogramas revelaram tanto bandas adicionais (Apêndice 2) quanto ausência de bandas, em comparação com o padrão esperado na interpretação proposta de dois locos com dois alelos. Para que os zimogramas de PGM de espinheira-santa possam ser interpretados com maior precisão, serão necessários estudos sobre o controle genético dessa enzima, usando plantas obtidas por cruzamentos controlados.

As enzimas 6PGDH, IDH, GOT e PGI apresentaram um padrão de bandas típico de enzimas diméricas. Os géis de 6PGDH revelaram duas regiões de atividade. A primeira (6PGDH-1), com pouca resolução, não pode ser caracterizada, enquanto que a segunda (6PGDH-2) ficou nítida (Apêndice 3).

Os géis IDH apresentaram uma única região de atividade com três alelos (Apêndice 4).

Foram observadas duas regiões de atividade de GOT; a primeira (GOT-1), polimórfica, com quatro alelos e a segunda (GOT-2), também polimórfica, porém, sem resolução suficiente das bandas (Apêndice 5).

A PGI apresentou duas regiões de atividade. Na primeira (PGI-1) não se obteve resolução suficiente para caracterizar os indivíduos. Na segunda (PGI-2) os alelos tornaram-se bem visíveis. Nestas últimas, cerca de 50 minutos após a adição da solução de revelação, ocorreu o aparecimento de bandas de cor mais intensa em sobreposição ao segundo loco, dificultando a interpretação dos zimogramas. Em

geral, estas bandas apresentaram coloração e intensidade distintas, permitindo uma adequada caracterização dos indivíduos. A reação de coloração do PGI-2 foi mais rápida. Assim, como a interpretação do zimograma foi feita logo após a reação (cerca de 40 minutos) não houve interferência desta segunda região de atividade na interpretação. Após a secagem do gel, esta tomou-se nitidamente distinta em quase todos os zimogramas (Apêndice 6).

A MnR apresenta uma região de atividade e o padrão de distribuição de bandas correspondeu ao de enzimas tetramérica (Apêndice 7). Em alguns zimogramas, porém, apareceu uma segunda região de migração, mais rápida que a primeira, confundindo-se, algumas vezes com a “frente de migração”. Nesta região, observou-se presença ou ausência de bandas, num padrão semelhante ao relatado por MARQUARD et al. (1995), sugerindo a existência de um segundo loco ou a revelação de DIA (SCALTSOYIANNES; ROHR; PANETSOS, 1994). Isto ocorre porque grupos distintos de flavoproteínas vegetais são capazes de reduzir o substrato. Em várias espécies, a mesma solução pode revelar ambas as enzimas (WENDEL; WEEDEN, 1989) e, aparentemente, o mesmo ocorreu com a espinheira-santa pois, os zimogramas de MnR e os de DIA apresentaram padrões semelhantes. Assim, optou-se por interpretar somente os zimogramas de MnR que, em geral, apresentavam melhor resolução. Os géis de MnR foram secos antes de fazer a ‘tipagem’, visto que a transparência do gel seco facilitou a visualização das bandas.

Os zimogramas de MDH apresentaram três regiões distintas de atividade, fortemente coloridas. Foram observadas variações em todas as regiões. Porém a baixa resolução na primeira e na terceira não permitiu contar os alelos e caracterizar os indivíduos. Na maioria dos zimogramas, a região intermediária apresentou somente uma banda fortemente colorida, tendo-se observado, em alguns casos, a ocorrência de três bandas (Apêndice 8). Especialmente em indivíduos originários de Viamão e de Arroio do Conde, não foram observadas bandas de atividade de MDH na região intermediária. A interpretação de zimogramas desta enzima é complexa na maioria das espécies, sendo relatadas sobreposições de alelos de locos distintos, formação de bandas secundárias (Bl et al., 1997), genes modificadores de velocidade de migração, e formação de heteromultímeros inter e intralocos (BREITENBACH-DOREFER; GEBUREK, 1995) que dificultam a interpretação dos zimogramas quando não se conhece o controle genético sua expressão.

4.2 SISTEMA DE CRUZAMENTO

A estimativa da taxa de fecundação cruzada da população, com base em todos os locos em conjunto (t_m) e na média dos locos simples (t_s) (Tabela 6) indicou que a espinheira-santa é uma espécie alógama. O coeficiente de endogamia médio dos indivíduos maternos estimado (F) foi zero. A correlação de paternidade dos indivíduos (probabilidade de que dois indivíduos numa progênie sejam irmãos germanos) foi 99%.

TABELA 6 – Sistema de cruzamento na população de espinheira-santa de Viamão, RS (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)

Parâmetro	Estimativa (desvio padrão)
Coeficiente de endogamia médio parental	0,000 (0,000)
Taxa de cruzamento (método multilocos) (t_m)	0,996 (0,013)
Taxa de cruzamento (média dos locos individuais) (t_s)	0,974 (0,004)
Diferença $t_m - t_s$	0,023 (0,011)
Correlação de paternidade dos indivíduos	0,990 (0,003)

Apesar da espinheira-santa ter flores hermafroditas, a hipótese da espécie ser predominantemente alógama já havia sido levantada com base na observação da existência de flores com órgãos sexuais atrofiadas (CARVALHO-OKANO, 1992; CALAGO, 1996). Quanto à elevada correlação de paternidade, algumas hipóteses podem ser levantadas para explicá-la. Primeiramente, assincronia na floração das plantas doadoras e receptoras de pólen. Outra causa pode ser o comportamento do agente polinizador, ainda não identificado, que pode ter um raio de ação limitado. As flores da espinheira-santa são pequenas e cada fruto pode produzir até quatro sementes. Assim, é grande a probabilidade de que as sementes contidas num mesmo fruto tenham sido formadas por pólen do mesmo doador. Além disso, como as flores concentram-se ao longo dos ramos, se o agente polinizador for um inseto, é provável que ele visite muitas flores ao longo do mesmo ramo, polinizando-as todas com o pólen de um único doador (HAMRICK, 1989). Essas hipóteses poderão ser testadas nos experimentos instalados em Ponta Grossa e São José dos Pinhais, assim que as plantas atingirem a idade reprodutiva.

As estimativas apresentadas referem-se às 15 progênies de uma população antropogênica, formada por árvores transplantadas de diferentes locais. Isso pode explicar a ausência de endogamia dos genitores, uma vez que, no plantio das mudas, não foi feito nenhum agrupamento por origem. Em populações naturais de *Maytenus aquifolia*, foram verificadas taxas significativas de endogamia (PERECIN, 2000) atribuídas ao cruzamento entre indivíduos aparentados e, eventualmente, à autofecundação. Assim, recomenda-se determinar a taxa de fecundação cruzada, também, em progênies obtidas a partir de populações naturais, em diferentes anos, uma vez que podem ocorrer variações devido à influência climática e da quantidade e comportamento de polinizadores (HAMRICK, 1989; BROWN; BURDON; JAROSZ, 1989).

Considerando o objetivo de transformar o teste de progênies em pomar de semente, será importante verificar a influência das variações regionais no fotoperíodo, na temperatura e na precipitação sobre o florescimento e a frutificação da espinheira-santa. Outro aspecto a ser investigado é o grau de controle genético da variação sobre a fenologia da frutificação. A fenologia é uma característica com herdabilidade elevada. Se os indivíduos não apresentarem sincronia na antese, poderá ocorrer maior frequência de cruzamentos entre indivíduos aparentados (PRAT; ARNAL, 1994).

Todas essas informações devem ser consideradas em programas de melhoramento com transformação do teste de progênies em pomar de semente. Esses fatores são importantes, também, na definição de estratégias de coleta visando à conservação de germoplasma, para que o tamanho efetivo da população seja suficiente para conter a diversidade genética da espécie.

4.3 DIVERSIDADE GENÉTICA NAS POPULAÇÕES REPRESENTADAS NO TESTE DE PROGÊNIES

4.3.1 Frequência dos Alelos

Foram encontrados 19 alelos nos cinco locos analisados (Tabela 7). Esse número é menor que o apresentado por PERECIN (2000), que encontrou 22 alelos em dez locos, em uma população de espinheira-santa localizada em Caçador, SC.

TABELA 7 - Frequência alélica em progênies de uma população antropogênica e de quatro populações de espinheira-santa representadas no teste de progênies em São José dos Pinhais, PR (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)

LOCO	POPULAÇÃO				
	Viamão total ¹	Viamão TP ²	Arroio do Conde	Campos Novos	Laranjeiras do Sul/Guarapuava
PGI-2					
(N)	279	58	23	33	13
1	0,357	0,353	0,000	0,030	0,000
2	0,289	0,241	0,217	0,318	0,192
3	0,326	0,345	0,435	0,333	0,308
4	0,014	0,034	0,217	0,303	0,462
5	0,014	0,026	0,130	0,015	0,038
6PGDH-2					
(N)	226	57	21	33	18
1	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000
2	0,828	0,886	0,833	0,985	1,000
3	0,162	0,114	0,095	0,015	0,000
IDH					
(N)	190	65	24	37	20
1	0,000	0,000	0,000	0,122	0,000
2	0,997	0,992	0,979	0,743	0,650
3	0,003	0,008	0,021	0,135	0,350
GOT-1					
(N)	167	57	22	34	22
1	0,090	0,044	0,068	0,162	0,068
2	0,695	0,684	0,773	0,676	0,864
3	0,156	0,175	0,091	0,147	0,068
4	0,060	0,096	0,068	0,015	0,000
MnR					
(N)	118	29	15	20	11
1	0,034	0,069	0,067	0,125	0,227
2	0,394	0,328	0,567	0,550	0,318
3	0,432	0,448	0,300	0,325	0,455
4	0,140	0,155	0,067	0,000	0,000

NOTA: ¹ total de indivíduos de Viamão, RS, analisados; ² indivíduos de Viamão representados no teste de progênies

Entretanto, no estudo desse autor são relatados somente três alelos no loco PGI-2 e dois no loco 6PGDH-2, enquanto que, no presente estudo, foram observados, respectivamente, cinco e três. Essa diferença deve-se, provavelmente, ao fato de PERECIN (2000) ter analisado uma única população dessa espécie.

O alelo 1 do loco 6PGDH-2 foi detectado somente na amostra de Arroio do Conde, e o alelo 1 do IDH exclusivamente na amostra de Campos Novos. Por outro lado, não foram observados o alelo 1 do PGI-2, o alelo 3 do 6PGDH-2, o alelo 4 do GOT e do MnR na amostra de Laranjeiras do Sul/Guarapuava. Na amostra de Arroio do Conde, não foi observado o alelo 1 do PGI-2 e, na amostra de Campos Novos, o alelo 4 do MnR.

A causa da não observância desses alelos pode ser o número reduzido de indivíduos amostrado nesses locais, já que, nas populações onde foram detectados, os alelos estão com baixa frequência baixa. A realização de mais análises envolvendo coletas adicionais poderá escarecer se a ausência desses alelos é decorrente da amostragem ou se constitui um diferencial entre populações.

4.3.2 Heterozigidade

Em todas as populações, a diferença entre a heterozigidade observada e a esperada de acordo com a Lei de Hardy-Weinberg foi pequena (Tabela 8). O número de locos polimórficos, pelo critério de 95% foi de quatro em cinco (80%), em todas as populações. Porém, nas populações de Viamão e Arroio do Conde, a enzima que não apresentou polimorfismo foi a IDH, enquanto nas populações de Campos Novos e Laranjeiras do Sul/Guarapuava, foi a 6PGDH-2.

As heterozigosidades observadas (H_o) e esperadas (H_e) no presente trabalho foram maiores do que as relatadas por PERECIN (2000), em seu estudo envolvendo 10 locos em 31 indivíduos de uma população natural em Caçador, SC, com 70% dos locos polimórficos e média de 2,1 alelos por loco. Os valores encontrados foram maiores, também, aos relatados por HAMRICK (1989). Porém, deve-se ressaltar que a inclusão de somente locos polimórficos na análise pode acarretar superestimação da heterozigidade devido à correlação negativa entre o número de indivíduos da população em reprodução (N) e a heterozigidade esperada, quando se considera somente locos polimórficos (H_{ep}). Em populações numerosas, observa-se maior número de alelos raros. Apesar desses alelos não contribuírem muito para a heterozigidade nos locos polimórficos, eles aumentam, substancialmente, o número de locos polimórficos da amostra. Assim, o valor médio

da H_{ep} se reduz com o aumento do número de indivíduos amostrados (BROWN; WEIR, 1983; SUN, 1995).

TABELA 8 - Variabilidade genética em cinco locos polimórficos em progênies de espinheira-santa representadas no teste de progênies em São José dos Pinhais, PR (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)

POPULAÇÃO	Tamanho médio de amostra por loco	Número médio de alelos por loco	Porcentagem de locos polimórficos ¹	Heterozigosidade média	
				Observada	Esperada
Viamão Total ²	190,0 (27,2) ⁴	3,4 (0,6)	80,0	0,416 (0,126)	0,417 (0,126)
Viamão TP ³	53,2 (6,2)	3,4 (0,6)	80,0	0,412 (0,132)	0,418 (0,134)
Arroio do Conde	21,0 (1,6)	3,4 (0,4)	80,0	0,353 (0,109)	0,410 (0,118)
Campos Novos	31,4 (2,9)	3,6 (0,5)	80,0	0,397 (0,101)	0,450 (0,115)
Laranjeiras do Sul / Guarapuava	16,8 (2,1)	2,6 (0,5)	80,0	0,404 (0,133)	0,414 (0,130)

NOTA: ¹ Um loco foi considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais comum não ultrapassou 95%; ² total de indivíduos de Viamão, RS analisados; ³ indivíduos de Viamão representados no teste de progênies; ⁴ o número entre parênteses refere-se ao erro padrão da respectiva média.

4.3.3 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Em nenhum dos locos a diferença entre a frequência de heterozigotos observada e a esperada foi significativa, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de qui-quadrado (Tabela 9). Isso pode ter sido decorrência da seleção intensa, aplicada na escolha das plantas para o teste de progênies. Mesmo sendo possível não se detectar desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg, quando um dos pressupostos é violado (HEDRICK, 1983; HARTL, 1980), no presente estudo as amostras foram muito pequenas e, nessas circunstâncias, o número esperado de heterozigotos pode aumentar e o de homozigotos diminuir na mesma proporção, distorcendo a análise.

TABELA 9 - Teste de χ^2 para desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg das classes de genótipos de cinco locos em quatro populações de espinheira-santa representadas no teste de progênies em São José dos Pinhais, PR (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)

Loco	Classes ¹⁾	Viamão TP			Arroio do Conde			Campos Novos			Laranjeiras do Sul / Guarapuava		
		N _o ²⁾	N _e ³⁾	χ^2	N _o	N _e	χ^2	N _o	N _e	χ^2	N _o	N _e	χ^2
PGI-2	A	9	7,13	1,16 ^{NS}	4	4,22	0,04 ^{NS}	6	3,56	3,70 ^{NS}	3	2,64	0,16 ^{NS}
	B	23	26,74		12	11,56		10	14,89		6	6,72	
	C	26	24,13		7	7,22		17	14,55		4	3,64	
6PGDH-2	A	44	44,69	0,86 ^{NS}	15	14,51	0,64 ^{NS}	32	32	0,00 ^{NS}			
	B	13	11,62		5	5,976		1	1				
	C	0	0,69		1	0,51		0	0				
IDH	A	64	64	0,00 ^{NS}	23	23	0,00 ^{NS}	20	20,34	0,09 ^{NS}	7	8,33	1,74 ^{NS}
	B	1	1		1	1		15	14,31		12	9,33	
	C	0	0		0	0		2	2,34		1	2,33	
GOT-1	A	30	26,57	4,433*	12	13,05	1,68 ^{NS}	17	15,45	1,49 ^{NS}	17	16,35	1,56 ^{NS}
	B	18	24,85		10	7,91		12	15,10		4	5,30	
	C	9	5,75		0	1,05		5	3,45		1	0,35	
MnR	A	7	5,70	0,95 ^{NS}	6	4,69	1,91 ^{NS}	7	5,92	0,95 ^{NS}	2	2,14	0,30 ^{NS}
	B	12	14,60		5	7,62		8	10,15		6	5,71	
	C	10	8,70		4	2,69		5	3,92		3	3,14	

NOTA: ¹⁾ A = número de homozigotos para o alelo mais comum, B = número de heterozigotos entre o alelo mais comum e outros alelos; C = número de homozigotos raros e demais heterozigotos; ²⁾ N_o = número observado; ³⁾ N_e = número esperado; * significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^{NS)} não significativo

Nesses casos, o agrupamento dos genótipos com base no alelo mais freqüente, como foi feito, é recomendado, mas também coloca-se, como regra geral, que o número de indivíduos esperados, em cada classe, deve ser maior que cinco (HEDRICK, 1983). Este estudo restringiu-se às populações representadas no teste de progênies que não atingem esse limite mínimo em todas as classes. É importante que se aumente o número de populações e o número de indivíduos amostrados por população para que os estudos sobre a variação genética possam ser aprofundados. Por outro lado, pode haver equilíbrio de Hardy-Weinberg quando a seleção é feita em um único sexo e favorece os heterozigotos em fecundidade ou viabilidade (HEDRICK, 1983). Para tanto, é necessário admitir que a espinheira-santa apresenta depressão endogâmica e que essa se reflete no vigor das mudas. O estudo do vigor relativo de heterozigotos em relação aos homozigotos não foi objeto do presente trabalho.

4.3.4 Índice de Fixação de Wright

O índice de fixação médio nos diferentes locos em cada população (F_{IS}) não apresentou tendência definida quanto ao excesso ou deficiência de heterozigotos em relação ao esperado conforme a Lei do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 10). Os valores extremos foram 0,425 na população de Arroio do Conde, no loco MnR e - 0,319 na população de Laranjeiras do Sul/Guarapuava, no loco IDH.

TABELA 10 - Índice de fixação médio dos alelos (F_{IS}) nas populações de espinheira-santa representadas no teste de progênies em São José dos Pinhais, PR (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)

Loco	População			
	Viamão TP	Arroio do Conde	Campos Novos	Laranjeiras do Sul / Guarapuava
PGI-2	-0,040	0,005	0,084	-0,059
6PGDH-2	-0,129	0,183**	-0,015	---
IDH	-0,008	-0,021	0,022	-0,319
GOT-1	0,105	-0,180	0,167	0,257**
MnR	0,012*	0,425**	0,132	0,148

NOTA: *) significativo ao nível de 5% de probabilidade e **) significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de χ^2 para equilíbrio de Hardy-Weinberg considerando todas as classes de genótipos.

Os maiores valores de F_{IS} foram encontrados nos alelos que são exclusivos em uma população (alelo 1 do loco 6PGDH-2 em Arroio do Conde e alelo 1 do loco IDH em Laranjeiras do Sul/Guarapuava) (Tabela 11). O índice de fixação médio dos alelos considerando todas as populações (F_{IS}) variou de - 0,148 no loco IDH a 0,173 no loco MnR (Tabela 11).

TABELA 11 - Índices de fixação de Wright em populações de espinheira-santa representadas no teste de progênies em São José dos Pinhais (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)

Loco	F	Alelo					Média
		1	2	3	4	5	
PGI-2	IS	0,114	-0,085	0,025	0,038	-0,102	-0,002
	IT	0,341	-0,072	0,034	0,158	-0,055	0,070
	ST	0,257	0,012	0,010	0,125	0,042	0,071
6PGDH - 2	IS	0,641	0,026	-0,110			0,051
	IT	0,661	0,094	-0,059			0,107
	ST	0,055	0,070	0,046			0,059
IDH	IS	0,368	-0,190	-0,245			-0,148
	IT	0,427	0,006	-0,036			0,034
	ST	0,094	0,165	0,168			0,159
GOT-1	IS	0,070	0,104	0,065	0,020		0,079
	IT	0,095	0,132	0,081	0,055		0,104
	ST	0,026	0,021	0,017	0,036		0,027
MnR	IS	0,119	0,181	0,184	0,197		0,173
	IT	0,154	0,227	0,201	0,259		0,208
	ST	0,040	0,056	0,021	0,077		0,042

NOTA: F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} = média ponderada do índice de fixação dos alelos dentro da população; na espécie e da medida de diferenciação entre populações, respectivamente

A variação do F_{IS} entre populações (Tabela 10) e na média das populações (Tabela 12) reflete o número reduzido de progênies representando cada população, sendo influenciado, provavelmente, pelo genótipo da matriz (BROWN; WEIR, 1989). Assim, o grau variável de fixação dos alelos nas populações representadas no teste de progênies não reflete, necessariamente, o que está ocorrendo nas populações de origem.

TABELA 12 - Média ponderada do índice de fixação dos alelos dentro da população (F_{IS}), na espécie (F_{IT}) e da medida de diferenciação entre populações (F_{ST}) para quatro populações de espinheira-santa representadas no teste de progênies em São José dos Pinhais, PR (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)

Loco	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
PGI-2	-0,002	0,070	0,071
6PGDH-2	0,051	0,107	0,059
IDH	-0,148	0,034	0,159
GOT-1	0,079	0,104	0,027
MnR	0,173	0,208	0,042
MÉDIA	0,053	0,114	0,065

Outro fator que pode influenciar nos índices de fixação é o desequilíbrio de ligação. Esta ligação pode ser entre os genes que controlam a expressão das isoenzimas analisadas nesse trabalho ou entre os genes que controlam essas isoenzimas e outros genes, que determinam caracteres qualitativos ou quantitativos. A existência de ligação entre os locos poderá ser verificada em estudos envolvendo progênies obtidas a partir de cruzamentos controlados.

A medida de diferenciação entre populações (F_{ST}) variou de 0,027 no loco GOT-1 até 0,159 no IDH (Tabela 12). O valor médio de 0,065, estimado para F_{ST} , é considerado moderado (HARTL, 1980), dentro do esperado para indivíduos de uma mesma espécie (CRAWFORD, 1983). Com relação à influência do sistema de cruzamento e do modo de dispersão das sementes sobre a diversidade genética entre populações, os valores de F_{ST} obtidos estão mais próximos dos esperados em espécie alógamas com polinização anemófila (0,068) e dispersão pelo vento (0,079), do que esperado para espécie alógamas polinizadas por animais (0,187) e cujas sementes são dispersas por ingestão por animais (0,332) (HAMRICK, 1989).

4.3.5 Identidade Genética e Análise de Agrupamento

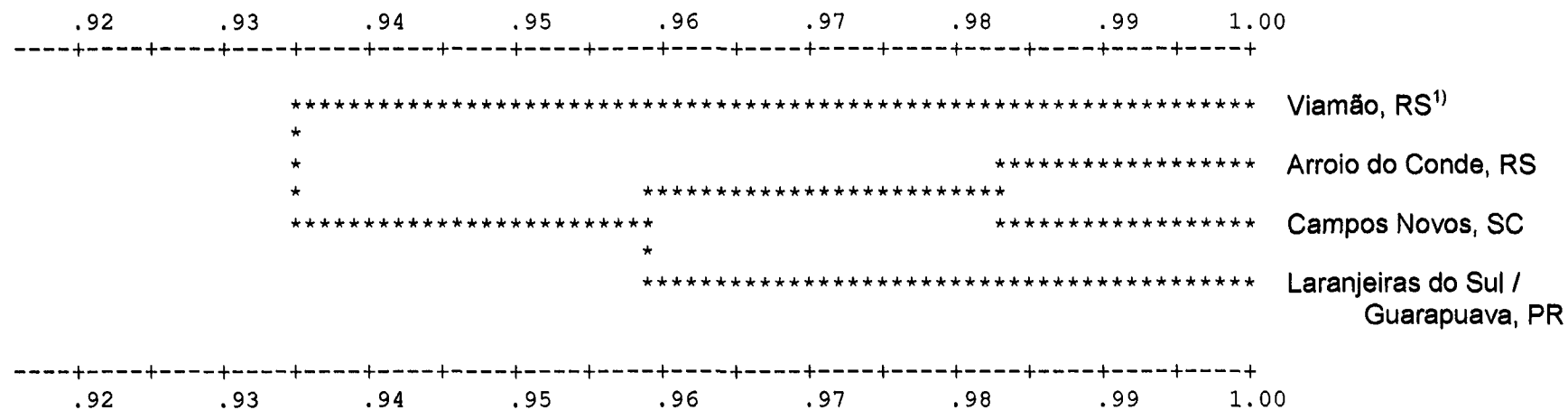
Os coeficientes de identidade genética de NEI (1978) entre populações referentes a cada loco (Tabela 13) revelaram que PGI-2 é o loco que proporciona a maior diferenciação entre as populações. Para todos os locos, exceto MnR, o coeficiente de identidade entre populações diminui à medida que se aumentou a

distância geográfica entre elas (Figura 5). Essa tendência é no dendrograma de análise de agrupamento dos locais pelo método UPGMA (Figura 4).

TABELA 13 - Matrizes dos coeficientes de identidade genética (NEI, 1978) entre as populações representadas no teste de progênies em São José dos Pinhais, PR (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)

Enzima	População	1	2	3	4
PGI-2	1. Viamão TP, RS	***			
	2. Arroio do Conde, RS	0,732	***		
	3. Campos Novos, SC	0,720	0,973	***	
	4. Laranjeiras do Sul / Guarapuava, PR	0,549	0,930	0,991	***
6PGDH-2	1. Viamão TP, RS	***			
	2. Arroio do Conde, RS	1,000	***		
	3. Campos Novos, SC	0,995	0,997	***	
	4. Laranjeiras do Sul / Guarapuava, PR	0,993	0,995	1,000	***
IDH	1. Viamão TP, RS	***			
	2. Arroio do Conde, RS	1,000	***		
	3. Campos Novos, SC	0,978	0,980	***	
	4. Laranjeiras do Sul / Guarapuava, PR	0,894	0,900	0,954	***
GOT-1	1. Viamão TP, RS	***			
	2. Arroio do Conde, RS	1,000	***		
	3. Campos Novos, SC	0,990	0,998	***	
	4. Laranjeiras do Sul / Guarapuava, PR	0,984	1,000	0,991	***
MnR	1. Viamão TP, RS	***			
	2. Arroio do Conde, RS	0,929	***		
	3. Campos Novos, SC	0,917	1,000	***	
	4. Laranjeiras do Sul / Guarapuava, PR	0,989	0,915	0,957	***

FIGURA 4 - Dendrograma de similaridade genética entre as populações de espinheira-santa representadas no teste de progênies em São José dos Pinhais, PR (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)



NOTA: foram utilizados o método UPGMA e os coeficientes de identidade genética de Nei (1978);
enzimas: PGI-2, 6PGDH-2, IDH, GOT-1 e MnR;
1) População antropogênica

FIGURA 5 – Locais de coleta dos frutos de espinheira-santa representados no teste de progênie em São José dos Pinhais, PR



FONTE: IBGE

Na matriz cofenética de identidade para análise de agrupamento pelo método UPGMA (Tabela 14) o menor valor encontrado foi de 0,935, entre Viamão e as demais populações. Isto se deve, provavelmente, ao fato da amostra de Viamão ser de uma população antropogênica, formada por indivíduos transplantados de diversos locais do Estado do Rio Grande do Sul. De modo geral, a identidade entre as populações foi grande. Isto é coerente com o valor estimado de $F_{ST} = 0,065$.

TABELA 14 - Matriz cofenética de identidade entre as populações representadas no teste de progênies em São José dos Pinhais, PR, utilizando a média dos coeficientes de identidade genética de NEI (1978) (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)

População	1	2	3	4
1. Viamão TP, RS	1,000			
2. Arroio do Conde, RS	0,935	1,000		
3. Campos Novos, SC	0,935	0,983	1,000	
4. Laranjeiras do Sul / Guarapuava, PR	0,935	0,959	0,959	1,000

NOTA: correlação cofenética é de 0,652.

A identidade genética média esperada entre populações de uma mesma espécie, em geral, é maior que 0,90, independente do sistema de cruzamento (CRAWFORD, 1983). Disto se deduz que a maior parte da diversidade genética das espécies, em geral, está contida dentro de cada população. Diante desse panorama, DIAS e KAGEYAMA (1991) recomendaram que, na conservação de populações cuja estrutura genética é desconhecida, a amostragem deve ser tão ampla quanto possível, com ênfase em poucas populações com muitos indivíduos por população. Entretanto, devido à rápida destruição dos ambientes onde a espinheira-santa ocorre naturalmente, é difícil encontrar populações dela com distribuição contínua. Não se tem informações suficientes sobre o alcance da atuação dos polinizadores e dos dispersores de sementes. Assim, a coleta de sementes em pequeno número de plantas em populações próximas entre si aumenta a possibilidade de perda de variação genética (PRAT; ARNAL, 1994). Assim, a estratégia de coleta mais prudente, no momento, inclui a amostragem, ao acaso, de poucas plantas no maior

número de locais possíveis e reuni-las em uma amostra composta única, com o objetivo de aumentar a base genética da geração seguinte, garantindo, assim, um tamanho efetivo populacional suficiente que não limite as futuras etapas dos trabalhos (VENCOVSKY, 1988).

4.4 ASPECTOS SILVICULTURAIS E VARIAÇÃO GENÉTICA ENTRE PROGÊNIES

4.4.1 Número Médio de Sementes por Fruto

Das 105 matrizes das quais foram coletados frutos, somente 49 permitiram fazer a avaliação de número de sementes por fruto. A variação no número de sementes foi significativa (Tabela 15), e o número médio de sementes por fruto variou entre 3,05 e 1,36 (Tabela 16), sendo quatro o número máximo possível.

TABELA 15 - Análise de variância do número médio de sementes por fruto de espinheira-santa (Escola de Florestas, UFPR, Curitiba, PR - 1997)

FV	GL	SQ	QM	F
Matriz	48	20976,5	437,01	18,1**
Erro	147	3549,5	24,14	
Total	195	24526,0		

NOTAS: Coeficiente de variação do erro experimental = 10.39%

FV = fonte de variação; GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = teste F de Snedecor ** significativo ao nível de 1%

A variação no número de sementes por fruto é influenciada por fatores como idade da planta, presença e atividade de polinizadores, fatores nutricionais e genéticos. Dentre as 25 matrizes com os maiores números médios de sementes por fruto, 21 eram de populações naturais e somente 4 de cultivo. Entre as 24 matrizes com os menores números médios de sementes por fruto, 19 eram de árvores cultivadas e somente 5 de populações naturais (Tabela 16). Essa tendência pode estar associada a vários fatores. Um deles é a idade das plantas. No momento da coleta dos frutos para o presente estudo, as árvores de Viamão haviam sido plantadas há quatro anos.

TABELA 16 - Número médio de sementes por fruto de espinheira-santa (Escola de Florestas, UFPR, Curitiba, PR - 1997)

continua

Matriz	Origem	Cultivo ¹⁾	Média ²⁾	
14	Arroio do Conde, RS	N	3,05	a
86	Campo Largo, PR	N	2,99	ab
15	Arroio do Conde, RS	N	2,67	abc
10	Arroio do Conde, RS	N	2,50	abcd
42	Guarapuava, PR	S	2,41	abcde
47	Laranjeiras do Sul, PR	N	2,40	abcde
11	Arroio do Conde, RS	N	2,39	bcde
96	Campo Largo, PR	N	2,39	bcde
46	Laranjeiras do Sul, PR	N	2,35	bcdef
85	Campo Largo, PR	N	2,33	cdef
88	Campo Largo, PR	N	2,28	cdefg
45	Laranjeiras do Sul, PR	N	2,14	cdefgh
12	Arroio do Conde, RS	N	2,13	cdefgh
33	Campos Novos, SC	N	2,10	cdefghi
27	Viamão, RS	S	2,09	cdefghij
91	Campo Largo, PR	N	2,05	cdefghijk
31	Campos Novos, SC	S	2,04	cdefghijk
21	Piraquara, PR	N	1,95	defghijkl
90	Campo Largo, PR	N	1,93	defghijkl
97	Campo Largo, PR	N	1,89	defghijkl
56	Campina Grande do Sul, PR	N	1,86	defghijkl
57	Campina Grande do Sul, PR	N	1,86	defghijkl
39	Viamão, RS	S	1,85	defghijkl
84	Campo Largo, PR	N	1,83	efghijkl
20	Sananduva, RS	N	1,82	efghijkl
99	Viamão, RS	S	1,80	efghijkl
55	Campina Grande do Sul, PR	N	1,79	efghijkl
30	Campos Novos, SC	S	1,71	fghijkl
1	Viamão, RS	S	1,71	fghijkl
19	Passo Fundo, RS	N	1,67	ghijkl
36	Viamão, RS	S	1,66	ghijkl
3	Viamão, RS	S	1,61	hijkl
25	Viamão, RS	S	1,61	hijkl
87	Campo Largo, PR	N	1,59	hijkl
54	Castro, PR	S	1,59	hijkl
38	Viamão, RS	S	1,55	hijkl
40	Viamão, RS	S	1,55	hijkl
41	Viamão, RS	S	1,55	hijkl
2	Viamão, RS	S	1,53	hijkl
4	Viamão, RS	S	1,53	hijkl

TABELA 16 - Número médio de sementes por fruto de espinheira-santa (Escola de Florestas, UFPR, Curitiba, PR - 1997)

Matriz	Origem	Cultivo	Média	conclusão
94	Campo Largo, PR	N	1,52	hijkl
24	Viamão, RS	S	1,51	hijkl
22	Viamão, RS	S	1,49	hijkl
6	Viamão, RS	S	1,45	ijkl
9	Viamão, RS	S	1,44	jkl
23	Viamão, RS	S	1,42	kl
28	Lapa, PR	N	1,41	kl
18	Guarapuava, PR	S	1,36	l
8	Viamão, RS	S	1,36	l

NOTA: ¹⁾ n = não; S = sim; ²⁾ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey

Não se conhece a idade das árvores nas populações naturais das quais foram coletados frutos, mas supõe-se que sejam mais velhas que aquelas cultivadas. A diferença na idade das matrizes pode ser um dos fatores influenciaram no menor número de sementes das árvores de cultivos, pois árvores jovens, quando iniciam a frutificação, em geral produzem pequenas quantidades de sementes (FIGLIOLA; AGUIAR, 1993).

Outro fator que pode estar influenciando a tendência de menor produção de sementes por fruto nas árvores cultivadas é o grau de perturbação do ambiente de cultivo refletindo, especialmente, na presença de polinizadores. Apesar de não se ter conhecimento de quais seriam os polinizadores específicos da espinheira-santa, o tipo da flor leva a crer que seja polinizada por agentes bióticos. Como o sistema de cruzamento da espinheira-santa é alógamo, a presença e a atividade destes agentes é determinante para a frutificação e a produção de sementes (KAGEYAMA; PIÑA-RODRIGUES, 1993).

O peso médio de 1000 sementes (Apêndice 1) variou entre 16,8 g (matriz 11) e 42,8 g (matriz 40), de forma que o número de sementes por quilo variou entre 59.523 e 23.364. O teor de umidade de sementes secas ao ar, mesmo método utilizado no presente trabalho, variou entre 6,72 e 7,42% para três lotes de sementes, oriundas de Castro, PR, de Prudentópolis, PR e de Agudos do Sul, PR (SANTOS, ARAUJO; SCHEFFER, 1999). Esses valores são próximos ao valor de

6% de umidade encontrado por EIRA; DIAS; MELLO (1995), que realizaram a secagem das sementes em câmara a 22° C e 15% umidade relativa do ar. Em sementes oriundas de Castro, Prudentópolis e Agudos do Sul o peso médio de 1000 sementes foi 29,2 g, 27,4 g e 42,7 g, respectivamente (SANTOS; ARAUJO; SCHEFFER, 1999). A amplitude dos valores encontrados no presente trabalho foi ainda maior

4.4.2 Fase de Viveiro

O número médio de plantas por parcela aos 11 meses, variou entre 1,25 e 14, de um máximo possível de 16 (Apêndice 9). Somente 25 matrizes apresentaram emergência igual ou maior que 50%. A altura média das plantas aos onze meses variou de 2,2 cm a 13,2 cm e o diâmetro médio variou de 0,6 mm a 2,6 mm. As variações entre progênies, com relação a número de plantas aos 45 dias, número de plantas aos 11 meses, altura média e diâmetro médio foram significativas ao nível de 1% pelo teste F (Tabela 17).

TABELA 17 - Análise de variância de aspectos silviculturais de espinheira-santa em viveiro (Escola de Florestas, UFPR, Curitiba, PR - 1998)

Fonte de variação e	NP45d ¹⁾		NP11m ¹⁾		AM (cm)		DM (mm)		
	GL	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
Blocos	3	1,68	9,2**	1,31	7,6**	36,29	5,5**	2,71	9,6**
Progênies	99	2,30	12,6**	2,42	14,0**	31,11	4,8**	1,20	4,2**
Erro	297	0,18		0,17		5,53		0,28	
C.V. %		21,86		17,99		33,67		31,68	
Média geral ²⁾		4,0		5,6		7,6		1,7	

NOTAS: Convenções utilizadas:

NP45d = número de plantas aos 45 dias; NP11m = número de plantas aos 11 meses; AM = altura média; DM = diâmetro médio

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = teste F de Snedecor; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade

¹⁾ dados transformados em raiz quadrada de $(x+0,5)$, sendo x o dado coletado.

²⁾ dados sem transformação

Houve grande variação no tempo de emergência das plantas. Para algumas matrizes os números de plantas aos 45 dias e aos 11 meses foram semelhantes, enquanto que, para outras, a emergência aos 45 dias representou menos de 50% do número de plantas aos onze meses (Apêndice 9). A diferença no tempo de germinação pode indicar a existência de um maior ou menor grau de dormência nas sementes. Como as sementes foram armazenadas em câmara fria por oito meses após a coleta, as baixas temperaturas podem ter induzido dormência secundária. A dormência, passível de controle genético, pode ser alterada significativamente por fatores pré e pós-colheita. Além disso, os lotes podem apresentar mistura de sementes dormentes e não-dormentes e a persistência da dormência pode variar entre as sementes (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1985).

Outro fator a considerar é a condição edafo-climática à qual cada matriz esteve submetida, que pode influenciar na qualidade fisiológica (por exemplo, velocidade e taxa de germinação) das sementes (SALISBURY; ROSS, 1992). Além disso, como a espinheira-santa é predominantemente alógama, e pressupõe-se que a endogamia tenha um efeito deletério no vigor das sementes, caracterizado pela velocidade de germinação (HAMRICK, 1989). A hipótese do efeito deletério em caso de endogamia é reforçada pelo fato de que poucas sementes das matrizes 27 e 37, sabidamente isoladas, germinaram e deram origem a mudas com baixo desenvolvimento.

Um período de germinação amplo é indesejável na produção de mudas em grande escala e as causas da diferença na velocidade de emergência devem ser investigadas. A seleção visando obter sementes com maior uniformidade no tempo de germinação deve ser feita com cautela pois poderá comprometer a variabilidade genética dos futuros povoamentos (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1985).

4.4.3 Testes de progênies

4.4.3.1 Sobrevivência

De modo geral, a sobrevivência nas áreas experimentais foi grande. Em Ponta Grossa a porcentagem de falhas na primeira avaliação, aos 23 meses de idade, foi 2,8% e em São José dos Pinhais, somente 0,7%. Na segunda avaliação,

aos 38 meses de idade, as falhas foram de 5,7% em Ponta Grossa e 3,6% em São José dos Pinhais (Tabela 18). Entretanto, em Ponta Grossa, das 25 plantas consideradas falhas (2,8%) na primeira avaliação, nove (1,0%) rebrotaram. Em São José dos Pinhais somente uma planta considerada falha na primeira avaliação voltou a rebrotar. Portanto, somente nas próximas avaliações será possível averiguar se as falhas verificadas na segunda medição foram decorrentes da morte das plantas ou de seu corte acidental durante a limpeza.

TABELA 18 - Número de falhas nos testes de progênies (Embrapa Negócios Tecnológicos, Ponta Grossa, PR e São José dos Pinhais, PR - dez. 1998 e mar. 2000)

Local	Nº total de plantas no experimento	Idade			
		23 meses		38 meses	
		Nº falhas	%	Nº falhas	%
Ponta Grossa	880	25	2,8	50	5,7
São José dos Pinhais	640	5	0,70	23	3,6

A taxa de sobrevivência observada neste experimento foi semelhante à verificada por KAGEYAMA et al. (1992) em espécies secundárias iniciais ou tardias. A tolerância da espinheira-santa ao plantio em campo aberto já foi constatada, também, em outros experimentos (RACHWALL; CURCIO; MEDRADO, 1998). Com isto, é possível recomendar seu plantio em campo aberto ou associado a culturas agrícolas ou outras espécies florestais que não provoquem sombreamento excessivo.

4.4.3.2 Avaliação do crescimento

O crescimento das plantas foi avaliado em dezembro de 1998 (23 meses) e em março de 2000 (38 meses), nos dois locais de testes (Ponta Grossa e São José dos Pinhais). Houve grande diferença entre esses locais, quanto ao crescimento das progênies. As plantas, em Ponta Grossa, cresceram, em média, 5,1 cm entre os 23 e 38 meses de idade (um incremento de 14,4% em relação à altura média aos 23 meses). Em São José dos Pinhais, elas cresceram, em média, 18,1 cm nesse

mesmo intervalo, representado um incremento de 69,9% em relação à altura aos 23 meses.

As análises de variância do crescimento em altura da espinheira-santa (Tabela 19) indicaram variações significativas entre progênies ao nível de 1% de probabilidade nas duas idades de avaliação em Ponta Grossa. Em São José dos Pinhais, as variações foram significativas ao nível de 1% de probabilidade na primeira avaliação e ao nível de 5% de probabilidade na segunda. A estratificação das plantas por altura, no momento do plantio, contribuiu para acentuar variações entre blocos. Os coeficientes de variação encontrados na primeira avaliação são considerados médios e aumentaram na segunda, sendo o coeficiente de variação de São José dos Pinhais considerado alto (> 20%) (GOMES, 1990). Não há citações bibliográficas referentes a testes de progênies de espinheira-santa para comparar estes valores.

TABELA 19 - Análise de variância da altura da espinheira-santa em teste de progênies em dois locais (Embrapa Negócios Tecnológicos, Ponta Grossa, PR e São José dos Pinhais, PR - dez. 1998 e mar. 2000)

	Ponta Grossa		São José dos Pinhais	
	Altura (23 meses)	Altura (38 meses)	Altura (23 meses)	Altura (38 meses)
\bar{X} (cm)	35,3	40,4	25,9	44,0
QM Progênies	164,84**	209,39**	63,84**	164,21*
QM Blocos	890,39**	800,81**	95,12**	224,77 ^{NS}
CV _e (%)	11,85	15,45	12,00	22,60
CV _g (%)	21,93	20,43	17,96	11,62

NOTAS: Convenções utilizadas:

\bar{X} = altura média das progênies; QM = quadrado médio; CV_e% = coeficiente de variação experimental; CV_g% = coeficiente de variação genética; ^{NS} = não significativo; ** = significativo a 1% de probabilidade; * = significativo a 5% de probabilidade pelo teste F de Snedecor;

Os coeficientes de variação genética, que expressam a magnitude da variação genética existente, em cada local de estudo, relativamente à média, foram mais expressivos em Ponta Grossa do que em São José dos Pinhais, indicando um ambiente mais propício para a expressão da variabilidade genética entre as progênies na fase inicial de desenvolvimento.

Em ambos os testes, ocorreu seca de ponteiros em algumas plantas. Em Ponta Grossa, este fator provocou redução na média das alturas de algumas progênies (Tabela 20).

Em São José dos Pinhais, os teores de cálcio e fósforo disponíveis no solo (Tabela 2) foram maiores do que em Ponta Grossa. Estas diferenças, associadas às diferenças climáticas, podem ter sido responsáveis pela diferença no crescimento da espinheira-santa entre esses locais.

O fósforo é um dos elementos essenciais para o crescimento das plantas mas, com frequência, em disponibilidade baixa ou nula nos solos brasileiros. Plantas com deficiência de fósforo apresentam, em geral, crescimento retardado e folhas com coloração verde escura. O cálcio é essencial para o funcionamento das membranas celulares, atuando na ligação dos fosfolipídios uns aos outros e às outras proteínas das membranas. Os sintomas de deficiência de cálcio são mais evidentes nos tecidos jovens pois as zonas meristemáticas são as mais suscetíveis, resultando em tecidos deformados que morrem logo (SALISBURY; ROSS, 1992).

A avaliação de produção de folhas nos experimentos do presente estudo não pode ser realizada dada a pouca idade das plantas. Essas avaliações deverão ser realizadas em anos posteriores. No teste de progênies, em Ponta Grossa, será necessário realizar uma adubação pois as plantas não se mostraram tolerantes às deficiências nutricionais constatadas no local.

TABELA 20 - Altura média das progênies (cm) de espinheira-santa nos dois locais de estudo (Embrapa Negócios Tecnológicos, Ponta Grossa, PR e São José dos Pinhais, PR - dez. 1998 e mar. 2000)

continua

Progênies	Ponta Grossa		São José dos Pinhais	
	23 meses	38 meses	23 meses	38 meses
1	37,9	45,4	27,2	38,6
3	37,5	39,5	21,5	33,5
4	38,9	37,9*	27,6	43,1
6	38,6	40,5	30,6	46,5
8	45,3	49,9	32,8	50,3
9	36,6	37,1	29,9	50,2
10	34,0	32,5*	23,1	34,5
11	36,6	36,9	25,3	45,9
12	34,3	34,1*	22,7	33,1
14	32,1	37,1	20,9	37,7
15	29,2	28,6*	21,7	43,7
18	35,8	48,6		
23	40,4	45,3	28,4	42,9
24	34,8	36,1	26,1	43,0
25	44,9	46,8	28,5	48,6
30	38,0	51,2	25,6	52,3
31	32,2	39,7	21,6	37,7
33	39,0	50,0	26,2	50,6
34	41,6	48,9	29,0	49,1
35	38,8	45,6	29,1	45,4
36	41,3	43,1	32,8	48,3
38	40,5	40,7	30,2	46,8
39	38,7	38,7	27,8	51,1
40	48,1	49,7	27,5	43,9
42	32,7	40,8	23,5	44,6
43	24,6	31,3	22,5	41,3
44	35,9	46,0	24,2	47,8
45	30,9	33,5		
46	40,4	50,8	25,8	51,3
48	40,7	48,7		
49	41,2	45,7	25,7	47,1
52	38,2	43,5	26,4	42,4
53	32,1	43,7	22,6	46,0
55	29,1	36,3		
56	27,8	32,0		
58	31,9	38,6		
69	30,0	36,2		
75	29,3	39,7		
85	28,8	33,7		

TABELA 20 - Altura média das progênies (cm) de espinheira-santa nos dois locais de estudo (Embrapa Negócios Tecnológicos, Ponta Grossa, PR e São José dos Pinhais, PR - dez. 1998 e mar. 2000)

Progênies	Ponta Grossa		São José dos Pinhais	
	23 meses	38 meses	23 meses	38 meses
90	22,5	27,6		
94	27,7	35,0		
96	28,8	36,0		
97	26,6	31,5	17,6	34,9
99	37,2	38,5	24,6	34,8
Média	35,3	40,4	25,9	44,0

NOTA: * redução na altura média devido a seca dos ponteiros.

4.4.3.3 Estimativa de parâmetros genéticos

Os valores altos de herdabilidade da altura no sentido restrito dos indivíduos na parcela, das progênies, das parcelas e indivíduo no experimento, estimados a partir dos dados coletados aos 23 meses (Tabela 21) foram provocados pelo modo como as mudas foram selecionadas e estratificadas para o plantio, que evidenciou as variações entre as progênies.

Na segunda avaliação, aos 38 meses, a estimativa de herdabilidade da altura ao nível de indivíduo no experimento foi menor para as progênies plantadas em São José dos Pinhais do que em Ponta Grossa. Uma das causas da redução da herdabilidade pode ser a maior variação ambiental em São José dos Pinhais, provocada por variações do solo da área experimental. O aumento na variação ambiental também pode ser provocado pela redução do efeito materno (FALCONER, 1989). Como, em São José dos Pinhais, as mudas cresceram mais rapidamente, a influência da variação ambiental foi mais pronunciada. Em Ponta Grossa, na segunda avaliação, os valores estimados de herdabilidade mantiveram-se altos tanto ao nível de progênies quanto ao nível de indivíduo no experimento, refletindo a condição inicial de plantio, pois neste local as mudas não se desenvolveram no mesmo ritmo que em São José dos Pinhais.

TABELA 21 - Coeficientes de herdabilidade da altura de espinheira-santa (método univariado) associados a diferentes efeitos, nos dois locais de estudo (Embrapa Negócios Tecnológicos, Ponta Grossa, PR e São José dos Pinhais, PR - dez. 1998 e mar. 2000)

Locais	Efeitos	Herdabilidade	
		23 meses	38 meses
Ponta Grossa, PR	(h_{ip}^2)	0,64	0,31
	(h_f^2)	0,94	0,86
	(h_p^2)	0,44	0,25
	(h_{ib}^2)	0,73	0,47
	(h_{ie}^2)	0,58	0,45
	(h_{ip}^2)	0,35	0,07
São José dos Pinhais, PR	(h_f^2)	0,89	0,42
	(h_p^2)	0,28	0,03
	(h_{ib}^2)	0,49	0,10
	(h_{ie}^2)	0,47	0,11

NOTAS: h_{ip}^2 = herdabilidade no sentido restrito ao nível de indivíduo na parcela; h_f^2 = herdabilidade no sentido restrito ao nível de progênes; h_p^2 = herdabilidade no sentido restrito ao nível de parcela; h_{ib}^2 = herdabilidade no sentido restrito ao nível de indivíduo no bloco; h_{ie}^2 = herdabilidade no sentido restrito ao nível de indivíduo no experimento.

A análise conjunta dos testes de progênes para a altura, aos 38 meses, nos dois locais confirmou a diferença significativa no crescimento entre os locais (Tabela 22). Porém, não foi detectada interação local x genótipos. A correlação genética entre os dois locais foi 0,91.

Comparando-se as médias das alturas aos 38 meses entre famílias comuns aos dois locais, as duas famílias de maior crescimento foram as mesmas em ambos os locais; entre as dez famílias de maior crescimento nos dois locais, sete foram as mesmas (Tabela 23). Se esse padrão de comportamento ocorrer com os caracteres de biomassa e de metabólitos secundários, futuramente, poderão ser usados,

índices de seleção combinando informações de mais de um local. Porém, como somente dois locais foram considerados nessa fase, é importante ampliar o número de locais de experimentação, usando um número restrito de matrizes, para verificar se a alta correlação genética se mantém mesmo quando se envolvem ambientes com características edafo-climáticas mais distintas.

TABELA 22 - Análise de variância conjunta da altura das progênes de espinheira-santa nos dois locais (Embrapa Negócios Tecnológicos, Ponta Grossa, PR e São José dos Pinhais, PR - mar. 2000)

Fonte de variação	Altura aos 38 meses		
	G. L	QM	F
Locais (L)	1	90,39	5,70**
Progênes (P)	31	55,81	3,52**
L x P	31	15,85	1,13 ^{NS}
Resíduo Médio	248	14,03	
Média geral			42,80 cm
Correlação genética			0,91
Coefficiente de variação (%)			8,75

NOTAS: Convenções utilizadas:

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = teste F de Snedecor; **significativo a 1% de probabilidade ; ^{NS} = não significativo

As perspectivas quanto à utilização dos testes de progênes como pomar de sementes por mudas para futuras etapas de seleção estão limitadas pelo pequeno número de famílias e de indivíduos por família. Recomenda-se, de modo geral, a amostragem de 25 a 50 indivíduos por população, distantes no mínimo 100 m entre si, o que proporcionaria maior segurança contra perda de genes e preservar as médias e variâncias genéticas de uma população (DIAS; KAGEYAMA, 1991). No presente ensaio, estas recomendações não foram observadas pois as populações amostradas eram pequenas, havendo o risco coletar frutos oriundos de cruzamentos entre indivíduos aparentados, conforme verificado em *M. aquifolia* por PERECIN (2000).

Considera-se que tamanho efetivo mínimo que conserva a variabilidade genética da população está entre 30 e 50. Para obter N_e de cerca de 30 indivíduos, o percentual selecionado, em Ponta Grossa, seria 5,68% e, em São José dos Pinhais, 7,81%. Porém, esta estimativa de N_e é teórica, pois está baseada no pressuposto da

TABELA 23 - Ordenamento das progênies de espinheira-santa por altura média (cm) aos 38 meses nos dois locais (Embrapa Negócios Tecnológicos, Ponta Grossa, PR e São José dos Pinhais, PR, mar. 2000)

Progênie	Ponta Grossa	Progênie	São José dos Pinhais
30	51,2	30	52,3
46	50,8	46	51,3
33	50,0	39	51,1
8	49,9	33	50,6
40	49,7	8	50,3
34	48,9	9	50,2
25	46,8	34	49,1
44	46,0	25	48,6
49	45,7	36	48,3
35	45,6	44	47,8
1	45,4	49	47,1
23	45,3	38	46,8
53	43,7	6	46,5
3	43,6	53	46,0
52	43,5	11	45,9
36	43,1	35	45,4
42	40,8	42	44,6
38	40,7	40	43,9
6	40,5	15	43,7
31	39,7	4	43,1
39	38,7	24	43,0
99	38,5	23	42,9
4	37,9	52	42,4
9	37,1	43	41,3
14	37,1	1	38,6
11	36,9	31	37,7
24	36,1	14	37,7
12	34,1	97	34,9
10	32,5	99	34,8
97	31,5	10	34,5
43	31,3	3	33,5
15	28,6	12	33,1

NOTA: sombreado, em destaque, respectivamente, as duas e as dez progênies que apresentaram maior crescimento

panmixia. A correlação de paternidade (probabilidade de dois indivíduos da mesma progênie serem irmãos germanos) estimada na população de Viamão foi 0,99. Para que se possa estimar corretamente o tamanho efetivo do grupo de indivíduos selecionados para transformação do teste em pomar de semente por mudas, é

necessário realizar estudos complementares visando determinar o tamanho da vizinhança genética, que depende, além do sistema de cruzamento, das distâncias cobertas pela dispersão do pólen e das sementes, bem como da distância coberta pela propagação clonal (ROBINSON, 1998), esta última é representada, no caso da espinheira-santa, por rebrota das raízes.

Devem ser amostrados mais populações e maior número de indivíduos por população para que a intensidade de seleção possa ser aumentada, permitindo a obtenção de maiores ganhos e com maior acurácia. As dificuldades nesta proposta são o tempo e o custo envolvidos. Como há necessidade imediata de produção de sementes de boa qualidade genética e fisiológica, a alternativa será aplicar baixa intensidade de seleção nos testes de progênies instalados, visando preservar o tamanho efetivo e, conseqüentemente, a variabilidade genética já obtida. As sementes das árvores selecionadas podem ser utilizadas para instalar se um novo teste de progênies com maior número de indivíduos por progênie, de tal forma que se possa aplicar maior intensidade de seleção de progênies e obter ganhos significativos, pois a correlação entre genótipo e fenótipo, para caracteres fisiológicos ligados ao crescimento é mais baixa que para caracteres morfológicos como o crescimento do tronco e da copa (DIAS; KAGEYAMA, 1991).

5 CONCLUSÕES

A espinheira-santa é uma espécie alógama.

A maior parte da variação genética concentra-se dentro das populações.

A identidade genética entre as populações, com base no coeficiente de Nei (1978), diminui à medida que aumenta a distância geográfica entre as mesmas.

A interferência humana, agregando materiais genéticos de diversas procedências para formação da população antropogênica de espinheira-santa, tornou-a geneticamente distinta das populações naturais examinadas.

As progênies apresentaram variação significativa com relação a germinação e crescimento inicial, indicando a possibilidade de ganhos genéticos por meio de seleção para estes caracteres.

As condições ambientais em São José dos Pinhais são mais favoráveis do que em Ponta Grossa para o crescimento da espinheira-santa.

A correlação genética entre os dois locais foi elevada e, aparentemente, não ocorre interação genótipo x ambiente em espinheira-santa, o que permite estabelecer um programa de melhoramento para as duas regiões, simultaneamente.

REFERÊNCIAS

ADAMS, W.T. 1983. Application of isozymes in tree breeding. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. Isozymes in plant genetics and breeding. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. p. 381-400.

AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. 1991. Conservation of medicinal plants. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 362 p.

ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. 1991. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa : UFV. 242 p.

BERNARDI, H. H.; WASICKY, M. 1959. Algumas pesquisas sobre a "Espinheira Santa" ou "Cancerosa" *Maytenus ilicifolia*, Martius, usada como remédio popular no Rio Grande do Sul. Santa Maria: URGs. 46 p.

BI, Z.; MAQUET, A.; WATHELET, B.; BAUDOIN, J. P. 1997. Genetic control of alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase, and phosphoglucumutase isozymes in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). Plant Breeding v. 116, n. 2, p. 181-185.

BRASIL. 1993. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Regras para análise de sementes. Brasília: Ministério da Agricultura, 365 p.

BRASIL. 1981. Portaria Nº 212, de 11 set. 1981. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, v. 119, n. 175, p. 17325-17328. 15 set. 1981. Seção I.

BRASIL. 1995. Portaria Nº 6 [SNVS], de 31 de janeiro de 1995. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, v. 133, n. 26, p. 1523-1524, 6 fev. 1995. Sec. I.

BRASIL. 1985. Portaria normativa N° 122-P, de 19 de março de 1985. Estabelece normas ao registro de pessoas físicas ou jurídicas que consumam, explorem ou comercializem, matéria-prima florestal. IN: Lex: coletânea de legislação e jurisprudência. São Paulo, v. 49, p. 597-609, jan.-mar., 1985. (Marginália).

BRASIL. 2000. Resolução-RDC N° 17, de 24 fev. 2000. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, v. 138. 25 fev. 2000. Seção I.

BREITENBACH-DORFER, M.; GEBURER, T. 1995. Gene modifies electrophoretic properties of malate dehydrogenase in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). Hereditas, v. 122, p. 103 - 108.

BROWN, A. H. D.; WEIR, B. S. 1983. Measuring genetic variability in plant populations. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. Isozymes in plant genetics and breeding. New York: Elsevier, p. 219-239. Part A.

BROWN, A. H. D.; BURDON, J. J.; JAROSZ, A. M. 1989. Isozyme analysis of plant mating systems. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. (Ed.) Isozymes in plant biology. Portland: Dioscorides Press. p. 73-86.

BRUNE, W.; ALFENAS, A. C.; JUNGHANS, T. G. 1998. Identificações específicas de enzimas em géis. In: ALFENAS, A. C. (ed.) 1998. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Viçosa : UFV. p. 201- 328.

CALAGO, K. 1996. Carta ao autor. Brasília, 06 de maio de 1996. 2 p.

CARLINI, E. A. (Coord.). 1988. Estudo da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-santa) e outras. Brasília: CEME/AFIP. 87 p.

CARVALHO, P. E. R. 1980. Levantamento florístico da região de Irati-PR. (1ª aproximação) Curitiba: EMBRAPA/ CNPF. 44 p. (Circular Técnica N° 03).

- CARVALHO-OKANO, R. M. 1992. Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol emend. Mol. (CELASTRACEAE) do Brasil extra-amazônico. Campinas: UNICAMP. 253 p. (tese de doutorado - Ciências: Biologia Vegetal).
- CERVI, A. C.; PACIORNIK, E. F.; VIEIRA, R. F.; MARQUES, L. C. 1989. Espécies vegetais de um remanescente de floresta de araucária (Curitiba, Brasil): Estudo preliminar I. Acta Biológica Paranaense, Curitiba, v. 18, n. 1/4, p. 73-114.
- CRAWFORD, D. J. 1983. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. In: TANKSLEY, S.D; ORTON, T.J. 1983. Isozymes in plant genetics and breeding. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. p. 257-287. Part A.
- DIAS, L. A. dos S. 1998. Variância de freqüências alélicas. In: ALFENAS, A. C. 1998. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Viçosa : UFV. p. 381-404.
- DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. 1991. Variação genética em espécies arbóreas e consequências para o melhoramento florestal. Agrotropica, v. 3, n. 3, p. 119-127.
- DONOSO, C.; WENDLER, J. 1985. Antecedentes morfológicos y genecológicos de *Maytenus boaria*. Bosque, v. 6, n. 2, p. 93-99.
- EIRA, M. T. S.; DIAS, T. M. C., MELLO, C. M. C. 1995. Comportamento fisiológico de sementes de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) no armazenamento. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 13, n. 1, p. 32-34.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. 1985. Handbook of seed technology for genebanks. V. 1: Principles and methodology. Rome : International Board for Plant Genetic Resources. 210 p.
- FALCONER, D. S. 1989. Introduction to quantitative genetics. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 438 p.

FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. 1985. Medicinal plants in therapy. Bull. W. H. O., v. 63, p. 965-981.

FERREIRA, M.; ARAÚJO, A. J. 1981. Procedimentos e recomendações para testes de procedência. Curitiba : EMBRAPA/URPFCS. 28 p.

FIGLIOLA, M. B.; AGUIAR, I. B. de. Colheita de sementes. In: In: AGUIAR, I. B. de; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLA, M. B. Sementes de espécies florestais. Brasília: Associação Brasileira de Tecnologia de sementes florestais, p. 275 - 302.

GOMES, F. P. 1990. Curso de estatística experimental. Piracicaba : ESALQ, 468 p.

GRÜNWARD, J. 1997. The market situation and marketing of Herbal Medicinal Products (HMP) in Europe. In: ICMAP/ISHS/SAIPA. Abstracts. ICMAP/ISHS/SAIPA: Buenos Aires. L. 33. [II World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare, Mendoza (Argentina), 10-15 nov. 1997)

HAMRICK, J.L. 1989. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. (Ed.) Isozymes in plant biology. Portland: Dioscorides Press. p. 87-105.

HARTL, D. L. 1980. Principles of population genetics. Sunderland : Sinauer Associates, Inc. Publishers. 488 p.

HEDRICK, P. W. 1983. Genetics of populations. Boston: Science Books International. 629 p.

ISSHIKI, S.; OKUBO, H.; FUJIEDA, K. 1994. Genetic control of isozymes in eggplant and its wild relatives. Euphytica, v. 80, p. 145-150.

KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, C. F. A.; CARPANEZZI, A. A. 1989. Implantação de matas ciliares: estratégias para auxiliar a sucessão secundária. p. 130-143 In: SIMPÓSIO SOBRE MATA CILIAR, São Paulo, 1989. Anais. Campinas: Fundação Cargill. 335 p.

KAGEYAMA, P. Y.; FREIXÉDAS, V. M.; GERES, W. L. A.; DIAS, J. H. P.; BORGES, A. S. 1992. Consórcio de espécies nativas de diferentes grupos sucessionais em Teodoro Sampaio-SP. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., São Paulo, 1992. Anais. São Paulo: Instituto Florestal, 1992. p. 527-533.

KAGEYAMA, P. Y.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. 1993. Fatores que afetam a produção de sementes. In: AGUIAR, I. B. de; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLA, M. B. Sementes de espécies florestais. Brasília: Associação Brasileira de Tecnologia de sementes florestais, p. 19-46.

KANASHIRO, M. 1992. Genética e melhoramento de essências florestais nativas: aspectos conceituais e práticos. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., São Paulo, 1992. Anais. São Paulo: Instituto Florestal. p. 1168-1178.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. 1993. Techniques for pollination biologists. Colorado: University Press of Colorado. p. 217-262.

KLEIN, R.M. 1972. Árvores nativas da floresta subtropical do Alto Uruguai. Sellowia, Itajaí, v. 24, p. 9-62.

LONGHI, S. J. 1993. Floresta ombrófila mista. Curitiba: UFPR. 61 p. (trabalho apresentado nas Disciplinas Ecologia Florestal e Fitogeografia Florestal, Curso de Pós-Graduação em Ciências Florestais).

LOPES, A. M.; ALVAREZ, A.; SIQUEIRA, V. L.; EISINGER, S.; ACHUTTI, M. H. 1991. Plantas utilizadas na medicina popular em Santa Maria - Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO DE FARMÁCIA DO CONE SUL, 1., Porto Alegre, 1991. Cad. Farmácia, P. Alegre, v. 7 (supl.): D.1-D.3.

MAGALHÃES, P. M.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MONTANARI JR, I. 1992. Conservação da espécie *Maytenus ilicifolia*, Mart. ex Reiss (espinheira-santa) através da técnica de propagação por sementes. CONGRESSO NACIONAL

SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., São Paulo, 1992. Anais. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente. p. 519-522.

MAGALHÃES, P.M.; FIGUEIRA, G.M.; ARCHANGELO JR., U.; MONTANARI JR., I. 1991. Aspectos agronômicos do cultivo em larga escala de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (espinheira-santa). Horticultura Brasileira, Brasília: Sociedade de Olericultura do Brasil, v. 9, n. 1, p. 44.

MARTINEZ-CROVETTO, R. 1963. Esquema fitogeográfico de la Provincia de Misiones (Republica Argentina). Bonplandia, Corrientes, v. 3, n. 1, p. 171 - 215.

MITTON J. B. 1989. Physiological and demographic variation associated with allozyme variation. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P.S. Isozymes in plant biology. 1989. Portland: Dioscorides. p. 127 - 145.

NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of Natural Academy of Science, v. 70, n. 12, p. 3321-3323.

NISSEN, O. 1991. User's guide to MSTAT-C: A microcomputer program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. Michigan: Michigan State University.

OCCHIONI, P.; HATSCHBACH, G. 1972. A vegetação arbórea dos ervais do Paraná. Leandra, Rio de Janeiro, v. 2, n. 3, p. 5 -59.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 1993. Manual de resoluciones y decisiones de la asamblea mundial de la salud y del consejo ejecutivo. Genebra: Organización Mundial de la Salud. p.95, 137. (Volume. III)

PARANÁ. SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE. 1995 Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no Estado do Paraná. Curitiba: SEMAGTZ. 139 p.

PERECIN, M. B. 2000. Diversidade genética em populações naturais de espécies de espinheira-santa, *Maytenus aquifolia* Mart e *M. ilicifolia* Mart ex

Reiss (Celastraceae). Tese (Doutoramento), ESALQ/USP, Piracicaba, 2000. 134 p.

PEREIRA, A. M. S. 1993. Influência da adubação em *Maytenus aquifolium* Mart., quanto a parâmetros agrônômicos e químicos. Jaboticabal. 17 p. (datilografado).

PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B. W.; RESENDE, I. D.; BARATTO, D. M.; SILVA, P. H. FRANÇA, S. C. 1994. Avaliação de características fenotípicas de *Maytenus aquifolium* para produção de clones superiores. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13., 1994, Fortaleza. Resumo de temas livres. [Fortaleza]: FINEP/CNPq. P. 188.

PEREIRA, A. M. S. 1993. Técnicas de micropropagação de *Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. (espinheira-santa). Jaboticabal:UNESP. 67 p. (Dissertação de Mestrado - Agronomia: Melhoramento Genético Vegetal).

PEROZIN, M. M. 1988. Ante-projeto de fitoterapia do SUDS: plantas medicinais no serviço de saúde. Curitiba:SESA/FCMR. 19 p. (datilografado).

PRAT, D.; ARNAL, S. 1994. Allozyme variation and mating system in three artificial stands of Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) Planted in Europe. Silvae Genetica, v. 43, n. 4, p. 199-206.

PRIORE, H.; CARPIUC, L.; ALONSO, E.; BASSAGODA, M. J. 1986. Guia taxonômico de plantas que se comercializam como medicinais en Uruguay: primera contribución. Acta Farmaceutica Bonaerense, Buenos Aires, v. 8, n. 3, p. 187-198.

RACHWAL, M. F. G.; CURCIO, G. R.; MEDRADO, M. J. S. 1998. Desenvolvimento de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*) em Floresta Ombrófila Mista no estádio de capoeirão, em cambissolo húmico em Colombo-PR. Boletim de Pesquisa Agropecuária, n. 52, p. 1-2.

RADOMSKI, M. I. 1998. Caracterização ecológica e fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em populações nativas, no município da Lapa, Paraná. Curitiba:

UFPR. 98 p. (dissertação de mestrado do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração "Ciência do Solo", Setor de Ciências Agrárias).

RAMALHO, M.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. B. 1997. Genética na agropecuária. São Paulo: Globo / FAEPE, 359 p.

RATERA, E. L.; RATERA, M. O. 1980. Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur. 189 p.

RESENDE, M. D. V. de; HIGA, A. R. 1994. Estimacão de valores genéticos no melhoramento de *Eucalyptus*: seleçãõ em um caráter com base em informações do indivíduo e de seus parentes. Bol. Pesq. Florestal, Colombo, n. 28/29, p. 11-36.

RESENDE, M. D. V. de; OLIVEIRA, E. B. de; MELINSKI, L. C.; GOULART JR.; F. S.; OAIDA, G. R. P. 1994. Seleção genética computadorizada - SELEGEN. Colombo: EMBRAPA. 32 p. (Módulo 1 - "Best Prediction". Manual do usuário. Versão 1.0).

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

RESENDE, M. D. V. de. 1998. Interaçãõ genótipo x ambiente e determinacão do número adequado de locais de experimentacão com base nas estatísticas "F" de Snedecor da análise de variância conjunta. Bol. Pesq. Florestal, Colombo, n. 37, p. 55-66.

REYES, B. G. D.; KHUSH, G. S.; BRAR, D. S. 1998. Chromosomal location of eight isozyme loci in rice using primary trisomics and monosomic alien addition lines. Journal of Heredity, v. 89, n. 2, p. 164-168.

RITLAND, K. A. 1996. Multilocus mating system program - MLTR. Version 1.1. Toronto : Kermit Ritland. 11 p.

RITLAND, K. A. 1990. Series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. The Journal of Heredity, v. 81, n. 3, p. 235-237.

RITLAND, K. 1989. Correlated mating in the partial selfer *Mimulus guttatus*. Evolution, v. 43, n. 4, p. 848-859.

RITLAND, K. 1986. Joint maximum likelihood estimation of genetic and mating structure using open-pollinated progenies. Biometrics, v. 42, p. 25-43.

RITLAND, K.; JAIN, S. A. 1981. Model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. Heredity, v. 47, n. 1, p. 35-52.

ROBINSON, I. P. 1998. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. (ed.) 1998. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Viçosa : UFV. p. 329 - 380. (574 p.)

ROSA, S.G.T.; BARROS, I.B.I. 1999. Behavior of *Maytenus ilicifolia* seeds in different periods and storage conditions. Acta Horticulturae, n. 502, p. 249-254.

ROTTA, E. 1981. Composição florística da unidade regional de pesquisa florestal centro-sul, Colombo, PR (resultados parciais). Curitiba: EMBRAPA / CNPF. 33 p.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. 1992. Plant Physiology. Belmont: Wadsworth. 682 p.

SANTOS, E. P. dos; ARAUJO, A. J. de; SCHEFFER, M. C. 1999. Efeito de diferentes substratos e recipientes na produção de mudas de espinheira-santa. Livro de resumos. Maringá, PR : Fundação Universidade Estadual de Maringá. p. 25. (Congresso Sul Brasileiro de Plantas Mediciniais, I., 1999. Maringá).

SCALTSOYIANNES, A.; ROHR, R.; PANETSOS, K. P. 1994. Allozyme frequency distributions in five European populations of black pine (*Pinus nigra* Arnold). Silvae Genetica, v. 43, n. 1, p. 20-30.

SCHEFFER, M. C.; DONI FILHO, L.; KOEHLER, H. S. 1994. Influência do tipo de coleta, das condições e do tempo de armazenagem na viabilidade de sementes de *Maytenus ilicifolia*. Resumo de temas livres. [Fortaleza]:FINEP/CNPq. P. 196. (SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13., 1994, Fortaleza.)

SCHEFFER, M. C.; CORRÊA JÚNIOR, C. 1997. Mercado de plantas medicinais. p. 102 a 108 e 182-184. In: UNISUL. Anais da 1ª Jornada Catarinense de Plantas Medicinais - Saúde e sustentabilidade para o 3º Milênio. Tubarão : UNISUL. 184 p.

SCHEFFER, M. C.; ARAUJO, J. A. de. 1998. Observações sobre a frutificação de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) na região sul do Brasil. Livro de resumos. São Paulo : UNIFESP. (SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XV. Águas de Lindóia, SP, 13 a 17/10/1998).

SHAW, D. V.; KAHLER, A. L.; ALLARD, R. W. 1981. A multilocus estimator of mating system parameters in plant populations. Proceedings of Natural Academy of Science, v. 78, n. 2, p. 1298-1302.

SILVA, J. A.; SALOMÃO, A. N.; MARTINS NETTO, D. A. 1993. Estrutura, fitossociologia e regeneração natural da reserva genética de Caçador, SC. In: CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO, 1./ CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7.; Curitiba, 1993. Anais. Curitiba: Sociedade Brasileira de Silvicultura/ Sociedade Brasileira de Engenheiros Florestais, Curitiba. p. 347-352. (v.1)

SPIR, I. H. Z. 1998. Sistema de eletroforese de isoenzimas para estudo de populações naturais de espinheira-santa. (Relatório de atividade do bolsista de iniciação científica - PIBIC/CNPq). Curitiba: UFPR. 28 p.

STELLFELD, C. 1934. A espinheira-santa: contribuição ao estudo farmacognóstico. Bol. Assoc. Bras. Pharm., v. 15, p. 551 - 571.

SUN, M. 1996. Effects of population size, mating system, and evolutionary origin on genetic diversity in *Spiranthes sinensis* and *S. hongkongensis*. Conservation Biology, v. 10, n. 3, p. 785-795.

SWOFFORD, D. L.; SELANDER, R.B. 1989. Biosys-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Champaign: Illinios Natural History Survey. 43 p.

TABARELLI, M.; VILLANI, J. P.; MANTOVANI, W. 1993. Estrutura, composição florística e dinamismo de uma floresta secundária na encosta atlântica - SP. In: CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO, 1.,/ CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7., Curitiba, 1993. Anais. Curitiba: Sociedade Brasileira de Silvicultura/ Sociedade Brasileira de Engenheiros Florestais, p. 340-343. (v.1)

TOURSARKISSIAN, M. 1980. Plantas medicinales de la Argentina. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur. 178 p.

UNICAMP / Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas. 1990. Estudo agrônômico de *Maytenus ilicifolia*. In:— . Estudo agrônômico de plantas brasileiras dotadas de atividade farmacológica. Paulínia: CEME/UNICAMP/ CPQBA. p. 3 - 13. (datilografado).

VENCOVSKI, R. 1988. Preservação e genética de populações. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal. Anais. Jaboticabal: FCAV/UNESP. p. 67-74.

VENCOVSKI, R.; BARRIGA, P. 1992. Genética biométrica no fitomelhoramento. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 496 p.

VIEIRA, R. F. 1993. Espécies medicinais prioritárias para conservação: levantamento preliminar. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN. p. 1-10. (Comunicado Técnico, n. 14).

WENDEL, J. F.; WEEDEN, N. F. 1989. *Visualization and interpretation*. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Isozymes in plant biology. Portland: Dioscorides Press. p. 5 - 45.

WRIGHT, J. W. 1976. Introduction to forest genetics. New York: Academic Press. 463 p.

WRIGHT, S. 1969. Evolution and the genetics of populations. Vol. 2: The theory of gene frequencies. London: the University of Chicago Press. 511 p.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Origem dos lotes de sementes de espinheira-santa, ambiente, número de sementes/100 frutos; peso de 1000 sementes e número de sementes por lote (Escola de Florestas, UFPR, Curitiba, PR - nov. 1995 a mar. 1996)

continua

MATRIZ	ESTADO	CULTIVO	SEMENTES EM 100 FRUTOS	PESO 1000 SEMENTES (g)	TOTAL SEMENTES AMOSTRA
001	RS	S	171	29,8	1055
002	RS	S	153	29,1	587
003	RS	S	161	23,1	613
004	RS	S	153	31,3	396
005	RS	S	-	13,4	429
006	RS	S	145	30,2	518
007	RS	S	-		133
008	RS	S	136	26,6	941
009	RS	S	144	23,7	1217
010	RS	N	250	20,6	1005
011	RS	N	239	16,8	1327
012	RS	N	213	20,9	490
013	RS	N	-		64
014	RS	N	305	22,3	396
015	RS	N	267	23,3	400
016	RS	N	-		116
017	RS	N	-		79
018	PR	S	136	36,4	720
020	RS	N	182	20,1	205
021	PR	N	-	34,5	356
022	RS	S	149		162
023	RS	S	142	38,9	487
024	RS	S	151	41,0	240
025	RS	S	181	41,6	399
028	PR	N	140		184
029	PR	S	-		137
030	SC	S	171	32,5	280
031	SC	S	204	26,4	248
032	SC	N	-		56
033	SC	N	210	25,2	778
034	SC	N	205	32,3	439
035	SC	N	-	20,7	1870
036	RS	S	166	28,3	2827
037	PR	S	-	21,9	283
038	RS	S	155	27,1	1538
039	RS	S	185	23,4	387
040	RS	S	154	42,8	695
041	RS	S	154	21,9	2654

APÊNDICE 1 - Origem dos lotes de sementes de espinheira-santa, ambiente, número de sementes/100 frutos; peso de 1000 sementes e número de sementes por lote (Escola de Florestas, UFPR, Curitiba, PR - nov. 1995 a mar. 1996)

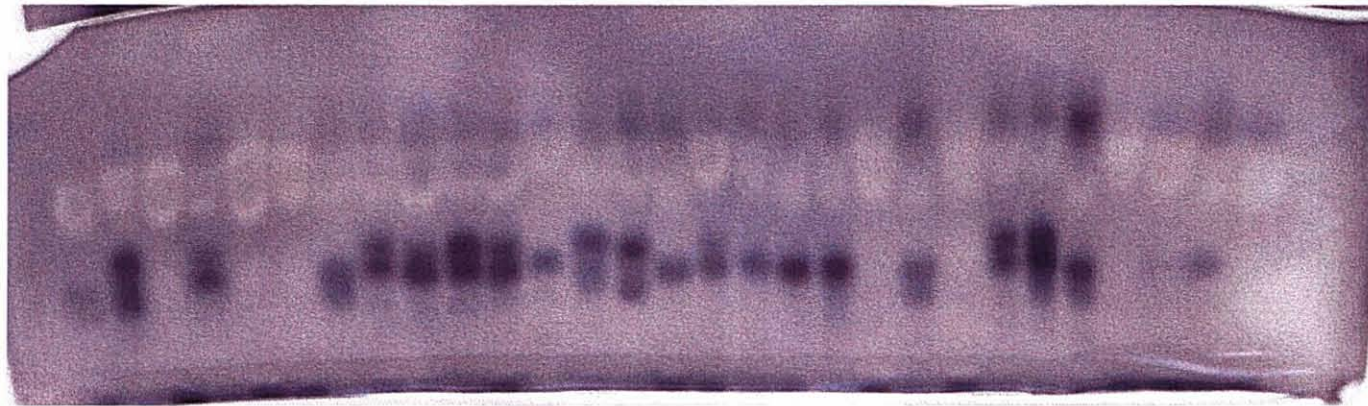
continuação

MATRIZ	ESTADO	CULTIVO	SEMENTES EM 100 FRUTOS	PESO 1000 SEMENTES (g)	TOTAL SEMENTES AMOSTRA
042	PR	S	241	34,3	401
043	PR	N	-	25,7	200
044	PR	N	-	-	185
045	PR	N	214	20,9	232
046	PR	N	235	20,2	845
047	PR	N	240	35,3	920
048	PR	N	-	29,6	2015
049	SC	N	-	25,4	383
050	SC	N	121	-	
051	SC	N	-	-	122
052	SC	N	180	20,3	593
053	SC	S	248	22,9	896
054	PR	N	158	39,6	236
055	PR	N	179	31,4	367
056	PR	N	186	27,3	435
057	PR	N	186	31,9	313
058	PR	N	-	28,6	1218
059	SC	N	-	-	152
060	SC	N	-	-	63
061	SC	N	-	-	118
062	SC	N	144	-	174
063	SC	N	-	-	82
064	SC	N	-	-	82
065	SC	N	-	-	114
066	SC	N	-	-	108
067	SC	N	-	-	57
068	SC	N	-	-	41
069	SC	N	212	-	185
070	SC	N	-	-	42
071	SC	N	-	-	124
072	SC	N	-	-	117
073	SC	N	-	-	122
074	SC	N	-	-	150
075	SC	N	133	18,3	239
076	SC	N	-	-	7
077	SC	N	-	-	24
078	SC	N	-	-	120
079	SC	N	-	-	81

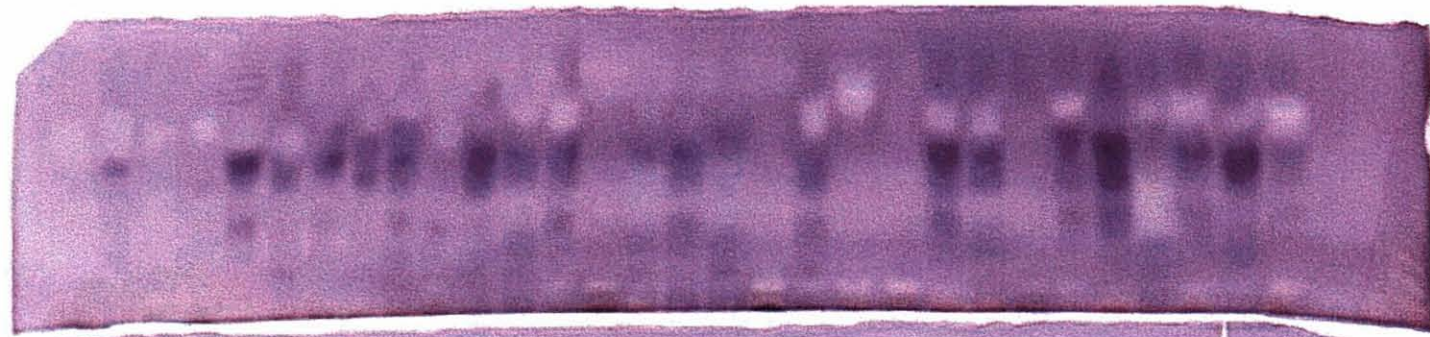
APÊNDICE 1 - Origem dos lotes de sementes de espinheira-santa, ambiente, número de sementes/100 frutos; peso de 1000 sementes e número de sementes por lote (Escola de Florestas, UFPR, Curitiba, PR - nov 1995 a mar 1996)

MATRIZ	ESTADO	CULTIVO	conclusão		
			SEMENTES EM 100 FRUTOS	PESO 1000 SEMENTES (g)	TOTAL SEMENTES AMOSTRA
080	SC	N	-		133
081	SC	N	-		85
082	PR	N	-	-	164
083	PR	N	-	-	164
084	PR	N	183	29,5	250
085	PR	N	233	30,8	432
086	PR	N	299	31,3	855
087	PR	N	159	24,2	470
088	PR	N	228	29,5	416
089	PR	N	-	-	70
090	PR	N	193	26,1	290
091	PR	N	205	22,9	602
092	PR	N	-	-	109
093	PR	N	-	-	26
094	PR	N	152	-	178
095	PR	N	-	-	156
096	PR	N	239	31,6	268
097	PR	N	189	28,3	528
098	PR	S	-	-	133
099	RS	S	180	25,7	1784

APÊNDICE 2 - Imagens digitalizadas de zimogramas da enzima fosfoglucomutase (PGM) em espinheira-santa (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)

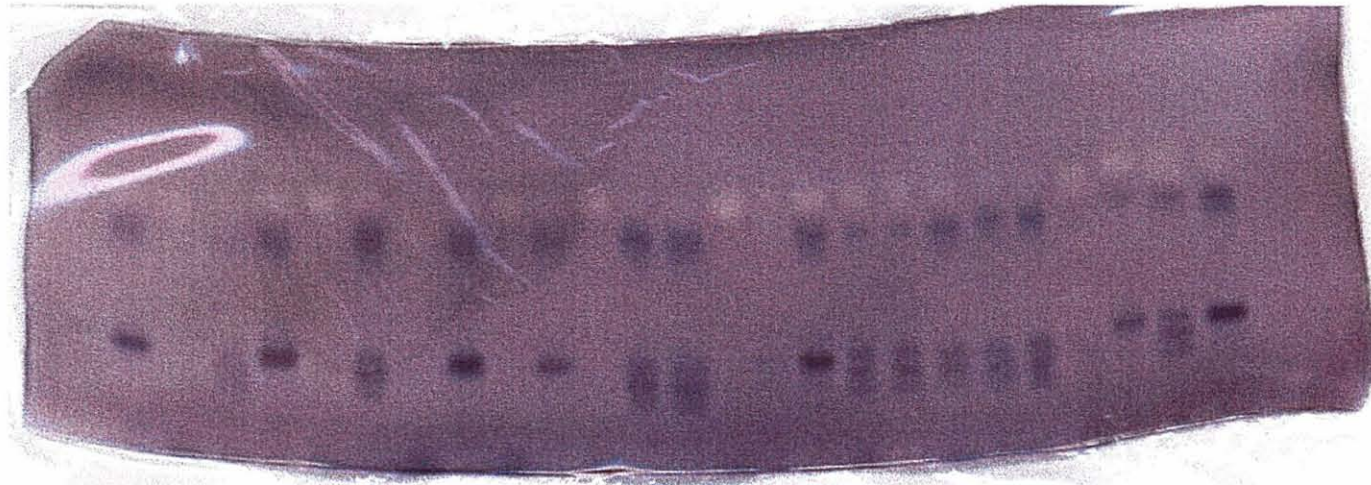


a) zimograma com duas regiões de atividade



b) zimograma com duas regiões de atividade e bandas secundárias

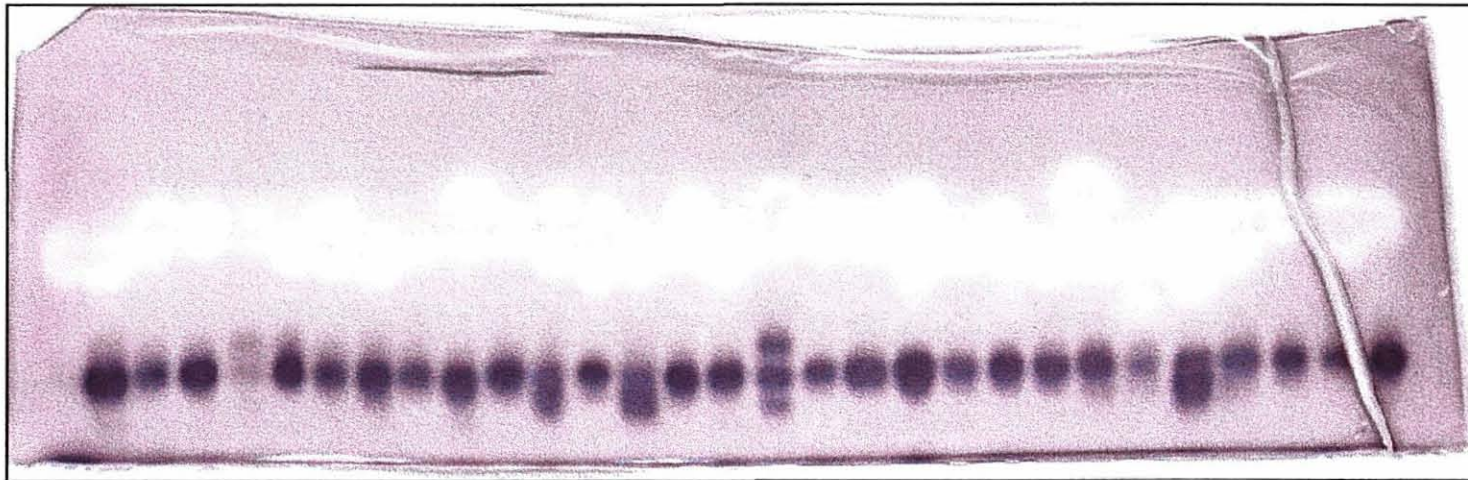
APÊNDICE 3 - Imagem digitalizada de zimograma da enzima 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) em espinheira-santa
(Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)



6PGDH-2 22 / 23 22 / 23 / 22 / 22 / 23 23 / / 22 23 23 23 23 23 / 22 23 22

NOTA: os números indicam a interpretação dos fenótipos

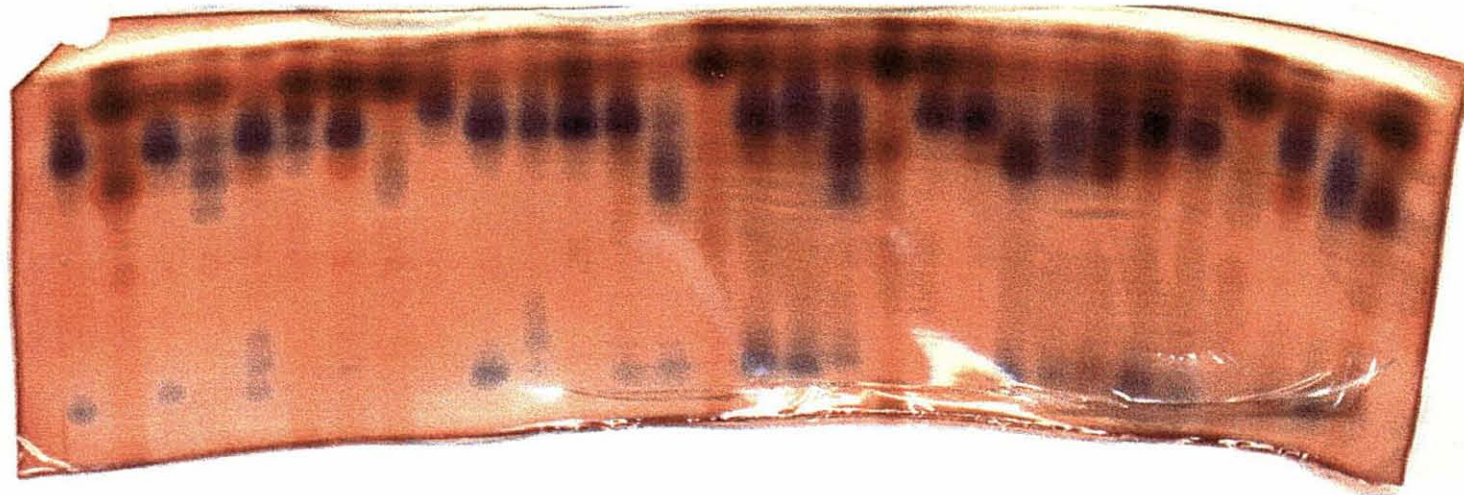
APÊNDICE 4 - Imagem digitalizada de zimograma da enzima isocitrato desidrogenase (IDH) em espinheira-santa (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR -1999)



22 22 22 / 22 22 22 22 22 22 23 22 23 22 22 13 22 22 22 22 22 22 22 23 22 22 22 22

NOTA: os números indicam a interpretação dos fenótipos

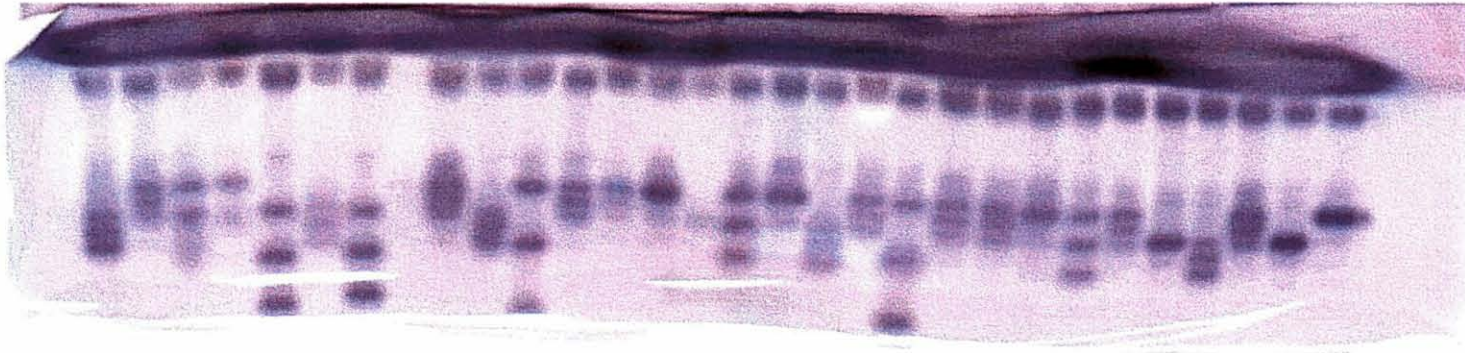
APÊNDICE 5 - Imagem digitalizada de zimograma da enzima glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT) em espinheira-santa (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)



GOT-1 22 / 22 24 22 13 / / / 22 22 / 22 34 / 22 12 24 / 22 22 33 23 13 12 22 / 12 23 33
 GOT-2 22 / 22 / 12 / 22 / / 22 12 / 22 22 / 22 22 / / / / 22 22 22 22 22 / / 22 /

NOTA: os números indicam a interpretação dos fenótipos nas respectivas regiões de atividade

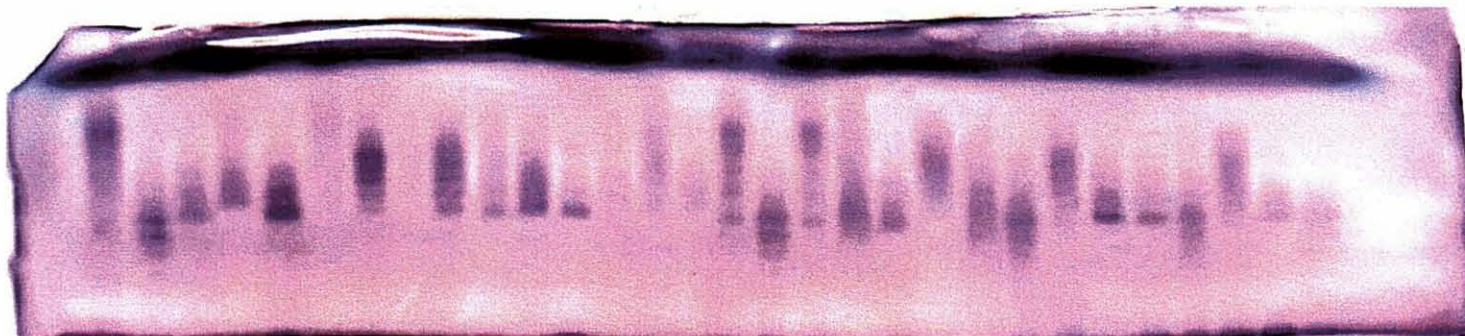
APÊNDICE 6 - Imagem digitalizada de zimograma da enzima fosfoglucoase isomerase (PGI) em espinheira-santa (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)



PGI-2 23 12 23 / 25 23 25 / 12 23 15 12 12 11 / 13 11 23 12 15 12 12 11 13 12 22 23 12 22 11

NOTA: os números indicam a interpretação dos fenótipos na região de atividade indicada

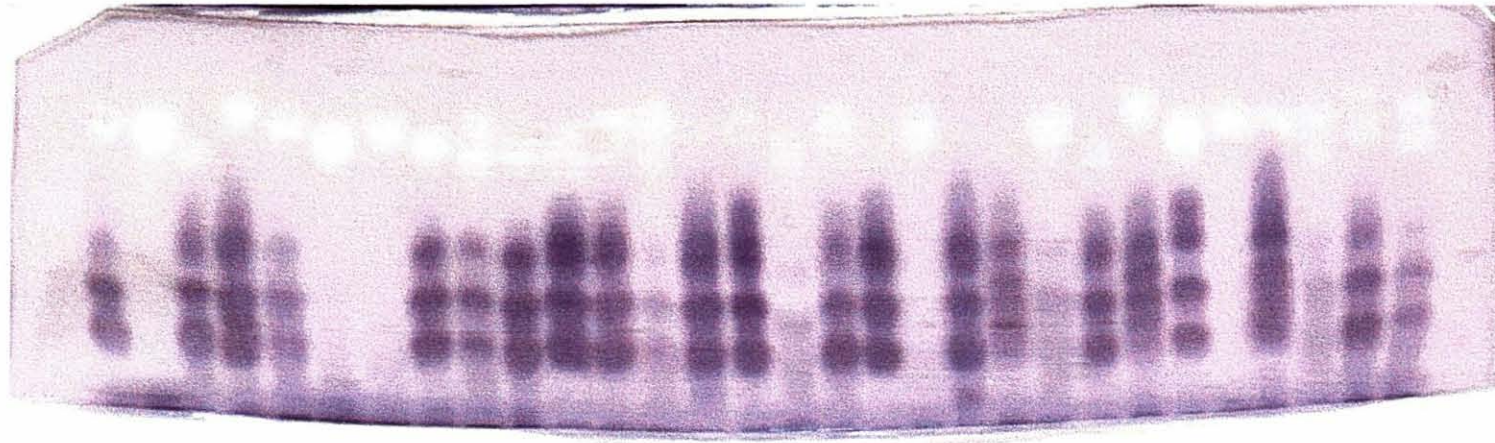
APÊNDICE 7 - Imagem digitalizada de zimograma da enzima menadiona redutase (MnR) em espinheira-santa (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)



/ 34 33 / 33 / 23 / 23 33 / 33 / / / 13 34 13 / 33 / / 34 23 33 33 34 23 33 33

NOTA: os números indicam a interpretação dos fenótipos.

APÊNDICE 8 - Imagem digitalizada de zimograma da enzima malato desidrogenase (MDH) em espinheira-santa (Laboratório de Genética, Embrapa Florestas, Colombo, PR - 1999)



APÊNDICE 9 - Desenvolvimento de mudas de espinheira-santa na fase de viveiro
(Escola de Florestas, UFPR, Curitiba, PR - 1998)

continua

MATRIZ ¹⁾	ESTADO	MUNICÍPIO	NP45d	NP11m	AM (cm)	DM (mm)
1	RS	Viamão	26	37	9,1	1,8
2	RS	Viamão	2	4	4,8	1,1
3	RS	Viamão	2	5	6,4	1,4
4	RS	Viamão	12	33	7,5	1,5
5	RS	Viamão	0	0	0,0	0,0
6	RS	Viamão	16	20	11,7	1,9
7	RS	Viamão	4	6	9,9	1,8
8	RS	Viamão	17	19	13,2	2,3
9	RS	Viamão	17	24	8,2	1,6
10	RS	Arroio do Conde	52	56	9,6	2,1
11	RS	Arroio do Conde	20	43	7,3	1,5
12	RS	Arroio do Conde	20	27	7,4	1,7
13	RS	Arroio do Conde	41	42	9,5	2,2
14	RS	Arroio do Conde	53	56	9,9	1,9
15	RS	Arroio do Conde	45	50	7,9	1,8
16	RS	Arroio do Conde	33	33	9,7	1,9
17	RS	Arroio do Conde	22	24	9,1	1,9
18	PR	Guarapuava	10	17	6,6	1,6
20	RS	Sananduva	0	0	0,0	0,0
21	PR	Piraquara	2	5	4,4	1,1
22	RS	Viamão	15	17	11,9	2,5
23	RS	Viamão	29	30	11,1	2,3
24	RS	Viamão	25	30	10,3	1,9
25	RS	Viamão	26	28	10,0	2,1
26	PR	Castro	5	7	8,5	1,9
27	PR	Castro	1	1	2,2	0,6
28	PR	Lapa	13	22	10,0	2,3
29	PR	Balsa Nova	2	3	5,5	1,4
30	SC	Campos Novos	28	28	10,3	2,0
31	SC	Campos Novos	18	29	8,9	2,0
32	SC	Campos Novos	9	9	10,2	2,1
33	SC	Campos Novos	23	25	9,6	2,3
34	SC	Campos Novos	24	33	9,1	2,0
35	SC	Campos Novos	9	10	12,2	2,4
36	RS	Viamão	22	29	9,8	2,0
37	PR	Bom Sucesso	9	4	2,4	0,7
38	RS	Viamão	34	41	9,2	1,9
39	RS	Viamão	12	13	11,9	2,4
40	RS	Viamão	17	19	11,3	2,3
41	RS	Viamão	4	6	8,9	1,8
42	PR	Guarapuava	14	15	8,4	1,6
43	PR	Laranjeiras do Sul	47	49	9,8	2,1
44	PR	Laranjeiras do Sul	32	36	10,2	2,2

APÊNDICE 9 - Desenvolvimento de mudas de espinheira-santa na fase de viveiro
(Escola de Florestas, UFPR, Curitiba, PR - 1998)

continuação

MATRIZ ¹⁾	ESTADO	MUNICÍPIO	NP45d	NP11m	AM (cm)	DM (mm)
45	PR	Laranjeiras do Sul	17	23	7,1	1,8
46	PR	Laranjeiras do Sul	8	20	6,1	1,4
47	PR	Laranjeiras do Sul	1	1	2,2	0,7
48	PR	Laranjeiras do Sul	6	7	12,6	2,3
49	SC	Campos Novos	23	26	9,1	2,0
50	SC	Campos Novos	0	0	0,0	0,0
51	SC	Campos Novos	23	31	8,7	1,8
52	SC	Campos Novos	23	24	9,7	2,0
53	SC	Campos Novos	30	34	9,7	2,2
54	PR	Castro	0	0	0,0	0,0
55	PR	Campina Grande do Sul	10	13	7,8	1,8
56	PR	Campina Grande do Sul	5	6	7,1	1,7
57	PR	Campina Grande do Sul	4	8	7,9	2,0
58	PR	Campina Grande do Sul	7	12	7,1	1,7
59	SC	Água Doce	21	40	8,3	1,7
60	SC	Água Doce	30	36	10,6	2,3
61	SC	Água Doce	6	13	3,7	0,8
62	SC	Água Doce	2	8	3,1	0,8
63	SC	Água Doce	12	19	9,3	1,8
64	SC	Água Doce	11	26	6,3	1,8
65	SC	Água Doce	18	29	6,9	1,7
66	SC	Água Doce	13	30	6,4	1,5
67	SC	Água Doce	21	27	9,4	2,2
68	SC	Água Doce	20	23	8,2	2,0
69	SC	Água Doce	31	31	10,4	2,6
70	SC	Água Doce	13	16	8,2	1,9
71	SC	Água Doce	35	41	8,5	1,8
72	SC	Água Doce	31	34	8,6	1,9
73	SC	Água Doce	19	32	8,0	1,8
74	SC	Água Doce	17	36	7,4	1,8
75	SC	Água Doce	25	29	8,1	2,0
78	SC	Água Doce	49	49	9,2	2,1
79	SC	Água Doce	9	18	6,2	1,4
80	SC	Água Doce	28	33	7,3	1,9
81	SC	Água Doce	16	21	6,9	2,0
82	PR	Araucária	13	30	5,4	1,3
83	PR	Araucária	20	36	7,2	1,6
84	PR	Araucária	5	13	5,2	1,4
85	PR	Araucária	16	31	6,1	1,6
86	PR	Araucária	1	14	5,1	1,2
87	PR	Araucária	4	19	6,7	1,5
88	PR	Araucária	3	8	4,8	1,1
89	PR	Araucária	21	40	7,1	1,5

APÊNDICE 9 - Desenvolvimento de mudas de espinheira-santa na fase de viveiro
(Escola de Florestas, UFPR, Curitiba, PR - 1998)

conclusão

MATRIZ ¹⁾	ESTADO	MUNICÍPIO	NP45d	NP11m	AM (cm)	DM (mm)
90	PR	Araucária	15	30	5,2	1,5
91	PR	Araucária	3	11	5,4	1,2
92	PR	Araucária	12	24	5,7	1,4
94	PR	Araucária	18	28	8,5	2,0
95	PR	Araucária	0	3	2,6	0,6
96	PR	Araucária	12	20	6,8	1,6
97	PR	Araucária	5	25	5,8	1,5
98	PR	Araucária	2	3	3,7	0,8
99	RS	Viamão	11	18	9,4	1,7
100	PR	Curitiba	5	9	7,2	1,7
101	PR	Marrecas	23	37	7,9	1,6
102	PR	Marrecas	13	19	8,3	1,8
104	PR	Marrecas	4	6	6,8	1,6
105	PR	Guarapuava	10	16	7,9	1,9

NOTAS: ¹⁾ Convenções utilizadas:

Matrizes incluídas só no teste de progênie em Ponta Grossa

Matrizes incluídas no teste de progênie em Ponta Grossa e em São José dos Pinhais

NP45d = número de plantas aos 45 dias; NP11m = número de plantas aos 11 meses;

AM = altura média aos 11 meses; e DM = diâmetro médio aos 11 meses.