

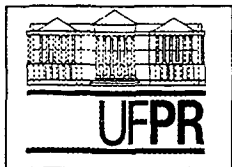
JULIANA VITÓRIA MESSIAS BITTENCOURT

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES  
NATURAIS DE *Maytenus ilicifolia* POR MEIO  
DE MARCADORES RAPD**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do título de Mestre em Agronomia -  
Área de concentração: Produção Vegetal - Curso  
de Pós-Graduação em Agronomia, Setor de  
Ciências Agrárias da Universidade Federal do  
Paraná.

Orientadora:  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin

CURITIBA  
2000



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
PRODUÇÃO VEGETAL

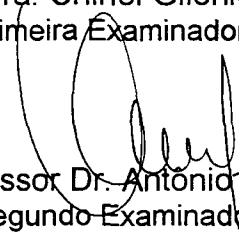
**PARECER**

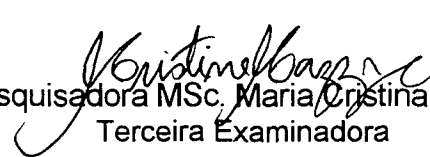
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a argüição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **JULIANA VITÓRIA MESSIAS BITTENCOURT**, sob o título “**Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Maytenus ilicifolia* por Meio de Marcadores RAPD**”, para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

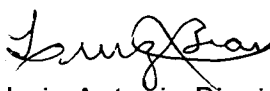
Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação.

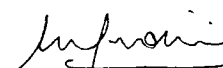
Curitiba, 14 de setembro de 2000.

  
Professora Dra. Chirlei Glienke de Blanco  
Primeira Examinadora

  
Professor Dr. Antonio Figa  
Segundo Examinador

  
Pesquisadora MSc. Maria Cristina Mazza  
Terceira Examinadora

  
Professor Dr. Luiz Antonio Biasi  
Quarto Examinador

  
Professora Dra. Marguerite Quoirin  
Presidente da Banca e Orientadora

## **OFEREÇO**

Aos meus pais Ivo e Irani, pelo amor e incentivo.

Por terem se DOADO, para que pudesse  
completar esta etapa.

Por sua vida, com todo meu amor,  
a FELIPE, irmão e amigo.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal da Universidade Federal do Paraná.

A *Embrapa Floresta* pela oportunidade do exercício científico e apoio para a realização deste trabalho.

A CAPES pelo suporte financeiro, na condição de Bolsa de Estudos.

A Prof. Dr. Marguerite Quoirin pela orientação, amizade e estímulo ao longo de meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

À Pesquisadora da *Embrapa Floresta* Maria Cristina Medeiros Mazza, co-orientadora e amiga, a qual com atenção, dedicação e confiança nos momentos difíceis mostrou-me o caminho da análise genômica para a conservação da biodiversidade.

À Eng. Agr<sup>o</sup> MSc. Maria Izabel Radomski, amiga e companheira, por toda sua atenção, dedicação e inestimável auxílio durante todas as fases deste trabalho.

Aos professores Dr. Raulindo Gardingo Junior (UEPG), Dra. Vânia Aparecida Vicente (UFPR), Dra. Chirlei Glienke de Blanco (UFPR), Dra. Sandra Milach (UFRGS), ao pesquisador Dr. Luis Estevan Pereira (IAPAR-Londrina) e Eng. Agr<sup>o</sup> MSc. Marianne C. Scheffer pelas contribuições, sugestões e auxílios prestados.

Ao Sr. Antonio J. Francheski Jr. (Lapa), a Reserva Indígena de Marrecas (Turvo) e Sr. Valdomiro Ramude (Guarapuava), por ceder as áreas para a coleta de material vegetal. Aos Eng. Agr<sup>o</sup>: Neuro (IAF), Walter (RURECO) e Emerson Oliveira (mestrando – UFPR) pelas informações e colaborações durante a coleta.

Aos funcionários da Biblioteca do Setor de Ciências Agrárias e *Embrapa Floresta*, pelos constantes auxílios prestados.

A todos os colegas e amigos da *Embrapa Floresta* pelo carinho, amizade e incentivo, em especial aos Laboratórios de Genética, Fisiologia e Solos.

Ao Eng. Fl. MSc. André Eduardo Biscaia de Lacerda, pelo interesse, atenção e companheirismo nos sonhos e ideais.

A todos aqueles que passaram deixando suas marcas e ensinamentos, sem os quais minha história não teria o mesmo sentido.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>03</b>
2.1 <i>Maytenus ilicifolia</i> (ESPINHEIRA-SANTA).....	03
2.2 RECURSOS GENÉTICOS.....	08
2.3 MARCADORES RAPD.....	14
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	20
3.1.1 Região da Lapa.....	20
3.1.2 Região de Guarapuava.....	22
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	24
3.2.1 Extração de DNA.....	24
3.2.2 Quantificação do DNA extraído.....	26
3.3 AMPLIFICAÇÃO AO ACASO DO POLIMORFISMO DO DNA RAPD.....	25
3.3.1 Eletroforese dos produtos de RAPD.....	29
3.4 ANÁLISE DA DISTÂNCIA GENÉTICA OBTIDA POR RAPD.....	29
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
4.1 EXTRAÇÃO DE DNA EM <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	31
4.2 RAPD NA DETECÇÃO DE VARIABILIDADE GENÉTICA.....	31
4.3 VARIABILIDADE INTERPOPULACIONAL.....	34
4.4 VARIABILIDADE INTRAPOPULACIONAL.....	38
4.4.1 População da Lapa.....	38
4.4.2 Região de Guarapuava.....	41
4.5 RECURSOS GENÉTICOS.....	44
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MOLÉCULAS BIOATIVAS ISOLADAS DE <i>Maytenus ilicifolia</i> , segundo FRANÇA e PEREIRA (1997).....	08
TABELA 2 - ESTUDOS DE RAPD EM PLANTAS: ESPÉCIES, AMOSTRAGEM, NÚMERO DE PRIMERS UTILIZADO, BANDAS GERADAS, PORCENTAGEM DE POLIMORFISMO, RAZÃO DE BANDAS POR PRIMERS E REFERÊNCIAS (adaptado de WOLF e LISTON, 1998).....	18
TABELA 3 - IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL COLETADO.....	21
TABELA 4 - COMPONENTES DO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO.....	25
TABELA 5 - COMPONENTES DO TAMPÃO (TE).....	26
TABELA 6 - COMPONENTES DO TBE 5X.....	26
TABELA 7 - COMPONENTES DO TAMPÃO DE CARREGAMENTO.....	27
TABELA 8 - LISTA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS COMO PRIMERS, SUAS RESPECTIVAS SEQÜÊNCIAS DE BASES, NÚMERO E TAMANHO DOS FRAGMENTOS A ESTES ASSOCIADOS.....	32

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - *Maytenus ilicifolia* – (A) PLANTA ADULTA; (B) ASPECTO DA MASSA FOLIAR; (C) APARÊNCIA FLORAL; (D) CARACTERÍSTICAS DAS FOLHAS, DA ESQUERDA PARA A DIREITA: 1 E 2, TOTALMENTE SOMBREADAS; 3 E 4, PARCIALMENTE SOMBREADAS E 5 E 6, SEM SOMBREAMENTO; (E) REBROTE; (F) RAMOS COM FRUTOS; (G) SEMENTES, FRUTOS APTOS A COLETA E FRUTIFICAÇÃO IMATURA.....04
- FIGURA 2 - ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA TOTAL DOS 71 INDIVÍDUOS DE *Maytenus ilicifolia* COM OS PRIMERS OPC19 (A) E OPF10 (B). AS AMOSTRAS ESTÃO ORDENADAS DA ESQUERDA PARA A DIREITA. A CANALETA “M” CORRESPONDE AO MARCADOR DE PESO MOLECULAR LADDER 1 pb.....33
- FIGURA 3 - DENDROGRAMA OBTIDO COM BASE NAS DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE OS INDIVÍDUOS DE *Maytenus ilicifolia*. OS GRUPAMENTOS 1, 2, 3 E 4 REPRESENTADOS RESPECTIVAMENTE PELAS CORES \* • • • E PARA DOIS INDIVÍDUOS ANÔMALOS NAS ANÁLISES.....35
- FIGURA 4 - GRUPAMENTOS OBTIDOS COM BASE NAS DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE OS INDIVÍDUOS DE *Maytenus ilicifolia*.....37
- FIGURA 5 - DENDROGRAMA OBTIDO COM BASE NAS DISTÂNCIAS GENÉTICAS UTILIZANDO O ÍNDICE DE JACCARD NOS INDIVÍDUOS DE *Maytenus ilicifolia* – LAPA (PR). OS GRUPAMENTOS 1 E 2 REPRESENTADOS RESPECTIVAMENTE PELAS CORES • E •.....39
- FIGURA 6 - TOPOSSEQUÊNCIA DA POPULAÇÃO DE *Maytenus ilicifolia* POPULAÇÃO DA LAPA (PR).....40

FIGURA 7 - DENDROGRAMA OBTIDO COM BASE NAS DISTÂNCIAS GENÉTICAS UTILIZANDO O ÍNDICE DE JACCARD NOS INDIVÍDUOS DE <i>Maytenus ilicifolia</i> – GUARAPUAVA (PR). OS GRUPOAMENTOS 3 E 4 REPRESENTADOS RESPECTIVAMENTE PELAS CORES • E •.....	41
FIGURA 8 - TOPOSSEQUENCIA DAS POPULAÇÕES DE <i>Maytenus ilicifolia</i> NA REGIÃO DE GUARAPUAVA, RESERVA INDÍGENA DE MARREAS (A) E COMUNIDADE DO JORDÃO (B).....	42



## RESUMO

*Maytenus ilicifolia* é um arbusto de ocorrência natural da Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária). Esta espécie tem uso popular em comunidades tradicionais e povos indígenas no Brasil. A fragmentação da Floresta com Araucária, nas últimas décadas, juntamente com a comprovação terapêutica em males gástricos e o uso em larga escala, causaram grande devastação de populações naturais de *Maytenus ilicifolia*, resultando na perda do complexo genético deste recurso medicinal. Há necessidade urgente de estudos para elaborar estratégias de conservação genética e domesticação deste germoplasma. O objetivo deste estudo foi determinar a variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio da análise do polimorfismo de DNA utilizando marcadores RAPD. Três populações foram estudadas, uma no município da Lapa e duas na região de Guarapuava. Estas áreas são distintas, tanto geologicamente quanto em relação a paisagem. Selecionou-se sete *primers* RAPD, os quais produziram 52 bandas em *Maytenus ilicifolia*, sendo 44 polimórficas. A análise da distância genética foi realizada pelo agrupamento das amostras segundo os princípios da taxonomia numérica, utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard. A partir das distâncias genéticas, montou-se um dendrograma, o qual separou o material estudado em quatro grupos distintos, dois para a região da Lapa e dois para Guarapuava. Os grupamentos formados estão arranjados de acordo com as características geológicas e classes de solos em que os indivíduos se encontram. A variabilidade genética das populações de Guarapuava, quando comparada a da Lapa, apresentou uma maior similaridade entre os grupos formados. Estratégias para conservação genética em *Maytenus ilicifolia* devem ser estruturadas de acordo com os parâmetros ecogeográficos locais, realizando a coleta em cada um dos compartimentos ambientais em que os indivíduos se encontram.

## ABSTRACT

*Maytenus ilicifolia* is a shrub with natural occurrence from Ombrophilous Mixed Forest (Araucaria Forest). This species is used by Brazilian indigenous and local people for stomachs illness. The fragmentation of the Araucaria Forest together with the therapeutic comprovation and use in large scale of *Maytenus ilicifolia* had caused big devastation of natural populations. This resulted in lost of genetic complex of this medicinal resources. It is urgent to elaborate strategies of genetic conservation and domestication of this germplasm. The goal of this study was to determine the genetic variability in natural populations of *Maytenus ilicifolia* through DNA polymorphism using RAPD markers. Three populations were studied, one in Lapa city and two in Guarapuava region. These areas have different geology and landscape characteristics. Seven RAPD *primers* were selected, which produced 52 markers in *Maytenus ilicifolia*. 44 of them were polymorphic. The genetic distance analysis was made by pair-group of the samples following the numerical taxonomy and using the similarity coefficient of Jaccard. With the genetic distance was made a dendrograme, which separated them in four main groups, two for the region of Lapa and two for Guarapuava. The groups were following the geological characteristics and soil groups where the plants were growing. The genetic variability of Guarapuava populations, when compared with Lapa, show as a large similarity among their groups. Strategies for genetic conservation of *Maytenus ilicifolia* should be desing following the local ecogeographic parameters, collecting samples in each environmental compartment.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas são uma importante fonte de substâncias bioativas, as quais há séculos são utilizadas pela sabedoria popular. Nas últimas décadas houve considerável crescimento do interesse popular, científico e comercial no uso de fitofármacos. Até meados deste século, a pesquisa de medicamentos foi baseada apenas em síntese química de novas substâncias e no estudo de sua atividade farmacológica. Porém, o interesse científico na busca de substâncias ativas do conhecimento popular, a partir de princípios vegetais, foi impulsionado devido a variabilidade e complexidade das moléculas sintetizadas por estes organismos.

As plantas da flora nativa utilizada na medicina tradicional representam alternativas de usos múltiplos para os ecossistemas tropicais e subtropicais, os quais têm sido depauperados. A excessiva fragmentação dos ecossistemas tem reduzido o tamanho efetivo das populações, concorrendo para a drástica redução da biodiversidade, acelerando o processo de extinção global de espécies.

No estabelecimento de cada população, as espécies fixam características que facilitam sua sobrevivência. Cada espécie viva corresponde a uma obra, genética e molecular, de uma grande biblioteca. Contudo, muitas dessas informações estão sendo destruídas sem ao menos terem sido conhecidas. O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo.

Várias espécies brasileiras estão sendo intensamente exploradas, de forma predatória, comprometendo inclusive sua própria existência. No estado do Paraná, *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) está em vias de extinção, em razão do extrativismo desenfreado. Alguns trabalhos estão sendo desenvolvidos sobre a auto-ecologia desta espécie. Entretanto, até o momento, não há informação sobre a estrutura genética das populações remanescentes.

Portanto, o conhecimento da diversidade genética nesta espécie poderá contribuir para a definição de estratégias de conservação e domesticação deste recurso.

Embora a conservação seja preocupação mundial nas últimas décadas, um alto nível de erosão genética vem ocorrendo na natureza e nos bancos de germoplasma. Porém, as novas tecnologias tornam disponíveis ferramentas que detectam o polimorfismo diretamente do genoma. Dentre as técnicas moleculares para análise do DNA (*desoxyribonucleic acid*), o RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) utiliza iniciadores (*primers*) aleatórios para amplificar regiões e assim revelar o polimorfismo entre indivíduos, ou seja, não necessita de conhecimentos prévios sobre a genética dos organismos em estudo.

O objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia*, por meio da análise do polimorfismo de DNA utilizando marcadores RAPD.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Maytenus ilicifolia* (ESPINHEIRA-SANTA)

De acordo com o sistema de CRONQUIST (1981), a taxonomia de *M. ilicifolia* obedece à seguinte hierarquia:

**Classe:** MAGNOLIOPSIDA

**Ordem:** CELASTRALES

**Família:** CELASTRACEAE

**Espécie:** *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss

**Sinonímias populares:** Espinheira-santa, cancerosa, cancorosa, cancorosa-de-sete-espinhos, cancorosa, coromilho do campo, erva-cancerosa, espinha-divina, espinho-de-deus, limãozinho, maiteno, marteno, pau-josé, salva-vidas, sombra-de-touro.

CARVALHO-OKANO (1992) descreve *Maytenus ilicifolia* como um sub-arbusto ou árvore, ramificado desde a base, podendo medir 5,0 m de altura, com ramos novos glabros angulosos, tetra ou multicarenados. As folhas são congestas, coriáceas, glabras, com estípulas inconspícuas, limbo com 2,2 - 8,9 cm de comprimento e 1,1 - 3,0 cm de largura, as nervuras são proeminentes na face abaxial, de forma elíptica, com a margem inteira ou com espinhos em número de 1 a vários, distribuídos regular ou irregularmente no bordo, geralmente concentrados na metade apical de um ou de ambos os semilimbos. As inflorescências ocorrem em fascículos multifloros. As flores possuem sépalas semi circulares e ciliadas, com pétalas ovais e inteiras, estames com filetes achatados na base, estigma capitado, séssil ou com estilete distinto, ovário saliente ou totalmente imerso no disco carnosos. O fruto é uma cápsula bivalvar, orbicular; com pericarpo maduro de coloração vermelho-alaranjada (Figura 1). As

flores são monóclinas, porém há evidências fortes de que muitas de suas flores sejam funcionalmente diclinas.

Uma das formas de caracterizar corretamente *M. ilicifolia* dentre as demais *Maytenus* é pela anatomia de suas folhas, a qual apresenta as três camadas de parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e estômatos na face inferior da folha abaixo da epiderme (BERNARDI e WASICKY, 1959; FRANCO, 1990; IWASAKI, 1999).

Quando *M. ilicifolia* desenvolve-se em local exposto ao sol, suas folhas apresentam características diferenciadas, sendo estas menores (Figura 1) e com espinhos nas margens em número reduzido. Em plantas crescidas à sombra, suas folhas são maiores e com maior número de espinhos. Esta característica foi relatada por BERNARDI e WASICKI (1959). Em levantamentos sobre fatores ambientais responsáveis pelas diferenças químicas observadas em folhas e ramos, RADOMSKI (1998) afirma ser a luminosidade o principal deles.

O gênero *Maytenus* é pantropical, altamente diversificado (255 espécies) e concentra o maior número de espécies na América do Sul (WILLIS, 1981). O Brasil conta com 77 espécies, das quais 43 situam-se no Brasil extra-amazônico, sendo apenas 6 exclusivas ou mais abundantes da região sub-tropical. *Maytenus ilicifolia* predomina nos estados da região Sul do Brasil, e nos países vizinhos, Paraguai, Uruguai e leste da Argentina (CARVALHO – OKANO, 1992).

Observa-se, predominantemente, *Maytenus ilicifolia* no sub-bosque de remanescentes da Floresta Ombrófila Mista, restringindo-se muitas vezes a ambientes ciliares, e nos agrupamentos arbóreos (capões) na região de predomínio das Estepes (KLEIN, 1968; ITCF, 1985; CERVI et al., 1989). Sua ocorrência na Floresta Ombrófila Densa parece estar restrita às porções superiores da Serra do Mar (KLEIN, 1968; TABARELLI et al., 1993).

Em áreas propícias ao seu desenvolvimento, constatou tratar-se de uma planta seletiva esciófila, desenvolvendo bem sob luz difusa, no interior dos sub-bosques, onde a floresta não

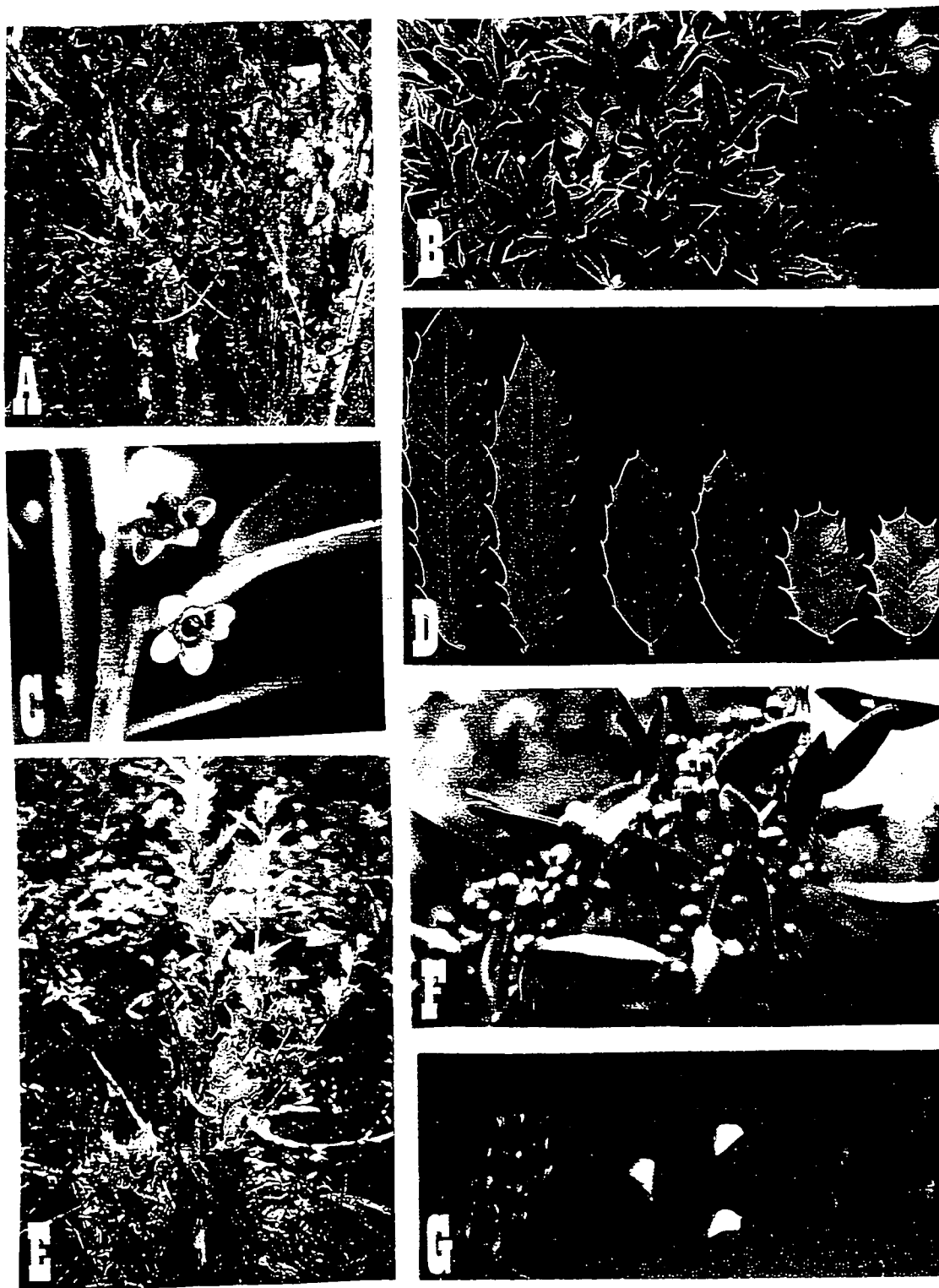


FIGURA 1 - *Maytenus ilicifolia* - (A) PLANTA ADULTA; (B) ASPECTO DA MASSA FOLIAR; (C) APARÊNCIA FLORAL; (D) CARACTERÍSTICAS DAS FOLHAS, DA ESQUERDA PARA A DIREITA: 1 E 2, TOTALMENTE SOMBREADAS; 3 E 4, PARCIALMENTE SOMBREADAS E 5 E 6, SEM SOMBREAMENTO; (E) REBROTE; (F) RAMOS COM FRUTOS; (G) SEMENTES, FRUTOS APTOS A COLETA E FRUTIFICAÇÃO IMATURA.

é muito densa. Ocorre também a pleno sol. É uma planta seletiva higrófila, sendo assim, prefere solos úmidos em ambientes ciliares (ROSA, 1994).

Plantas que crescem diretamente sob a luz solar acumulam maiores teores de taninos do que aquelas sob sombra. Sob sombra, as plantas acumulam maiores teores de nitrogênio, potássio, boro e silício (RADOMSKI, 1998). O excesso de radiação solar retarda o crescimento da planta e as folhas tornam-se um pouco pálidas (CORREA JÚNIOR et al., 1991).

A espinheira-santa floresce a partir do início da primavera e continua florescendo durante todo o verão. A frutificação ocorre nos meses de novembro, dezembro e janeiro, iniciando-se no estado do Rio Grande do sul, depois em Santa Catarina e por fim no Paraná (SCHEFFER et al., 1999).

As observações de SCHEFFER et al. (1999) destacam: “as condições do tempo por ocasião da frutificação dificultam uma coleta adequada de sementes; os frutos concentram-se nos ramos do ano anterior. Embora as sementes devam ser colhidas quando as cápsulas estão abertas, expondo o arilo brando que as envolve, também é possível obter sementes com boa capacidade de germinação, de frutos coletados fechados; há uma grande variação no tamanho das sementes, caracterizado pelo peso médio, porém não verificou-se correlação com a capacidade de germinação ou vigor das mudas”.

Protocolos para a clonagem de *Maytenus ilicifolia* foram estabelecidos por PEREIRA (1998), viabilizando a produção de mudas em larga escala, evitando a extinção de germoplasma e assegurando o suprimento contínuo de material vegetal padronizado para a produção de fitoterápicos.

A primeira colheita deve ser feita aos 18 meses do plantio e depois a cada seis meses, quando a planta não está vegetando ou florindo. Na colheita, as plantas são podadas,



tomando-se o cuidado para que o corte seja preciso, sem lascas os galhos e deixando-se 50% das folhas para permitir uma melhor rebrota (MONTANARI, 1999).

Vários gêneros dentro da família Celastraceae, e um grande número de espécies de *Maytenus*, tem sido estudados fitoquimicamente nos últimos vinte anos. LIMA et al. (1969) mostraram a presença de substâncias denominadas de maitenina e pristimerina no extrato benzênico de raízes de *Maytenus ilicifolia* Mart. Uma revisão mais recente feita por FRANÇA e PEREIRA (1997) reuniu as moléculas bioativas isoladas da espécie, as quais estão representadas na Tabela 1.

As propriedades medicinais de *M. ilicifolia* para males gástricos foram comprovadas por pesquisas coordenadas pela CEME (Central de Medicamentos) – Ministério da Saúde, sendo que as dosagens para o emprego na forma de chá foram descritas por CARLINI et al. (1988).

A demanda por espinheira-santa é crescente. Extrativistas, produtores e firmas distribuidoras afirmam que não comercializam maior quantidade desta planta, por que não há uma maior oferta do produto. Talvez esta falta de matéria-prima explique a presença de folhas secas de outras espécies como *Sorocea bonplandii*, *Pachystroma iliscifolium* e *Zollernia sp.* vendidas como sendo *Maytenus ilicifolia*. A espinheira-santa pode ser comercializada de duas formas: o chamado tipo misto, em que o produto é vendido com os galhos, e a chamada pura, composta apenas por folhas (MONTANARI, 1999).

A espinheira-santa está em via de extinção no estado do Paraná (SEMA, 1995; CREA 1999), em razão do extrativismo predatório. Para reverter esta situação, as pesquisas têm atuado em duas frentes: com a conservação e manejo sustentado em ambiente natural e com o cultivo em sistemas agrossilviculturais (CREA, 1999). Para evitar o extrativismo predatório, que põe os vegetais em risco de extinção (erosão genética), é preciso domesticar e cultivar as espécies.

TABELA 1 - MOLÉCULAS BIOATIVAS ISOLADAS DE *Maytenus ilicifolia*, segundo FRANÇA e PEREIRA (1997).

Princípios ativos	Atividades	Referências
Maitansina (ansamacrolídeo)	Antitumor	Fox, B. W. (1991)
Cangoroninas A-J	Citotóxica	Itakawa et al. (1991)
Ilicifoliana (triterpenos tipo friedelano)	Citotóxica	Itakawa et al. (1991)
4- O-metilepigalocatequina (taninos)	Antiúlcera gástrica	Oliveira et al. (1991)
Triterpenos quinídes	Citotóxica	Shiota et al. (1994)
Flavonóides	Citotóxica	Silva et al. (1991)

Um dos aspectos de maior relevância para a sustentabilidade para produção das plantas medicinais, quando manejadas, é a manutenção da diversidade genética existente. Este raciocínio se torna crucial em espécies arbóreas, pois estarão sujeitas por um longo período às diferentes condições ambientais (LIBBY, 1991). Informação sobre diversidade e distribuição de genes dentro de espécies e suas populações locais é essencial para o manejo e conservação dos recursos genéticos medicinais, mas tais informações são muito limitadas ou inexistentes para a maioria das espécies tropicais (FAO, 1993).

## 2.2 RECURSOS GENÉTICOS

Durante as últimas décadas, notou-se a crescente preocupação com a conservação dos recursos genéticos vegetais. Entretanto, os trabalhos nesta abordagem são incipientes, ressaltando-se somente algumas estruturações nacionais ou internacionais para a conservação de espécies, principalmente em culturas agrícolas ou culturas com interesse industrial, como: café, cacau, seringueira, algodão, tabaco, cana-de-açúcar, bem como as forrageiras, ou ainda espécies arbóreas para indústria papelreira. Em ações isoladas encontra-se o estudo de plantas

medicinais, alguns cultivos indígenas, ornamentais e de espécies agroflorestais (HEYWOOD, 1991).

Remanescentes florestais e ecossistemas, especialmente nos trópicos, estão destinados a desaparecer pela conversão destas áreas para outros usos, quando se verifica a proporção assumida nos últimos anos. LIBBY (1991) afirma que a intervenção antrópica é negativa. Portanto, chama-se a atenção para esforços na conservação de espécies nativas concentrando-se em coleções de germoplasma não domesticado, especialmente para espécies ameaçadas de extinção ou em perigo, e com ênfase em espécies de valor econômico ou potencial. HEYWOOD (1991), sob este prisma, destaca as plantas medicinais. Este mesmo autor ressalta que mais de 25.000 espécies medicinais tem sido utilizadas pela humanidade. ELISABETSKY (1991) indica que a maior parte da flora medicinal, quimicamente desconhecida e utilizada em medicina tradicional, está localizada em países em desenvolvimento.

Comissões da FAO em Recursos Genéticos e algumas ONGs estão preocupadas com os direitos de propriedade intelectual (“Farmer’s right”), na exploração destes germoplasmas, os quais resultam das contribuições do conhecimento popular e indígena, “o qual funcionaria como uma analogia à proteção de cultivares, pois retornariam royalties para os produtores” (DAY, 1991; COELHO, 1999).

Recursos genéticos podem ser definidos sob diferentes óticas, porém uma das formas mais concisas e diretas foi proposta pela FAO (1984), onde recursos genéticos são os recursos de “valor econômico, científico ou social do material hereditário contido dentro e entre espécies”. Neste sentido, a biodiversidade pode ser considerada como a somatória da variação de genes, espécies e ecossistemas que ocorrem na natureza (McNEELY et al., 1990), que se vê refletida no número de diferentes espécies, em diferentes combinações de espécies e nas diferentes combinações de genes dentro de cada espécie (IPGRI, 1993).

Portanto, existe uma importante diferença entre a conservação da natureza e a conservação genética, como coloca FRANKEL e SOULE (1981). A conservação da natureza visa proteger áreas que representam habitats e comunidades que podem ser identificados. A conservação genética vai além, pois se preocupa com diferenças genéticas no material conservado. Sob este ponto de vista, BARNES et al. (1998) apontam a necessidade dos estudos envolvendo biodiversidade serem realizados seguindo a genética ecológica, a qual considera a variação genética das espécies e suas propriedades adaptativas com relação ao ambiente em que estão inseridas.

A preocupação com a conservação dos recursos requer conhecimento de como estes se encontram distribuídos na natureza. WILLIAMS (1991) divide os recursos genéticos florestais, nos trópicos, em populações silvestres em ambientes naturais, usualmente nas florestas ou algumas populações adaptadas a maiores ecozonas, e os materiais cultivados primitivamente associados ao campesinato. Cada população representa uma fonte genética de variação e diversidade com a adaptação a novos ambientes, portanto, material com potencialidades para melhoramento, uso e conservação.

Este mesmo autor enfatiza que espécies, no espaço, podem ocupar vastas áreas geográficas contínuas, apresentando uniformidade morfológica em cada maciço, ou podem diferenciar-se para raças, como no caso de algumas espécies. Outras, porém, têm distribuição restrita, localizada e/ou espacialmente distribuída com baixa densidade. KLEIN (1990) caracteriza uma diferença marcante entre espécies raras, aquelas que, devido ao processo evolutivo, ainda se encontram numa fase de expansão ou de isolamento geográfico e aquelas que, atualmente, tornam-se raras por estarem ameaçadas pela ação antrópica.

Domesticação de plantas é um processo co-evolucionário pelo qual a seleção humana seleciona fenótipos, manejando e/ou cultivando-os, induzindo trocas genéticas na população, a qual torna-se melhor adaptada à intervenção humana (CLEMENT, 1999). Porém, a

domesticação de paisagens, segundo o mesmo autor, é um processo pelo qual a ação antrópica causa a mudança ecológica e demográfica de plantas e animais.

Os estudos de auto-ecologia, direcionados principalmente para a enumeração de estratégias relacionadas com a área de distribuição geográfica e do habitat preferencial, indicam as espécies características e não características de cada tipologia, ou ainda, a exclusividade dentro destas. Desta maneira, é indicado o tipo de macro vegetação e/ou ambiente necessário para manter cada uma das espécies raras ou ameaçadas de extinção. Além disso, há ainda uma caracterização mais refinada que detalha o ambiente mais típico para a sobrevivência das populações, distinguindo as como endêmicas, seletivas para vegetações com caracterização de clímax climático ou seletivo para ambientes de clímax edáfico (REIS, 1993).

O conhecimento da estrutura genética das populações naturais oferece evidências da atuação dos diversos fatores ambientais sobre a dinâmica dessas populações, considerada como totalidade das relações ecológicas e genéticas entre indivíduos (JAIN, 1979).

Evolução pode ser definida como as trocas genéticas que acontecem entre os indivíduos de uma população no curso de sucessivas gerações, ou simplesmente troca da frequência alélica (BARNES et al., 1998). SOLBRIDG (1980) relata sobre evolução de populações, a qual ocorre por mudanças em sua constituição genética, isto é, pelas alterações na frequência dos alelos e genótipos. Assim sendo, o polimorfismo genético, em populações naturais, é o produto de várias forças evolutivas ao longo da história dessas populações.

A variabilidade é a mais importante consequência da evolução da meiose e diploidia, constituindo-se em um dos fatores chaves da evolução dos eucariotos. A presença de variabilidade genética dentro da espécie é que possibilita esta se adaptar às mudanças ambientais. Estudos de variação genética em populações naturais são importantes para

identificar os processos que causam as trocas microevolucionárias (ARNOLD e EMMS, 1998).

A variabilidade genética surge como resultado da atuação de várias forças como a mutação, a recombinação e o fluxo gênico. As frequências alélicas podem ser alteradas pela seleção natural e pela deriva genética. Enquanto a mutação, a recombinação e a deriva genética são processos casuais e independentes com respeito à adaptação, a seleção natural é um processo adaptativo direcional de mudança evolutiva (MARCON, 1988; BARNES et al., 1998).

No caso de espécies com pequenas populações, reprodução vegetativa e dispersão limitada de pólen e sementes, seria esperada relativamente pequena variação dentro da população e relativamente mais variação entre populações (HAMRICK, 1983).

Embora a conservação da diversidade genética tenha sido uma preocupação mundial durante as últimas décadas, os elevados níveis de erosão genética que vem ocorrendo na natureza e nos bancos de germoplasma e, ao mesmo tempo, o potencial oferecido pelas modernas tecnologias, apresentam um cenário com potencial de oferecer retornos sócio-econômicos para a sociedade, porém com uma série de barreiras que necessitam ser superadas tanto para conservar adequadamente, como para utilizar a variação genética existente (VILELA-MORALES et al., 1997). Estes autores indicam que programas de recursos genéticos não devem ser ações isoladas e reativas, mas ao contrário, devem ser estruturados para torná-los pró-ativos e intimamente integrados com os programas científicos e tecnológicos de interesse nacional, principalmente com aqueles relacionados com o melhoramento genético e a conservação ambiental. Esta situação é claramente identificada pela forte demanda por coleções estruturadas de germoplasma, onde seja possível, de forma rápida e organizada recuperar caracteres qualitativos e quantitativos.

Numerosos estudos têm sido feitos, relatando níveis de variação genética dentro e entre populações de plantas e animais. Estes estudos envolvem a aplicação de técnicas bioquímicas, principalmente a eletroforese de isoenzimas, e mais recentemente, análises de DNA. A maioria das informações sobre genética de populações está centrada na distribuição da variabilidade genética, locus de isoenzimas em particular. Entretanto, apesar da importância da eletroforese de isoenzimas nos estudos da variabilidade genética, os métodos de biologia molecular permitem detectar o polimorfismo diretamente na molécula de DNA. Análises do DNA detectam qualquer alteração mutacional (mutações pontuais, inserções, deleções e rearranjos), em regiões codificadoras e não codificadoras do genoma (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). Estas pesquisas são escassas para culturas arbóreas, e os estudos já realizados indicam que a maioria das espécies contém considerável variação dentro de populações (WILLIAMS, 1991).

As estratégias de conservação deveriam enfatizar as espécies que não podem ser conservadas *ex situ* devido ao comportamento recalcitrante das sementes. Portanto, uma estratégia global precisa ser desenvolvida com a utilização de reservas extrativistas para uma conservação apropriada. A estrutura genética de uma população de plantas resulta da interação entre o sistema de cruzamento, fluxo gênico e seleção. Em essência, é preciso: primeiro, em bases amplas, correlacionar as espécies, utilizando parâmetros ecogeográficos, e conseqüente, pormenorizar os estudos de acordo com os ambientes locais (WILLIAMS, 1991).

ENGELS et al. (1995) enumeram as razões principais para se coletar germoplasma de um dado *pool* gênico em uma dada área. São elas: (1) o germoplasma está em perigo de erosão genética ou mesmo de extinção; (2) a necessidade do germoplasma é claramente expressa por usuários em nível nacional ou internacional; (3) a diversidade que o germoplasma representa está sendo perdida, ou insuficientemente representada nas coleções

*ex situ* de germoplasma existentes; (4) o conhecimento sobre o germoplasma deve ser ampliado.

Para espécies arbóreas tropicais, o futuro da conservação genética está concentrado na conservação em ecossistema, *in situ*. Entretanto, mais do que dimensionar a área de reserva com o número máximo de espécies, deve-se objetivar populações alvos de uma espécie. O fato de que espécies úteis estão presentes não significa que a diversidade genética é necessariamente de alta utilidade. Além disso, a seleção de microambientes é determinante para definir padrões de variação em populações (ALLARD et al., 1972; BRADSHAW, 1984) e não pode ser confundida com o amplo padrão de diferenciação ecogeográfico. O interesse corrente em dados de autocorrelação espacial de populações isoladas não deveria desprezar a necessidade de procedimentos para o monitoramento da variação genética global, como um total de variância, por meio de uma gama de populações (EPPERSON, 1990). Neste sentido, a contribuição de geneticistas no planejamento ou manejo da regeneração natural de florestas é ressaltado por LIBBY (1991).

A disponibilidade de modernas tecnologias para atender o manejo de recursos genéticos das regiões tropicais e subtropicais ainda parece ser bastante precária. No intuito de organizar as atividades de pesquisa e tecnologia para recursos genéticos, deve-se considerar que o principal objetivo de um sistema de recursos genéticos não deve estar unicamente direcionado para conservar germoplasma, mas também apresentar um forte componente para estimular sua utilização racional (VILELA-MORALES et al., 1997).

### 2.3 MARCADORES RAPD - *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA*

Um dos objetivos da biologia é a descrição, classificação e manejo da diversidade. De uma forma ou outra esta questão invade a ciência biológica desde o ecossistema até chegar à população. Diversidade tem um papel central na genética. Uma ampla variedade de métodos



são usado na avaliação genética. Esta gama abrange desde várias avaliações fenotípicas até sofisticadas técnicas moleculares. Nos últimos vinte anos tem sido desenvolvido um notável número de técnicas moleculares que permitem a resolução de diferenças genéticas entre indivíduos com a diferença de um nucleotídeo na molécula de DNA (CLEGG, 1991).

O passo chave na análise de fragmentos de DNA de plantas é a purificação de quantidades suficientes de DNA de boa qualidade (KIDWELL e OSBORN, 1992). Tecidos maduros de muitas espécies de plantas contêm metabólitos secundários, os quais podem interferir nos procedimentos de extração de DNA. Estes compostos, freqüentemente, estão ausentes ou se encontram em baixas concentrações em folhas jovens, em sementes e pólen (MITTON et al., 1979). Entretanto, quando se trabalha com espécies arbóreas em populações naturais, nem sempre se tem acesso a tais tecidos, estando-se restrito a determinado estágio reprodutivo da árvore ou maturidade da folha.

Espécies arbóreas tropicais produzem quantidades significativas de polissacarídeos e de metabólitos secundários. Os protocolos atuais foram desenvolvidos principalmente para espécies cultivadas. Portanto, quando aplicados em espécies florestais nativas, não produzem quantidade e qualidade de DNA suficientes para utilização em PCR (KIDWELL e OSBORN, 1992).

SAMBROOK et al. (1989) descrevem a reação da polimerização em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), como amplificação e síntese enzimática, de um segmento específico do genoma localizado entre duas regiões de seqüência conhecida. Os dois oligonucleotídeos são utilizados como *primers* para uma série de reações para síntese *in vitro* de milhões de cópias, as quais são catalisadas por uma DNA polimerase. Os oligonucleotídeos são compostos de diferentes seqüências, as quais são complementares e em sentidos opostos dos *templates* (moldes) de DNA e flanqueiam o segmento de DNA que será amplificado. O *template* de DNA é primeiro desnaturado por aquecimento na presença de um excesso dos

dois oligonucleotídeos e as quatro dNTPs ( bases que compõem o DNA). A reação é então resfriada, a uma temperatura que permite o anelamento dos *primers* nas seqüências alvos, depois de anelados os fragmentos são estendidos com a DNA polimerase. O ciclo (desnaturação, anelamento e síntese de DNA) é, então, repetido muitas vezes. Devido aos produtos de uma amplificação servirem como *template* para a próxima, cada ciclo sucessivo essencialmente duplica a quantidade de produto de DNA desejado.

Quando a distância entre os sítios de pareamento varia em indivíduos diferentes, o padrão das bandas geradas por PCR também varia, revelando polimorfismo essencialmente genético (SAIKI et al., 1985).

A PCR é uma técnica bastante versátil porque vários tipos de *primers* podem ser utilizados, dependendo do objetivo do estudo. Inúmeras derivações surgiram a partir da descoberta do PCR. Uma destas é a técnica de amplificação do polimorfismo de DNA ao acaso, ou RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), que envolve a amplificação simultânea de vários loci anônimos no genoma, utilizando *primers* de seqüência arbitrária para iniciar a reação de amplificação. Esta técnica foi desenvolvida, recentemente, por dois grupos independentes. WILLIAMS et al. (1990) patentearam a tecnologia com o nome de RAPD, enquanto Welsh e McClelland por sua vez, denominaram a técnica de AP-PCR (*Arbitrarily Primed – Polymerase Chain Reaction*), uma vez que os *primers* possuem seqüência arbitrária, mas as amplificações tecnicamente não são ao acaso e sim em segmentos específicos do genoma (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

Os *primers* utilizados normalmente tem 10 pb (pares de base) de comprimento contendo ao menos 50% de GC (guanina e citosina). Diferenciando-se da reação de PCR, no RAPD um único *primer* é utilizado na amplificação. Dois sítios de ligação com a orientação desejada entre uma distância limite, tipicamente menor que 3000 pb, precisam existir no DNA genômico para que ocorra a amplificação com sucesso. Produtos da amplificação são

visualizados por meio da separação em gel de agarose e posteriormente corados com brometo de etídeo (WILLIAMS et al., 1990; WHITKUS et al., 1994). Os polimorfismos são reconhecidos pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência deste mesmo fragmento em um outro genótipo (WILLIAMS et al., 1990).

Sendo o RAPD baseado em utilização de iniciadores aleatórios, pode ser aplicado a qualquer organismo, sem a necessidade de conhecimento prévio da seqüência do DNA a ser analisado (VASCONCELOS, 1995; WOLFE e LISTON, 1998). Devido a sua simplicidade e rapidez, os marcadores RAPD têm sido extensivamente utilizados em análises genéticas.

O principal inconveniente dos marcadores RAPD reside no fato de tratar-se de marcadores dominantes que não mostram o estado heterozigoto: os indivíduos contendo duas cópias de um dado alelo não são distinguíveis daqueles que contêm somente uma cópia do alelo (WILLIAMS et al., 1990; MICHELMORE et al., 1991). Não somente inerente ao RAPD, mas também com às técnicas que utilizam o PCR, há a possibilidade da sensibilidade dos fatores componentes da reação, tais como: concentração de *primers*, substrato e presença de impurezas restantes do processo de purificação de DNA. Neste sentido WHITKUS et al. (1994) ressalta a necessidade um controle rigoroso das condições experimentais para se obter resultados reproduzíveis.

Porém, o mesmo autor citado acima aponta as principais vantagens do uso destes marcadores, dentre elas: menor trabalho de laboratório com custos inferiores, quando comparados a métodos de hibridização; não exige a construção de bibliotecas genômicas; requer pequenas quantidades de DNA (poucos nanogramas); possibilidade de gerar um número ilimitado de marcadores. Além disso, os dados preliminares obtidos com RAPD demonstram alto nível de polimorfismo mesmo entre ou dentro de espécies.

FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1995) relatam que, desde sua descrição, o uso de marcadores RAPD na análise genética e no melhoramento de plantas tem sido de difusão

extremamente rápida. As suas aplicações incluem: a obtenção de *fingerprints* genômicos de indivíduos, variedades e populações; a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações melhoradas e banco de germoplasma; o estabelecimento de relações filogenéticas entre diferentes espécies ou populações; a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e localização de genes de interesse econômico.

WOLFE e LISTON (1998) realizaram uma revisão sobre a contribuição de métodos baseados em PCR para sistemática e biologia evolucionária de plantas. Enfocando somente RAPD, estes autores citam centenas de estudos, dentre estes os estudos representativos intraespecíficos encontram-se na Tabela 2.

Recentemente, tem aumentado o interesse pelos marcadores RAPD na análise da variabilidade de populações. Inclusive, estudos comparativos de outros marcadores moleculares demonstraram validade e confiabilidade para a determinação de parâmetros genéticos de populações (GAUER, 1999). Enfoques microevolucionários podem ser realizados através dos estudos com marcadores RAPD, como indicam ARNOLD e EMMS (1998).

TABELA 2 - ESTUDOS DE RAPD EM PLANTAS: ESPÉCIES, AMOSTRAGEM, NÚMERO DE PRIMERS UTILIZADO, BANDAS GERADAS, PORCENTAGEM DE POLIMORFISMO, RAZÃO DE BANDAS POR PRIMERS E REFERÊNCIAS (adaptado de WOLF e LISTON, 1998).

Táxon	Amostras *	Número de primers	Bandas avaliadas	% de polimorfismo	Bandas / primer	Referências
Apiaceae: <i>Apium graveolens</i>	23 cvs.	228	309	9.3	1,0	Yang e Quiros, 1993
Asteraceae: <i>Microseris bigelovii</i>	13 pops.	22	194	77	6,8	Van Heusden e Bachmann, 1992c
Asteraceae: <i>Microseris elegans</i>	10 pops.	17	134	83	6,5	Van Heusden e Bachmann, 1992b
Asteraceae: <i>Microseris pygmaea</i>	10 pops.	24	208	56	4,8	Van Heusden e Bachmann, 1992a

Continua

Continuação

Táxon	Amostras	Número de primers	Bandas avaliadas	% de polimorfismo	Bandas / primer	Referências
Brassicaceae: <i>Brassica juncea</i>	23 accs.	34	595	84	14,7	Jain et al., 1994
Brassicaceae: <i>Capsella bursa-pastoris</i>	21 pops.	7	180		25,7	Neuffer, 1996
Fabaceae: <i>Cajanus cajan</i>	10 cvs.	16	127	Ns	7,9	Ratnaparkhe et al., 1995
Fabaceae: <i>Gliciridia sepium</i>	10 accs.	9	63	61	7,0	Chalmers et al., 1992
Liliaceae: <i>Allium aaseae</i> (8), <i>A. simillimum</i> (6)	2 spp. 14 pops.	12	65	76	5,4	Smith e Pham, 1996
Myrtaceae: <i>Eucalyptus globules</i>	4 subsps. 37 pops.	10	162	92	14,9	Nesbitt et al., 1995
Oleaceae: <i>Olea europaea</i>	17 cvs.	17	47		2,8	Fabbri et al., 1995
Pinaceae: <i>Abies alba</i> (3), <i>A. nebrodensis</i> (1)	2 spp. 4 pops.	12	84	65	4,6	Vicario et al., 1995
Poaceae: <i>Avena sterilis</i>	24 acc.	21	177	65	5,5	Heun et al., 1994
Poaceae: <i>Buchloe dactyloides</i>	4 pops.	7	98	100	14	Huff et al., 1993
Poaceae: <i>Hordeum spontaneum</i>	10 pops.	10	152	24	3,6	Dawson et al., 1993
Poaceae: <i>Sorghum bicolor</i>	36 accs.	29	262	55	5,0	Tao et al., 1993
Poaceae: <i>Triticum aestivum</i>	15 cvs.	32	109	65	2,2	Joshi et al., 1993
Solanaceae: <i>Lycopersicon esculentum</i> (46), <i>L. cheemanii</i> (2)	2 spp. 48 accs.	24	215	37	3,3	Williams e St. Clair, 1993
Solanaceae: <i>Solanum melongena</i>	52 cvs.	22	130	55	3,3	Karihaloo et al., 1995
Sterculiaceae: <i>Theobroma cacao</i>	25 accs.	9	75	80	6,7	Russel et al., 1993
Sterculiaceae: <i>Theobroma cacao</i>	41 accs.	24	105	30	1,3	De la Cruz et al., 1995
Theaceae: <i>Camellia sinensis</i>	38 clones	21	253	62	7,5	Wachira et al., 1995

\* cvs: cultivares; pops: populações; accs: acessos; spp: espécies; subsps: subespécies.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado neste estudo perfaz um total de 71 plantas, caracterizadas na Tabela 3, provenientes de duas regiões geologicamente distintas, Lapa e Guarapuava.

Ambas as regiões tiveram o processo de colonização iniciado no tropeirismo (início do século XIX), sofreram atividade ervateira exploratória e posterior uso da terra com agricultura iniciada por imigrantes no final do século XIX. Como característica de ocupação das terras, as áreas mais exploradas, inicialmente, eram os topos de morros aplainados, com solos profundos e encostas menos íngremes (no caso da região da Lapa). Em Guarapuava, em função do relevo plano, os campos nativos foram transformados em pastagem ou campos para a agricultura. As áreas de floresta contínua (com exceção dos capões em áreas de solos rasos e alta declividade) sobre solos profundos e relevo mais suave também foram sendo sistematicamente substituídas por lavouras ou pastagens (RADOMSKI, 1998).

##### 3.1.1 Região da Lapa – Amostras de L01 a L30

A área desta população localiza-se no município da Lapa, ainda sobre a região fisiográfica do primeiro planalto paranaense. A altitude média é de 907 metros, latitude 25° 46' 02'' Sul e longitude 49° 43' 10'' Oeste. Apresenta clima subtropical úmido mesomérico, verões quentes com tendência de concentração de chuvas (temperatura média superior a 22° C), inverno com geadas pouco frequentes (temperatura média inferior a 18° C), sem estação de seca definida.

O acesso à área de coleta se faz pela Rodovia do Xisto (PR-476), sentido Curitiba-Lapa, seguindo por estrada secundária, na localidade de Alto Serrinha, até a microbacia dos arroios Passa-da-Guarda e Passa-Passo.

Esta região é constituída por rochas de idade Pré-Cambriana, de origem metamórfica, com presença de diques de diabásio do Jurássico. Predominam os migmatitos homogêneos do tipo embrechítico, de granulação grosseira e essencialmente feldspáticos (TREIN, 1967).

A vegetação original predominante é a Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária) (IBGE, 1990). Atualmente, a área de floresta nativa está representada por formações secundárias, que cobrem cerca de 16% da superfície do município da Lapa (IPARDES, 1993).

TABELA 3 - IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL COLETADO

<b>Região</b>	<b>Local</b>	<b>Identificação das plantas</b>	<b>Classe de solo</b>	<b>Nº do espécime e Herbário</b>
		L 01 a 15	Neossolo Litólico	Museu Botânico
Lapa	Lapa	L 16 a 20	Cambissolo gleico	Municipal de
		L 21 a 30	Cambissolo gleico/ Neossolo Aluvial	Curitiba MBM 248503
		Reserva	G 31 a 37	Cambissolo Húmico
	Indígena de	G 38 a 48	Cambissolo raso	Cardoso
Guarapuava	Marrecas	G 49 a 58	Afloramento de rocha	HFC 5251
		G 59 a 67	Neossolo Litólico +	Herbário Fernando
	Comunidade do Jordão		Afloramento de rocha G 68 a 71	Cardoso Neossolo Litólico

A população de *Maytenus ilicifolia*, em estudo neste ambiente, constitui-se, segundo classificação de CLEMENT (1999), como população semidomesticada, pois se apresenta significativamente modificada pela seleção humana. Constatam-se reflexos de tratos culturais no fenótipo da população. Portanto, a população adquire adaptabilidade ecológica suficiente para manter sua sobrevivência. Segundo classificação do mesmo autor a paisagem é identificada como Manejada, pois se observa clareiras e agricultura itinerante, atualmente em abandono de cultivo.

### 3.1.2 Região de Guarapuava – Amostras de G31 a G71

A região dos campos de Guarapuava, terceiro planalto paranaense, caracteriza-se pela ocorrência predominante da floresta com araucária associada aos campos nativos. Altitude média de 1.120 metros, latitude 25° 23' 36'' Sul e longitude 51° 27' 19'' Oeste. Apresenta clima subtropical úmido mesomérico, verões frescos (temperatura média superior a 22° C), inverno com geadas severas e frequentes (temperatura média inferior a 18° C), não apresentando estação de seca definida. A cobertura florestal nativa ocupa 23,17% da área total, colocando a região em primeiro lugar no ranking estadual de floresta nativa do Estado (15,22% de florestas nativas) (SPVS, 1996). Geologicamente, a região encontra-se sob o domínio de rochas basálticas, de origem ígnea. Nesta região foram coletados indivíduos de duas populações distintas:

#### **A - Reserva Indígena de Marrecas, município de Turvo – Amostras de G31 a G58**

Localiza-se ao norte da cidade de Guarapuava, a 45 km da sede, seguindo pela PR 460 em direção ao município de Turvo com altitude média de 950 metros.



A caracterização da população de plantas é tida como Incidentalmente Co-Envolvida (CLEMENT, 1999), pois a condição de reserva indígena permite que estes indivíduos dividam o ambiente com antropização, pois as trocas genéticas ocorrem sem a intervenção da seleção humana. Este manejo é característico dos tratos realizados por povos indígenas. Recentemente, foi iniciado um processo de exploração comercial de *Maytenus ilicifolia* nesta área. A paisagem é identificada como Promovida, pois deixou de ser um ambiente perfeito, pois há antropização. Porém, apresenta o mínimo de alterações, não comprometendo os componentes bióticos do ecossistema.

#### **B - Comunidade do Jordão, município de Guarapuava – Amostras de G59 a G71**

Situa-se ao sul deste município, na calha do rio Jordão. Foram coletadas amostras de indivíduos localizados em área de floresta ciliar, sobre solo Litólico.

Incipiente Domesticada é a classe desta população, a qual apresenta certo grau de modificação, com a distribuição dos indivíduos nas bordas da floresta e em céu aberto, porém o grau de intervenção humano não se reflete nos indivíduos. A domesticação da paisagem para esta população é enquadrada em área Manejada, na qual se observa clareiras e sistema pastoril em uso (CLEMENT, 1999).

A coleta do material vegetal foi realizada nos meses de setembro e outubro de 1999. Coletaram-se aproximadamente 10 folhas de cada indivíduo, sendo que o número de indivíduos foi determinado pelo tamanho da população encontrada, ou seja, todos quando possível. Em cada população adequou-se as condições das distâncias entre os indivíduos, ao mínimo de 5 m entre dois indivíduos. Optou-se pela coleta de folhas jovens, para facilitar a extração e a preservação do DNA, já que estas folhas possuem menos compostos secundários

e cera epicuticular menos espessa. Cada indivíduo coletado recebeu uma plaqueta de metal com seu número de identificação.

### 3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Os estudos da variabilidade populacional foram feitos pela análise de polimorfismo do DNA do tipo RAPD, descrito por WILLIAMS et al. (1990), e seguiu as etapas descritas.

#### 3.2.1 Extração de DNA genômico total:

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Genética Molecular, *Embrapa Florestas*, seguindo os procedimentos padrões do isolamento de DNA total em vegetais. Testaram-se os métodos descritos por FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1996), MAZZA (1998), MILACH (1998) e GAUER (1999), verificando qual o mais eficiente, em qualidade e quantidades de DNA necessárias.

Com base no rendimento e qualidade do DNA total extraído das amostras, descreveu-se uma técnica específica para *Maytenus ilicifolia*. A metodologia proposta por MAZZA (1998) demonstrou ser a mais eficiente para o material estudado, na qual alterou-se o momento de adição da proteínase K, adicionando-a ao tampão de extração. As condições estabelecidas perfazem um modelo, o qual pode ser um protocolo inicial para outras plantas de ativo metabolismo secundário.

#### Condições estabelecidas:

A quantidade de material vegetal liofilizado utilizado para a extração variou de 120 a 150 mg em cada uma das três repetições. O material foi macerado com nitrogênio líquido até a formação de um pó fino. Com espátula, este pó foi transferido para um tubo *eppendorf* de 1,5 ml e adicionou-se 850  $\mu$ l de tampão de extração aquecido a 65 °C (Tabela 7) e

homogeneizou-se rapidamente (no tampão de extração, previamente ao uso, foram adicionados 0,2 µl/ml do antioxidante 2-β mercaptoetanol e proteinase K). Após homogeneização, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65 °C durante 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos.

TABELA 4 - COMPONENTES DO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO

PRODUTO	CONCENTRAÇÃO FINAL	QUANTIDADE PARA 100 ml
CTAB	2,0%	2,0 g
NaCl	1,4 M	8,12 g
EDTA pH 8,0 - 0,5 M	20 mM	4 ml
Tris HCl pH 8,0 - 1,0M	100 mM	10 ml
PVP	1%	1,0 g
H <sub>2</sub> O milli-Q autoclavada		q.s.p.

Finalizando este período, em capela, foram adicionados 550 µl de clorofórmio-isoamil (24:1 v/v), agitando-se por inversão durante 5 minutos, visando a eliminação de paredes celulares, polissacarídeos e proteínas desnaturadas. Após, centrifugou-se durante 15 min a 13000 rpm, pipetando a fase superior para um tubo limpo. Neste, foram adicionados 550 µl de clorofórmio-isoamil (24:1 v/v), agitando-se por inversão durante 5 min. A seguir, centrifugou-se durante 15 min a 13000 rpm, pipetando a fase superior para um tubo limpo. Adicionaram-se 800 µl de etanol P.A. gelado, fechar os tubos e inverte-los, gentilmente, para obter o precipitado de DNA, e centrifugou-se durante 5 minutos a 13000 rpm.

O *pellet* de DNA foi lavado com etanol 70% e, na sequência, foi seco à temperatura ambiente. O DNA foi dissolvido em 100 µl de tampão TE estéril (Tabela 8). Após dissolução

total, centrifugou-se durante 10 min. a 13000 rpm, transferindo o sobrenadante para tubos limpos. O DNA obtido foi armazenado a 4° C, até o momento do uso.

TABELA 5 - COMPONENTES DO TAMPÃO (TE)

PRODUTO	CONCENTRAÇÃO FINAL	QUANTIDADE PARA 50 ml
EDTA pH 8,0 - 0,5 M	1 mM	0,1 ml
Tris HCl pH 8,0 - 1,0M	10 mM	0,5 ml
H <sub>2</sub> O milli-Q autoclavada		q.s.p.

### 3.2.2 Quantificação do DNA total extraído

A concentração foi estimada por espectrofotometria assumindo uma equivalência de 50 mg/ml<sup>-1</sup> para 1 unidade de absorvância a 260 nm. A qualidade foi determinada pela razão de A260/A280 e paralelamente avaliada por eletroforese do DNA em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio e TBE 1X, sob corrente contínua de 3 V por cm. Na Tabela 4 encontra-se a composição concentrada 5X do TBE.

TABELA 6 - COMPONENTES DO TBE 5X.

PRODUTO	CONCENTRAÇÃO FINAL	QUANTIDADE PARA 500 ml
EDTA pH 8,0 - 0,5 M	0,001 M	10 ml
Tris base	0,054 g/ml	27g
Ácido bórico	0,027 g/ml	13,5 g
H <sub>2</sub> O milli-Q autoclavada		q.s.p.

Da amostra de DNA genômico retirou-se cinco microlitros, o qual foi homogeneizado com quatro microlitros do tampão de carregamento (TC - Tabela 7) e esta solução aplicada no gel. O gel foi transferido para uma cuba eletroforética e encoberto com tampão TBE 1X. As moléculas de DNA foram submetidas à corrente elétrica e migraram para o pólo positivo do sistema, até que a linha formada pelo azul de bromofenol (presente no tampão de carregamento) atingisse 3 cm em relação ao ponto de aplicação. Os géis foram fotografados com máquina Polaroid MP4+ e filme 667.

Posterior a quantificação, uma fração do DNA total extraído de cada amostra foi diluída com água milli-Q autoclavada para se obter uma concentração de 10 ng de DNA por microlitro e reservando-o sob refrigeração, para posterior utilização nas reações de amplificação.

TABELA 7 - COMPONENTES DO TAMPÃO DE CARREGAMENTO (TC) \*

<b>PRODUTO</b>	<b>10 ml</b>
Tris e EDTA	10 ml
Sacarose	4 g
Azul de bromofenol	25 mg
Brometo de etídeo	0,2 mg

\* O TC foi distribuído em alíquotas de 1 ml e armazenado em freezer -20 °C.

### 3.3 AMPLIFICAÇÃO AO ACASO DO POLIMORFISMO DE DNA – RAPD

Para determinação das condições de amplificação, utilizou-se o DNA genômico total isolado de dois indivíduos de cada população amostrada de *Maytenus ilicifolia*. As condições inicialmente utilizadas nas reações foram descritas por VASCONCELOS (1995).

Realizaram-se testes para otimizar as condições para espinheira-santa, nos quais avaliaram-se as concentrações, em esquema fatorial, dos seguintes componentes:  $MgCl_2$ , dNTPs, *primers*, *Taq* polimerase e DNA. Verificou-se a possibilidade de diminuir o volume da reação de 25  $\mu$ l para 13  $\mu$ l, reduzindo assim, o uso de reagentes. Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, nas concentrações de 1,5 a 1,7%, corado com brometo de etídio, onde se observou o padrão e a intensidade das melhores condições de amplificação para as variáveis testadas. A presença e ausência das bandas de RAPD foram avaliadas a partir do gel fotografado.

#### Condições estabelecidas:

O preparo das reações para RAPD foi realizado em capela de fluxo laminar para evitar as contaminações das soluções. O DNA de cada amostra foi amplificado no volume de 13  $\mu$ l com os componentes da reação: Tampão de reação 10 X (Tabela 10);  $MgCl_2$  2,5 mM; mistura de dNTP 0,4 mM; *primer* 0,4  $\mu$ M; *Taq* polimerase 1 U/ $\mu$ l, 10 ng/ $\mu$ l de DNA e  $H_2O$  milli-Q autoclavada (q.s.p.). Os ciclos de amplificação utilizados para *Maytenus ilicifolia* foram os indicados no protocolo de VASCONCELOS (1995), constando de 40 ciclos consistindo de 94°C por 15 segundos (desnaturação), 35°C por 30 segundos (anelamento dos primers) e 72°C por 1 min (extensão). Finalmente, 72° C por 10 min, para permitir a terminação de possíveis polimerizações interrompidas, e subsequente resfriamento para 4° C.

As quantidades de reagentes necessárias para todas as reações foram calculadas para suprir todas as reações necessárias dos 71 indivíduos analisados, evitando utilizar lotes diferentes de um mesmo reagente. Para todos os componentes de reação, foram distribuídas alíquotas necessárias para a reação de um *primer* para todos os indivíduos

deste estudo, evitando a sua degradação e/ou precipitação, resultante de congelamento e descongelamento por repetidas vezes e, concomitantemente, para evitar a contaminação.

Depois de estabelecidas as condições de amplificação, testou-se 118 *primers* dos kits A a F da Operon Technologies (Alameda, CA, EUA), para escolha dos que apresentassem um padrão de bandas adequado.

A reprodutibilidade das amplificações foi testada para cada *primer* que apresentou amplificação em *Maytenus ilicifolia*. Somente as bandas consistentemente reproduzíveis foram consideradas. Prova em branco foi rotineiramente utilizada para checar possíveis contaminações. As bandas com o mesmo peso molecular e mobilidade foram tratadas como fragmentos idênticos.

### 3.3.1 Eletroforese dos produtos de RAPD

Separadamente, a mistura contendo 13 µl de cada indivíduo mais 4 µl de TC (Tabela 5) foi aplicada no gel com concentração de 1,7%. Sempre no início e fim das seqüências de amostras foi adicionado o marcador de peso molecular Ladder 1 pb. A eletroforese foi realizada sob voltagem constante de 3 V por cm. O gel de agarose foi corado com brometo de etídio e exposto à luz ultra violeta para a visualização das bandas de DNA.

### 3.4 ANÁLISE DA DISTÂNCIA GENÉTICA OBTIDA POR RAPD

Os fragmentos amplificados, resultantes dos marcadores RAPD da espécie, foram mensurados para a sua presença (1) ou ausência (0). A partir destes dados montou-se uma matriz com os diferentes fenótipos RAPD. Devido ao fato destes marcadores serem

dominantes, assumiu-se que cada banda representada é o fenótipo em um locus bi-alélico (WILLIAMS et al., 1990).

A análise da distância genética foi realizada pelo agrupamento das amostras segundo os princípios da taxonomia numérica. Utilizou-se o coeficiente de similaridade de Jaccard, o qual permitiu calcular similaridade com base em variáveis binárias. O coeficiente de Jaccard foi calculado segundo a fórmula  $J = M/P$ , onde M é o número de concordâncias positivas, e P o número total de variáveis, menos concordâncias negativas. As unidades foram agrupadas pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), o qual é um modelo de grupamento hierárquico que permite a construção de dendogramas (SNEATH e SOKAL, 1973), quando necessário após a obtenção do dendograma fez-se análise crítica dos indivíduos com 100% de similaridade e vizinhos optou-se sempre por manter um genótipo apenas. As matrizes e dendogramas foram elaborados com o auxílio do programa NTSYS (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*) (ROHLF, 1988).

A consistência dos agrupamentos foi verificada pela análise *bootstrap*, segundo descrito por FELSENSTEIN (1993), utilizando o software *Winboot* (YAP e NELSON, 1996). Foram utilizadas 800 amostragens com reposição dos dados dos marcadores. Foram considerados consistentes os agrupamentos que apresentaram P maior ou igual a 95 %, sendo P a freqüência de determinado agrupamento no conjunto dos dendogramas resultantes das repetições *bootstrap*.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EXTRAÇÃO DE DNA EM *Maytenus ilicifolia*

A quantidade média de DNA total obtida em *Maytenus ilicifolia* nas condições descritas, foi de 821,62 ng/ $\mu$ l, variando de 300 a 1475 ng/ $\mu$ l. A pureza foi estimada pela razão entre as leituras espectrofométricas a 260 e 280 nm. A razão média das leituras foi de 1,64; houve indivíduos em que esta relação atingiu 1,89, mostrando que o DNA obtido neste caso estava com elevado grau de pureza, livre de contaminações por clorofórmio e proteínas (SAMBROOK et al. 1989). A integridade do DNA de todas as amostras foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%. As amostras não se apresentavam degradadas e, também, não houve problemas nas reações de amplificação.

### 4.2 UTILIZAÇÃO DE RAPD NA DETECÇÃO DE VARIABILIDADE GENÉTICA

Para a determinação da distância genética entre as populações em estudo, foram selecionados sete iniciadores (Tabela 8), *primers*, em base a sua reprodutibilidade, sinal de intensidade e adequado número de bandas entre os indivíduos analisados. Esses sete decâmeros geraram 52 produtos de amplificação (bandas), com uma média de 7,42 bandas por *primer*. WOLFE e LISTON (1998) revisaram estudos empregando RAPD em vegetais (sumarizados na Tabela 2) os quais apresentam grande variabilidade no número de bandas geradas por *primers* RAPD utilizados nas espécies vegetais, resultados que podem ser atribuídos à característica destes marcadores relacionados à arbitrariedade dos decâmeros utilizados para amplificação do DNA. Das 52 bandas obtidas nos estudos em *Maytenus ilicifolia*, 44 foram classificadas como polimórficas e 8 monomórficas. Esses iniciadores

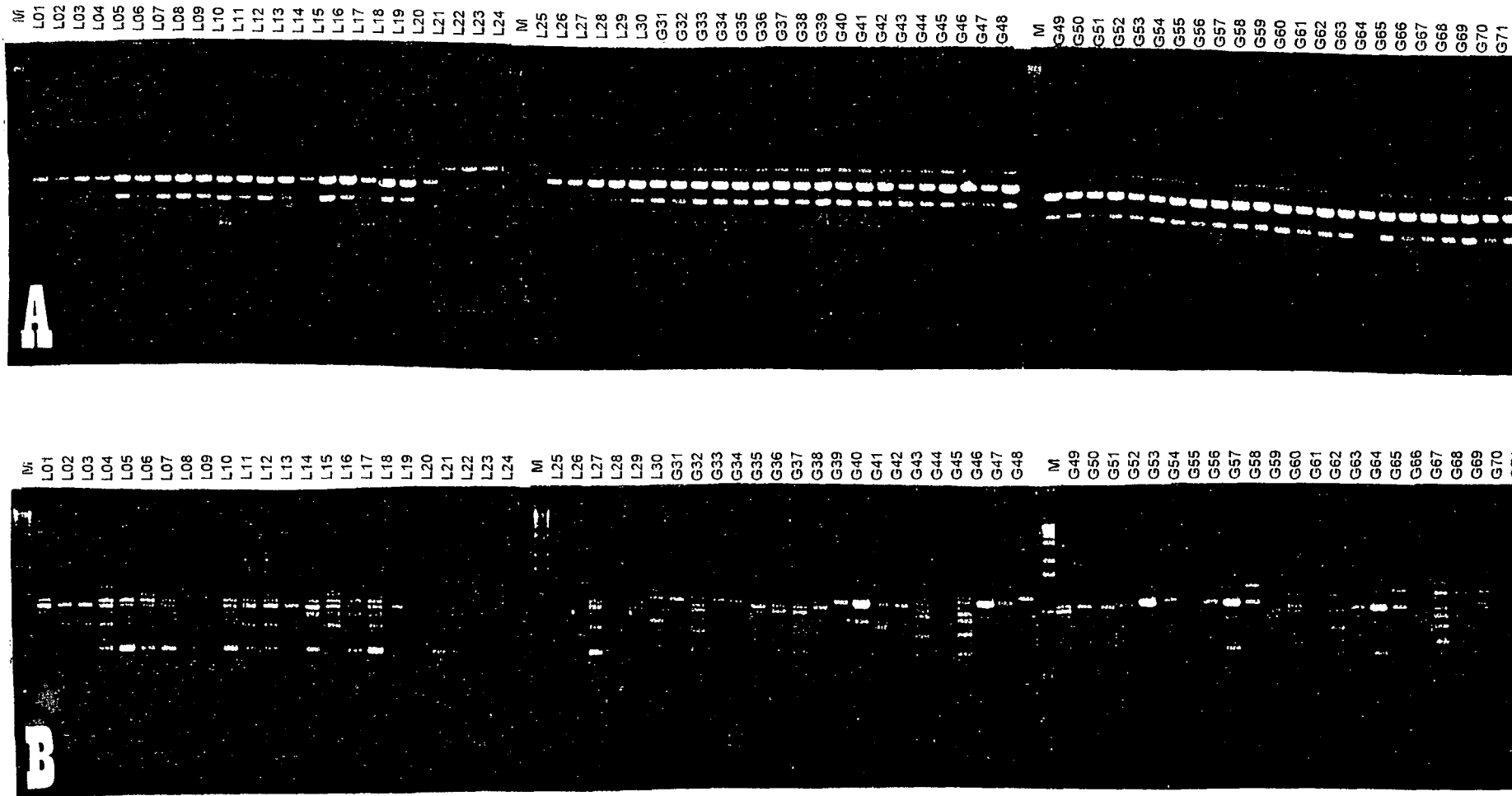
apresentaram ampliações com tamanho variando entre 500 a 3000 pares de base (pb) (Tabela 8).

Os *primers* selecionados neste estudo apresentam os conteúdos da base CG variando de 60 a 80%, resultado que confirma as indicações de WHITKUS (1994) e WILLIAMS et al. (1990), quando ressaltam a necessidade dos primers RAPD apresentarem ao mínimo 50% destas bases.

TABELA 8 - LISTA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS COMO *PRIMERS*, SUAS RESPECTIVAS SEQUÊNCIAS DE BASES, NÚMERO E TAMANHO DOS FRAGMENTOS A ESTES ASSOCIADOS.

<i>Primers</i>	Sequências de nucleotídeos (5' → 3')	% de CG	Nº Fragmentos polimórficos	Nº Fragmentos monomórficos	Faixa de tamanho dos fragmentos (pb)
OPA09	GGGTAACGCC	70	2	3	3000 a 1600
OPB07	GGTGACGCAG	70	9	0	3000 a 500
OPC19	GTTGCCAGCC	70	1	5	3000 a 1600
OPD08	GTGTGCCCCA	80	7	0	3000 a 500
OPD20	ACCCGGTCAC	70	10	0	3000 a 500
OPF01	ACGGATCCTG	60	8	0	2000 a 500
OPF10	GGAAGCTTGG	60	7	0	2500 a 500

Dos *primers* utilizados nas análises por RAPD, destacam-se o polimorfismo dos *primers* OPB07/OPD08/OPD20/OPF01/OPF10, os quais não exibiram sequer uma banda monomórfica (Tabela 8). O polimorfismo destes decâmeros nas populações tende a refletir alto nível de variação genética entre os indivíduos. A Figura 2 mostra o padrão de amplificação obtido com OPC19 (monomórfico) e OPF10 (polimórfico).



**FIGURA 02.-** Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA total de 71 indivíduos de *Maytemus ilicifolia* com os primers OPC19 (A) e OPF10 (B). As amostras estão ordenadas da esquerda para a direita. A canaleta “M” corresponde ao marcador de peso molecular Ladder 1pb.

### 4.3 VARIABILIDADE INTERPOPULACIONAL

Os dados moleculares obtidos por meio dos marcadores RAPD para os 71 indivíduos das três populações sugerem a estrutura genética e a inter-relação com a paisagem em que as populações estão inseridas. A avaliação constou da presença (1) e ausência (0) de bandas obtidas nos primers utilizados para cada um dos indivíduos. Com estes números relativos, montou-se uma matriz, da qual resultou o dendrograma (Figura 3) da distância genética, segundo os princípios de taxonomia numérica, obtido pelo índice de Jaccard, o qual utiliza apenas as similaridades.

Formou-se quatro grupos distintos onde, a separação do primeiro grupamento formado apresenta a similaridade de 40% dentre os demais. Na Figura 3 os grupamentos estão identificados como: a primeira chave (\*1) das amostras L18 a L25. Seguindo a leitura os indivíduos de L01 a L17 apresentam a formação do grupo \*2. O próximo nó da chave montada a partir dos coeficientes genéticos esta estruturado para os indivíduos de G49 a G71 (\*3) e para finalizar os grupamentos formados há uma última chave de G31 a G48, na amostragem de (\*4).

Os grupamentos formados estão coerentes com as características geológicas e classes de solos em que os indivíduos se encontram naturalmente, apesar da consistência pela análise *Bootstrap* ter indicado a necessidade de saturação a necessidade da saturação neste estudo de um maior número de marcadores RAPD e/ou correlação com outros descritores, morfológicos ou fitoquímicos.

O primeiro grupamento do dendrograma é formado pelos indivíduos de planícies aluvionar, da população da Lapa (\*1) e, ainda, dois indivíduos oriundos da transição, em Cambissolo Gleico/Neossolo aluvial.

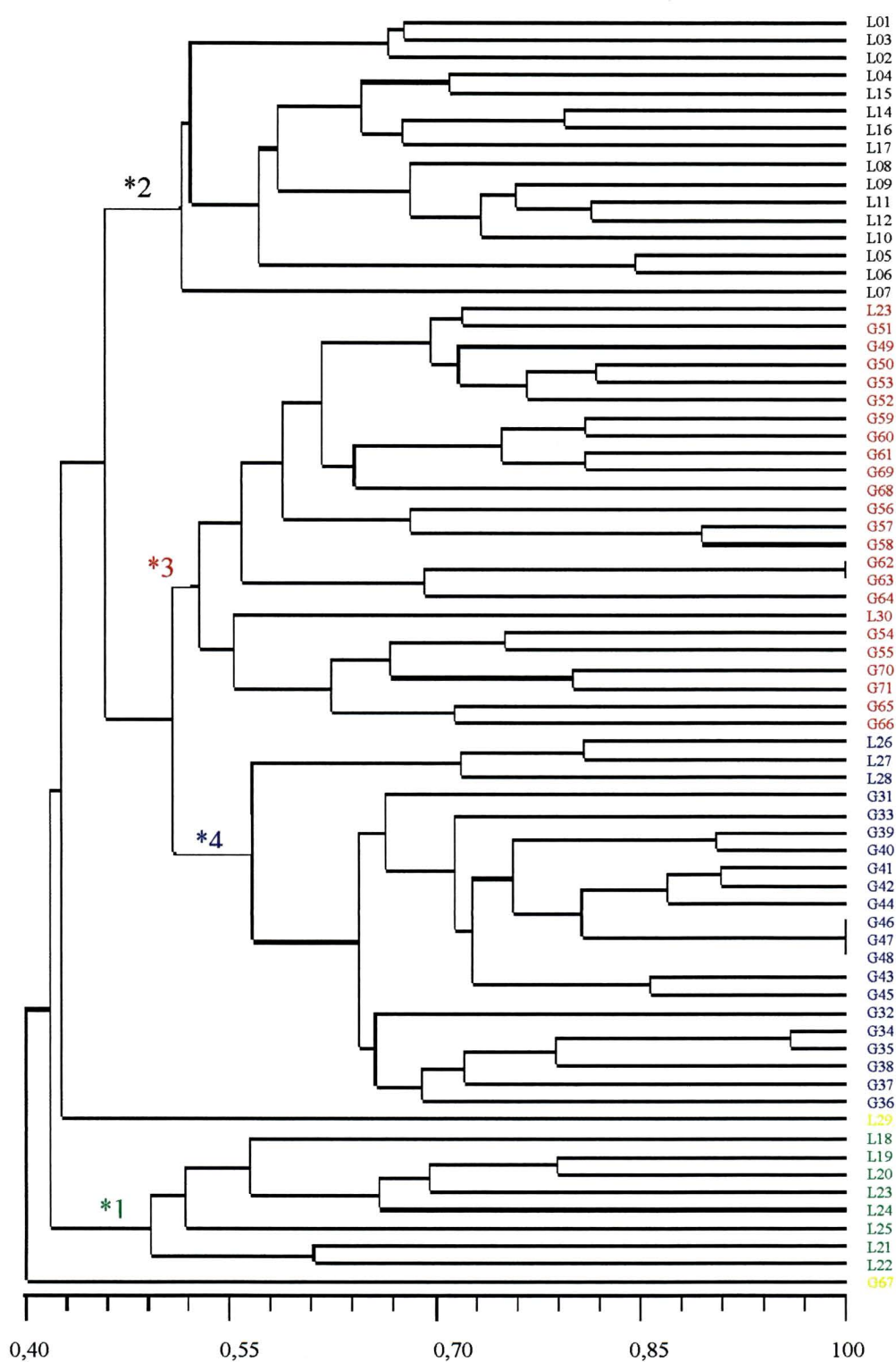


FIGURA 3 - DENDROGRAMA OBTIDO COM BASE NAS DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE OS INDIVÍDUOS DE *Maytenus ilicifolia*. OS GRUPAMENTOS 1, 2, 3 E 4 REPRESENTADOS RESPECTIVAMENTE PELAS CORES ● ● ● ● E ● PARA DOIS INDIVÍDUOS ANÔMALOS NAS ANÁLISES

A próxima chave (grupamento \*2) obtida na análise de distância genética é composta por indivíduos distribuídos na mesma encosta de solo Neossolo Litólico, destacando apenas como não constituintes desta porção geomofológica os indivíduos L16 e L17, os quais estão localizados em solos de transição entre a encosta e os de superfície aluvial, em Cambissolo Gleico.

O grupamento \*3, representado pelos indivíduos de ambas as populações de Guarapuava - Reserva Indígena de Marrecas e Comunidade do Jordão - possuem em comum as classes de solos em que se encontram: os quais pouco desenvolvidos, quase que na totalidade sobre rocha. Neste grupamento encontram-se os indivíduos somente em áreas com Afloramentos de Rocha ou Neossolo Litólico + Afloramento de Rocha .

O último grupamento (\*4) é constituído por indivíduos da Reserva Indígena de Marrecas e apenas três indivíduos da população da Lapa, todos localizados sobre solo Cambissolo Raso. Vale ressaltar que os indivíduos da Lapa que aparecem neste grupamento, mesmo sendo oriundos de solos com origens evolucionárias diferentes estão contidos em uma mesma classe de solo

Os dados obtidos pela técnica de RAPD demonstraram que em *Maytenus ilicifolia*, para as populações estudadas, a estrutura genética esta intimamente relacionada com o micro-ambiente no qual se desenvolveram.

Os grupamentos obtidos demonstram as tendências evolucionárias das populações através da fixação de genes adaptativos, por meio da separação dos grupos em relação ao material geológico em que as populações se encontram. Dos quatro grupos formados, o primeiro e o segundo estão representados pelos indivíduos da Lapa, os quais se encontram sobre formação pré Cambriana, material metamórfico. As populações da região de Guarapuava constituem o segundo e o terceiro grupamento e apresenta distância genética menor do que a detectada na população da Lapa, a qual se encontra numa mesma

topossequência, diferenciando as duas populações da Região de Guarapuava coletadas. As populações, da Reserva Indígena de Marrecas e de Comunidade do Jordão, se encontram distanciadas aproximadamente em 50 km uma da outra e os solos são de domínio de rochas basálticas com origem ígnea.

A Figura 4 apresenta uma abordagem simplificada do dendrograma da Figura 3, o qual ilustra apenas os quatro principais grupamentos formados. Nota-se que os indivíduos da Lapa, mesmo estando concentrados em uma única porção, apresentam os grupos genéticos definidos de acordo com os micro-ambientes (classes de solo), característica também verificada nos grupamentos das populações da região de Guarapuava, as quais se encontram distribuídas em dois diferentes sítios, Reserva Indígena e Comunidade do Jordão.

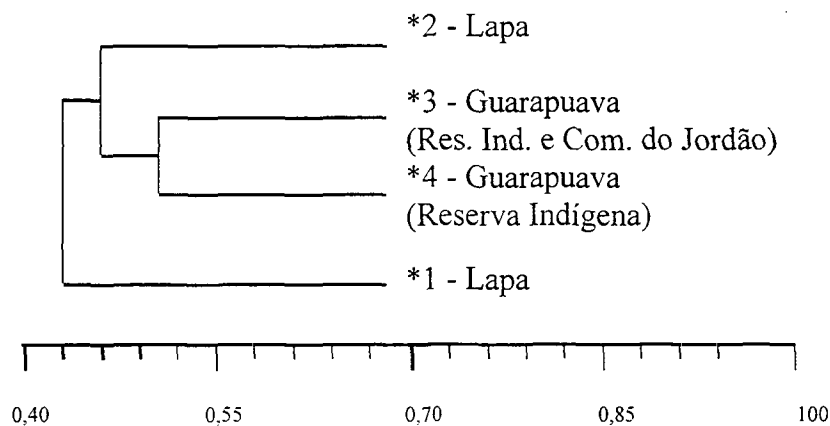


FIGURA 4 - GRUPAMENTOS OBTIDOS COM BASE NAS DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE OS INDIVÍDUOS DE *Maytenus ilicifolia*

Os estudos da variabilidade genética em populações naturais são importantes para se compreender melhor os processos evolucionários. Dentro deste contexto, ARNOLD e EMMS (1998) enfatizam que a presença de variabilidade genética dentro da espécie possibilita a esta adaptar-se às mudanças ambientais. CLEGG (1993), citando os trabalhos de WRIGHT (1969), esclarece que populações de distintos ambientes sofrem adaptações diferentes e por

esta razão, espera-se que as populações de uma mesma espécie de planta sofram um arranjo diferente nas combinações de genes adaptativos.

#### 4.4 VARIABILIDADE INTRAPOPULACIONAL

A compartimentalização ambiental e a diferenciação no grau de domesticação na paisagem em que as populações estão inseridas são fatores que contribuíram para a troca rápida do padrão de variação genética e fixação de indivíduos mais adaptados. Os trabalhos de ALLARD et al. (1972) e BRADSHAW (1984) destacam a fixação de genótipos segundo o microambiente em que estão inseridos.

##### 4.4.1 População da Lapa

O dendrograma obtido com as distâncias genéticas utilizando índice de Jaccard para a população da Lapa mostra grande divergência, com baixo coeficiente de similaridade entre os dois principais grupos que se formam neste local (42%) e atingindo o máximo de similaridade (85%) entre genótipos mais semelhantes da população (Figura 5). Estes percentuais refletem baixa similaridade genética na população avaliada, provavelmente em consequência do processo de formação ambiental da região da Lapa refletida na população.

O primeiro grupo formado localiza-se em planície aluvionar, na superfície de degradação de arroios meandrantés. Esta compartimentalização é plana e formada por deposição de sedimentos por ocasião das cheias do arroio Passa-da-Guarda. O segundo grupamento é constituído, em sua maioria, por indivíduos desenvolvidos em Neossolo Litólico, à exceção de L26 a L30 que originalmente pertencem a superfície aluvionar.



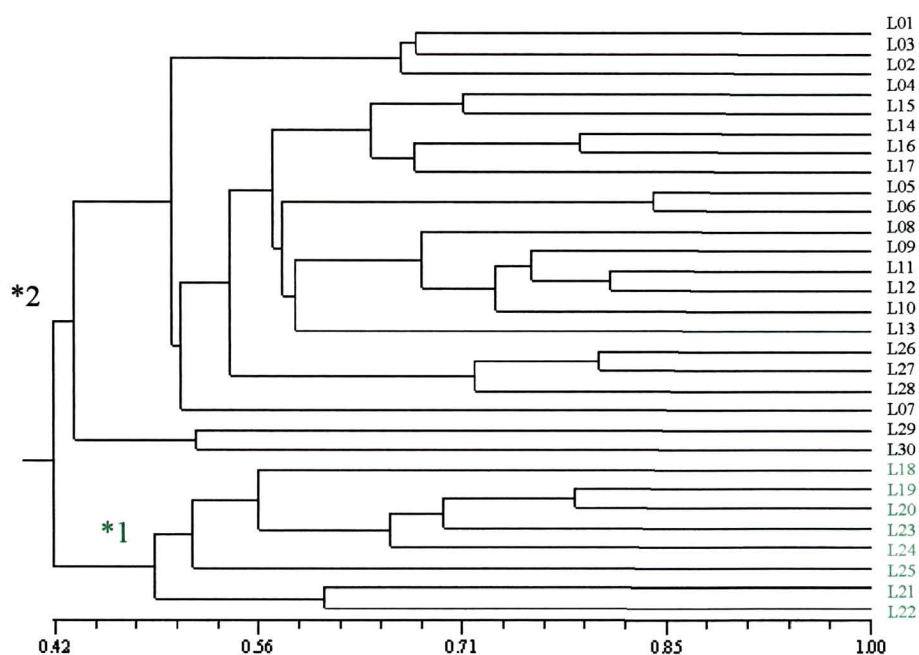


FIGURA 5 - DENDROGRAMA OBTIDO COM BASE NAS DISTÂNCIAS GENÉTICAS UTILIZANDO O ÍNDICE DE JACCARD NOS INDIVÍDUOS DE *Maytenus ilicifolia* – LAPA (PR). OS GRUPAMENTOS 1 E 2, ESTÃO REPRESENTADOS RESPECTIVAMENTE PELAS CORES ● E ●.

Os resultados obtidos sugerem que a população oriunda da zona aluvionar seja constituída por outros *pools* gênicos trazidos com a sedimentação, característica peculiar ao processo da formação deste ambiente. Neste contexto, a deposição de sedimentos poderia estar contribuindo para o aumento da variabilidade genética na amostra da planície aluvionar da Lapa. Utilizando maior quantidade de populações distribuídas ao longo destes ambientes ciliares, trabalhos futuros poderão contribuir para o melhor esclarecimento destas questões, agregando informações sobre a autoecologia de *Maytenus ilicifolia*, especialmente na elucidação de uma das formas de dispersão da espécie que, segundo KLEIN (1968), pode estar restrita aos ambientes ciliares.

A Figura 6 representa a situação esquemática na topossequência da população da Lapa. Nesta figura, também, se encontram destacados os dois principais grupos, segundo caracterização genética dos indivíduos do local.

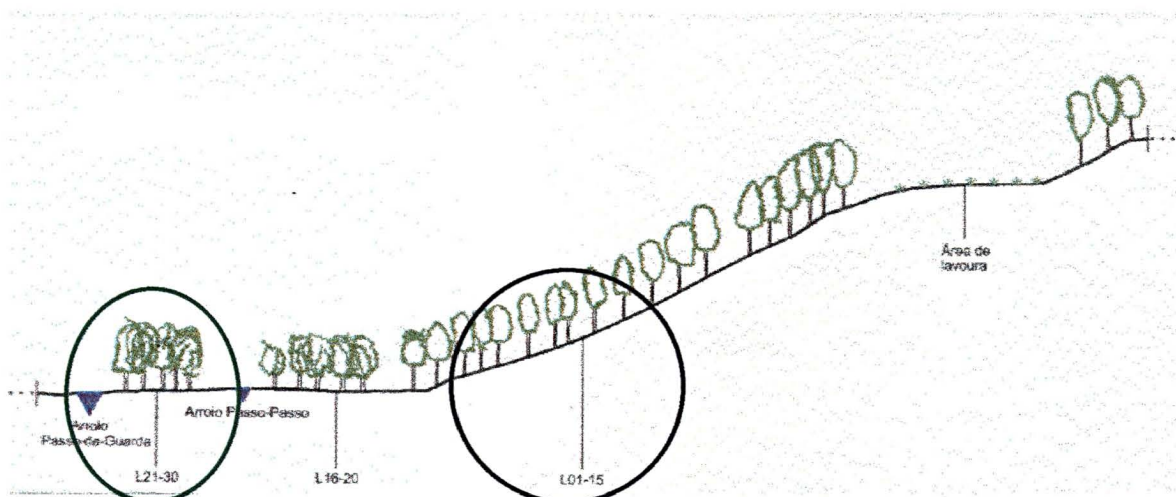


FIGURA 6 – TOPOSSEQUÊNCIA DA POPULAÇÃO DE *Maytenus ilicifolia* POPULAÇÃO DA LAPA (PR).

A população da Lapa encontra-se em paisagem semi-domesticada, onde se destacam os microambientes de planície e encosta. Entre estas duas situações observa-se a vegetação de capoeirão existindo apenas no ambiente de transição, onde estão localizados os indivíduos L16 a L20. Neste local, anteriormente foram cultivadas espécies anuais em consórcio com *Maytenus ilicifolia*. Tais fatos estão coerentes com a inclusão desta área na categoria de paisagem semi-domesticada e, entretanto, não se precisa as influências destes tratamentos culturais sobre a estrutura genética da população original, seja pela retirada ou pela introdução de plantas selecionadas.

#### 4.4.2 Região de Guarapuava

O desdobramento da análise para os indivíduos oriundos da Reserva Indígena de Marrecas e Comunidade do Jordão, região de Guarapuava, está representado no dendrograma obtido com base nas distâncias genéticas estimadas pelo índice de Jaccard com estas populações (Figura 7).

O dendrograma de Guarapuava, quando comparado ao da Lapa (Figura 5), mostra uma maior similaridade genética entre os grupos, com o coeficiente de similaridade de 51% entre os dois grupos principais e o máximo de 96% entre genótipos mais semelhantes desta população (Figura 7).

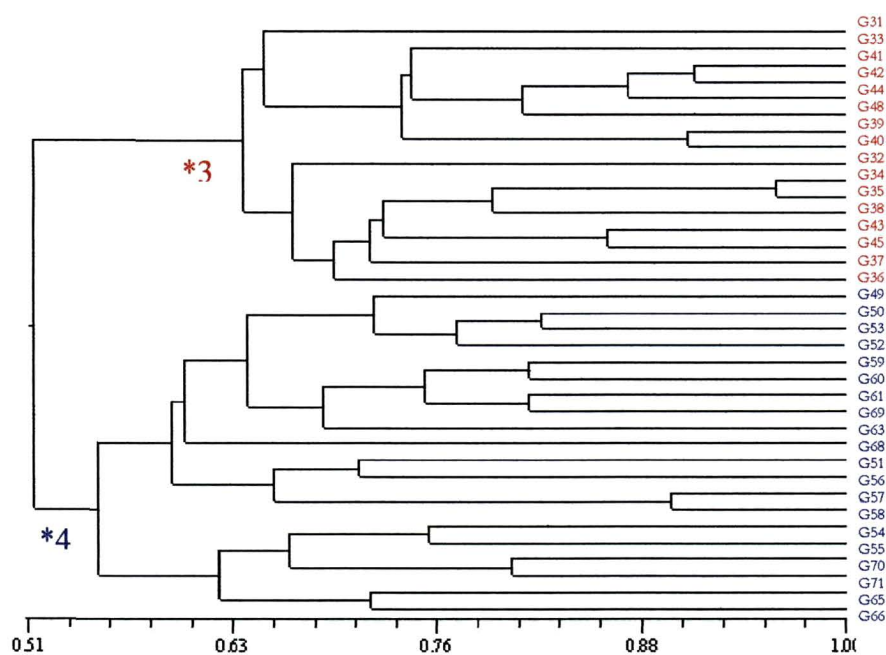


FIGURA 7 - DENDROGRAMA OBTIDO COM BASE NAS DISTÂNCIAS GENÉTICAS UTILIZANDO O ÍNDICE DE JACCARD NOS INDIVÍDUOS DE *Maytenus ilicifolia* – GUARAPUAVA (PR). OS GRUPAMENTOS 3 E 4 REPRESENTADOS RESPECTIVAMENTE PELAS CORES ● E ●.

O grupo \*3 do dendrograma da Figura 7 está constituído por indivíduos estabelecidos em dois sítios de coletas diferentes dentro da Reserva Indígena de Marrecas, onde os microambientes são compostos pela mesma classificação pedológica - Cambissolo Raso.

microambientes são compostos pela mesma classificação pedológica - Cambissolo Raso. Como característica, os solos desta classe são bem drenados e apresentam um certo grau de evolução, que pode ter contribuído para a adaptação e diferenciação destes indivíduos, incluindo-os em um mesmo grupamento genético. Na Figura 8, estes grupos encontram-se representados esquematicamente nas topossequências das duas populações da região de Guarapuava.

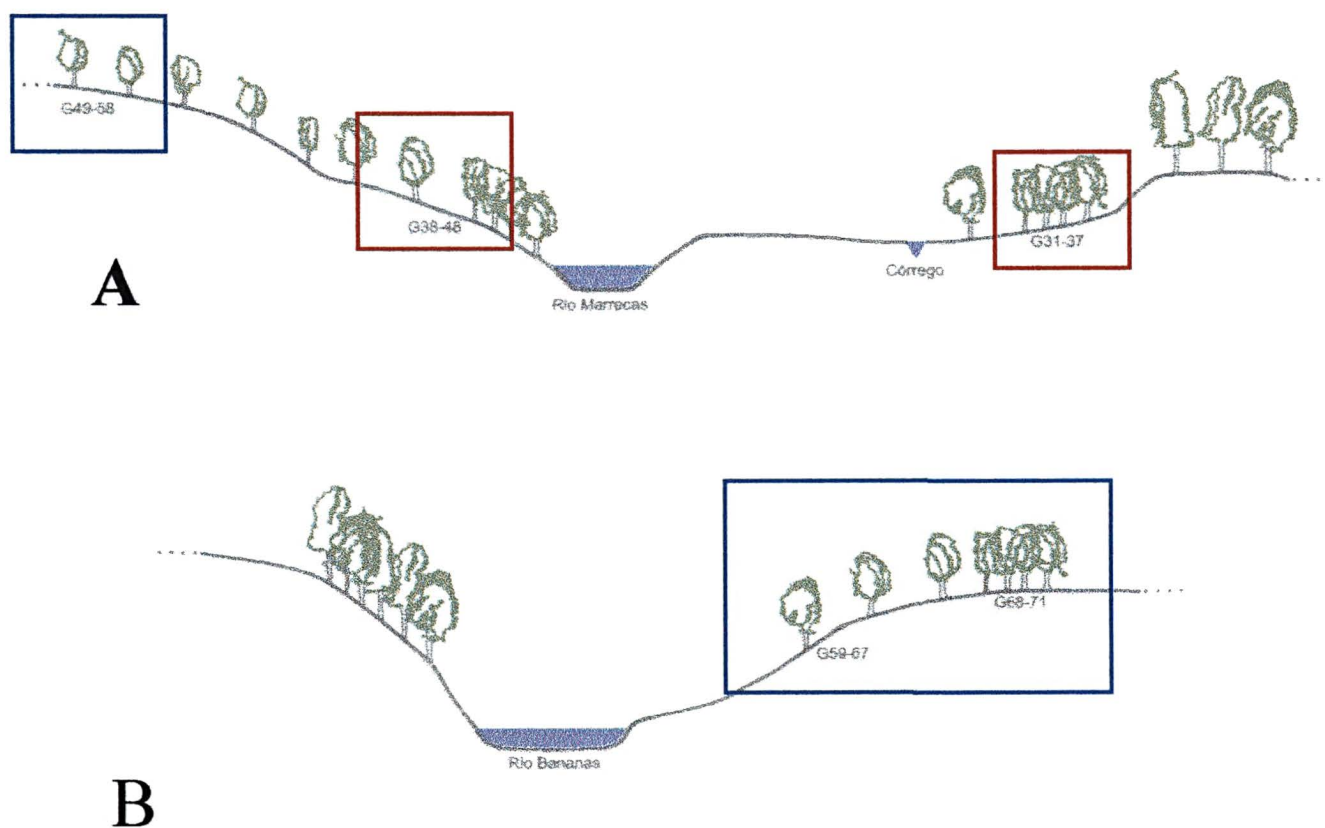


FIGURA 8 – TOPOSSEQUÊNCIA DAS POPULAÇÕES DE *Maytenus ilicifolia* NA REGIÃO DE GUARAPUAVA, RESERVA INDÍGENA DE MARRECAS (A) E COMUNIDADE DO JORDÃO (B).

O grupo \*4 do dendrograma (Figura 7) é composto por indivíduos presentes em solos da classe Neossolo Litólico ou ainda solos com Afloramento de rocha, solos com curto período de desenvolvimento. A presença de indivíduos da Reserva Indígena de Marrecas e da Comunidade do Jordão neste grupo, pode ser explicada pela semelhança ambiental nas duas localidades. Tais fatos podem, ao longo do período evolucionário, ter propiciado a seleção dos genótipos mais adaptados, refletida na similaridade genética observada no agrupamento genético (Figura 8).

A ecologia da paisagem poderia reforçar (CLEMENT, 1999) e, até mesmo, explicar alguns aspectos relacionados aos mais altos coeficientes de similaridade encontrados nas populações de Guarapuava (Reserva Indígena de Marrecas e Comunidade do Jordão), quando comparados com a população da Lapa.

A conectividade entre fragmentos remanescentes de Floresta Ombrófila Mista, possibilitando fluxo gênico contínuo entre as populações na região de Guarapuava, pode ter favorecido uma maior homogeneidade genética entre as populações. Adicionalmente, a conservação da paisagem natural da região, onde ainda predominam sistemas tradicionais, pode ter contribuído para a manutenção destes agrupamentos genéticos detectados neste trabalho. Vale ressaltar que, com base na classificação proposta por CLEMENT (1999), esta região foi considerada como Incidentalmente Co-envolvida (Reserva Indígena de Marrecas) e Incipiente Domesticada (Comunidade do Jordão), onde as intervenções antrópicas não interferem nas trocas genéticas. Entretanto, estes resultados necessitam de estudos mais aprofundados utilizando marcadores moleculares mais informativos que permitam uma análise mais completa do genoma e, conseqüentemente, o maior esclarecimento dos processos evolutivos das populações de *Maytenus ilicifolia*.

#### 4.5 RECURSOS GENÉTICOS

*Maytenus ilicifolia* enquadra-se na definição de recursos genéticos proposto pela FAO (1989), devido ser uma fonte econômica para as comunidades, ter valor científico pelas suas potencialidades que vem sendo comprovadas e por constituir um valor social por meio das propriedades medicinais, não só para as comunidades tradicionais que a utilizam, mas para a humanidade.

Apesar de seu valor como um recurso genético, medidas urgentes para a preservação de suas populações são necessárias. Num exemplo de grande pressão a que se encontra submetido pode ser registrado, durante o curto intervalo de tempo de 24 meses, a destruição completa de uma das quatro populações inicialmente selecionadas, para o estudo.

A proporção de devastação de ecossistemas florestais nas últimas décadas tem sido assustadora. Porém, quando se discutem espécies medicinais, o problema se agrava considerando a exploração seletiva, algumas vezes disimadoras, concordando com a afirmação, já apresentada em trabalhos anteriores (LIBBY, 1991), de que a intervenção antrópica se faz de forma negativa.

WILLIAMS (1991) divide os recursos genéticos florestais, nos trópicos, em populações silvestres em ambientes naturais e os materiais cultivados primitivamente associados ao campesinato. Neste trabalho as populações da região de Guarapuava e da Lapa representam estas situações, cada umas das populações apresentam uma fonte de variação genética e diversidade adaptadas aos seus ambientes e, portanto, constituem material com potencialidades para domesticação, uso e conservação. BARNES (1998) ressalta a importância da relação dos organismos e as adaptações genéticas aos distintos ecossistemas em que ocorrem.

A partir da década de 60 houve significativo desenvolvimento da biologia molecular, em especial nas décadas de 80 e 90, quando se generalizou o uso da sistemática molecular, a

qual emprega a biologia molecular e métodos estatísticos. Portanto, estas biotecnologias devem ser empregadas, também, para subsidiar o manejo sustentável de recursos genéticos das regiões tropicais e subtropicais, o que ainda é bastante precário, de acordo com VILELA-MORALES et al. (1997).

Um dos grandes desafios da conservação de espécies arbóreas é, sem dúvida, a alta diversidade associada a pouca informação genética e ecológica. Diante dos resultados obtidos neste trabalho, com base somente em informações moleculares tipo RAPD, uma estratégia para conservação de material vegetal de *Maytenus ilicifolia* para a formação de um banco genético poderia seguir a coleta de material em cada uma das compartimentalizações ambientais as quais os indivíduos pertencem. Com isto, o processo de prospecção de germoplasma para esta espécie deveria se iniciar com uma análise da paisagem em que as populações estão inseridas, ou melhor, no local onde a espécie ainda ocorre e, na seqüência seguir com a determinação de unidades amostrais, considerando os diferentes *pools* genéticos potenciais para o resgate de variabilidade em função dos parâmetros ecogeográficos locais.

Considerando-se que as espécies perenes encontram-se expostas por um longo período as condições genética-ecológicas de um mesmo ambiente, a variabilidade genética torna-se fator preponderante na conservação e manejo destes recursos genéticos. LIBBY (1991) ressalta a importância deste fator para a domesticação de espécies lenhosas devido à seleção ser realizada em poucas gerações.

Os trabalhos de CLEGG (1991) revelam um importante aspecto ao lembrar alguns aspectos importantes da redução de variabilidade genética em espécies medicinais em suas discussões. Normalmente a redução de variabilidade genética leva a perda de genes e em espécies medicinais esta redução reflete-se em perda da diversidade bioquímica.

A Reserva Indígena de Marrecas esta iniciando a exploração comercial de *Maytenus ilicifolia*, havendo a necessidade de viabilizar a utilização racional deste recurso genético

naquela área. As informações geradas neste estudo fornecem indicativos para o manejo sustentável deste recurso, considerando a estrutura da variabilidade genética na região.

Geralmente, a coleta de material vegetal limita a produção de sementes. Portanto, existe a necessidade de selecionar árvores, que não seriam exploradas, destinadas apenas a produção de sementes. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, nas populações genotipadas da Reserva Indígena de Marrecas indica-se preferencialmente a seleção de indivíduos dos dois principais grupamentos formados, refletindo condições genéticas distintas, uma localizada sobre o Afloramento de Rocha e a outra sobre os Cambissolos. Tais procedimentos permitem uma maior variabilidade genética na seleção de matrizes, aspecto de fundamental importância no estabelecimento de estratégias para a conservação de espécies nativas.



## 5 CONCLUSÕES

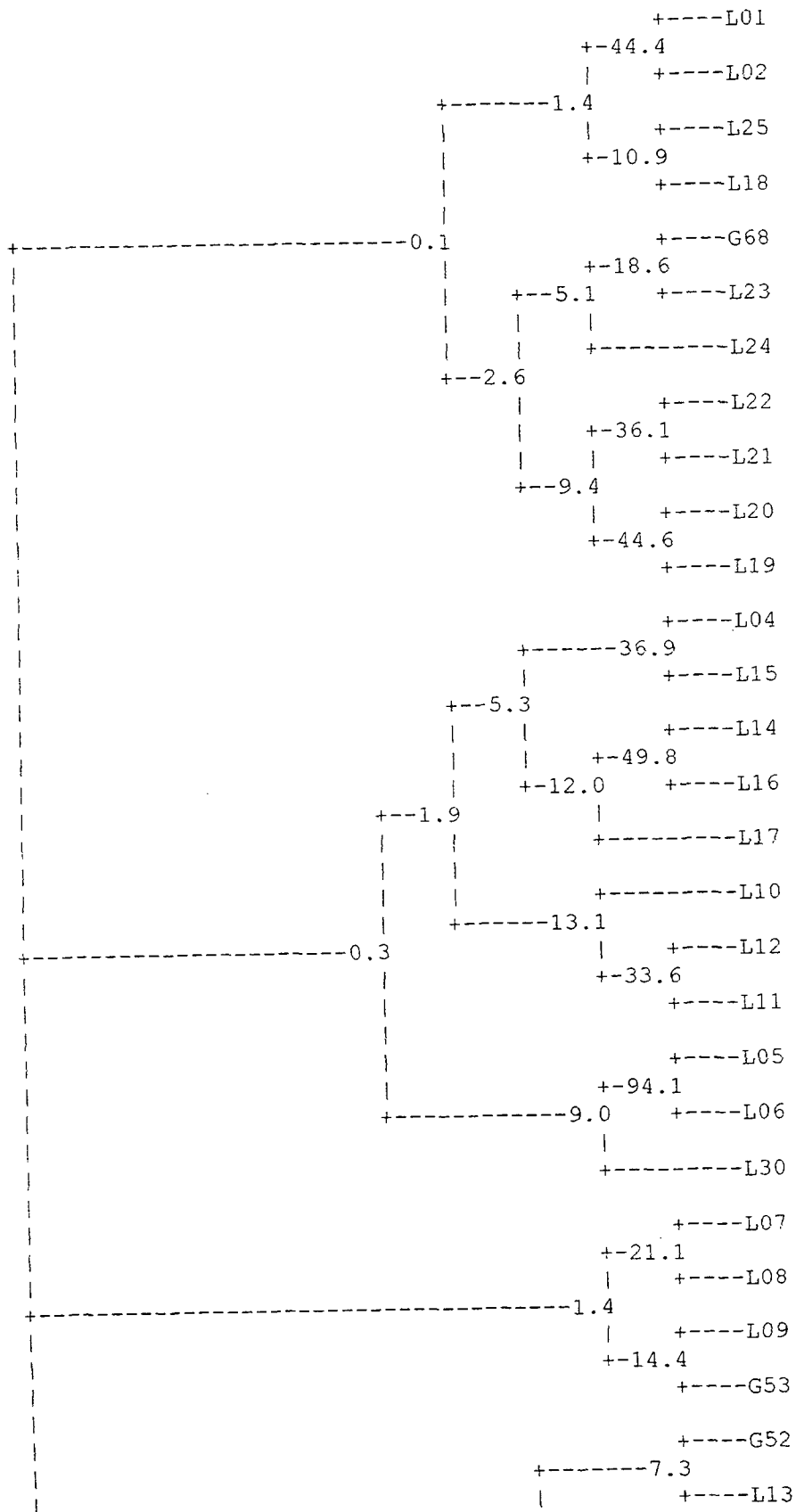
- Foram analisados 52 fragmentos de RAPD com tamanhos que variaram de 500 a 3000 pares de base. O número de bandas geradas por *primer* variou de 05 a 10, com um média de 7,42 por *primer*. Dentre as bandas apresentadas, 44 foram polimórficas para a espécie.
- No dendrograma montado com as distâncias genéticas utilizando índice de Jaccard, formou-se quatro grupos distintos. O coeficiente de similaridade, entre o primeiro grupamento e os demais, foi de 40%. Os grupos formados foram dois para a região Lapa e dois para Guarapuava. Eles estão arranjados de acordo com as características geológicas e classes de solos em que os indivíduos se encontram.
- A população da Lapa mostrou grande divergência. A similaridade entre os dois principais grupos foi de 42%. Os indivíduos mais semelhantes geneticamente alcançaram 85% de similaridade. A variabilidade genética das populações de Guarapuava, quando comparado ao da Lapa, apresentaram uma maior similaridade entre os grupos formados, com o coeficiente de 51% entre os dois grupos principais e o máximo de 96% entre genótipos mais semelhantes.
- Estratégias para conservação genética em *Maytenus ilicifolia* devem ser estruturadas de acordo com os parâmetros ecogeográficos, e, portanto, as coletas realizadas em

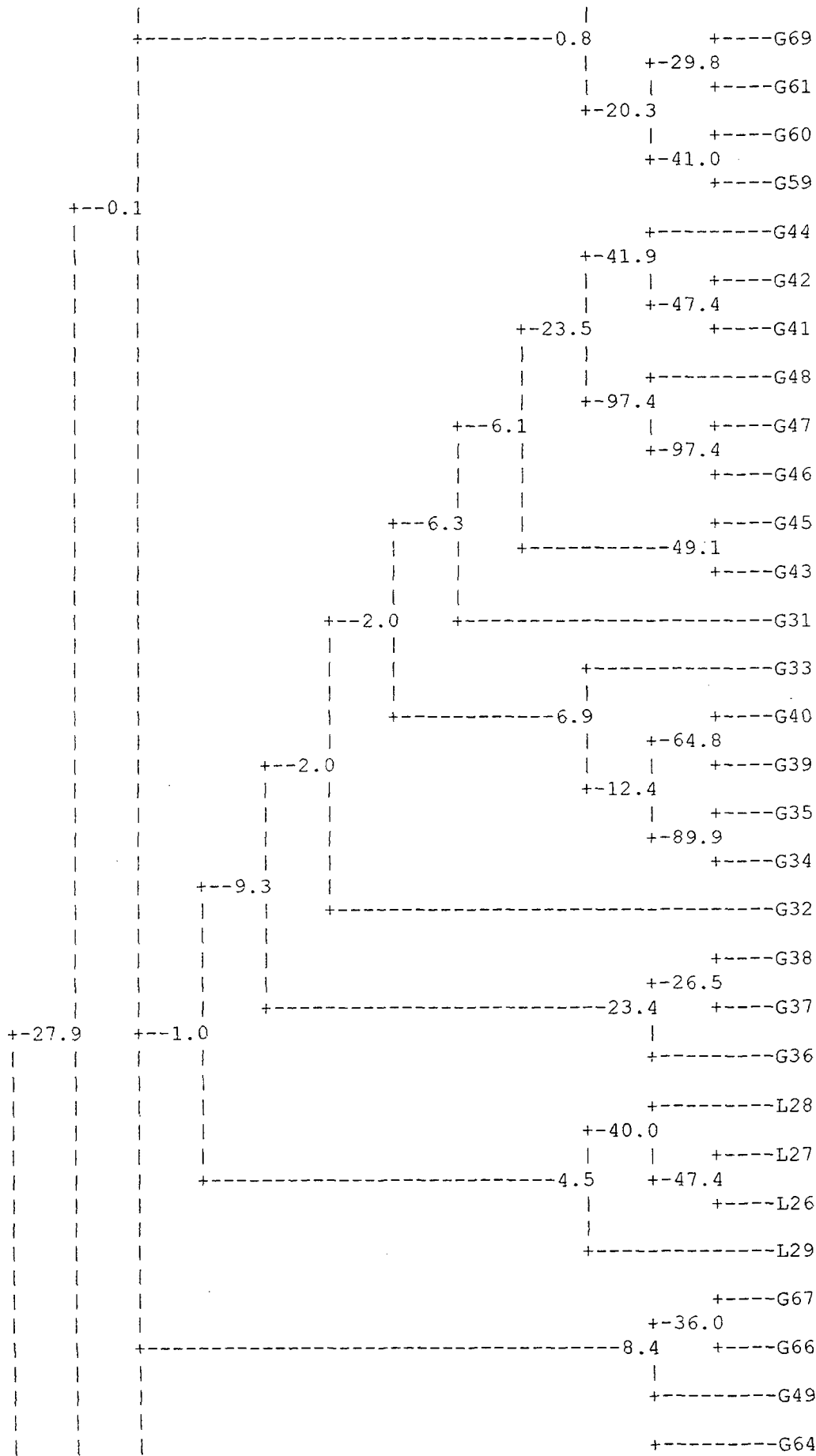
cada uma das compartimentalizações ambientais locais em que os indivíduos se encontram.

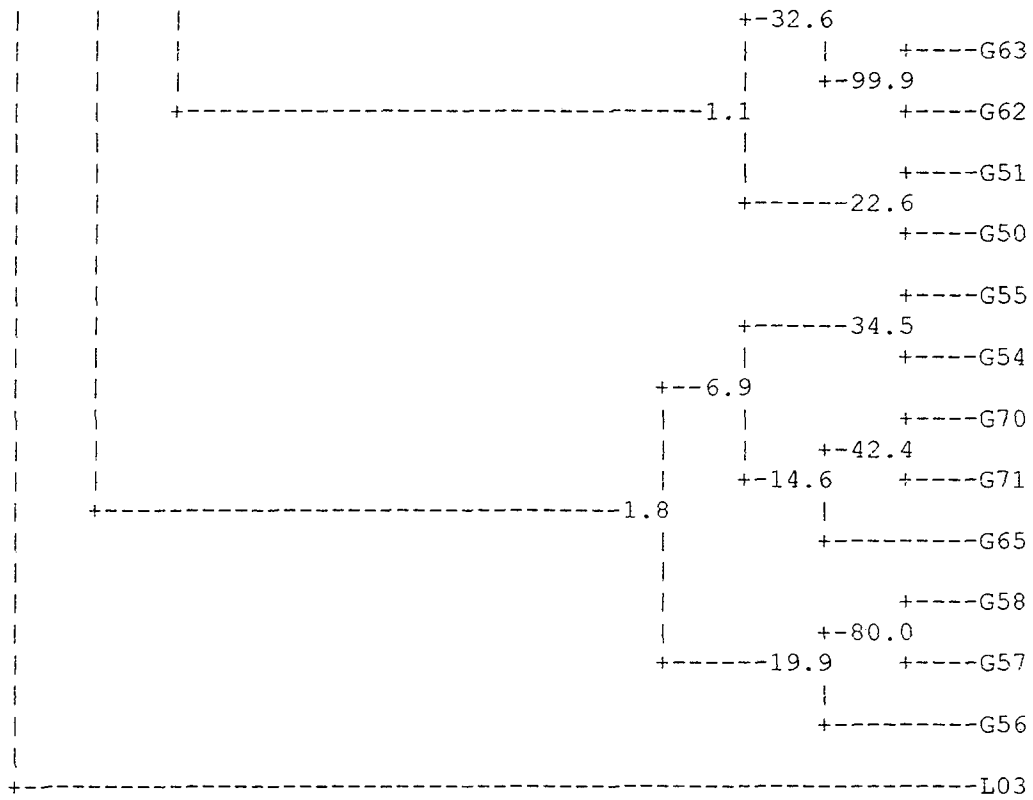
- As informações geradas neste estudo fornecem indicativos para o manejo sustentável deste recurso, considerando a estrutura da variabilidade genética. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, na população genotipada da Reserva Indígena de Marrecas indica-se preferencialmente a seleção de árvores matriz em duas áreas, uma localizada sobre o Afloramento de Rocha e a outra sobre os Cambissolos.

ANEXO

Consistência entre os indivíduos de *Maytenus ilicifolia* obtidas pela análise *Bootstrap*.







## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALLARD, R.W.; KAHLER, A.L.; WIER, B.S. The effect of selection on esterase allozymes in a barley population. **Genetics**, [S.l.] v. 73, p. 489-503, 1972.
- 2 ARNOLD, M.L. EMMS, S.K. Molecular markers, gene flow, and natural selection. In: SOLTIS, D.; SOLTIS, P.; DOYLE, J. (Eds.). **Molecular systematics of plants II: DNA Sequencing**. New York: Kluwer Academic, 1998. p. 442-458.
- 3 BARNES, B.V.; ZAK, D.R.; DENTON, S. R.; SPURR, S. H. **Forest ecology**. 4ed. New York. J. Wiley & Sons, 1998. 753p.
- 4 BERNARDI, H.H.; WASICKY, M. **Algumas pesquisas sobre a “Espinheira Santa” ou “Cancerosa” *Maytenus ilicifolia* Martius, usada como remédio popular no Rio Grande do Sul**. Santa Maria: URGs, 1959. 46 p.
- 5 BRADSHAW, A.D.; Ecological significance of genetic variation between populations. In: DIRZO, R; SARUKHAN, J. (Eds.). **Perspectives on plant population ecology**. Sunderland: Sinauer, 1984. p. 230-244
- 6 CALHEIROS, M.B.P.; FORD-LLOYD, B. Preliminary evaluation of potencial of RAPD markers for the study of diversity in brazilian medicinal plants. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS (Campinas). **Anais**. Campinas: IAC, EMBRAPA/CENARGEN, 1997. p. 96.
- 7 CARLINI, E.A. (Coord.). **Estudo da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-santa) e outras**. Brasília: CEME/AFIP, 1988. 87 p.
- 8 CARVALHO –OKANO, R. M. **Estudos taxonômico do gênero *Maytenus* MOL. Emend. Mol. (CELASTRACEAE) do Brasil extra-amazônico**. Campinas: 1992, Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Setor de Ciências, Universidade de Campinas. 253f.
- 9 CERVI, A.C.; PACIORNIK, E.F.; VIEIRA, R.F.; MARQUES, L.C. Espécies vegetais de um remanescente de Floresta de Araucária (Curitiba-Brasil): estudo preliminar I. **Acta Biolo. Par.**, Curitiba, v. 18, n. 1-4, p. 73-114, 1989.

- 10 CLEGG, M. T. Molecular evaluation of plant genetic resources. In: GUSTAFSON, P.; APPELS, R.; RAVEN, P (Eds.). **Gene conservation and exploitation**. New York: 1991. p. 67-86.
- 11 CLEMENT, C.R. 1492 and the loss of Amazonian Crop Genetic Resources. I. The relation between domestication and human population decline. **Economy Botany**, New York: Botanical Garden, v. 53 n. 2, p. 188-202. 1999.
- 12 COELHO, C.M. In situ conservation and intellectual property rights. In: BRUSH, S.B. (Ed.). **Genes in the field: on-farm conservation of crop diversity**. Canadá: IDR/IPGRI/Lewis, 1999. p.239-260.
- 13 CONSELHO REGIONAL DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - CREA. **Ervas que dão lucro**. Revista CREA/PR, Curitiba, Jan./Fev., 1999. p. 8-9.
- 14 CORREA JÚNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba: EMATER-PR, 1991. 151p
- 15 CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York,: Columbia University Press, 1981.
- 16 DAY, P. R. The exploitation of genetic resource In: GUSTAFSON, P.; APPELS, R.; RAVEN, P (Ed.) **Gene conservation and exploitation**. New York: 1991. p. 53-66.
- 17 ELISABETSKY, E. (1991). Plantas Mediciniais. In: SEMINÁRIO ALTERNATIVAS ECONÔMICAS PARA RESERVAS EXTRATIVISTAS. **Anais**. Acre: Fundação Konrad Adenauer, 1991. p.42-52.
- 18 ENGELS, J.M.M.; ARORA, R.K.; GUARINO, L. An introduction to plant germplasm exploration and collecting: planning, methods and procedures follow-up. In: GUARINO, L.; RAO, V.R.; REID, R. (Eds.). **Collecting plant genetic diversity technical guidelines**. Wallingford Oxon: Cab **International**, 1995. p. 31-63
- 19 FERREIRA , M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1995. p. 220.
- 20 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Animal genetic resources information**. Rome, 1984. 56p

- 21 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Conservation of genetics resources in tropical forest management : principles and concepts.** Rome, 1993. 86p.
- 22 FELSENSTEIN, J. **PHYLIP** (phylogeny Inference Package) version 3.5c. Washington. Seattle Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, 1993.
- 23 FRANÇA, S. de C.; PEREIRA, A. M. S.. Espinheira-santa: do estudo a viabilização de um fitoterápico brasileiro contra úlcera gástrica. **Revista Racine**, São Paulo, set./out./nov., p. 67-69, 1997.
- 24 FRANCO, S.L. **Maytenus ilicifolia ex. Reiss. Celastraceae: proposta tecnológica de macerados.** Porto Alegre, 1990. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 153 f.
- 25 FRANKEL, O.H.; SOULE, M.E. **Conservation and evolution.** Cambridge: Cambridge University Press. 1981. 327p.
- 26 GAUER, L. **Variabilidade genética em populações naturais de erva-mate usando marcadores RAPD.** Porto Alegre, 1999. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 80f.
- 27 HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COS, C.M.; CHAMBERS, S.M.; THOMAS, W.L. (Eds.). **Genetic and conservation.** Menlo Park: Cummings, 1983. p. 234-265.
- 28 HEYWOOD, H.V. Broadening the basis of plant resource conservation. In: GUSTAFSON, P.; APPELS, R.; RAVEN, P (Ed.) **Gene conservation and exploitation.** New York, 1991. p. 1-15.
- 29 IBGE. **Geografia do Brasil: região Sul.** Rio de Janeiro, 1990. 420 p.
- 30 INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE - IPGRI. **Diversity for development.** Rome: FAO, 1993. 62p.
- 31 IPARDES. **Base de dados do Estado.** Curitiba: BDE/SEEPLAN, 1993.



- 32 ITCF. **Plano de Manejo**: Parque Estadual de Caxambu, Castro, PR. Curitiba, ITCF, 1985. 126p.
- 33 IWASAKI, C. **Caracterização morfo-anatômica das folhas utilizadas em fitoterapia de três plantas medicinais nativa**. Curitiba, 1999. Monografia (Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná. 40 f.
- 34 JAIN, S.K.. Estimation of outcrossing rates: some alternative procedures. **Crop Science**, [S.l.], v. 19, p. 23-26, 1979.
- 35 KIDWELL, M.E.; OSBORN, T. C. Simple plant DNA isolation procedures. In: BECKMANN, J.S.; OSBORN, T. C. (Eds.). **Plant Genomes: methods for genetic and physical mapping**. London: Kluwer, 1992.
- 36 KLEIN, R.M. **Espécies raras ou ameaçadas de extinção**: Estado de Santa Catarina. Rio de Janeiro: IBGE/Diretoria de Geociências, 1990.
- 37 KLEIN, R.M. Árvores nativas da Mata Pluvial da costa Atlântica de Santa Catarina. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO (1968: Curitiba). **Anais**. Curitiba: Associação Paranaense de Engenheiros Florestais, 1968. p. 65-103.
- 38 LIBBY, W.J. Use of genetic variation for breeding forest trees. In: STALKER, H.T.. MURPHY, J.P. (Eds) **Plant Breeding in the 1990s**. North Carolina: CAB International, 1991. p. 101-118.
- 39 LIMA, A.G.; COELHO, J.S.B.; MARTINS, D.G.; LACERDA, A.L.; MACIEL, G.M. Substância antimicrobiana de plantas superiores. **Rev. Instituto Antibióticos**, [S.l.], v. 9, n.1/2, p.17-25, 1969.
- 40 MARCON, G. **Estrutura genética de populações de *Stylosanthes humilis* H.B.K. (Leguminosae) de três regiões ecogeográficas do estado de Pernambuco**. Piracicaba: 1988. Tese (Doutorado em Genética Vegetal) Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”. 179f.
- 41 MAZZA, M.C.M. Use of RAPD markers in the study of genetic diversity of *Araucaria angustifolia* (Bert) populations in Brazil. In: **Recent advances in biotechnology for tree conservation and management**. Switzerland: International Foundation for Science, 1998.

- 42 McNEELY, J.A.; MILLER, K.R.; REID, W.; MITTERMEIR, R..A.; WERNER, T.B. **Conserving the world's biological diversity**. Gland: Switzerland: IUCN/WRI/CI/WWF-US/ World Bank, 1990. 193 p.
- 43 MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings National Academy Science**, [S.l.], n. 88, p.9828-9832, 1991.
- 44 MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Milach. 1998, 141p.
- 45 MITTON, J.B.; LINHART, Y.B.; STURGEON, K.B.; HAMRICK, J.L. Allozyme polymorphism detected in mature needle tissue of Poderosa pine. **Journal of Heredity**, [S.l.], v. 70, n. 2, p. 86-89, 1979.
- 46 MONTANARI, I. Aspectos do cultivo comercial de Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss.). **Boletim AgroEcológico**, Botucatu, n. 10. p. 19, Fev. 1999.
- 47 PEREIRA, A.M.S. Micropropagação de maytenus aquifolium Mart e Maytenus ilicifolia Mart. (Espinheira-santa). In: MING, L.C. (Coord). **Plantas medicinais aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: UNESP, 1998. p. 19-32.
- 48 RADOMSKI, M. I. **Caracterização ecológica e fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em populações nativas no município da Lapa - Paraná**. Curitiba, 1998. Dissertação (Ciência do Solo) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. 98 f.
- 49 REIS, A. **Manejo e conservação das florestas catarinenses**. Florianópolis, 1993. Tese (Professor Titular) - Universidade Federal de Santa Catarina. 137 f.
- 50 ROHLF, F.J. NTSYS-PC - **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Exeter, 1988.
- 51 ROSA, S.G.T. da. **Caracterização das sementes de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss, Espinheira Santa, e viabilidade de sua propagação sexuada**. Porto Alegre, 1994. 106 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 106 f.

- 52 SAIKI, R.K.; SCHARF, S.J.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H. A. ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, [S.l.] v. 230, p. 1350-1354, 1985.
- 53 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2<sup>a</sup>ed. CSH Press, 1989.
- 54 SNEATH, P. H.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1973, 573p.
- 55 SCHEFFER, M.C.; ARAUJO, A.J. de ; SANTOS, E.P. dos. Estudo da variação em populações e progênes de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) – resultados preliminares. In: **INTERNATIONAL CONGRESS AND EXHIBITION ON FOREST (5: 1999, Curitiba)**. Rio de Janeiro: BIOSFERA, 1999. 1 CD Rom
- 56 SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE / DEUTSHE GESELLSCHAFT FUR TECHNISCHE ZUSAMMERNARBEIT. **Lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção do Estado do Paraná**. Curitiba, SEMA/GTZ, 1995. p. 139
- 57 SOCIEDADE DE PESQUISA EM VIDA SELVAGEM - SPVS. **Manual para recuperação de reserva florestal legal**. Curitiba: FNMA, 1996. 42 p.
- 58 SOLBRIDG, O.T. Genetic structure of plant populations. In: SOLBRIDG, O.T. (Ed.). **Demography and evolution in plant populations**. Berkeley: University of California Press, 1980, p. 49-64.
- 59 TABARELLI, M.; VILLANI, J. P.; MANTOVANI, W.. Estrutura e composição florística e dinamismo de uma floresta secundária na encosta atlântica – SP. CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO (1°. 1993: Curitiba); CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO (7°. 1993: Curitiba) **Anais**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1993. p. 340-343.
- 60 TREIN, E. **Geologia da folha de Contenda – PR**. Curitiba: Editora da UFPR, 1967. (Boletim Universidade Federal do Paraná – Geologia 27).
- 61 VASCONCELOS, M.J.V. **Avaliação da variabilidade genética de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo uso de marcadores moleculares RAPD**. Viçosa, 1995.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa.  
54 f.

- 62 VILELA-MORALES, E.A.; VALOIS, A.C.C. NASS, L.L. **Recursos genéticos vegetales**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa Cerangen, 1997. 78 p.
- 63 WHITKUS, R. DOEBLEY, J. WENDEL, J. F. Nuclear DNA markers in systematics and evolution. In: PHILLIPS R. L. and. VASIL, I. K. (Eds.). **DNA-Based Markers in Plants**. 1994. p. 116-141.
- 64 WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALKY, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p.6531-6535, 1990.
- 65 WILLIAMS, J. T. Scientific issues affecting gene conservation and exploitation of some tropical perennials. In: GUSTAFSON, P.; APPELS, R.; RAVEN, P (Eds.). **Gene conservation and exploitation**. New York, 1991. p. 15-28.
- 66 WILLIS, J.L. **A dictionary of the flowering plants and ferns**. 8. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1981.
- 67 WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR based methods to plant systematic and evolutionary biology. In: SOLTIS D.; SOLTIS, P.; DOYLE, J. (Eds.). **Molecular systematic of plants II: DNA Sequencing**. New York: Kluwer Academic, 1998. p.43-86.
- 68 YAP, I.V.; NELSON, R.J. Winboot: **A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendograms**. IRRJ discussion paper n.14,1996. 22p.