

MÁRCIA VAZ RIBEIRO

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA
DE ACESSOS DE ESPINHEIRA-SANTA (*Maytenus ilicifolia*) COLETADOS
NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Ciências (M.Sc.).

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Co-orientadores: Prof. Dr. José Antonio Peters

Prof. Dr. Valmor João Bianchi

Pelotas, 2008

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB-10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

R484e

Ribeiro, Márcia Vaz

Estabelecimento *in vitro* e análise da variabilidade genética de acessos de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) coletados no Rio Grande do Sul / Márcia Vaz Ribeiro; orientadora Eugenia Jacira Bolacel Braga; co-orientadores José Antonio Peters e Valmor João Bianchi. – Pelotas, 2008. – 42f. ; il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Área de concentração: Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2008.

1. Espinheira-santa. 2. *Maytenus ilicifolia*. 3. Plantas medicinais. 4. Cultivo *in vitro*. 5. Similaridade genética. 6. AFLP. 7. Polimorfismo. I. Peters, José Antonio. II. Bianchi, Valmor João. III. Título.

CDD: 633.883271

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA
DE ACESSOS DE ESPINHEIRA-SANTA (*Maytenus ilicifolia*) COLETADOS NO
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Ciências (M.Sc.).

APROVADA: 08 de julho de 2008

Dr^a. Rosa Lia Barbieri

Dr. Márcio Paim Mariot

Prof^a.Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga
(Orientadora)

Aos meus pais Joaquim e Lourdes

Ao meu marido Clóvis e minha filha Guilhermina

A minha vó Edi (*in memoriam*)

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), através do Departamento de Botânica e do Curso Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade e estrutura física para a realização deste trabalho.

A Prof^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga pela amizade, carinho, dedicação, ensinamentos e apoio em todas as etapas do trabalho, bem como aos co-orientadores Prof. José Antonio Peters e Prof. Valmor João Bianchi, meus sinceros agradecimentos.

À Embrapa Clima Temperado através da pesquisadora Rosa Lia Barbieri pelo fornecimento das sementes do banco de germoplasma, bem como o material vegetal para as análises moleculares.

Ao professor Márcio Paim Mariot por ter iniciado o projeto através de suas coletas e o fornecimento dos dados para a realização deste trabalho.

A esta força superior que nos rege, que através de meus pais Joaquim e Lourdes me proporcionaram a vida e com ela todas as etapas e obstáculos ultrapassados para resultarem no que sou hoje.

A minha família e principalmente meu marido Clóvis, minha filha Guilhermina por todo o apoio e compreensão proporcionados nas horas mais difíceis.

Aos meus irmãos Roberto, Paulo, Vinícius, Ricardo, Eduardo, Gustavo, Janaína, Joaquim e Guilherme pelas horas de alegria e divertimento.

A todos os funcionários pela amizade nestes longos anos de convivência e em especial a Suzi Braga pelo carinho das palavras.

Aos colegas e amigos do LCTP por estes anos de convivência e pela colaboração prestada, em especial Alexandre de Carvalho, Aniheb Prestes Vieira, Daiane de Pinho, Isabel Corrêa da Silva Rodrigues, Juliana Magalhães Bandeira, Letícia Carvalho Benitez, Monalize Mota e Simone Pohl.

ÍNDICE

SUMÁRIO.....	vii
SUMMARY.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> de sementes de <i>M. ilicifolia</i>	9
3.2 Regeneração <i>in vitro</i> de partes aéreas de <i>M. ilicifolia</i>	10
3.3 Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>M. ilicifolia</i>	12
3.4 Estabelecimento <i>in vitro</i> de sementes de <i>M. ilicifolia</i> em diferentes substratos.....	12
3.5 Análise da variabilidade genética de acessos de <i>M. ilicifolia</i> coletados no Rio Grande do Sul.....	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> de sementes de <i>M. ilicifolia</i>	17
4.2 Estabelecimento <i>in vitro</i> de sementes de <i>M. ilicifolia</i> em diferentes substratos.....	18
4.3 Análise da variabilidade genética de acessos de <i>M. ilicifolia</i> coletados no Rio Grande do Sul.....	21
5 CONCLUSÕES.....	31
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
7 APÊNDICES.....	39

SUMÁRIO

RIBEIRO, Márcia Vaz, M.Sc. Universidade Federal de Pelotas, julho de 2008. **Estabelecimento *in vitro* e análise da variabilidade genética de acessos de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) coletados no estado do Rio Grande do Sul.** Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga. Co-orientadores: Prof. Dr. José Antonio Peters e Prof. Dr. Valmor João Bianchi.

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reis., popularmente conhecida como espinheira-santa, é uma espécie autóctone pertencente à família Celastraceae que apresenta alto valor medicinal para o tratamento de úlceras, gastrites crônicas, dispepsias e indigestão. Devido a sua importância medicinal, houve um aumento no extrativismo em populações naturais, tornando-a prioritária para a conservação, a fim de evitar o risco de erosão genética. A cultura de tecidos tem importante papel por proporcionar produção massiva de plantas, livres de agentes patogênicos e geneticamente uniformes, sendo o estabelecimento *in vitro* a primeira fase do processo de micropropagação, onde o material vegetal utilizado pode variar de acordo com a finalidade do estudo. Estudos evidenciam que o fluxo gênico por sementes ou dispersão de grãos de pólen, bem como o ambiente, principalmente o habitat, tem o potencial de aumentar a variabilidade genética de populações de uma mesma localidade. O objetivo deste trabalho foi estabelecer e avaliar a capacidade de multiplicação *in vitro* de plântulas de *M. ilicifolia*, bem como, analisar a variabilidade genética de 20 acessos coletados em diferentes localidades no estado do Rio Grande do Sul, através da técnica AFLP. Para o estabelecimento *in vitro*, sementes previamente desinfestadas foram inoculadas em três meios diferentes: MS; MS + Carvão Ativado (1g L⁻¹) e MS + Vermiculita. As variáveis analisadas foram altura das plântulas e comprimento de raiz. Para a

análise molecular foram testadas oito combinações de *primers* AFLP. Os valores de similaridade genética foram calculados pelo *Simple-matching coefficient* e utilizados para gerar o dendrograma de similaridade pelo método UPGMA. As variáveis analisadas apresentaram diferença significativa, onde as maiores médias para altura das plântulas (5,06 cm) e comprimento de raiz (3,4 cm), foram obtidas no meio MS acrescido de Vermiculita. Observou-se que o aspecto morfológico das raízes deve ser considerado, pois as raízes das plântulas germinadas em meio MS apresentaram-se bastante fibrosas e com ausência de pêlos radiculares, diferentemente das plântulas germinadas em meio MS + Vermiculita, onde apresentaram raízes adequadas para a absorção de nutrientes do meio de cultura. As oito combinações de *primers* geraram 455 perfis eletroforéticos, com 100% de polimorfismo. Os *primers* E-ACC/M-CAA, E-ACG/M-CTA, E-ACG/M-CTC apresentaram o maior número de perfis eletroforéticos, 71 cada, totalizando 46,80% do polimorfismo total. Na análise do dendrograma foi observado um alto coeficiente de correlação ($r = 0,94$), demonstrando elevada representatividade dos dados de similaridade genética e os de agrupamento. Pela AMOVA verificou-se que 89,33% da variabilidade total ocorreu entre indivíduos da mesma população. Com base no exposto conclui-se que o meio mais adequado para o estabelecimento *in vitro* é o meio MS acrescido de Vermiculita e marcadores moleculares tipo AFLP permitem a caracterização e a estimativa da variabilidade genética de populações de *M. ilicifolia*.

SUMMARY

RIBEIRO, Márcia Vaz, M.Sc. Universidade Federal de Pelotas, 2008 July. ***In vitro* establishment and analysis of genetic variability of *Maytenus ilicifolia* accessions collected at Rio Grande do Sul State, Brazil.** Adviser: Prof. Dr. Eugenia Jacira Bolacel Braga. Co-advisers: Dr. José Antonio Peters and Dr. Valmor João Bianchi.

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reis., popularly known as espinheira-santa, is an autochthonous specie belonging to Celastraceae family. Presents high medicinal value for treatment of ulcers, chronicle gastritis, dyspepsia and indigestion. Due its medicinal importance, have been an increase of extractivism in natural populations. So, this specie is priority for conservation, to avoid the risk of genetic erosion. The tissue culture is important because allows massive production of plants free from pathogenic agents and genetically uniforms. The *in vitro* establishment is the first phase of the micro propagation process, where the plant material used can vary according to the finality of the work. Studies evidence that genetic flux by seeds or pollen grains, and also the environment, mainly the habitats, has the potential to improve the genetic variability of populations from one locality. The objective of this work was to establish and evaluate the capacity of *in vitro* multiplication of *M. ilicifolia* plantlet, and also analyze by AFLP the genetic variability of 20 accessions collected in different localities from Rio Grande do Sul State. For the *in vitro* establishment previously disinfected seeds were inoculated in three different media: MS; MS + Active Coal (1g L⁻¹) and MS + Vermiculite. The variables analyzed were plantlet height and root length. For the molecular analysis it was tested eight primers combinations. Values of genetic similarities were calculated by *Simple-matching coefficient* and used to generate a similarity dendrograma by UPGMA method. The analyzed variables showed significant differences. The greater media for plantlet height (5.06 cm) and root

length (3.4 cm) were obtained in the MS medium with Vermiculite. The morphological aspect of the roots must be considered, because the roots from plantlets germinated in MS medium was very fibrous and without root hairs, differently from plantlets germinated the MS medium + Vermiculite, were presented roots adequate for absorption of nutrients from the medium culture. The eight primers generate 455 eletrophoretical profiles, obtaining 100% of polymorphism. The primers E-ACC/M-CAA, E-ACG/M-CTA and E-ACG/M-CTC presented the greater number of eletrophoretical profile, 71 each, totalizing 46.80% of the total polymorphism. Dendrograma analysis showed a high coefficient of correlation ($r = 0.94$), demonstrating high representativity from the data of genetic similarity and those of groupings. By AMOVA it was verified that 89.33% of the total variability happened among individuals from the same population. Based on the discussed can be concluded that the more adequate medium for the in vitro establishment is the MS medium added of Vermiculite and AFLP molecular markers allow the characterization and genetic variability estimative of *M. ilicifolia* populations.

1 INTRODUÇÃO

O uso de espécies vegetais com fins de tratamento, cura de doenças e sintomas remontam ao início da civilização, determinando um acúmulo secular de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais por diversos grupos étnicos (Di STASI, 1996; SIMÕES et al., 1998).

Entre as espécies medicinais nativas do Brasil destaca-se a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.), pelo seu potencial no tratamento de úlcera gástrica e gastrite, comprovadas por pesquisas coordenadas pelo CEME (Central de Medicamentos) do Ministério da Saúde (CARLINI, 1988) e ainda por apresentar propriedades analgésicas, anti-sépticas e cicatrizantes (ALMEIDA, 1993; CARVALHO, 2005).

A forte ação antrópica a que a espinheira-santa vem sendo submetida e a carência de informações com relação à caracterização de germoplasma tem levado a uma perda de material vegetal e por conseqüência perda da variabilidade genética desta espécie (MARIOT, 2005). Este fato resultou na entrada desta planta à lista de espécies ameaçadas de extinção da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) como uma das espécies prioritárias para estudo e conservação na América do Sul (MOSSI, 2003).

Um das maneiras de tentar reduzir os danos causados pelo extrativismo, desta espécie, seria a conservação *in situ* e *ex situ* (através de bancos de germoplasma) e de técnicas de produção de plantas em larga escala. Uma das técnicas que pode ser utilizada é a cultura de tecidos de plantas, através da micropropagação. No entanto, este estudo em relação à espinheira-santa é escasso na bibliografia (ABREU et al., 2003).

Os principais benefícios da aplicação de técnicas de micropropagação de plantas medicinais são: a possibilidade de aumento rápido do número de indivíduos geneticamente idênticos a partir de plantas selecionadas; produção de mudas o ano todo com elevada qualidade sanitária e o melhoramento genético por meio de regeneração de plantas *in vitro* (Di STASI, 1996; CORRÊA et al., 1999; SERAFINI; BARROS, 2001).

No sentido de contribuir com os estudos de conservação e preservação da variabilidade genética de espinheira-santa, a Embrapa Clima Temperado criou um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) desta espécie, com acessos oriundos de vários locais do Rio Grande do Sul. Os acessos foram caracterizados através de descritores morfológicos, tanto através das matrizes (MARIOT et al., 2003), quanto das progênies presentes no banco de germoplasma (MARIOT et al., 2004).

A variabilidade genética se constitui na fonte primária dos estudos genéticos e sem ela não seria possível ocorrer adaptações e evolução nas espécies, portanto, o sucesso de qualquer programa de melhoramento depende, fundamentalmente, da variabilidade genética dos progenitores envolvidos, podendo ser gerada por recombinação, mutação e/ou hibridação dos genes (OLIVEIRA et al., 2008).

Estudos sobre a identificação e caracterização da variabilidade genética em plantas concentram-se em vários aspectos, desde características morfofenológicas, bioquímicas e até características em nível de DNA e seus fragmentos, genes mutantes e cromossomos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996; OLIVEIRA et al., 2005). O conjunto de todas essas características que podem demonstrar variações entre espécies e até mesmo dentro da própria espécie é chamado de marcadores genéticos.

Dentro da classe dos marcadores genéticos, os moleculares apresentam vantagens e superam muitos dos limites dos marcadores morfológicos e bioquímicos, pois detectam variação em nível de DNA, são obtidos em grande número além de não sofrerem influências de fatores ambientais e estágio de desenvolvimento da planta (BORÉM, 1998; UPADHYAY et al., 2004).

Diversas técnicas de marcadores moleculares têm sido utilizadas para a análise de variabilidade e diversidade em várias espécies, em diferentes regiões do mundo. Marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length*

Polymorphisms) combinam técnicas de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) e de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), são de caráter dominante e revelam altos níveis de polimorfismo com grande número de marcadores que atuam com precisão em análises de germoplasma. Desta forma, a técnica de AFLP possui vantagens em relação a outras técnicas, como a possibilidade de identificar alto nível de polimorfismo e pela sua alta reprodutibilidade (JONES et al., 1997; TANG et al., 2003; YANG et al., 2005).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer e avaliar a capacidade de multiplicação *in vitro* de plântulas de *M. ilicifolia*, bem como analisar a variabilidade genética de 20 acessos coletados em diferentes localidades no estado do Rio Grande do Sul.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil possui uma biodiversidade vegetal que proporciona uma posição de destaque em relação à diversidade de espécies nativas com potencial medicinal (VIEIRA, 1999). Muitos centros de pesquisa no Brasil e no Exterior vêm desenvolvendo estudos sobre as propriedades farmacológicas das plantas medicinais, chegando a resultados bastante promissores.

No Brasil, 20% da população são responsáveis por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis, o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos. Várias espécies são nativas e têm sido largamente exploradas para serem empregadas pela população, algumas com estudo químico e/ou farmacológicos. Entre as principais, pode-se citar o guaco (*Mikania* spp.), a embaúba (*Cecropia* spp.), o maracujazeiro (*Passiflora* spp.), a carqueja (*Baccharis* spp.), a pata-de-vaca (*Bauhinia* spp.), a espinheira-santa (*Maytenus* spp.) e muitas outras (REIS; MARIOT, 2002).

Dentre as espécies de uso medicinal, *M. ilicifolia*, pertencente à família Celastraceae, é uma espécie autócone do Brasil, com maior ocorrência nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (MARIOT; BARBIERI, 2007). Foi descrita morfológicamente por Carvalho-Okano (1992) e apresenta uma taxa de fecundação cruzada de 99,6%, sendo classificada como uma espécie alógama (SCHEFFER, 2001).

Entre os metabólitos secundários que estão associados à ação farmacológica em *M. ilicifolia*, destacam-se os triterpenos, os taninos e os flavonóides (MARIOT; BARBIERI, 2007).

A grande maioria das plantas medicinais é coletada em habitat natural e por maior que seja o número de indivíduos numa localidade não são suficientes para atender uma demanda constante e ininterrupta, principalmente quando a espécie tem multiusos. Apenas o cultivo sistematizado pode garantir produção regular e em larga escala (PEREIRA et al., 1995).

Na década de 90, *M. ilicifolia* foi alvo de biopirataria, tendo seu extrato patenteado por uma empresa japonesa, logo após as primeiras publicações que comprovaram a eficiência da planta contra gastrite e úlcera gástrica em pesquisa realizada no Brasil (CARVALHO, 2005).

A cultura de tecidos já vem sendo utilizada para multiplicar centenas de espécies medicinais. Essa técnica é usada rotineiramente para multiplicar genótipos selecionados, ou para substituir acessos que tenham adquirido caracteres indesejáveis como baixa produtividade e susceptibilidade às doenças. A alta quantidade de plantas oriundas de genótipos selecionados poderia ser uma alternativa para reduzir o número de plantas retiradas do ambiente natural (VIEIRA, 2002).

Uma importante aplicabilidade da cultura de tecidos é a conservação de germoplasma *in vitro*. Segundo Villalobos; Engelmann (1995) de todo material vegetal do mundo conservados em coleções *ex situ*, as plantas medicinais representam apenas 0,07%. As coleções *in vitro*, além de conservarem acessos que sejam representativos da diversidade genética das populações naturais, permitem fornecer um fluxo constante de explantes e plântulas com excelentes condições fitossanitárias.

Protocolos de micropropagação das espécies *Maytenus aquifolium* e *M. ilicifolia*, que também apresentam quimio e morfotipos, foram desenvolvidos, visando o cultivo em larga escala, onde plantas micropropagadas apresentaram a mesma produtividade em fitomassa e o mesmo perfil químico das matrizes doadoras de explantes (PEREIRA et al., 1994; PEREIRA et al., 1995). A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* parece estar associada não apenas ao genótipo, mas à atividade fisiológica na planta matriz e sob o controle de diversos fatores endógenos (CALDAS et al., 1998; HU; FERREIRA, 1998).

Atualmente, é crescente a preocupação com o conhecimento de nossa biodiversidade no que diz respeito a sua variabilidade genética, principalmente

em função do crescente aumento da erosão dos recursos genéticos (EHRlich, 1997). A avaliação da diversidade genética constitui uma importante ferramenta que permite desde a descrição de espécies, bem como a separação de populações divergentes tanto com interesse agrônômico, ecológico e/ou medicinal (CARPENTIERI-PIPOLO et al., 2000; AARES et al., 2000).

A correlação entre os níveis de diversidade genética intra e inter-populacional em comunidades vegetais, são raramente investigados, pois tais correlações podem demonstrar o efeito da diversidade genética nas populações em uma determinada localidade, através das forças de seleção que atuam nas diferentes comunidades (ODAT et al., 2004). A presença de variabilidade genética dentro da espécie é que possibilita a adaptação às mudanças ambientais, por isto, a variação genética em populações naturais é importante para identificar seus processos microevolucionários (BITTENCOURT, 2000).

Vários estudos evidenciaram que o fluxo gênico por sementes ou dispersão de grãos de pólen, bem como o ambiente, principalmente o habitat, tem o potencial de aumentar a variabilidade genética de populações de uma mesma localidade (WASER, 1987; GRAM; SORK, 2001; ODAT, 2004). Além da variabilidade de habitat, a diversidade genética em plantas pode ser influenciada por outros processos como tamanho da população e práticas agrícolas (GRAY, 1996; YOUNG et al., 1998).

Os marcadores genéticos têm sido freqüentemente utilizados nos estudos sobre a diversidade, variabilidade e a estrutura genética populacional. A introdução desses marcadores revolucionou a genética de populações na década de 50, com a técnica de isoenzimas, e recentemente tem conseguido enormes avanços com a aplicação de tecnologias baseadas na análise do DNA. Os marcadores moleculares permitiram uma ampla cobertura genômica e tornaram-se poderosas ferramentas para estudos de genética populacional. No início da década de 90, técnicas utilizadas para distinguir cultivares ao nível de DNA permitiram acessar a variabilidade genética dentro do *pool* gênico de espécies cultivadas, assim como identificar a diversidade disponível em bancos de germoplasma e populações naturais de plantas (SALLA et al., 2002).

Perecin; Kageyama (2002) utilizando marcadores isoenzimáticos estudaram cinco populações nativas de *M. aquifolium* nos estados de São

Paulo e uma de *M. ilicifolia* de Santa Catarina, observando alta variabilidade genética, compatíveis com as encontradas na literatura para plantas de fecundação cruzada e a presença de alelos raros nas populações. A diferenciação entre as populações não mostrou estar relacionada com a distância geográfica, com o tipo de floresta, nem com o nível de ação antrópica.

As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos que correspondem a regiões expressas ou não do genoma. A tecnologia de PCR (reação de polimerização em cadeia) é uma técnica versátil, pois vários tipos de *primers* podem ser utilizados, dependendo do objetivo do estudo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Inúmeras derivações surgiram a partir da descoberta do PCR, entre elas o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), que envolve a amplificação simultânea de vários *loci* anônimos no genoma, utilizando *primers* curtos (oligonucleotídeo de 10 bases) de seqüência arbitrária. Os marcadores RAPD caracterizam-se como dominantes, sendo um alelo de cada loco visualizado (MILACH, 1998).

Bittencourt (2000), estudando duas populações de *M. ilicifolia* no estado do Paraná (Lapa e Guarapuava) com RAPD, analisou 52 fragmentos, com média de 7,42 fragmentos por *primer*, sendo que destes, 44 eram polimórficos. O dendrograma baseado no índice de Jaccard permitiu a separação em quatro grupos, porém com baixos índices de confiança. Os índices de similaridade intrapopulacionais variaram de 42 a 85% para a população de Guarapuava e entre 51 a 96 % para a população da Lapa.

Outra técnica de caráter dominante chamada de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), descrita por Vos et al. (1995), associa os polimorfismos gerados por enzimas de restrição com a capacidade de detecção da técnica de PCR. A técnica de AFLP apresenta vantagens, tais como: ser altamente reproduzível, rápida e confiável e ainda a detecção de maior número de *locus*, cobertura ampla do genoma e baixo custo (KARDOLUS et al., 1998). Marcadores moleculares tipo AFLP possibilitam a estimativa de vários índices genéticos, possibilitando o conhecimento da organização de genomas dentro da população e na caracterização da variabilidade existente entre esses indivíduos.

A análise da variabilidade genética de várias espécies tem sido realizada através de marcadores moleculares tipo AFLP. Goulão et al., (2001) analisaram a similaridade genética entre cultivares de maçãs, Odat et al., (2004), observaram a variabilidade genética entre indivíduos de *Ranunculus acris* L. em função do habitat e Monte-Corvo et al. (2000) estudaram a similaridade genética entre cultivares do gênero *Pyrus*. Todos os autores destacaram a grande capacidade de marcadores AFLP em diferenciar cultivares, mas de mesma espécie, devido ao alto polimorfismo apresentado.

Em recursos genéticos, em que normalmente são caracterizados e conservados muitos acessos, esta ferramenta também se torna bastante útil no sentido de identificar a variabilidade genética do banco de germoplasma, agrupar os acessos mais similares e assim otimizar os trabalhos nas coleções e muitas vezes diminuindo o número de acessos que represente os genes da espécie em estudo (MARIOT, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estabelecimento *in vitro* de sementes de *M. ilicifolia*

Como material vegetal foram utilizadas sementes de espinheira-santa (Figura 1) coletadas no ano de 2003, no município de Canguçu. As mesmas permaneceram armazenadas em câmara fria, na Embrapa Clima Temperado, Pelotas – RS, até serem utilizadas neste estudo.



Figura 1- Sementes de *Maytenus ilicifolia* utilizadas para o estabelecimento *in vitro*.

Para a desinfestação, as sementes foram primeiramente lavadas em água destilada esterilizada com duas gotas de detergente neutro durante 15 minutos sob agitação mecânica. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, foram imersas por 1 minuto em etanol 70% e lavadas com água destilada esterilizada. Na seqüência, as sementes foram submetidas por 20 minutos a hipoclorito de

sódio 2%, sob agitação mecânica. Posteriormente foram lavadas em água destilada esterilizada, secadas em papel filtro e inoculadas em meio de cultura básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo metade da concentração dos sais e de sacarose (15 g L^{-1}), solidificado com 6 g L^{-1} de ágar e sem a presença de reguladores de crescimento (Figura 2).

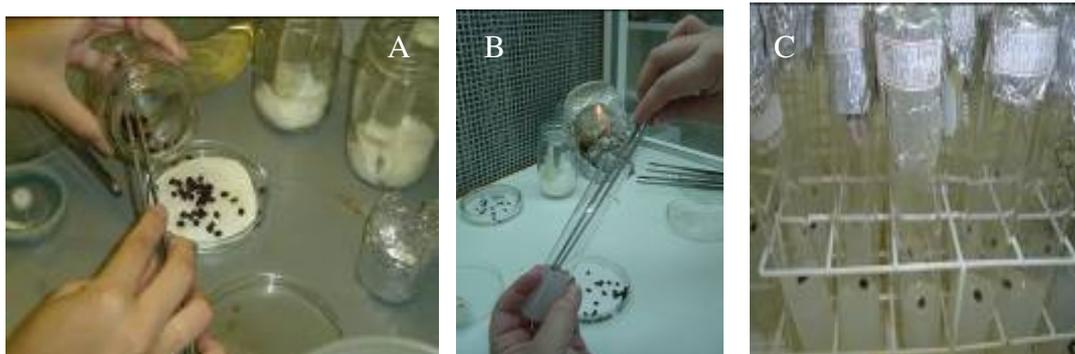


Figura 2- Desinfestação das sementes de *Maytenus ilicifolia* (A), inoculação das mesmas em meio MS/2 (B) e organização dos frascos em sala de crescimento (C).

Foram inoculadas 102 sementes em tubos de ensaio, sendo que metade destas foi mantida em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 horas de fotoperíodo e $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos e a outra metade mantida em câmara escura, na mesma temperatura. Após sete dias foi avaliada a taxa de contaminação e aos trinta e cinco dias a de germinação.

3.2 Regeneração *in vitro* de partes aéreas de *M. ilicifolia*

Foram utilizados como material vegetal, segmentos internodais e foliares oriundos de plantas pré-estabelecidas no experimento anterior.

O meio utilizado foi o MS, suplementado com diferentes combinações de 2,4D (2,4 - Diclorofenoxiacético) e TDZ (Thidiazuron), conforme Tabela 1.

Tabela 1- Combinações de 2,4D e TDZ utilizadas no meio MS para regeneração *in vitro* de *Maytenus ilicifolia*

Tratamentos	2,4D (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)	Tratamentos	2,4D (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)
T1	0	0	T16	0,5	0,75
T2	0	0,25	T17	0,5	1,0
T3	0	0,50	T18	0,5	2,0
T4	0	0,75	T19	0,75	0
T5	0	1,0	T20	0,75	0,25
T6	0	2,0	T21	0,75	0,50
T7	0,25	0	T22	0,75	0,75
T8	0,25	0,25	T23	0,75	1,0
T9	0,25	0,50	T24	0,75	2,0
T10	0,25	0,75	T25	1,0	0
T11	0,25	1,0	T26	1,0	0,25
T12	0,25	2,0	T27	1,0	0,50
T13	0,5	0	T28	1,0	0,75
T14	0,5	0,25	T29	1,0	1,0
T15	0,5	0,50	T30	1,0	2,0

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial 6x5, sendo seis concentrações de 2,4 D e cinco concentrações de TDZ, adicionadas ao meio de cultura totalizando 30 tratamentos. Cada tratamento constou de cinco repetições, sendo cada representada por uma placa de petri contendo dois explantes (um segmento internodal e um segmento foliar), conforme Figura 3. As placas foram mantidas no escuro em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, por um período de 90 dias, sendo que a cada 20 dias, os explantes eram transferidos para meios novos.

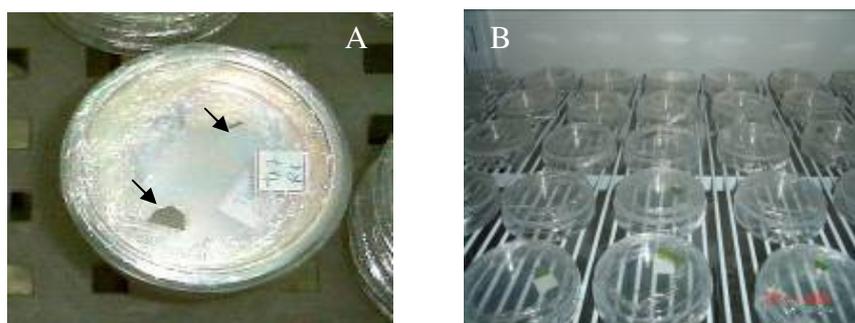


Figura 3- Explantes de *Maytenus ilicifolia* utilizados no experimento de regeneração, segmento foliar e entrenós (A) e distribuição aleatória dos tratamentos em câmara de crescimento com temperatura controlada (B).

3.3 Multiplicação *in vitro* de *M. ilicifolia*

Como explantes, foram utilizados segmentos nodais de aproximadamente 2,0 cm, oriundos das plântulas pré-estabelecidas, conforme item 3.1.

O meio de cultura utilizado foi o WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), acrescido de 15 g L⁻¹ e de diferentes combinações de ANA (Ácido α -naftaleno acético) e BAP (N-6 Benzilaminopurina), conforme Tabela 2. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 \pm 2°C, fotoperíodo de 16 horas, durante 90 dias.

Tabela 2- Combinações de ANA e BAP utilizadas no meio WPM para multiplicação *in vitro* de *Maytenus ilicifolia*

Tratamentos	ANA (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)
T1	0,0	0,0
T2	0,1	0,0
T3	0,2	0,0
T4	0,0	2,0
T5	0,1	2,0
T6	0,2	2,0
T7	0,0	4,0
T8	0,1	4,0
T9	0,2	4,0

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 3x3, sendo três concentrações de ANA e três concentrações de BAP, totalizando nove tratamentos. Cada tratamento constou de cinco repetições, sendo cada representada por um frasco contendo cinco explantes.

3.4 Estabelecimento *in vitro* de sementes de *M. ilicifolia* em diferentes substratos

O processo de desinfestação das sementes de *M. ilicifolia* foi realizado conforme descrito no item 3.1. Posteriormente as sementes foram inoculadas em meio MS semi-sólido (T1), MS semi-sólido adicionado de 1g L⁻¹ de Carvão Ativado (T2) ou em MS líquido adicionado ao frasco contendo vermiculita (T3) (Figura 4).



Figura 4- Vista lateral dos frascos contendo as sementes de *Maytenus ilicifolia* (A) e vista superior da distribuição das sementes nos diferentes substratos (B): Meio MS líquido + Vermiculita; MS semi-sólido + carvão ativado; MS semi-sólido, respectivamente.

Os frascos contendo as sementes permaneceram em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 horas de fotoperíodo e $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, durante 95 dias. As variáveis analisadas foram: altura média das plântulas (cm) e comprimento médio de raiz (cm).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, composto de três tratamentos, com cinco repetições, sendo cada representada por um frasco contendo cinco sementes. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

3.5 Análise da variabilidade genética de acessos de *M. ilicifolia* coletados no Rio Grande do Sul

Foram utilizados 20 genótipos, caracterizados como acessos (Tabela 3), coletados em diferentes localidades do estado do Rio Grande do Sul e catalogados no herbário da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS. A análise

molecular foi realizada a partir de folhas jovens que haviam sido armazenadas a -80°C , no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas-RS.

Tabela 3- Origem dos acessos de *Maytenus ilicifolia* para análise molecular, coletados em seis municípios do estado do Rio Grande do Sul

Acesso	Município	Data coleta
1, 2, 3	Encruzilhada do Sul	23/11/2002
6	Encruzilhada do Sul	23/11/2002
7	Encruzilhada do Sul	23/11/2002
44	Piratini	28/11/2002
47	Piratini	28/11/2002
51	Piratini	28/11/2002
54	Piratini	28/11/2002
64	Candiota	12/12/2002
66	Candiota	12/12/2002
70	Candiota	12/12/2002
74	Candiota	12/12/2002
75	Candiota	12/12/2002
85	Pelotas	18/11/2002
99	Caxias do Sul	09/01/2003
101	Caxias do Sul	09/01/2003
103	Esmeralda	10/01/2003
108	Esmeralda	11/01/2003
111	Esmeralda	11/01/2003

A extração de DNA foi realizada pelo método proposto por Doyle; Doyle (1990), com algumas modificações, onde foram utilizadas 0,15 g de folhas

jóvens maceradas em nitrogênio líquido e adicionados 750 µL de tampão de extração CTAB.

As amostras de DNA foram armazenadas à temperatura de 4°C por 24 horas para posterior quantificação em gel de agarose a 0,8%. A fim de obter melhor qualidade do DNA, foi efetuada uma reextração das amostras e uma diluição equimolar, para a padronização do DNA para uma concentração final de 250 ng µL⁻¹.

Posteriormente as amostras de DNA foram submetidas às etapas padrões do Kit Invitrogen AFLP® Analysis System I. A combinação de *primers* utilizadas, bem como as seqüências dos adaptadores tanto para *EcoRI*, quanto para *MseI* estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4- Seqüência de *primers* AFLP utilizados nas ampliações por PCR de *Maytenus ilicifolia*. Pelotas – RS, 2008

<i>Primers</i> com Adaptadores	Seqüência (5' – 3')
<i>EcoRI</i>	5'-CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA-5'
<i>MseI</i>	5'-GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT-5'
Combinação de <i>Primers</i> (<i>EcoRI</i> + <i>MseI</i>)	E-ACG/M-CTA E-ACA/M-CTA E-ACC/M-CAA E-AGG/M-CAG E-AGC/M-CAG E-ACG/M-CTC E-ACT/M-CTC E-AAC/M-CTA

A reação de PCR ocorreu com as seguintes etapas: um ciclo de 94°C, por 30 segundos, 65°C, por 30 segundos e 72°C, por 1 minuto; durante os 12 ciclos seguintes a temperatura de anelamento diminuía 0,7°C a cada ciclo; os 23 ciclos restantes foram de 94°C, por 30 segundos, 56°C, por 30 segundos e 72°C, por 1 minuto em termociclador PTC-100TM – MJ Research. Após esta etapa, os tubos foram armazenados *overnight* a -20°C. Em cada tubo, foram adicionados 4,0 µL de solução desnaturante (EDTA 10mM, azul de bromofenol

0.05% e xileno-cianol 0.05%) e desnaturadas a 95°C, por 5 min, e em seguida rapidamente resfriadas em gelo.

Foram vertidas 5,0 µL de cada amostra em gel vertical desnaturante de poliacrilamida 6%, sendo utilizado TBE 1X, como tampão de corrida, em cuba de eletroforese vertical TVS 1400 e fonte CONSORT E-832 (3000 V – 150 mA) por 3 horas de corrida, a 1250V. A revelação do gel foi realizada conforme Bassam et al. (1991).

Os fragmentos amplificados foram mensurados para presença (1) ou ausência (0) em cada perfil eletroforético na comparação dos isolados. A partir destes dados foi montada uma matriz com os diferentes acessos. Para a definição dos agrupamentos (similaridade genética), foi utilizado *Simple-matching coefficient* (SOKAL; MICHENER, 1958) utilizando o programa NTSYS-pc. Uma matriz de similaridade entre os perfis foi construída utilizando-se o método de ligação média não-ponderada (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average* – UPGMA) (RHOLF, 2000). A partir da matriz de similaridade, foi computada a estabilidade dos agrupamentos pela análise de *Bootstrap* com 1000 replicações utilizando o programa computacional *Winboot* (YAP; NELSON, 1996) e a análise de coordenada principal proposta por Gower (1966). A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada através do programas Genes (CRUZ, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento *in vitro* de sementes de *M. ilicifolia*

A desinfestação com hipoclorito de sódio na concentração utilizada não foi efetiva, sendo que, 33,33% das sementes mantidas sob luminosidade e 43,14% das mantidas no escuro, apresentaram contaminação tanto por fungo quanto por bactéria (Tabela 5).

Este fato pode ter ocorrido devido a estas sementes terem sido coletadas há cinco anos e também por apresentarem, ainda durante o armazenamento, o mesocarpo do fruto, comumente chamado de arilo, que devido a sua composição auxilia no crescimento de fungos e outros agentes contaminantes.

Diferentemente dos dados encontrados, Kalil Filho (2000), observou que a utilização de hipoclorito de sódio associado ao tempo de desinfestação na presença e ausência de luz foi considerada eficiente, obtendo 100% da capacidade de germinação, mesmo quando as sementes apresentavam 11,8% de contaminação por fungos e bactérias. Os métodos de desinfestação devem ser eficazes, para que a plântula sirva de fonte de explante livre de fungos e bactérias (COUTO et al., 2004).

Em relação à porcentagem de germinação, após 35 dias observou-se que das 29 sementes mantidas no escuro, 26 (89,65%) germinaram e das 34 sementes germinadas no claro, 20 (58,82%) germinaram, conforme pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5- Número de sementes contaminadas e germinadas de *Maytenus ilicifolia* após sete e 35 dias, respectivamente de estabelecimento *in vitro*, na presença e ausência de luminosidade

Condições de Luz	sementes inoculadas	Nº de sementes contaminadas	% de sementes contaminadas	Nº de sementes não contaminadas	% de sementes não contaminadas	Nº de plântulas obtidas
Claro	51	17	33,33	34	66,67	20
Escuro	51	22	43,14	29	56,86	26

Resultados semelhantes foram obtidos por Couto et al. (2004), em trabalho realizado com sementes de mogno, os autores observaram que as maiores porcentagens de germinação das sementes (48%) *in vitro* ocorreram aos 30 dias após semeadura das sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio 2,5%, mantidas embebidas por 30 minutos no hipoclorito e no escuro.

4.2 Estabelecimento *in vitro* de sementes de *M. ilicifolia* em diferentes substratos

Observou-se no presente trabalho, que os tratamentos utilizados influenciaram na resposta *in vitro* considerando as variáveis analisadas. As maiores médias para a altura das plântulas (5,06 cm) foram obtidas no meio MS acrescido de Vermiculita, não diferindo estatisticamente do meio MS, conforme pode ser observado na Figura 5. Este resultado corrobora com os dados obtidos por Sousa et al. (2007) em trabalho realizado com sementes de mangabeira, observaram maior altura das plântulas oriundas de meio com vermiculita. A vermiculita é um substrato que possui boa retenção de umidade, alta porosidade e baixa densidade, o que muitas vezes, proporciona maior facilidade para a plântula emergir. É utilizado com sucesso para espécies que possuem sementes de forma esférica, pois permite um maior contato com o substrato (VARELA et al., 2005; DOUSSEAU et al., 2008).

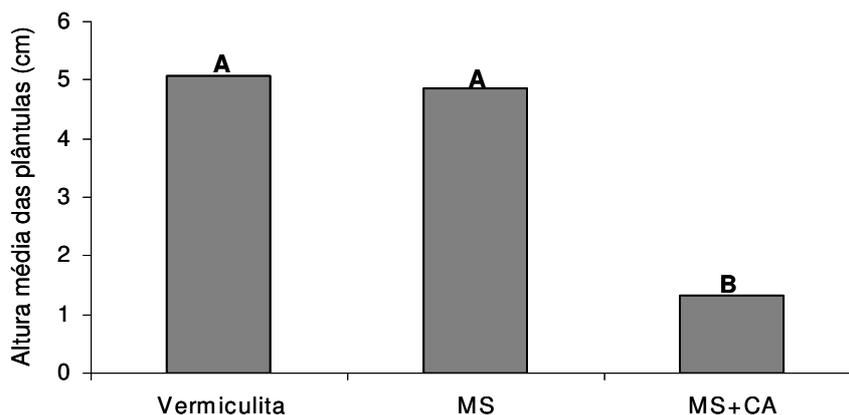


Figura 5- Altura média das plântulas de *Maytenus ilicifolia* submetidas a diferentes substratos, por 95 dias. * Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Para a variável comprimento médio de raiz (Figura 6), as maiores médias foram obtidas no meio MS acrescido de Vermiculita, não diferindo estatisticamente do meio MS.

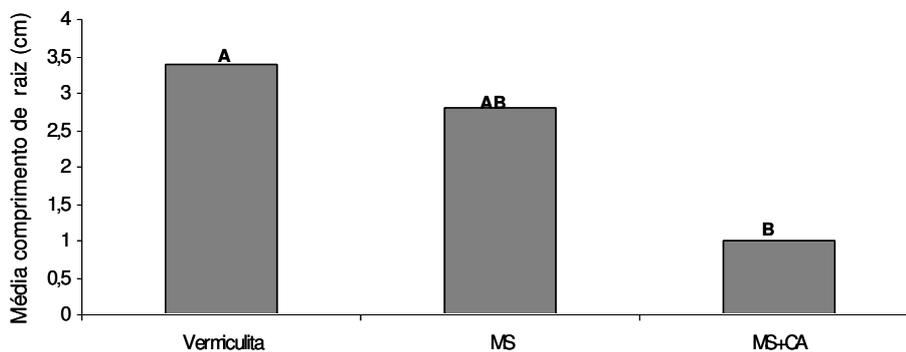


Figura 6- Comprimento médio das raízes das plântulas de *Maytenus ilicifolia* submetidas a diferentes substratos durante 95 dias. * Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Apesar de não apresentarem diferença estatística para as variáveis analisadas entre o meio MS e o MS+Vermiculita, o aspecto morfológico das raízes deve ser considerado, pois as raízes das plântulas germinadas em meio MS apresentaram-se bastante fibrosas e com ausência de pêlos radiculares, diferentemente das plântulas germinadas em meio MS+Vermiculita, onde apresentaram raízes adequadas para a absorção de nutrientes do meio de cultura (Figura 7).



Figura 7- Aspecto das raízes de plântulas de *Maytenus ilicifolia*, mantidas em diferentes substratos por 95 dias.

De acordo com Pasqual et al. (2001) e Caldas et al. (1998) a utilização de Vermiculita umedecida com solução nutritiva contribui para a formação de raízes devido à maior aeração e retenção de água no meio de cultura. Couto et al. (2004), observaram que a vermiculita foi superior ao ágar como substrato para a germinação *in vitro* de sementes de mogno. Para Sousa et al. (2007) o aspecto das raízes das plântulas quando germinadas em meio com vermiculita deve-se ao fato da grande porosidade proporcionada por esta.

Em relação aos experimentos de regeneração e multiplicação *in vitro* de *M. ilicifolia*, não foram obtidos resultados positivos, possivelmente devido aos explantes serem pouco responsivos às concentrações de reguladores de crescimento utilizados no meio de cultura e também à alta taxa de oxidação presente tanto nos segmentos nodais, internodais, quanto nos foliares. Este comportamento pode ser decorrente de uma maior lignificação dos tecidos, pois segundo Andrade et al. (2000), a oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos que se concentram no interior dos frascos quando a planta é cultivada *in vitro*, os quais são precursores da síntese de lignina e

liberados dos tecidos perante injúria ou senescência. O acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como suberina, lignina, cutina e calose, em torno da superfície excisada, modifica a composição do meio de cultura, assim como a absorção de nutrientes, devido à ação de enzimas polifenases que produzem substâncias tóxicas, as quais atuam inibindo o crescimento dos explantes, podendo causar a morte do mesmo (SATO et al., 2001). Os polifenóis são derivados do metabolismo secundário, os quais exercem importante papel no metabolismo das espécies e, ainda, atuam na defesa contra predadores e microrganismos (TEIXEIRA, 2001).

Outra hipótese para a não organogênese seria a possibilidade de que as células apresentassem baixa competência para responder à ação dos hormônios, comprometendo a determinação das mesmas (KERBAUY, 1999).

A falha de competência de um tecido poderia refletir, portanto, a falta de receptores para a classe hormonal que irá induzir o processo organogênético. Outro fator associado à resposta organogênica seria o próprio metabolismo hormonal dos explantes, pois ele é que irá determinar, em última análise, o balanço hormonal endógeno para indução da organogênese (CARRY et al., 2001). Tanto a competência quanto a determinação são reflexos da expressão diferencial de genes envolvidos nos processos de desenvolvimento (PERES, 2002).

4.3 Análise da variabilidade genética de acessos de *M. ilicifolia* coletados no Rio Grande do Sul

Um grande número de *loci* AFLP foi obtido para cada uma das oito combinações de *primers*, produzindo um total de 455 perfis eletroforéticos, sendo 100% polimórficos (Tabela 6). Os pares de *primers* M-CTA/E-ACG, M-CAA/E-ACC e M-CTC/E-ACG foram os que apresentaram os maiores números de perfis eletroforéticos, 71 cada, contribuindo com 46,80% do total de polimorfismos. Esta alta taxa de polimorfismo detectado é justificada pelo fato desta técnica explorar simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição (WÜNSCH; HORMAZA, 2002), associado à ocorrência ou não de amplificação a partir de seqüências arbitrárias, conseguindo assim uma

flexibilidade significativa na obtenção de marcadores polimórficos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Tabela 6- Dados de polimorfismo obtidos na análise de 20 acessos de *Maytenus ilicifolia*, com diferentes combinações de *primers* AFLP

<i>Primers</i>	Número de perfis	% de PP*	% de PP/PT**
M-CAG/E-AGC	39	100	8,57
M-CAG/E-AGG	45	100	9,90
M-CTA/E-AAC	38	100	8,35
M-CTA/E-ACG	71	100	15,60
M-CTA/E-ACA	61	100	13,41
M-CAA/E-ACC	71	100	15,60
M-CTC/E-ACG	71	100	15,60
M-CTC/E-ACT	59	100	12,97
Média	57		
Total	455	100	100

* PP: porcentagem de perfis polimórficos; **PP/PT: relação do polimorfismo por *primer* em relação ao polimorfismo total.

A ausência de bandas monomórficas evidenciou a grande variabilidade genética presente nos acessos de *M. ilicifolia* estudados. Altas taxas de polimorfismo foram detectadas pela técnica AFLP, similares às identificadas no presente trabalho, sendo relatado por vários autores. Odat et al. (2004), estudando a diversidade genética de *Ranunculus acris*, observaram a presença de 79,5% de polimorfismo; já Monte-Corvo et al. (2000), trabalhando com cultivares de *Pyrus*, obtiveram 87% de bandas polimórficas. Por sua vez, Goulão et al. (2001) observaram 57,2% de polimorfismo em análise da similaridade genética entre cultivares de *Malus*.

Bandas no gel que apresentaram tamanho inferior a 125pb não foram registradas devido à inconsistência de amplificação. Comumente em vários trabalhos é relatada a presença de bandas *erráticas*, ou seja, inconsistentes, cuja aparência não é uniforme, tornando-se difícil sua análise. Este fato pode ocorrer e está diretamente relacionado com a qualidade das amostras ou até mesmo com a qualidade do DNA após a digestão. Essas amplificações inconsistentes nunca devem exceder 0,5-3%, estimam Tohme et al. (1996) e Hartal; Seefelder (1997). Por outro lado, dependendo da combinação de *primers* utilizados, as bandas de maior tamanho apresentaram variação entre 400pb até

1500pb e o número de alelos amplificados variou de 38 a 71, com valor médio de 57 polimorfismos (Tabela 6), confirmando a alta taxa multiplex obtida com esta técnica. A Figura 8 representa um exemplo de gel de poliacrilamida com os marcadores AFLP dos 20 acessos de *M. ilicifolia*, gerados com a combinação de *primers* E-ACC/M-CAA.

A relação genética entre os 20 acessos foi baseada nos dados de similaridade (Tabela 9A) calculada pelo coeficiente *Simple Matching*, estando representada no dendrograma da Figura 9. Os dados do dendrograma foram utilizados para gerar uma matriz cofenética que quando comparada à matriz de similaridade, apresentou um coeficiente de correlação alto ($r=0,94$), indicando boa correspondência dos dados de agrupamento em relação à similaridade original.

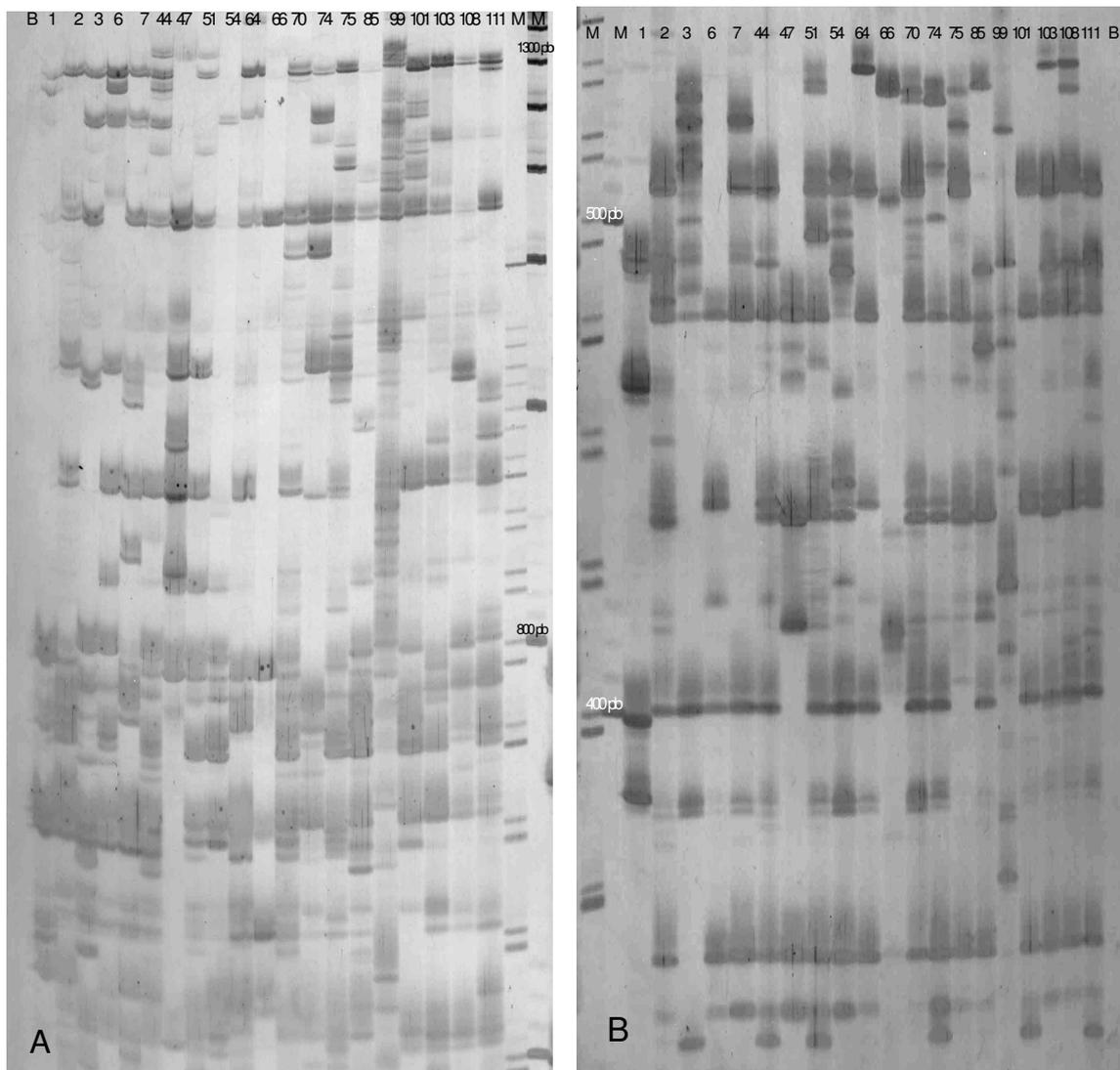


Figura 8- Perfil eletroforético de 20 acessos de *Maytenus ilicifolia*, gerados pela combinação de *primers* AFLP E-ACC/M-CAA (A) e E-ACG/M-CTA (B). B – Branco; M – marcador molecular 25pb; M' – 100pb (Life Technologies, Inc.).

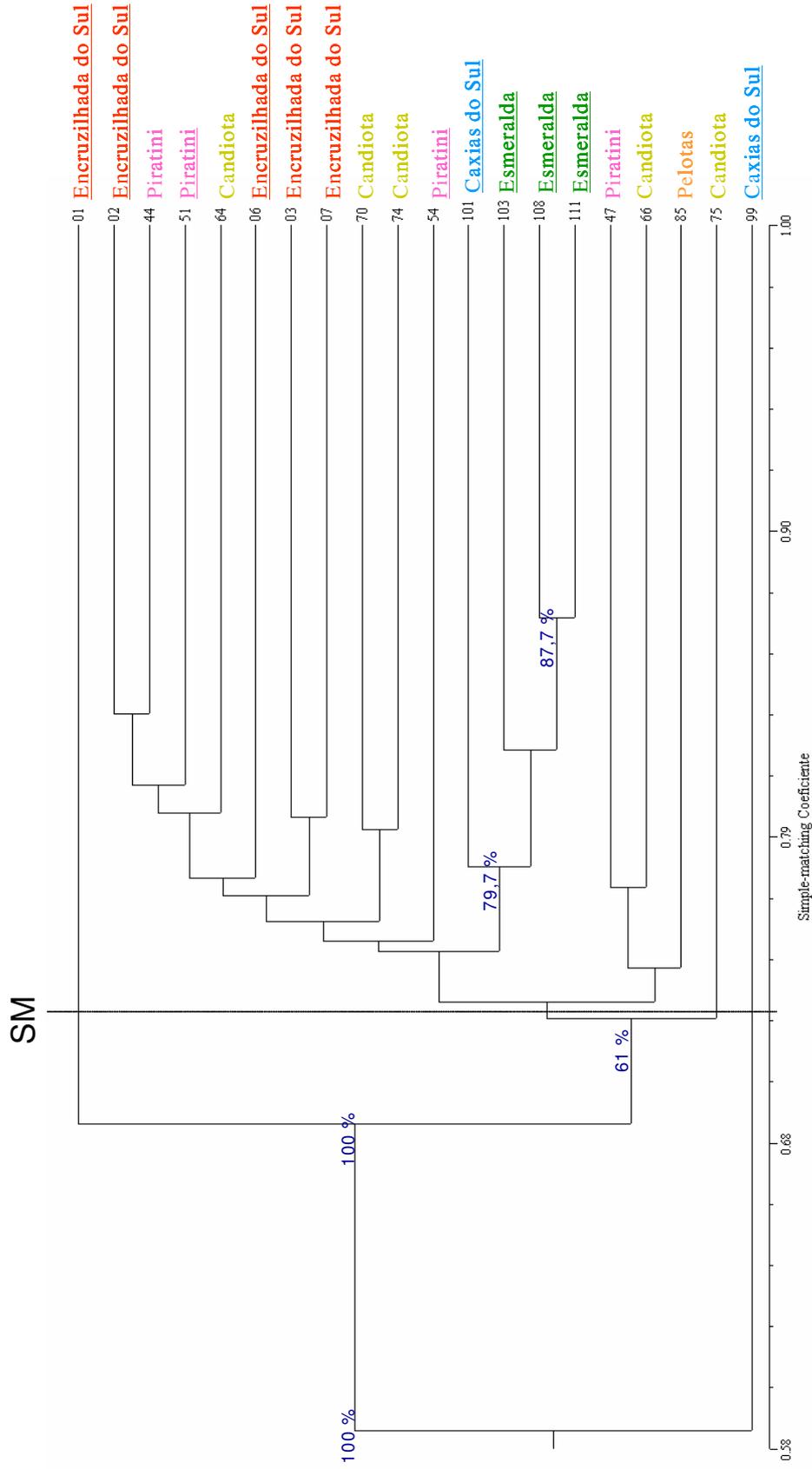


Figura 9- Dendrograma de similaridade genética de 20 acessos de *Maytenus ilicifolia*, baseado em polimorfismos AFLP. SM = similaridade genética média.

Como pode ser observado no dendrograma (Figura 9), exceto os acessos 103, 108 e 111, coletados no município de Esmeralda, e que ficaram agrupados juntos, de maneira geral houve uma ampla dispersão dos acessos avaliados, ou seja, genótipos coletados em localidades próximas foram agrupados relativamente distantes, indicando existir grande variabilidade desta espécie.

Isso pode ser justificado pelo fato desta espécie ser alógama e apresentar dispersão de suas sementes por zoocória, principalmente por pássaros (TABARELLI et al., 1993), ou ainda por gerenciamento humano, através do transporte de sementes, seja para ornamentação ou para o plantio de mudas (SOUSA et al., 2007). Por tanto, a interferência do homem, bem como a ação de seus dispersores naturais, são fatores que até o presente podem explicar a alta variabilidade detectada entre os indivíduos avaliados, uma vez que não existem muitas informações sobre a genética de populações desta espécie.

Os acessos 108 e 111, coletados em Esmeralda, apresentaram a maior similaridade genética entre si (0,83) e valores de *bootstrap* de 87,7%. Mesmo a análise AFLP ter produzido um significativo número de polimorfismos, devido à grande variabilidade entre acessos, a confiabilidade dos agrupamentos, indicada pela análise de *bootstrap*, foi pouco significativa, exceto para os acessos 99 e 01, provenientes de Caxias do Sul e Encruzilhada do Sul, respectivamente, que sempre agruparam da mesma forma, apresentando valores de *bootstrap* de 100%.

O agrupamento do acesso 104 de Caxias do Sul, com os acessos de Esmeralda apresentou valor de *bootstrap* de 79,9%, indicando que o primeiro acesso compartilha um maior número de alelos com acessos de Esmeralda, em relação ao outro acesso coletados na mesma localidade. Essa grande distância genética entre os acessos coletados em Caxias do Sul pode ser resultado da introdução de plantas vindas de Esmeralda, no caso do acesso 101.

Para a análise da variância dos dados moleculares (AMOVA) os acessos foram agrupados em populações, em função dos municípios onde foram coletados. Pelo fato de ter sido coletado somente um acesso no município de Pelotas (85), este foi incluso, para análise, na população de Candiota (população 3), conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7- Acessos de *Maytenus ilicifolia* de seis localidades do estado do Rio Grande do Sul agrupados em populações para a AMOVA

População	Acessos	Localidade	Nº de indivíduos
1	01,02,03,06,07	Encruzilhada do Sul	5
2	44,47,51,54	Piratini	4
3	64,66,70,74,75,85	Candiota (64 a 75); Pelotas (85)	6
4	99,101	Caxias do Sul	2
5	103,108,111	Esmeralda	3

Pela análise de variância molecular (AMOVA) baseada nos 455 polimorfismos AFLP, o valor F_{st} estimado foi altamente significativo ($F_{st} = 0,10$), revelando que 10,67% da variação genética total ocorreu entre populações e 89,33% entre indivíduos dentro da mesma população (Tabela 8).

Tabela 8- Análise da variância molecular (AMOVA) de 20 acessos divididos em cinco populações de *Maytenus ilicifolia*, coletados no estado do Rio Grande do Sul. GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrados médios

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Componente de variância	Total (%)
Entre populações	4	330,283	82,571	6,744	10,674**
Dentro da populações	15	846,567	56,438	56,438	89,326**
Total	19	1176,85	61,939	63,182	100,0

$F_{st} = 0,10$ (estimativa da diferença entre heterozigosidades esperada e total das populações).

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro.

Corroborando com os dados obtidos no presente trabalho, Bittencourt (2000), estudando a variabilidade genética através de marcadores RADP em populações naturais no estado do Paraná, observou que a variabilidade genética entre indivíduos da mesma população foi de 85% e a variabilidade genética entre as populações foi de 15%. Percin; Kageyama (2002), estudaram a variabilidade genética de populações de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* através de marcadores isoenzimáticos e observaram que há uma alta variabilidade genética dentro da

população, do que entre as populações estudadas. Estes autores confirmam, juntamente com os dados deste trabalho que independente do marcador genético utilizado nas análises em *M. ilicifolia*, a alta variabilidade entre os indivíduos da mesma população será maior,

Já em outras espécies, Odat et al. (2004), através da análise da diversidade genética em *Ranunculus acris* L., observaram uma alta taxa de variabilidade dentro da população (89,03%), em relação aquela entre populações (10,97%), sugerindo que os indivíduos presentes dentro da população apresentam uma grande proporção de *loci* de alta variação alélica. De forma similar, Freitas et al. (2005) demonstraram que 16,2% da variabilidade genética de *Myracrodruon urundeuva*, popularmente conhecida como aroeira se encontrava entre as populações e 83,8% dentro da população, demonstrando que espécies de fecundação aberta ocorrem cruzamentos aleatórios.

Paiva (1998) observou que a variabilidade genética em populações naturais de plantas demonstra que estas preservam grandes quantidades de variabilidade dentro das populações e a distribuição da variabilidade genética natural é influenciada por fatores como modo de reprodução das espécies, sistema de cruzamento, tamanho efetivo da população, distribuição geográfica e fluxo gênico.

Loveless; Hamrick (1984) apontaram que espécies tipicamente alógamas, apresentaram uma alta variação genética intrapopulacional em detrimento à variação genética interpopulacional que é menor, sendo que a divergência dentro de populações é inversamente proporcional à quantidade de fluxo gênico (quanto maior o fluxo menor a divergência intrapopulacional).

Esta variação pode ser observada através do gráfico de dispersão dos acessos obtido pelo método de ordenação de coordenada principal gerado em função das 455 polimorfismos de AFLP (Figura 13), originando quatro principais agrupamentos, onde acessos dentro da mesma população apresentaram diferentes posições no gráfico. O acesso 1 de Encruzilhada do Sul (01) foi um dos que ficou mais distantes de sua população de origem. Corroborando com este resultado, Mariot (2005), através da análise de dados morfológicos, observou que este mesmo acesso também ficou em um grupo totalmente isolado dos demais acessos desta localidade.

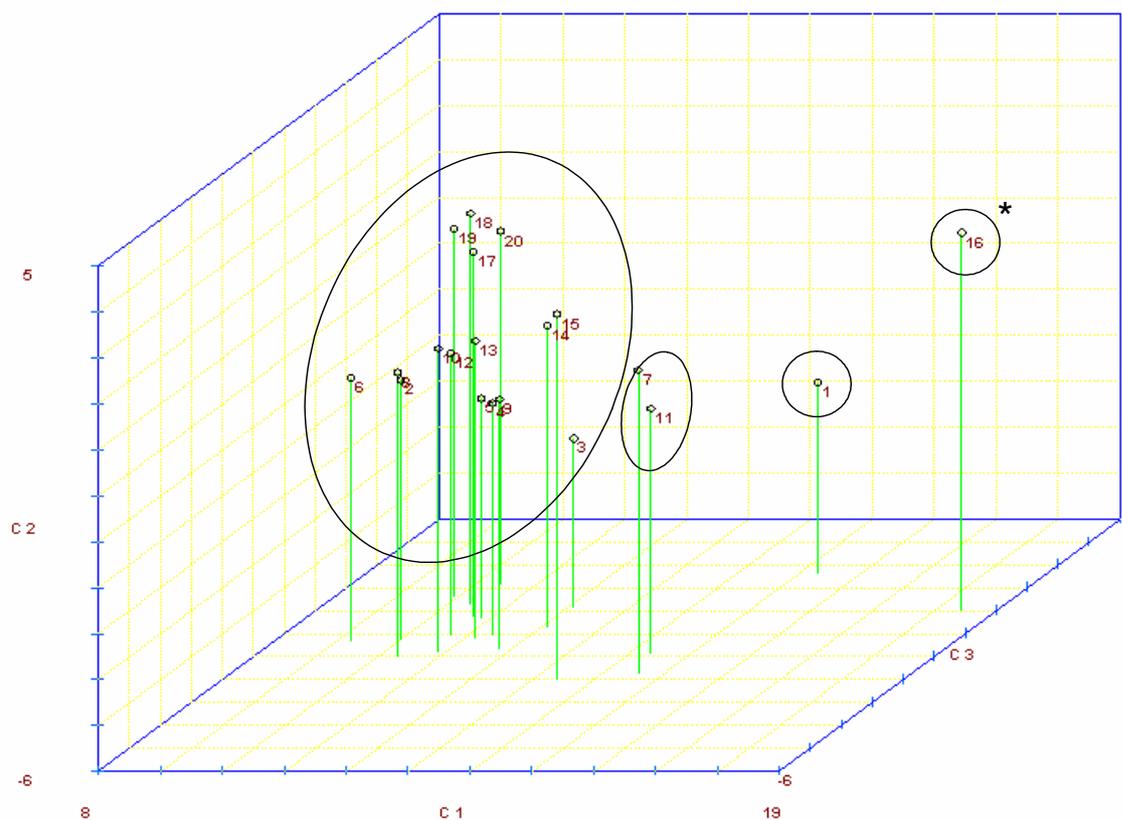


Figura 13- Associações entre 20 acessos de *Maytenus ilicifolia*, obtidos pela análise de coordenada principal dos coeficientes de similaridade *Simple-matching* calculados de 455 bandas AFLP geradas por 8 combinações de *primers*. Os acessos 1(01), 2 (02), 3 (03), 4 (06), 5 (07), correspondem à população de Encruzilhada do Sul; 6 (44), 7 (47), 8 (51), 9 (54) a população de Piratini; 10 (64), 11 (66), 12 (70), 13 (74), 14 (75) e 15 (85) a população de Candiota e Pelotas; 16 (99), 17 (101) a população de Caxias do Sul; 18 (103), 19 (108), 20 (101) a população de Esmeralda. * Os círculos demonstram a forma de agrupamento dos acessos.

Como pode ser observado no dendrograma (Figura 9), através da similaridade média e no gráfico de dispersão (Figura 10), foram formados quatro grupos, sendo o maior representado pelos acessos 02, 03, 06 e 07 de Encruzilhada do Sul, 44, 51 e 54 da população de Piratini, 64, 70, 74, 75 da população de Candiota, 85 de Pelotas, 101 de Caxias do Sul e 103, 108, 111 da população de Esmeralda. Os acessos 47 e 66, de Piratini e Candiota, respectivamente, ficaram em um mesmo grupo; enquanto que o acesso 1 de Encruzilhada do Sul, e o 99 de Caxias do Sul formaram dois grupos totalmente separados e isolados de sua população original, sendo estes, os que mais contribuíram para a variação total. Este tipo de representação gráfica nos permite uma visão da distribuição geral das

populações, podendo observar que os grupos formados foram bem distintos aos da população original.

Esses dados demonstraram a alta variabilidade genética presente nesta espécie e que deve ser mantida a fim de evitar o risco de erosão genética.

5 CONCLUSÕES

- O meio de cultura MS líquido + Vermiculita permite o estabelecimento *in vitro* de *M. ilicifolia*, porém não é suficiente para a etapa de multiplicação, necessitando de um complemento hormonal adequado.
- Problemas relacionados à oxidação principalmente de compostos fenólicos inibem o crescimento e desenvolvimento *in vitro* desta espécie.
- A caracterização molecular em acessos de *Maytenus ilicifolia* através da técnica AFLP é eficiente para identificar variabilidade genética e disponibilizar dados para a conservação dos recursos genéticos em bancos de germoplasma.
- A variabilidade genética intrapopulacional presente em *Maytenus ilicifolia* é muito maior do que a variabilidade genética entre populações.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I.N. de; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; MORAIS, A.R. de; GEROMEL, C.; LADEIRA, A.; LAMEIRA, O.A. Propagação *in vitro* de *Cissus sicyoides*, uma planta medicinal. **Acta Amazônica**, v.33, n.1, p.1-7, 2003.

ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras**. São Paulo: Hemus, 1993.

AARES, E.; NURMINIEMI, M.; BROCHMANN, C. Incongruent phylogeographies in spite of similar morphology, ecology and distribution: *Phippsia algida* and *P. concinna* (Poaceae) in the North Atlantic region. **Plant Systematics and Evolution**, Heidelberg, v.220, n. 3-4, p.241-261, 2000.

ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q; LACERDA, A.S.; MELO, P.R.A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agricultura**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.

BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 196, p.80-83, 1991.

BITTENCOURT, J.V.M. **Variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD**. 2000. 58f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 2.ed. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1998. 453p.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPASPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. p.87-132.

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

CARPENTIERI-PIPOLO, V.; DESTRO, D.; PRETE, C.E.C; GONZALES, M.G.N.; POPPER, I.; ZANATTA, S.; DA SILVA, F.A.M. West Indian Cherry parental genotype selection base don multivariate genetic divergence. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n.8, p.1613-1619, 2000.

CARVALHO, M.G. **Espinheira-santa tem ação contra úlcera gástrica**. Disponível em: <http://www.unifesp.br/comunicacao/jpta/ed120/pesq1.htm>. Acesso em 20 de outubro de 2005.

CARVALHO-OKANO, R.M. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (CELASTRACEAE) do Brasil extra-amazônico**. 1992. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Vegetal), UNICAMP, Campinas.

CARRY, A.; UTTAMCHANDANI, S.J.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.A. & HOWELL, S.H.H. *Arabidopsis* mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signals. **Planta**, v. 213, p.700-707, 2001.

COUTO, J.M. F.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; F.E.P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, v.28, p.633-642, 2004.

CORRÊA, A.D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L.E. **Plantas medicinais – do cultivo à terapêutica**. Petrópolis, RJ: Ed. Vozes, 1999. 246p.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 648p.

Di STASI, L.C. **Plantas Mediciniais: Arte e ciência. Um guia de estudos interdisciplinar**. São Paulo, SP: ED. UNESP, 1996. 230p.

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A.A.; ARANTES, L.O.; OLIVEIRA, D.M.; NERY, F.C. Germinação de sementes de tanchagem (*Plantago tomentosa* Lam.): influência da temperatura, luz e substrato. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.32, n.2, p.438-443, 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

EHRlich, P.R. A perda da biodiversidade-causas e conseqüências. In: Wilson, E.O. **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira, 1997. p.27-35.

FERREIRA, M.E.F.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa, 1996. p.220.

FREITAS, M.L.M.; AUKAR, A.P.A. DE; SEBBENN, A.M.; MORAES, M.L.T. de; LEMOS, E.G.M. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. por marcador AFLP. **Scientia Forestalis**, n.68, p.21-28, 2005.

GOULÃO, L.; CABRITA, L.; OLIVEIRA, C.; LEITÃO, J. Comparing RAPD and AFLP™ analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. **Euphytica**, v. 119, p.259-270, 2001.

GOWER, J.C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, London, v.53, p.325-338, 1966.

GRAM, W.K., SORK, V.L. Association between environmental and genetic heterogeneity in forest tree populations. **Ecology**, 82, p.1012–1021, 2001.

GRAY, A.J. Genetic diversity and its conservation in natural populations of plants. **Biodiversity Letters**, v.3, p.71–80, 1996.

HARTAL, L.; SEEFELDER, S. Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.112-116, 1997.

HU, C. Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. p.371-393.

JONES, C.J; EDWARDS, K.J.; CASTAGLIONE,S.; WINFIELD, M.O.; SALA, F.; van de WIEL, C.; BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATTHES, M.; DALY, A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding**, v.3, p. 381-390, 1997.

JORGE, R.M.; LEITE, J.P.V.; OLIVEIRA, A.B. Evaluation of antinociceptive, antiinflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.93-100, 2004.

KALIL FILHO, A.N. A Micropropagação mogno (*Swietenia macrophylla*): desinfestação e germinação. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ECOSSISTEMAS FLORESTAIS – FOREST 2000, 6., 2000. Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: [s.n.], 2000. p. Bio1013.

KARDOLUS, J.; ECK, H.; BERG, R. The potential of AFLP in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy. **Plant Systematic and Evolution**, v.2, p.87-103, 1998.

KERBAUY, G.B Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A (Eds). 519 p. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, CBAB/EMBRAPA, v.2, 1999.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Int. Plant Prop. Soc. Proceedings**, n.30, p.421-427, 1980.

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

MARIOT, M.P. **Recursos genéticos de Espinheira-Santa (*Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*) no Rio Grande do Sul**. 2005. 125f. Tese (Doutorado em Agronomia – Fitomelhoramento), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MARIOT, M.P.; BARBIERI, R.L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *Maytenus aquifolium* Mart.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9, n.3, p.89-99, 2007.

MARIOT, M.P.; BARBIERI, R.L.; SINIGAGLIA, C. Dissimilaridade entre genótipos de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) de uma população do Rio Grande do Sul. **Anais do II Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Porto Seguros, SBMP**, 2003. CD Rom.

MARIOT, M.P.; CORREA, F.; BARBIERI, R.L. Variabilidade para morfologia foliar em espinheira-santa. **Anais do XIV Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul, Canoas, ULBRA**, 2004. CD Rom.

MILACH, S. C. K. **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. 139p.

MONTE-CORVO, L.; CABRITA, L.; OLIVEIRA, C.; LEITÃO, J. Assessment of genetic relationships among *Pyrus* species and cultivars using AFLP and RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evaluation**, v.47, p.257-265, 2000.

MOSSI, A.J. **Análise genética e de compostos voláteis e semi-voláteis em *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss**. 2003. 123f. Tese (Doutorado Ciências – Ecologia e Recursos Naturais), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.6, p.473-479, 1962.

ODAT, N.; JETSCHKE, G.; HELLWIG, F.H. Genetic diversity of *Ranunculus acris* L. (Ranunculaceae) populations in relation to species diversity and habitat type in grassland communities. **Molecular Ecology**, v.13, p.1251-1257, 2004.

OLIVEIRA, J.E.Z. de; AMARAL, C.L.F.; CASALI, V.W. D. Recursos genéticos e perspectivas do melhoramento de plantas medicinais. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/medicinaismelhoramento.pdf>> Acesso em 28 mar. de 2008.

OLIVEIRA, P.R.D. de; SCOTTON, D.C.; NISHIMURA, D.S.; FIGUEIRA, A. Análise da Diversidade Genética por AFLP e identificação de marcadores associados à resistência em videiras. **Revista Brasileira Fruticultura**, v.27, n.3, p.454-457, 2005.

PASQUAL, M. **Cultura de Tecidos Vegetais: Tecnologia e Aplicações: meios de cultura**. Lavras: Ed. UFLA/FAEPE, 2001. p. 74.

PAIVA, J.R. **Melhoramento genético de espécies agroindustriais na Amazônia: estratégias e novas abordagens**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1998. 135 p.

PERECIN, M.B.; KAGEYAMA, P.Y. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.) e suas implicações para o manejo e conservação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.4, n.2, p.80-90, 2002.

PEREIRA, A.M.S; MORO, J.R; CERDEIRA, R.M.M; FRANÇA, S.C. Effect of phyto-regulations and physiologia characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant, Cell, tissue & Organ Culture**. v.42, p.295-297, 1995.

PEREIRA, A.M.S; MORO, J.R; CERDEIRA, R.M.M; FRANÇA, S.C. Micropropagation of *Maytenus aquilolia*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v.2, n.3, p.11-19, 1994.

PERES, L.E. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Ano IV, 2002. 29p.

REIS, M.S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4.ed. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2002. 41-62p.

RHOLF, F. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.10**. New York, 2000.

SALLA, M.F.S.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Belém, 2002.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v.7, p.117-123, 2001.

SCHEFFER, M.C. **Sistema de cruzamento e variação genética entre populações e progênies de espinheira-santa**. 2001. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal – Silvicultura) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. de. **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba, RS: ED. Agropecuária, 2001. 463p.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, RS: Ed. Universidade/UFRGS, 1998. 173p.

SOKAL R.R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **University of Kansas Science Bulletin**, v.38, p.1409–1438, 1958.

SOUSA, C.S.; MOREIRA, M.J.S.; BASTOS, L.P.; COSTA, M.A.P.C. de; ROCHA, M.A.C. da, HANSEN D.S. Germinação e indução de brotações *in vitro* utilizando diferentes reguladores vegetais em mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.276-278, 2007.

TANG, T.; ZHONG, Y.; JIAN, S.; SHI, S. Genetic diversity of *Hibiscus tiliaceus* (Malvaceae) in China assessed using AFLP markers. **Annals of Botany**, v.92, p.409-414, 2003.

TABARELLI, M.; VILLANI, J.P.; MANTOVANI, W. Estrutura e composição florística e dinamismo de uma floresta secundária na Encosta Atlântica. In: 1º CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO e 7º CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 1993, Curitiba. **Anais**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, p.340-343.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**, 2001. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc2001/simposios/S-06/Joao%20Batista%20Teixeira.pdf>. Acesso em jun. de 2007.

TOHME, J.; GONZALEZ, D.O.; BEEBE, S.; DUQUE, M.C. AFLP analysis of gene pools of wild bean core collection. **Crop Science**, v.36, p.1375-1384, 1996.

UPADHYAY, A.; JAYADEV, K.; MANIMEKALAI, R.; PARTHASARATHY, V.A. Genetic relationship and diversity in Indian coconut accessions based on RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.99, p.353-362, 2004.

VARELA, V.P.; COSTA, S.S.; RAMOS, M.B.P. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes de itaubarana (*Acosmium nitens* (Vog.) Yakovlev) - Leguminosae, Caesalpinoideae. **Acta Amazônica**, Manaus, v.35, n.1, p.35-39, 2005.

VIEIRA, R. F. Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas. Resultados da 1ª. Reunião Técnica. Brasília: Embrapa Cenargen/Ibama/CNPq, p.180-182, 2002.

VIEIRA, R.F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brasil. In: JANICK, J. (ed.) **Perspectives on new crops and new uses**. ASHS Press, Alexandria, VA., p.152-159, 1999.

VILLALABOS, V.M.; ENGELMANN, F. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.11, p.375-382, 1995.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van de; HORNES, M.; FRITERS, A.; POT, J.; PALEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, 1995.

WASER, N.M. Spatial genetic heterogeneity in a population of the montane perennial herb *Delphinium nelsonii*. **Heredity**, v.58, p.249–256, 1987.

WÜNSCH, A.; HORMAZA, J.I. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. **Euphytica**, v.125, p.59-67, 2002.

YANG, C.; ZHANG, J.; XU, Q.; XIONG, C.; BAO, M. Establishment of AFLP technique and assessment of primer combinations for mei flower. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.23, p.79a.-791, 2005.

YAP, I.V.; NELSON, R.J. **Winboot**: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. Manila: IRRI, 1996. 22p.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequence of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, v.11, p.413–418, 1998.

APÊNDICE

Tabela 10A- Soluções de macro, micronutrientes e vitaminas utilizadas no meio MS, para o cultivo *in vitro* de *Maytenus ilicifolia*

Sol. estoque	Vol. no meio	Compostos	Peso L ⁻¹	Sol. estoque [] final
A	→ 20 mL	NH ₄ NO ₃	82,5g	1,650 g.L ⁻¹
B	→ 20 mL	KNO ₃	95g	1,9 g.L ⁻¹
C	→ 5 mL	MgSO ₄ ·7H ₂ O	74 g	370 mg.L ⁻¹
		MnSO ₄ ·H ₂ O	3,38 g	16,9 mg.L ⁻¹
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,72 g	8,6 mg.L ⁻¹
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	5 mg	0,025 mg.L ⁻¹
D	→ 5 mL	CaCl ₂	66,6 g	333 mg.L ⁻¹
		ou CaCl ₂ ·2H ₂ O	85,12 g	
E	→ 5 mL	H ₃ BO ₃	1,24 g	6,2 mg.L ⁻¹
		KH ₂ PO ₄	34 g	170 mg.L ⁻¹
		KI	166 mg	0,83 mg.L ⁻¹
		NaMoO ₄ ·2H ₂ O	50 mg	0,25 mg.L ⁻¹
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	5 mg	0,025 mg.L ⁻¹
F	→ 5 mL	Na ₂ EDTA	7,45 g	37,25 mg.L ⁻¹
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	5,57 g	27,85 mg.L ⁻¹
G	→ 5 mL	TIAMINA	200 mg	1 mg.L ⁻¹
		PIRIDOXINA	100 mg	0,5 mg.L ⁻¹
		ÁC. NICOTÍNICO	100 mg	0,5 mg.L ⁻¹
		GLICINA	400 mg	2 mg.L ⁻¹
		MIO-INOSITOL	100 mg.L ⁻¹	
		SACAROSE		30 g.L ⁻¹
		ÁGAR		7 g.L ⁻¹

Tabela 11A- Soluções de macro, micronutrientes e vitaminas utilizadas no meio WPM, para o cultivo *in vitro* de *Maytenus ilicifolia*

Solução Estoque	Compostos	Peso L ⁻¹ Solução Estoque	Vol. (mL) Utilizado no meio L ⁻¹	Modificação (Prof. Peters)
1	NH ₄ NO ₃	85,5 g L ⁻¹	4,85	4,85
2	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	32,6 g L ⁻¹	10,0	20,00
3	CaCl ₂ .2H ₂ O	19,2 g L ⁻¹	5,0	5,00
4	KH ₂ PO ₄ H ₃ BO ₃ Na ₂ MoO ₄	34,0 g L ⁻¹ 1,24 g L ⁻¹ 50,0 mg L ⁻¹	5,0	5,00
5	MgSO ₄ 7 H ₂ O MnSO ₄ H ₂ O ZnSO ₄ 7 H ₂ O CuSO ₄ 5 H ₂ O	36,14 g L ⁻¹ 5,46 g L ⁻¹ 1,72 g L ⁻¹ 50 mg L ⁻¹	5,0	5,00
6	Na ₂ EDTA FeSO ₄ 7H ₂ O	7,45 g L ⁻¹ 5,57 g L ⁻¹	5,0	5,0
7	Tiamina Piridoxina Ácido Nicotínico Glicina	200 mg L ⁻¹ 100 mg L ⁻¹ 100 mg L ⁻¹ 400 mg L ⁻¹	5,0	5,0
8	K ₂ SO ₄	49,5 g L ⁻¹	20,0	20,0
Sol. B (MS)		7,2 g L ⁻¹	2,0	2,0