

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

CANSIAN, R.L.¹; MOSSI, A.J.¹; LEONTIEV-ORLOV, O.¹; CECHET, M.L.¹; CARVALHO, A.Z.¹; ECHEVERRIGARAY, S.²; CORREA, G.³

RESUMO

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

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

IDENTIFICATION OF POLLINATORS IN THE LINEAGE OF CAMBONA-4 MATRIX OF MATÉ, USING RAPD MARKERS.

ABSTRACT

The present work objective to determine the paternity of a lineage of maté of the Cambona-4 matrix and four possible pollinators (A, B, C and D). The same it aims at the production of changes for seeds with the maintenance of the agronomic characteristics and mainly smoothness in the flavor, inherent the Cambona-4 matrix. For in such way, fragments gifts in only one of the pollinators and the lineage had been used RAPD markers identifying itself, and obligatorily absent in the too much pollinators and the matrix. A minimum of six fragments with these characteristics had been used for determination of each paternity. It was gotten confirmation of 83,3% of deriving plants of the crossing with the pollinator A, 11,9% with the pollinator B, and 4,8% with pollinator C. No plant of the lineage confirmed to be son

¹ Departamento de Ciências Agrárias, URI-Campus de Erechim, Av. 7 de setembro, 1621. CEP 99700-000 Erechim - RS, Brasil. E-mail: cansian@uricer.edu.br

² Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul – RS, Brasil. E-mail: selaguna@yahoo.com

³ EMBRAPA-Florestas, Colombo, PR.

of the crossing with pollinator D. Of a total of 107 tested lineages, 23 had not been possible to determine its paternity with primers used. The determination of the paternity preferential for pollinator A will allow the aiming of crossings in order to get seeds and plants with a low variability and characteristic similar to the Cambona-4, a time that the confirmed plants of the lineage as Cambona-4/pollinator A had presented similar characteristics to the matrix, with 90% of the similar plants in relation to the color of leaf and 84% in relation to the brightness of the leaf.

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

INTRODUÇÃO

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

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

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

Por ter fecundação cruzada, as plantas de erva-mate oriundas de sementes sempre apresentam apenas 50% do genótipo da planta matriz. Assim, para a manutenção das características da matriz é necessário o uso de métodos de propagação vegetativa ou a condução de cruzamentos entre parentais selecionados visando a obtenção de populações com as características desejadas.

Este trabalho teve por finalidade identificar os parentais polinizadores de uma progênie da matriz de erva-mate Cambona-4 (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) através de marcadores moleculares RAPD. É interesse ressaltar que a matriz Cambona-4 possui excelentes características agrônômicas, alta produtividade e sabor suave. Plantios comerciais

oriundos desta planta ou de descendentes que mantenham as suas características básicas poderiam reduzir o impacto provocado pelo extrativismo.

MATERIAL E MÉTODOS

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

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

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

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

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

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

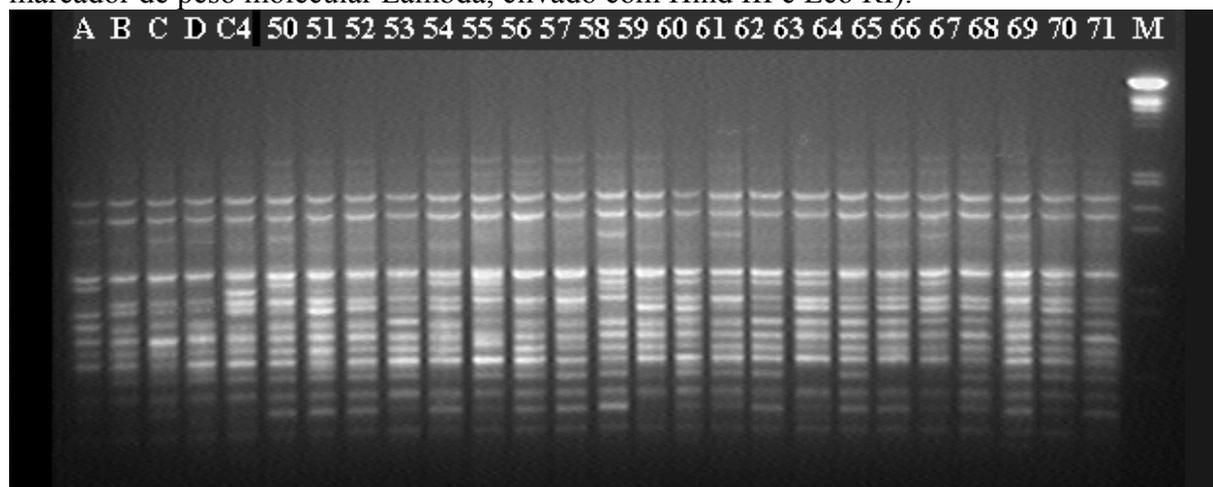
Análise dos dados: A identificação de plantas foi realizada através da determinação da presença ou ausência de bandas sendo consideradas as bandas presentes em plantas da progênie e em apenas um dos progenitores masculinos, devendo estar obrigatoriamente

ausentes nos demais progenitores masculinos e na planta matriz (Figura 1). As progênes foram consideradas oriundas de um polinizador quando pelo menos seis fragmentos característicos deste estavam presentes nos perfis da progênie.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primers selecionados para a identificação das progênes e o respectivo peso molecular do fragmento analisado foram: OPA-18_(850 bp), OPB-06_(500 bp), OPF-06_(950 bp), OPF-08_(900 bp), OPF-09_(830 bp), OPH08_(400 bp), OPH-14_(790 bp) e OPW-03_(540 bp) com fragmento identificador do polinizador A; OPA-10_(2000 bp), OPB-17_(1800 bp), OPF-07_(1150 bp), OPF-08_(860 bp), OPW-18_(700 bp) e OPY-08_(280 bp) com fragmento identificador do polinizador B; OPF-02_(1300 bp), OPF-03_(1050 bp), OPF-05_(880 bp), OPF-16_(500 bp), OPW-17_(240 bp) e OPW-18_(770 bp) com fragmento identificador do polinizador C; OPF-07_(200 bp), OPF-20_(1200 bp), OPH-17_(320 bp), OPW-07_(840 bp), OPW-13_(1400 bp) e OPW-15_(1550 bp) com fragmento identificador do polinizador D.

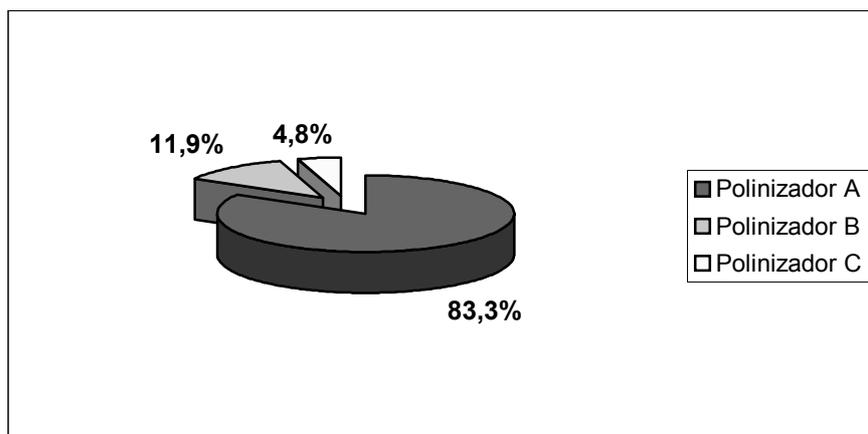
Figura 1: Gel de agarose gerado por RAPD com o primer OPA-18, mostrando um fragmento específico do polinizador A, ausente nos demais progenitores e presente em diversas progênes. (A, B, C e D = polinizadores; C4 = matriz Cambona-4; 50 a 71 = progênes; M = marcador de peso molecular Lambda, clivado com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



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

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

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



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

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

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

A determinação da paternidade preferencialmente pelo polinizador A é um importante resultado para o direcionamento de cruzamentos a fim de obter-se sementes e mudas com uma variabilidade baixa e características próximas a da matriz Cambona-4, uma vez que as plantas da progênie confirmadas como Cambona-4/polinizador A apresentaram características próximas à planta matriz, sendo que 90% das plantas foram semelhantes quanto à cor da folha e 84% quanto ao brilho da folha. Estudos de degustação para determinação das características organolépticas, e principalmente o amargor, estão programados para um futuro próximo, ainda que testes preliminares mostrem que a característica de suavidade no sabor esteja mantida nesta progênie.

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem ao CNPq, FAPERGS, SCT – RS, APROMATE e MAESA pelo apoio financeiro.

BIBLIOGRAFIA

- ANVISA, 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br> (acesso em 20 de maio de 2002).
- BERTOLETTI, J.J., 1997. Relatório de Impacto Ambiental – RIMA. Usina Hidrelétrica Machadinho. Centrais Elétricas do Sul do Brasil S.A. ed. MCT.UBEA-PUC RS, 131p.
- CORRÊA, G. Sistema Agroflorestal com Erva-mate para Reposição da MAESA. Projeto Operativo. Comunicação Pessoal. Machadinho RS, 2001.
- DA CROCE, D.M., 2000. Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: Erva-mate. EPAGRI – Empresa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. – Boletim Técnico nº 112, Florianópolis.
- DOYLE, J.; DOYLE, J. L., 1988. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Am J Bot.* **75**:1238.
- FERREIRA, A.G.; KASPARY, R.; FERREIRA, H.B.; ROSA, L.M., 1983. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Brasil Florestal.* 53.
- RESENDE, M.V.D.; STURION, J.A.; CARPANEZZI, A.A.; MENDES, S., 1993. Genética e melhoramento da erva-mate para produção de massa verde na região de Curitiba. EMBRAPA-CNPQ. Subprojeto 08.0.94.501.02. Colombo, PR. 10p.
- RESENDE, M.D.V.; STURION, J.A.; SIMEÃO, R.M., 1997. Estratégias para o melhoramento genético da erva-mate. I Congresso Sul-Americano da erva-mate. Curitiba PR, 243-266.
- TORMEN, M.J., 1995. Economia ervateira brasileira. In: *Erva-mate: Biologia e Cultura no Cone Sul*. Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 27-40.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V., 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**:6531-6535.
- WINGE, H., 1997. Conservação genética da erva-mate no Brasil. I Congresso Sul-Americano da erva-mate. Curitiba PR, 209-226.
- WOLLHEIM, C.; WINGE, H., 1992. Análise de paternidade em populações de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil, Aquifoliaceae. Reunião Técnica do Cone Sul sobre a cultura da erva-mate, 1. Porto Alegre, p.41.