

Caracterização genética de procedências e progênes de
Ilex paraguariensis St. Hil. utilizando marcadores RAPDGenetic characterization of provenances and progenies
of *Ilex paraguariensis* St. Hil. by using RAPD markersSimone Neumann Wendt¹, Valderês Aparecida de Sousa², Marguerite Quoirin³,
Alexandre Magno Sebbenn⁴, Maria Cristina Mazza² e José Alfredo Sturion²**Resumo**

Ilex paraguariensis St. Hil. é uma arbórea nativa do Brasil, Paraguai e Argentina, onde apresenta grande importância sócio-econômica. Com a crescente demanda e a redução dos ervais nativos, o plantio surge como uma solução para o atendimento do mercado. Porém, devido à escassez de estudos genéticos e de programas de melhoramento, as sementes utilizadas para a formação de novas populações não apresentam boa qualidade, resultando em ervais com baixa produtividade. Informações sobre a variabilidade genética são de extrema importância para nortear os programas melhoramento e conservação dos recursos genéticos da espécie. Esse trabalho teve por objetivo determinar a variabilidade genética em um teste de procedências e progênes de *I. paraguariensis*, utilizando marcadores RAPD. Para isso, utilizaram-se folhas jovens de três procedências do estado do Paraná: Ivaí, Pinhão e Cascavel, do teste de procedências e progênes, localizado no município de Ivaí. Os quinze primers empregados produziram 159 fragmentos, sendo 70,4% polimórficos. As distâncias genéticas entre as procedências e progênes foram baixas. Verificou-se maior variação dentro das procedências (88,3%) do que entre procedências (11,7%). A maior parte da variação dentro de procedências foi devido a diferenças genéticas entre as progênes (55,5%). Os resultados sugerem que, devido ao fato da maior variação genética estar entre progênes, maiores ganhos podem ser obtidos pela seleção entre progênes do que entre procedências.

Palavras-chave: Diversidade genética, Marcadores moleculares, Erva-mate

Abstract

Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) is a native tree species from Brazil, Argentina, and Paraguay, where it plays important economic and social roles. Due to increasing demand for raw-material and the reduction of native mate populations, production from planted stands has become the solution to supply the market. However, due to the lack of genetic information and improvement programs, the seeds in use to establish new plantations are usually of poor quality. The general has been formation of average to low yielding stands. Information on the genetic variability is of utmost importance in order to establish sound improvement and conservation programs. This purpose of this study was to characterize the genetic variability among progenies of mate from different provenances by using RAPD markers. Young leaves were collected from three provenances from the Paraná State (Ivaí, Pinhão and Cascavel) established in a provenance/progeny trial in Ivaí. Fifteen primers were used. Among 159 fragments analyzed, 70.4% were polymorphic. The genetic distances among provenances and progenies were small. The genetic variation was higher within provenances (88.3%) than among provenances (11.7%). A large part of the variation within provenances was due to the genetic variation among progenies (55.5%). These results suggest the possibility to obtain high genetics gains through selection among progenies than among provenances.

Keywords: Genetic diversity, Molecular markers, Erva-mate

INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. - Aquifoliaceae) é uma espécie arbórea, típica das regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, sendo encontrada no Brasil, Paraguai e Argentina (OLIVEIRA e ROTA, 1985).

Suas folhas e ramos são utilizados, principalmente, na produção de bebidas, como chimarrão e chás, mas estudos recentes têm revelado importantes substâncias químicas na sua composição, possibilitando o seu emprego em novos produtos, como: medicamentos, corantes, conservantes alimentares, produtos de higiene e

¹Doutora em Processos Biotecnológicos pela Universidade Federal do Paraná. Embrapa Florestas - Caixa Postal 319 - Colombo, PR - 83411-000 - E-mail: snwendt@hotmail.com

²Pesquisadores da Embrapa Florestas - Caixa Postal 319 - Colombo, PR - 83411-000 - E-mail: valderes@cnpf.embrapa.br; mcmazza@terra.com.br; sturion@cnpf.embrapa.br

³Professora Doutora do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná - Caixa Postal 19031 - Curitiba, PR - 81531-990 - E-mail: mquoirin@ufpr.br

⁴Pesquisador do Instituto Florestal de São Paulo - Caixa Postal 339 - Piracicaba, SP - 13400-970 - E-mail: alexandresebbenn@yahoo.com.br

cosméticos, e assim, incrementado a demanda no mercado (MACCARI JUNIOR, 2000).

A espécie desempenha grande importância sócio-econômica para a região Sul do Brasil, sendo produzida sob cultivo ou por extrativismo (SIMEÃO *et al.*, 2002). Todavia, os ervais cultivados apresentam baixa produtividade, devido à deficiência das técnicas de cultivo e de colheita, e também à baixa qualidade genética e fisiológica das sementes utilizadas nos plantios (RESENDE *et al.*, 1995). Para contornar esse problema, é fundamental o desenvolvimento e o aprimoramento dos programas de melhoramento genético com a espécie. Nestes programas, o conhecimento da quantidade e distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações dos materiais utilizados é de extrema importância para o delineamento de estratégias ideais, visando maximizar os ganhos genéticos das características de interesse. Dentro deste contexto, a seleção de árvores superiores em programas de melhoramento genético com espécies arbóreas, envolve testes combinados de procedências e progênies. Esses testes permitem a seleção das populações mais adaptadas e produtivas para os locais onde se pretende realizar os plantios (procedências), bem como, a seleção das melhores progênies e plantas dentro das procedências, simultaneamente (RESENDE *et al.*, 2000).

Em geral, a distribuição da variação genética em testes de procedências e progênies é quantificada a partir de caracteres quantitativos. No entanto, tais análises geralmente requerem longo tempo de experimentação para a obtenção de resultados consistentes, visto que as variáveis usadas como resposta, são caracteres fenotípicos fortemente influenciados por fatores ambientais. Contudo, esta variação também pode ser estudada a partir de dados de marcadores genéticos, os quais teoricamente não sofrem efeito ambiental e, portanto, os resultados obtidos não se alteram com o desenvolvimento das plantas (diferentes fases ontogênicas), como pode ocorrer quando a variação é avaliada por caracteres quantitativos.

A técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é uma das diversas técnicas atualmente existentes que permite determinar a variabilidade molecular e quantificar a distribuição da variação genética entre e dentro de populações de plantas. Esta técnica utiliza *primers* aleatórios para amplificar segmentos de DNA ao acaso e assim revelar o polimorfismo entre

indivíduos (WILLIAMS *et al.*, 1990; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Devido à sua simplicidade, rapidez e custo relativamente baixo, tem sido eficientemente empregada em programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos de erva-mate (GAUER e CAVALLI-MOLINA, 2000; CANSIAN, 2003) e outras espécies arbóreas como, por exemplo, *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* (GRATTAPAGLIA e SEDEROFF, 1994), *Hevea brasiliensis* (VARGHESE *et al.*, 1997; VENKATACHALAM *et al.*, 2004), *Caesalpinia achinata* (CARDOSO *et al.*, 1998), *Theobroma cacao* (LERCATEAU *et al.*, 1997, DIAS *et al.*, 2005), *Trichilia pallida* (ZIMBACK *et al.*, 2004) e *Eremanthus erythropappus* (ESTOPA *et al.*, 2006).

O objetivo deste trabalho foi quantificar a distribuição da variação genética entre e dentro de procedências e progênies de *I. paraguariensis* em um teste combinado de procedências e progênies, utilizando marcadores RAPD.

METODOLOGIA

Material vegetal e amostragem

O material analisado pertence ao teste combinado de procedências e progênies de polinização aberta de *I. paraguariensis*, instalado no município de Ivaí, PR, situado a 25° 01' S, 50° 48' W e 600 m de altitude. Essa região encontra-se, segundo Köppen, no tipo climático Cfb (temperado úmido, com temperatura média do mês mais quente inferior a 22 °C), com temperatura média anual entre 17 e 18 °C.

Três procedências foram selecionadas para os estudos genéticos: duas mais produtivas, em termos de massa foliar, Ivaí, PR e Cascavel, PR, com produtividade média de 1.755,38 kg/ha e 1.666,50 kg/ha, respectivamente, e uma menos produtiva, Pinhão, PR, com média de 1.155,44 kg/ha, sendo a avaliação realizada aos 28 meses de idade (SIMEÃO *et al.*, 2002). Cascavel localiza-se a 24° 57' S, 53° 27' W e 750 m de altitude, com tipo climático Cfa/Cfb (temperado úmido, com temperatura média do mês mais quente superior/inferior a 22 °C) e temperatura média variando de 18 a 19 °C. Pinhão situa-se a 25° 41' S, 51° 40' W e 1050 m de altitude, no tipo climático Cfb, com temperatura média anual variando de 17 a 18 °C. Nas três regiões de origem das procedências, o solo predominante é o latossolo vermelho distrófico, com textura argilosa.

De cada procedência, selecionaram-se sete progênies, sendo cada uma delas representada por quatro indivíduos. Coletaram-se as folhas

jovens de 84 árvores, sendo identificadas de acordo com procedência e progênie de origem e armazenadas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico utilizou-se o protocolo CTAB, descrito por Doyle e Doyle (1988), modificado para a erva-mate. Maceurou-se 200 mg de tecido foliar, com auxílio de nitrogênio líquido. Ressuspendeu-se o material em 750 μL de tampão de extração (0,1 mol.L⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0; 0,02 mol.L⁻¹ EDTA, pH 8,0; 1,4 mol.L⁻¹ NaCl; 2% CTAB; 1% PVP e 1% mercaptoetanol) e incubou-se em banho-maria a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min. Em seguida, realizou-se a extração com 650 μL de solvente orgânico, clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), centrifugou-se a suspensão e transferiu-se o sobrenadante para novo tubo (repetindo-se esse procedimento por quatro vezes). Adicionou-se 260 μL de isopropanol para a precipitação do DNA. A seguir, lavou-se o pellet com etanol 70% e, finalmente, ressuspendeu-se o mesmo em 100 μL de tampão TE (0,01 mol.L⁻¹ tris-HCl, pH 8,0 e 0,001 mol.L⁻¹ EDTA). Quantificou-se o DNA mediante a leitura no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm.

Amplificação do DNA e eletroforese

As reações de amplificação foram realizadas conforme Williams *et al.* (1990), com algumas modificações para erva-mate. O volume final da reação foi 13 μL , contendo 13 ng de DNA, tampão de reação (50 mmol.L⁻¹ Tris-HCl, 50 mmol.L⁻¹ KCl), 2,5 mmol.L⁻¹ de MgCl_2 ; 0,4 mmol.L⁻¹ de cada dNTP (A, T, C, G); 0,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de *primer*, 1 unidade de enzima, sendo 90% Taq polimerase recombinante e 10% Platinum Taq polimerase e água de milli-Q autoclavada, para completar o volume. Utilizaram-se 15 *primers* da *Operon Technologies*, descritos na Tabela 1.

Realizou-se a amplificação no termociclador Perkin Elmer 9600 em 40 ciclos repetidos de 15 segundos a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (desnaturação), 30 segundos a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ (anelamento do *primer*), 60 segundos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ (extensão pela enzima e incorporação dos nucleotídeos). Após os 40 ciclos, acrescentou-se um passo final de extensão de 7 minutos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A separação dos produtos da amplificação ocorreu por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose 1,6% em tampão TBE 1X (0,089 mol.L⁻¹ tris base; 0,089 mol.L⁻¹ ácido bórico e 5

ml de 0,50 mol.L⁻¹ EDTA), corado com brometo de etídeo. Após a corrida de três horas a 150 Volts, visualizaram-se os géis sobre um transiluminador de luz ultravioleta, sendo fotografados com vídeo câmara.

Análise estatística

Para a análise da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de procedências e progênies para os marcadores RAPD, consideraram-se os fragmentos amplificados de DNA de maior intensidade e reprodutibilidade.

Foi estimada para cada população e conjunto das populações a porcentagem de locos polimórficos a 95% de probabilidade. A distribuição da variação genética entre e dentro das procedências foi quantificada por análise da variância molecular (AMOVA) para estimar a divergência genética entre as procedências ($\hat{\theta}_{ST}$) e progênies ($\hat{\theta}_{SP}$). A significância estatística dos valores de divergência genética entre procedências e progênies foi testada por reamostragem *bootstraps* (foram usados 5.000 *bootstraps*). Adicionalmente, foram calculadas as distâncias genéticas entre as procedências e progênies com base no método de Nei (1978). Estas distâncias genéticas foram utilizadas para construir o dendrograma por análise de agrupamentos do tipo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*), desenvolvido por Sokal e Michener (1958). A consistência dos agrupamentos foi verificada por 5.000 reamostragem *bootstraps*. Todas as estimativas foram realizadas utilizando o software TFGA (*Tools for Population Genetic Analysis*) versão 1.3 (MILLER, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Locos RAPD

Os quinze *primers* utilizados para análise molecular de erva-mate geraram 159 marcadores, com número de fragmentos produzidos por *primer*, variando entre 6 (OPH-19) e 13 (OPH-05), com média de 10,6 marcadores por *primer* e os tamanhos dos fragmentos variando de 110 a 1.830 pb. Os *primers* que apresentaram maiores números de bandas polimórficas (dez bandas) foram OPF-03 e OPH-04 e os *primers* OPF-05 e OPH-19, foram os menos polimórficos (cinco bandas) (Tabela 1).

A porcentagem de locos polimórficos foi de 70,4%, considerando os locos cuja frequência do alelo mais comum não excedeu 0,95. A procedência que apresentou maior porcentagem

de locos polimórficos foi Ivaí (54,1%), seguida de Pinhão (50,9%) e, por último, Cascavel (44,6%).

Tabela 1. Primers e suas respectivas seqüências de nucleotídeos, utilizados nas análises genéticas de *I. paraguariensis* e o nível de polimorfismo obtido. (Primers and its nucleotide sequences used in genetics analysis of *I. paraguariensis* as well the polymorphism level obtained)

Primers	Seqüência de oligonucleotídeos (5' → 3')	Marcadores Polimórficos	Marcadores monomórficos	Total marcadores
OPA-01	CAGGCCCTTC	7	4	11
OPA-02	TGCCGAGCTG	9	4	12
OPF-01	ACGCATCCTG	7	5	12
OPF-03	CCTGATCACC	10	1	11
OPF-04	TGCTGCAGGT	5	6	11
OPF-14	AGACGTCCAC	8	2	10
OPH-03	GGAAGTCGCC	8	4	12
OPH-04	AGTCGTCCCC	10	2	12
OPH-05	GAAACACCCC	8	5	13
OPH-08	GAAACACCCC	8	2	10
OPH-12	ACGCGCATGT	6	4	10
OPH-13	GACGCCACAC	9	0	9
OPH-15	AATGGCGCAG	7	2	9
OPH-18	GAATCGGCCA	7	4	11
OPH-19	CTGACCAGCC	5	1	6
Total		114	45	159

Gauer e Cavalli-Molina (2000), utilizando os mesmos *primers* no estudo de populações naturais de erva-mate, selecionaram 341 marcadores e obtiveram um número médio de 22,7 fragmentos por *primer*, sendo todos os marcadores polimórficos para a espécie (100%). As diferenças entre os resultados dos trabalhos podem ser atribuídas ao material alvo de estudo, às distintas condições de amplificação e ao critério de seleção na escolha dos marcadores para a análise. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998) e Hoelzel e Green (1998), a técnica RAPD apresenta grande sensibilidade, sendo o perfil eletroforético (número e padrões de marcadores) influenciado pela qualidade e concentração do DNA utilizado e pelas condições de amplificação dos fragmentos.

Estrutura genética

A análise da variância molecular (AMOVA) foi utilizada para estimar a divergência genética entre as procedências (populações) e progênes dentro de procedências (subpopulações). Usando reamostragem *bootstrap*, foram detectadas diferenças significativas a 5% de probabilidade entre procedências e entre progênes dentro de procedências (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância molecular (AMOVA) para procedências e progênes de *I. paraguariensis*. (Analysis of molecular variance (AMOVA) for provenances and progenies of *I. paraguariensis*)

Origem da variação	Varição genética (%)
Entre procedências - $\hat{\theta}_{ST}$	11,7*
Dentro de procedências - $\hat{\theta}_{d,proc} = 1 - \hat{\theta}_{ST}$	88,3
Entre progênes dentro de procedências - $\hat{\theta}_{prog}$	55,5*
Entre indivíduos dentro de progênie - $\hat{\theta}_{d,prog} = 1 - \hat{\theta}_{ST} - \hat{\theta}_{prog}$	32,8

(*) P < 0,05

Constatou-se que maior variação genética encontra-se dentro das procedências ($\hat{\theta}_{d,proc} = 1 - \hat{\theta}_{ST} = 88,3\%$), do que entre procedências ($\hat{\theta}_{ST} = 11,7\%$) (Tabela 2). Embora a maior parte da variação genética esteja dentro de procedência, o nível de divergência genética entre procedências é substancial ($0,05 \leq \hat{\theta}_{ST} \leq 0,15$) e indica que este efeito deve ser considerado nos programas de melhoramento e conservação florestal da espécie. Esse resultado sugere que diferenças genéticas importantes, entre procedências, podem ser exploradas nos programas de melhoramento genético, a partir da seleção das que apresentam as características desejadas. Além disso, também sugere que a variação genética entre populações deve ser grande, visto que aqui foram estudadas apenas três, de uma parte restrita da distribuição natural da espécie, e uma substancial variação genética entre elas foi detectada. Por sua vez, indica a necessidade de conservar várias populações da espécie para reter esta importante fonte de variação (entre procedências) possibilitando a sua exploração futura em programas de melhoramento genético.

Da variação genética existente dentro de procedências ($\hat{\theta}_{d,proc} = 1 - \hat{\theta}_{ST} = 88,3\%$), verificou-se que a variação entre progênes ($\hat{\theta}_{prog} = 55,5\%$) foi superior a de indivíduos dentro de progênes ($\hat{\theta}_{d} = 1 - \hat{\theta}_{ST} - \hat{\theta}_{prog} = 32,8\%$) (Tabela 2). A variação genética entre progênes dentro de procedências é significativamente diferente de zero. Esse resultado sugere a existência de grande variação genética entre progênes, que pode ser explorada em programas de melhoramento genético a partir da seleção das progênes mais produtivas.

A matriz de distâncias genéticas entre as procedências permitiu a construção do dendrograma, representado na Figura 1, onde se verifica que as procedências Ivaí e Pinhão apresentaram maior similaridade genética, enquanto Cascavel encontra-se mais distante geneticamente dessas.

Entretanto, a magnitude da distância genética entre as procedências foi pequena, conforme revela a escala de valores. A análise *bootstraps* apresentou baixa consistência no agrupamento das procedências Ivaí e Pinhão (28,3%), indicando a necessidade de saturação com maior número de marcadores RAPD para aumentar a precisão dos resultados.

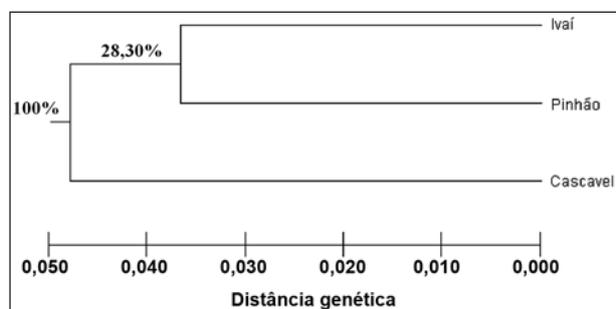


Figura 1. Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de Nei (1978), entre as procedências Ivaí, Pinhão e Cascavel, de *I. paraguariensis*. (Dendrogram based on genetic distances of Nei (1978), among Ivaí, Pinhão and Cascavel provenances of *I. paraguariensis*)

Os resultados obtidos nesse trabalho concordaram com diversos estudos realizados em espécies arbóreas, utilizando marcadores moleculares, que relataram que a maior diversidade genética encontra-se dentro de populações. Em *Coffea arabica*, verificou-se 61,5% da diversidade dentro de populações (SILVEIRA *et al.*, 2003); em *Plathymenia reticulata* este índice foi de 87,7% (LACERDA *et al.*, 2001); em *Cynara scolymus* foi de 71,8% (LANTERI *et al.*, 2001) e em *Trichilia pallida* foi de 87,5% (ZIMBACK *et al.*, 2004).

O padrão de distribuição da variação genética entre e dentro das procedências aqui estudadas é também similar ao observado em outros estudos com a espécie: Gauer e Cavalli-Molina (2000), estudando populações naturais, verificaram 85% da variabilidade genética ocorrendo dentro das populações e 15% entre populações. Cansian (2003), também caracterizando populações naturais, e Vidor *et al.* (2002), analisando um ensaio de progênies, estimaram que as variâncias intra-populacionais foram maiores que as interpopulacionais. Outros marcadores genéticos também foram empregados nos estudos de variabilidade em erva-mate: Gregianini e Winge (2000), analisando proteínas de reserva de sementes, constataram que 85% da variabilidade encontravam-se dentro de populações e 15% entre populações. Os resultados obtidos com marcadores isoenzimáticos em populações naturais detectaram que a diferenciação genética entre as populações foi de 12,9%, verificando-se maior variabilidade dentro das populações (87,1%) (WENDT, 2005).

Portanto, todos os trabalhos de estrutura genética com erva-mate têm mostrado o mesmo padrão, sendo os resultados revelados pelos marcadores RAPD coerentes com os observados pelos locos isoenzimáticos e com os resultados observados por outros autores para a espécie, indicando maior variação genética dentro (mais especificamente, neste caso, entre progênies) do que entre procedências. Tais resultados, em termos de contribuição aos programas de melhoramento, indicam que o efeito de procedência é importante e que deve ser avaliado grande número de procedências por região ecogeográfica (em torno de 10 procedências) no início dos programas, visto que foram detectadas razoáveis diferenças genéticas entre as três procedências testadas. Se a avaliação de apenas três procedências, de origem restrita da distribuição da espécie, revelou razoáveis diferenças genéticas entre elas, grandes diferenças podem existir entre procedências mais distantes, o que deve ser considerado nos programas de melhoramento genético. Ressalta-se que a seleção de procedências adequadas para uma determinada região é uma das fases mais importante nos programas de melhoramento florestal, permitindo geralmente a capitalização de altos níveis de ganhos genéticos.

A alta variação detectada entre progênies dentro de procedência indica que esse efeito pode ter grande importância em programas de melhoramento da espécie, devendo ser avaliado grande número de progênies, das melhores procedências, para a seleção de árvores superiores. Também, é importante que este material genético seja avaliado futuramente por outros tipos de marcadores genéticos, com herança codominante como isoenzimas e microssatélites, para confirmar os resultados aqui obtidos e fazer uma melhor descrição dos níveis de variação genética presente dentro das populações, em termos de heterozigiosidade e níveis de endogamia.

CONCLUSÕES

As procedências estudadas apresentaram maior diversidade genética dentro de procedência, principalmente entre as progênies dentro da procedência, do que entre procedências. Portanto, sugere-se que os programas de melhoramento devem considerar, além do efeito de procedências, suas respectivas progênies;

As distâncias genéticas entre as procedências e entre as progênies dentro das procedências são pequenas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa Florestas pelo financiamento do projeto e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos à primeira autora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CANSIAN R.L. Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi-voláteis em populações nativas de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) do Brasil, visando a conservação da espécie. 2003. 82p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

CARDOSO, M.A.; PROVANI, J.; POWELL, W.; FERREIRA, P.C.G.; OLIVEIRA, D.E. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinoideae). *Molecular Ecology*, London, v.7, p.601-608, 1998.

DIAS, L.A.S.; ROCHA, R.B.; PICOLE, E.A.T. Distinctness of cacao cultivars using yield components data and RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, Viçosa, n.5, p.47-54, 2005.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, Rochester, v.12, p.13-15, 1988.

ESTOPA, R.A.; SOUZA, A.M.; MOURA, A.C.O.; BOTTREL, M.C.G.; MENDONÇA, E.G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (D.C.) MacLeish). *Scientia Forestalis*, Piracicaba, n.70, p.97-106, 2006.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, S. Genetic variation in natural populations of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. *Heredity*, London, v.84, p.647-656, 2000.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, London, v.137, p.1121-1137, 1994.

GREGIANINI, T.S.; WINGE, H. Variabilidade de proteínas de reserva em populações naturais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae). In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA MATE, 3, 2000, Encantado. *Anais*. Porto Alegre: Edição dos Organizadores, 2000. p.373-380

HOELZEL, A.R.; GREEN, A. PCR protocols and population analysis by direct DNA sequencing and PCR-based DNA fingerprinting. In: HOELZEL, A.R. (Ed.) *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. 2.ed. New York: Oxford University Press, 1998. p.201-235.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P.; LEMOS FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. *Molecular Ecology*, Edinburgh, v.10, p.1143-1152, 2001.

LANTERI, S.; DI LEO, I.; LEDDA, L.; MAMELI, M.G.; PORTIS, E. RAPD variation within and among populations of globe artichoke cultivar "Spinoso sardo". *Plant Breeding*, Berlin, v.120, p.243-246, 2001.

LERCATEAU, E.; ROBERT, T.; PÉTIARD, V.; CROUZILLAT, D. Elevation of the extend of genetic variability of *Theobroma cacao* L. accessions using RAPD and RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, London, n.95, p.10-19, 1997.

MACCARI JUNIOR, A. *Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate*. Curitiba: Câmara Setorial de Cadeia Produtiva da Erva-mate, 2000. 160 p. (Série PDACT, 1)

MILLER, M.P. *TFPGA: Tools for population genetics analysis: version 1.3- a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data*. Logan: Utah State University, 1997. Disponível em: <http://www.marksgeneticsoftware.net>. Acesso em: 00 mes 0000

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

OLIVEIRA, Y.M.M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10, 1983, Curitiba. *Anais*. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1985. p.17-36.

- RESENDE, M.D.V.; STURION, J.A.; MENDES, S. **Genética e melhoramento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Colombo: EMBRAPA-CNPF, 1995. 33p.
- RESENDE, M.D.V.; STURION, J.A.; CARVALHO, A.P.; SIMEÃO, R.M.; FERNANDES, J.S.C. **Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 65p.
- SILVEIRA, S.R.; RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; SERA, T.; CARVALHO, V.P.; COELHO, A.S.G. Assessment of genetic variability within and among coffee progenies and cultivars using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.26, n.3, p.329-336, 2003.
- SIMEÃO, R.M.; STURION, J.A.; RESENDE, M.D.V.; FERNANDES, J.S.C.; NEIVERTH, D.D.; ULBRICH, A.L. Avaliação genética em erva-mate pelo procedimento BLUP individual multivariado sob interação genótipo x ambiente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.11, p.1589-1596, 2002.
- SOKAL, R.R.; MICHENER, D. A statistical method for evaluation systematic relationships. **University of Kansas Scientific Bulletin**, Kansas, v.38, p.1409-1438, 1958.
- VARGHESE, Y.A.; KNAAK, C.; SETHURAJ, M.R.; ECKE, W. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Hevea brasiliensis*. **Plant Breeding**, Berlin, n.116, p.47-52, 1997.
- VENKATACHALAM, P.; PRIYA, P.; SARASWATHY-AMMA C.K.; THULASEEDHARAN, A. Identification, cloning and sequence analysis of a dwarf genome-specific RAPD marker in rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg.] **Plant Cell Reports**, Berlin, n.23, p.327-332, 2004.
- VIDOR, M.A.; RUIZ, C.P.; MORENO, S.V.; FLOSS, P.A. Genetic variability in a trial of erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, p.584-587, 2002.
- WENDT, S.N. **Genética de populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil.** 2005. 165f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RA-FALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p.6531-6535, 1990.
- ZIMBACK, L.; MORI, E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; VEIGA, R.F.A.; MELLO JUNIOR, J.R.S.M. Genetic structure of *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) populations by RAPD markers. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.65, p.114-119, 2004.

Recebido em 03/11/2005

Aceito para publicação em 12/02/2007