

JULIANA CRISTHINA FRIEDRICH

**VARIABILIDADE GENÉTICA E TEORES DE METILXANTINAS E COMPOSTOS
FENÓLICOS EM PROGÊNIES DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
ABRIL - 2009

JULIANA CRISTHINA FRIEDRICH

**VARIABILIDADE GENÉTICA E TEORES DE METILXANTINAS E COMPOSTOS
FENÓLICOS EM PROGÊNIES DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
ABRIL - 2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

F911v Friedrich, Juliana Cristhina
Variabilidade genética e teores de metilxantinas e compostos fenólicos em progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) / Juliana Cristhina Friedrich. -- Maringá : [s.n.], 2009.
121 f. : il. color.

Orientador : Prof^a. Dr^a. Adriana Gonela.
Co-orientador : Prof. Dr. Euclides Lara Cardozo Junior.
Co-orientador : Prof^a. Dr^a. Maria Celeste Gonçalves Vidigal.
Co-orientador : Prof. Dr. Pedro Soares Vidigal Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, 2009.

1. Erva-mate - Genética - Variabilidade. 2. Erva-mate - RAPD - Variabilidade genética. 3. Erva-mate - Metilxantinas - Variabilidade genética. 4. Erva-mate - Compostos fenólicos - Variabilidade genética. I. Gonela, Adriana, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 21.ed. 633.77

“O que importa na vida não é o ponto de partida, mas a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher!”.

Cora Coralina

Aos meus pais, Zeferino Adolar (*in memoriam*) e Ottilia, os quais, durante toda minha vida, compartilharam os meus ideais e me incentivaram a prosseguir, independente dos obstáculos, até que cada vitória fosse alcançada com determinação, grandeza e êxito.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e à Santa Rita de Cássia, pelas bênçãos concedidas e por me concederem forças e coragem para acreditar que tudo é possível quando se tem persistência.

À Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de ingresso no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM) e conseqüente realização do curso.

À professora doutora Adriana Gonela, pela orientação, dedicação, ensinamentos e, principalmente, pela amizade e confiança depositada em mim.

Ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico Avançado da Fundação Parque Tecnológico Itaipu (PDTA/FPTI-BR), pela bolsa concedida.

Ao Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri), pela disponibilidade do laboratório, materiais e reagentes. E à funcionária Kaciele Cristina da Costa, pela disponibilidade e auxílio indispensáveis.

À Universidade Paranaense (UNIPAR), campus Toledo, pela parceria e pelas condições proporcionadas para a execução do trabalho.

À Embrapa Florestas e, em especial, ao doutor José Alfredo Sturion, pela concessão do material genético.

Ao Laboratório Prati, Donaduzzi & Cia Ltda e toda sua equipe, por possibilitar a realização das análises fitoquímicas;

Aos empresários do setor ervateiro, senhor Afonso Olisewski e senhor Dalnei Neiverth da empresa Neiverth Filhos & Cia Ltda - Chimarrão Bitumirim, de Ivaí/PR, pelo apoio irrestrito durante a coleta do material.

Ao professor doutor Euclides Lara Cardozo Junior, pela colaboração, parceria e pelas dicas valiosas.

Ao meu amado pai, Zeferino Adolar Friedrich (*in memoriam*), por todo o ensinamento que me deste em vida.

À minha adorável mãe, Ottilia Grigolo Friedrich, pelo carinho, paciência e torcida durante toda caminhada e, especialmente, por ser meu alicerce em todas as minhas decisões.

Ao meu irmão, Júlio César Friedrich, pelo afeto, dedicação e disposição incondicional nos momentos de necessidade.

Ao meu sobrinho, Matheus Felipe Friedrich, e minha cunhada Vera Rosana Simon Friedrich, pelas palavras de conforto e amizade.

À professora doutora Maria Celeste Gonçalves Vidigal e ao professor doutor Pedro Soares Vidigal Filho, pela co-orientação e incentivo e à professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, pelas palavras ternas e sábias.

Ao doutor Marcus Vinicius Kvitschal, pelo apoio na realização dos testes estatísticos.

Aos funcionários do PGM, Francisco José da Cruz e Maria Valquiria Magro, pela atenção e serviços prestados.

Aos técnicos de laboratório da UNIPAR, campus Toledo, Ângela Francieli Luft Prates, Giovani Medeiros de Oliveira, Marcelo Henrique Friedrich, Luciane Sartoretto Bueno, Márcia Cristina Lawich, Rosi Terezinha Schneider, Rúbia Pizzato Cavasine e Zélia Salete de Souza, pelo respeito, dedicação e disposição durante o desempenho das tarefas.

Às acadêmicas do curso de Farmácia da UNIPAR, campus Toledo, Ana Carolina Menegotto, Jane Fernanda Lopes, Jaqueline Hoscheid e Vandréia Aparecida Andriolli, pela amizade e companheirismo. E às acadêmicas do curso de Ciências Biológicas, Andressa Camila de Souza Rocha, Cátia Raquel Volkweis e Jaqueline Manzatti da Silva, pelo auxílio dispensado durante a condução das análises moleculares e fitoquímicas.

À grande amiga Gheisa Hettwer Cassol, pelo companheirismo e força e por ser meu braço direito em diversas etapas da minha vida acadêmica e pessoal.

À minha prima Sandra Mara Sartoretto, pela colaboração e ajuda no início dos experimentos e à doutora Giselly Figueiredo Lacanallo, pelo apoio intelectual e prático fornecido.

Ao querido Fabiano Guerra, pela atenção e estímulo nas horas de dificuldades, e aos amigos que conquistei durante o mestrado, em especial à Ana Daniela Lopes, Anelise da Silva Cruz, Boris Briñez Rodrigues, Cristiane Zorzatto, Celina Inês Heidemann, Elisangela dos Santos, Isaac Romani, Josiele Paula Klassmann, Juliana Franzoni dos Santos, Lara Daniela de Souza, Lorena Lopes de Sousa, Rachel Leggi Arrias, Raphael Augusto e Simone Aparecida dos Santos.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram para que esta trajetória fosse finalizada com sucesso.

BIOGRAFIA

JULIANA CRISTHINA FRIEDRICH, filha de Zeferino Adolar Friedrich e Ottilia Grigolo Friedrich, irmã de Júlio César Friedrich, nasceu aos vinte e dois dias do mês de maio de 1984, em Toledo, Estado do Paraná.

Em dezembro de 1998, concluiu o Ensino Fundamental, na Fundação Educacional de Toledo - FUNET e, em dezembro de 2001, finalizou o Ensino Médio no Colégio La Salle, ambos na cidade de Toledo, Estado do Paraná.

Ingressou no curso de Farmácia da Universidade Paranaense - UNIPAR, campus Toledo, em 2002, graduando-se em Bacharelado no ano de 2006. Durante a vida acadêmica, participou de diversos projetos de pesquisa, merecendo destaque o estudo voltado à constituição química e biológica de produtos comerciais e de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC/UNIPAR, durante dois anos.

No período entre novembro de 2007 e agosto de 2008, foi bolsista do Programa de Desenvolvimento Tecnológico Avançado da Fundação Parque Tecnológico Itaipu (PDTA/FPTI-BR). Atuou como docente substituta no Curso de Farmácia da Universidade Paranaense - UNIPAR, campus Toledo, de setembro a novembro de 2008. Atualmente, participa como sócia efetiva da SUSTENTEC - Produtores Associados para o Desenvolvimento de Tecnologias Sustentáveis.

Em 2007, iniciou o Curso de Pós-graduação (*Lato Sensu*) em Farmácia Oncológica, no Centro Educacional São Camilo - Sul, em chancela com o Centro Universitário São Camilo - SP.

Buscando novos conhecimentos e desafios, em março de 2007, matriculou-se no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Mestrado, na Universidade Estadual de Maringá - UEM, prosseguindo os estudos sobre a erva-mate, mais especificamente, analisando a variabilidade genética desta espécie de grande interesse econômico, social e terapêutico.

ÍNDICE

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Evolução histórica da erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.).....	4
2.2. Considerações gerais sobre a erva-mate	6
2.2.1. Aspectos taxonômicos e botânicos	6
2.2.2. Distribuição natural	9
2.2.3. Importância sócio-econômica	12
2.3. Composição química e atividades biológicas da erva-mate	13
2.3.1. Metilxantinas	14
2.3.2. Compostos fenólicos	20
2.3.3. Ácidos fenólicos	21
2.4. Programas de melhoramento e conservação genética da erva-mate	25
2.5. Marcadores moleculares	28
2.5.1. Polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD)	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Material vegetal	33
3.2. Delineamento e caracterização da área experimental.....	35
3.3. Seleção das progênes de erva-mate	36
3.4. Divergência genética entre progênes de erva-mate mediante o uso de marcadores moleculares RAPD	40
3.4.1. Coleta das amostras e extração de DNA	40
3.4.2. Quantificação do DNA e diluição das amostras	41
3.4.3. Reações de amplificação, separação dos fragmentos por eletroforese e detecção das bandas polimórficas	42
3.4.4. Caracterização da variabilidade genética entre e dentro de progênes e procedências de erva-mate utilizando marcadores RAPD	43
3.5. Análise da composição fitoquímica	46

3.5.1. Beneficiamento e extração.....	46
3.5.2. Quantificação de metilxantinas e compostos fenólicos	46
3.5.3. Análises estatísticas.....	47
3.5.3.1. Análise da variância	47
3.5.3.2. Teste comparativo de médias entre progênies de erva-mate.....	48
3.5.3.3. Correlação genética entre caracteres.....	50
3.5.3.4. Medida de dissimilaridade entre progênies de erva-mate por meio da Distância Generalizada de Mahalanobis (Mahalanobis, 1936).....	51
3.5.3.5. Método de otimização de Tocher	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. Análise da divergência genética por meio de marcadores moleculares RAPD entre e dentro de procedências e progênies	55
4.2. Análise da composição fitoquímica	73
5. CONCLUSÕES	92
6. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
APÊNDICE.....	116

RESUMO

FRIEDRICH, Juliana Cristhina, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, abril de 2009. **Variabilidade genética e teores de metilxantinas e compostos fenólicos em progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Professora Orientadora: Dra Adriana Gonela. Professores Conselheiros: Dr. Euclides Lara Cardozo Junior, Dra Maria Celeste Gonçalves Vidigal e Dr. Pedro Soares Vidigal Filho.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é uma planta nativa da América do Sul, onde possui grande importância sócio-econômica. Entretanto, esta espécie está em risco de erosão genética devido à exploração predatória, desmatamento e baixa qualidade genética e fisiológica das sementes. Neste sentido, medidas de conservação devem ser tomadas com base no conhecimento de parâmetros genéticos e fitoquímicos sobre a espécie. Este trabalho teve por objetivo caracterizar a variabilidade genética e química entre progênies de erva-mate, coletadas em Pinhão/PR, Quedas do Iguaçu/PR, Ivaí/PR, Cascavel/PR e Barão de Cotegipe/RS, mediante utilização de marcadores moleculares RAPD e análise dos teores de metilxantinas e compostos fenólicos por cromatografia líquida. As análises moleculares foram realizadas utilizando-se 20 *primers* para RAPD. Os dados da quantificação dos compostos foram submetidos à análise de variância, comparação entre médias e correlação fenotípica, genotípica e ambiental, além do método de agrupamento de Tocher e UPGMA, tendo como referência a Distância Generalizada de Mahalanobis ($D_{ii'}^2$). Os *primers* empregados geraram um total de 254 fragmentos amplificados (94,89% polimórficos) e o tamanho das bandas variou de 300 pb a 3.533 pb. Constatou-se maior variabilidade genética dentro das procedências (92,00%), ou seja, entre as progênies. A combinação mais similar ocorreu entre os acessos 47 (progênie C 4/4) e 48 (progênie C 4/6), com $s_{ii'} = 0,913$, enquanto a combinação entre os acessos 4 (progênie AM 110/1) e 68 (progênie Q 65/6) foi a mais dissimilar, com $d_{ii'} = 0,718$. Quanto ao doseamento dos compostos, os resultados mostraram diferenças estatísticas significativas para os teores de cafeína e teobromina entre as dezesseis progênies. Os valores mínimos e máximos foram de 0,0129% (progênie BA 25) e 1,3821% (progênie AB 91) para cafeína, e de 0,01021% (progênie S 69) e 0,8499% (progênie NA 121) para teobromina, respectivamente. Para ácidos

fenólicos, os dados obtidos mostraram diferenças entre as progênies somente para ácido clorogênico, com concentração variando de 1,5924% (progênie AQ 151) a 2,8046% (progênie NA 121). Observou-se correlação negativa entre teores de cafeína com teobromina (-0,8643) e ácido clorogênico (-0,6806), além dos seus isômeros, os ácidos neoclorogênico (-0,6755) e criptoclorogênico (-0,4264). Obteve-se correlação positiva entre teobromina e os derivados cafeoil, com valores de 0,4245; 0,7106 e 0,3937 para os ácidos neoclorogênico, clorogênico e criptoclorogênico, respectivamente. Os resultados evidenciaram divergência genética e química entre as progênies, sugerindo que ganhos apreciáveis podem ser obtidos pela seleção destes materiais, o que tende a aprimorar os programas de melhoramento da espécie.

Palavras-chave: Erva-mate, RAPD, metilxantinas e compostos fenólicos.

ABSTRACT

FRIEDRICH, Juliana Cristhina, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, April 2009. **Genetic variability and methylxanthine and phenolic compound content in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies.** Advisor: Dra Adriana Gonela. Committee Members: Euclides Lara Cardozo Junior, Dra Maria Celeste Gonçalves Vidigala and Dr. Pedro Soares Vidigal Filho.

Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), is a plant native to the South America, where it has a great social economic importance. However, the species is threatened by genetic erosion resulting from predatory exploitation, deforestation, and poor seed genetic and physiological quality. Conservation measures should be taken based on the knowledge of the genetic and phytochemical parameters of the species. This work aimed to characterize the genetic and chemical variability between mate progenies collected in Pinhão, Quedas do Iguaçu, Ivaí, and Cascavel, all in Paraná (PR) State, and in Barão de Cotegipe, Rio Grande do Sul (RS) State, using RAPD molecular markers and analysis of methylxanthine contents and phenolic compounds by liquid chromatography. The molecular analyses were performed using 20 RAPD primers. The compound quantification data were submitted to variance analysis, mean comparison, and phenotypic, genotypic, and environmental correlation, in addition to Tocher and UPGMA grouping using the generalized Mahalanobis distance ($D_{ii'}^2$) as a reference. The primers used yielded 254 amplified fragments (94.89% polymorphics) and the band size ranged from 300 to 3,533 pb. A larger genetic variability was observed between the progenies (92.00%). The most similar combination occurred between accesses 47 (progeny C 4/4) and 48 (progeny C4/6), for $s_{ii'} = 0.913$, while the combination of accesses 4 (progeny AM 110/1) and 68 (progeny Q 65/6) was the most dissimilar, $d_{ii'} = 0.718$. Compound profiling revealed significant statistical differences in caffeine and theobromine contents between the 16 progenies. The minima and maxima were 0.0129% (progeny BA 25) and 1.3821% (progeny AB 91) for caffeine and 0.01021% (progeny S 69) and 0.8499% (progeny NA 121) for theobromine, respectively. The phenolic acid contents showed differences between progenies only for chlorogenic acid, whose concentration ranged from 1.5924% (progeny AQ 151) to 2.8046% (progeny NA 121). A negative correlation was observed between the concentrations of caffeine and theobromine (-0.8643), and chlorogenic acid (-

0.6806), as well as their isomers, neochlorogenic acid (-0.6755) and cryptochlorogenic acid (-0.4264). Theobromine presented a positive correlation with caffeoyl derivatives, 0.4245, 0.7106, and 0.3937 for neochlorogenic, chlorogenic, and cryptochlorogenic acids, respectively. The results evidenced a large genetic and phytochemical divergence between the studied progenies, suggesting that significant gains may be achieved by material selection in species improvement programs.

Keym words: Mate, RAPD, methylxanthines, and phenolic compounds.

1. INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. - Aquifoliaceae) é uma espécie arbórea nativa da floresta ombrófila mista e apresenta grande importância sócio-econômica no Brasil, Paraguai e Argentina (Fowler e Sturion, 2000). Nestas regiões, esta espécie é cultivada pelas ervateiras ou por pequenos produtores (Costa et al., 2005) devido às propriedades nutricionais e estimulantes obtidas por meio da infusão de suas folhas secas (Díaz e Tonon, 2006).

Estudada por diversos autores sob o ponto de vista químico e farmacológico (Da Croce, 2002; Carneiro et al., 2006; Schubert et al., 2006; Streit et al., 2007; Rivelli et al., 2007), a erva-mate possui em sua composição química as saponinas triterpênicas derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico (Campos et al., 1996); os flavonóides quercetina, rutina e caempferol; os derivados cafeoil (ácido clorogênico, ácido neoclorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido cafeico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico) (Filip et al., 2001; Silva et al., 2007); as metilxantinas (cafeína e teobromina), além de aminoácidos, açúcares e vitaminas (Rates, 1999).

As metilxantinas são os compostos mais conhecidos desta espécie e possuem as propriedades de estimulação do sistema nervoso central, vasoconstrição periférica, relaxamento da musculatura lisa e estimulação do miocárdio (Kikatani et al., 1993; Lorist e Tops, 2003). No que diz respeito aos fenóis, de acordo com Gorzalczany et al. (2001), estes compostos são tradicionalmente utilizados em problemas gastrintestinais, como agentes coleréticos e eupépticos. Além disso, Campos et al. (1996) relatam que os fenóis possuem uma alta capacidade antioxidante e ainda conferem às suas infusões um papel hepatoprotetor.

Todavia, ainda são escassas as informações existentes sobre a variação dos constituintes químicos desta planta (Coelho et al., 2001), especialmente das metilxantinas e compostos fenólicos. O que se sabe é que seus teores estão relacionados à variabilidade genética, local de origem, cultivo das progênies (Cardozo Junior et al., 2007), processamento (Esmelindro et al., 2002), época de colheita, idade da planta (Schubert et al., 2006), entre outros fatores.

Neste sentido, a determinação do teor de compostos químicos e a padronização de métodos de análise seria uma das maneiras imprescindíveis

para detectar a variação destes componentes que podem influenciar na qualidade do produto elaborado e nas suas propriedades sensoriais (Donaduzzi et al., 2000; Sturion et al., 2004).

Aliado a isso, a identificação e seleção de materiais produtivos em todas as safras, com estabilidade de produção e adaptabilidade às melhorias nas condições ambientais, são fundamentais para o desenvolvimento e aprimoramento dos programas de melhoramento da espécie (Sturion e Resende, 2005; Resende et al., 2000). Também trazem reflexos positivos na qualidade final do produto.

Os programas de melhoramento da erva-mate tiveram início na Argentina em 1970 (Prat Kricun e Belingheri, 1995). No Brasil, o melhoramento genético é mais recente, podendo-se destacar os programas que iniciados em 1986 pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina (Epagri) e pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Florestas), em 1995, com a seleção de procedências, progênies, indivíduos e clones (Da Croce e Floss, 1999; Resende et al., 2000; Costa et al., 2005).

Como critérios passíveis de melhoramento, tem se dado ênfase às características silviculturais, tais como produção de massa foliar, adaptação, resistência a pragas e doenças, desfolhamento e tipo de ramificação ou arquitetura (Resende et al., 2000; Sturion et al., 2003).

No entanto, é de extrema importância incluir nos programas de melhoramento informações úteis para a seleção de árvores superiores, tanto em termos de produtividade quanto de qualidade (Sturion e Resende, 1997; Sturion e Resende, 1999; Sturion et al., 2000; Sturion e Resende, 2001; Sturion et al., 2002). Os ervais cultivados estão diminuindo sua produção em virtude do emprego de deficientes técnicas de cultivo e colheita, e a baixa qualidade genética e fisiológica das sementes empregadas no plantio (Resende et al., 1995; Wendt et al., 2007).

Para tanto, deve-se conhecer a diversidade genética entre e dentro de populações, a fim de aumentar o ganho genético das características de interesse (Resende et al., 2000). Uma forma de avaliar estas variáveis seria empregando marcadores moleculares, os quais permitem identificar genótipos em estádios iniciais de desenvolvimento da planta, permitindo selecionar árvores superiores em termos de adaptação e produtividade, reduzir o tempo e aumentar

consideravelmente a eficiência do programa de melhoramento (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Os marcadores moleculares RAPD têm se mostrado muito eficientes em estudos de divergência genética empregada em programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos de erva-mate (Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Vidor et al., 2002a, 2002b; Cansian, 2003). Wendt et al. (2007), utilizando marcadores RAPD para determinar a variabilidade genética em um teste de procedências e progênies de erva-mate, encontraram 70,4% de polimorfismo entre os indivíduos e, ainda, houve maior variação genética entre progênies do que entre procedências, sugerindo que maiores ganhos genéticos podem ser obtidos mediante seleção entre progênies.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar a variabilidade genética e química entre progênies de erva-mate, coletadas em Pinhão/PR, Quedas do Iguaçu/PR, Ivaí/PR, Cascavel/PR e Barão de Cotegipe/RS, mediante a utilização de marcadores moleculares RAPD e análise dos teores de metilxantinas e compostos fenólicos por cromatografia líquida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Evolução histórica da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

A erva-mate é uma planta nativa da América do Sul e o seu consumo na forma de “chimarrão” pelos indígenas foi relatado antes da chegada dos portugueses ao Brasil e, também, dos espanhóis que dominaram boa parte da América (Marx et al., 2003; Bondarik et al., 2006). Uma prova disto foi evidenciada nos túmulos pré-colombianos de Ancon, nas proximidades de Lima no Peru, onde a planta foi encontrada juntamente com alimentos e objetos, comprovando o seu uso pelos povos incas, também chamados de quíchuas (Linhares, 1969; Mazuchowski, 1989).

O mate é derivado do vocábulo quíchua “mati”, que significa cabaça, cuia, porongo. No entanto, a palavra utilizada para designar o objeto no qual se bebia acabou sendo modificada para mate e empregada para designar a própria bebida consumida pelos povos sul-americanos (Linhares, 1969; Boguszewski, 2007).

Os espanhóis colonizadores do Peru foram os primeiros europeus a entrarem em contato com a erva-mate. Entretanto, foi depois da chegada dos espanhóis no Paraguai. Daí a designação “erva do Paraguai”, cujo consumo na forma de infusão se tornou hábito e foi difundido entre os conquistadores de toda região sul do continente. O vício era tão contagiante que nem mesmo as proibições do governo paraguaio, nem as malsinações dos jesuítas (entre os quais o Padre Antonio, que a chamava de “erva do diabo”, referindo-se às suas supostas propriedades afrodisíacas) pôs fim a este costume (Linhares, 1969; Mazuchowski, 1989; Boguszewski, 2007).

Apesar das tentativas de proibições, foram os próprios jesuítas que depois de instituírem várias feitorias, passaram a ensinar os métodos de cultivo aos indígenas das tribos Tupi-Guarani que habitavam o Brasil, Paraguai e Argentina, e já chamavam a planta de “caá”. Ainda no século XVII, eles passaram a estudar o sistema vegetativo desta espécie, definindo a época de colheita das sementes e a produção de mudas (Prat Kricun, 1990; Mazuchowski e Rücker, 1993).

Durante mais de um século e meio (1610-1768), os jesuítas foram os principais responsáveis pela expansão da bebida, melhorando seu preparo e sua difusão entre os europeus, chegando a ser chamada como “chá dos jesuítas” (Mazuchowski e Rücker, 1993).

Algumas tribos que viviam em áreas onde a erva-mate não apresentava ocorrência natural, como é o caso dos indígenas das tribos da Bolívia, Chile e Peru, diziam que esta planta dava resistência durante o trabalho, além de reduzir a sede e a fome. Assim, eles não só obtinham o produto por meio de permutas e o transportavam por milhares de quilômetros (Linhares, 1969; Bragagnolo et al., 1980; Mazuchowski et al., 1996).

Os portugueses, por sua vez, conheceram o mate quando percorreram a região de Guairá (1628-1632) e regressaram para São Paulo, levando consigo os índios guaranis e o costume da bebida, uma vez que era apreciada pelos índios caingangues do planalto curitibano, os quais a nomeavam de “congoin” ou congonha, como é chamada até os dias atuais nas localidades de São Paulo e Minas Gerais (Mazuchowski, 1989; Boguszewski, 2007).

Os primeiros relatos sobre a comercialização das folhas foram obtidos em 1610, porém, somente em 1804, surgiram os primeiros documentos com registro da exportação oficial desta planta por meio do Porto de Paranaguá. A influência sócio-econômica da erva-mate foi fundamental e decisiva para que o Estado do Paraná conseguisse sua emancipação política da 5ª Comarca de São Paulo, no ano de 1853 (Mazuchowski, 1989).

A erva-mate foi considerada o principal produto de exportação da Província do Paraná no final do século XIX e, até o início da primeira Guerra Mundial, foi a base da economia do Estado.

Depois da primeira Guerra Mundial, o foco até então para a erva-mate foi sendo substituído pela madeira (Paraná, 1993), cuja exploração marcou o começo da devastação da Floresta com Araucária. Neste período, havia no Estado mais de noventa engenhos para o beneficiamento da erva-mate, que era exportada principalmente para o mercado latino (Mazuchowski e Rücker, 1993).

2.2. Considerações gerais sobre a erva-mate

2.2.1. Aspectos taxonômicos e botânicos

Ilex paraguariensis foi a designação proposta por August de Saint Hillaire, um naturalista francês, que encontrou a planta durante as diversas viagens que fez pela América do Sul, mais especificamente ao Brasil (Fagundes, 1980). Depois de identificados, o gênero e a espécie foram publicados nas referências do Museu de História Natural de Paris, no ano de 1822. Segundo o naturalista, este nome foi dado em função da planta assemelhar-se à erva do Paraguai (Mazuchowski e Rücker, 1993).

Representante da família Aquifoliaceae e muito importante economicamente na América do Sul (Filip et al., 2001), o gênero *Ilex* possui aproximadamente 600 espécies, sendo 220 nativas da América do Sul e, destas, 68 estão presentes no Brasil (Giberti, 1995; Scherer, 1997; Sturion e Resende, 1997).

De acordo com Valduga (1995), a taxonomia da erva-mate pode ser identificada por dois sistemas, sendo eles: Engler (1964) e Cronquist (1981), os quais estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Taxonomia da erva-mate segundo o Sistema de Engler (1964) e o Sistema de Cronquist (1981)

Sistema de Engler	Sistema de Cronquist
Divisão: Angiospermae	Divisão: Magnoliophyta
Classe: Dicotyledoneae	Classe: Magnoliopsida
Subclasse: Archichlamydeae	Subclasse: Rosidae
Ordem: Celastrales	Ordem: Celastrales
Família: Aquifoliaceae	Família: Aquifoliaceae
Gênero: <i>Ilex</i> L.	Gênero: <i>Ilex</i> L.
Espécie: <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.	Espécie: <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.

Caracterizada como uma espécie perene, em estado natural, é ombrófila, com crescimento lento ou moderado. De porte arbóreo e grande longevidade, sua altura varia de acordo com a idade e o tipo de sítio, podendo atingir até 30 m na

floresta. Todavia, quando podada, na maioria das vezes, não ultrapassa os 7 m de altura. Quando cultivada em local aberto, está predisposta ao ataque de pragas e manifestações de doenças (Figura 1) (Mazuchowski, 1989; Carpanezi, 1995; Carvalho, 2003; Carvalho, 2009).

O seu tronco é cilíndrico, reto ou pouco tortuoso, geralmente com 20 a 40 cm de diâmetro, podendo chegar a 100 cm. Possui uma casca com espessura de até 20 mm. A casca externa apresenta coloração de cinza-clara a acastanhada, persistente e com textura de áspera a rugosa, enquanto a casca interna apresenta textura arenosa e cor branca-amarelada, que depois da incisão acaba escurecendo devido ao contato com o ar (Reitz e Edwin, 1967; Reitz et al., 1988; Carvalho, 2003; Carvalho, 2009).



FOTO: Friedrich, 2004.

Figura 1 - Árvore de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em plantio na Fazenda Vila Nova, da Ervateira Bitumirim, no município de Ivaí/PR.

Quanto às características das folhas, estas são simples, alternadas, geralmente estipuladas, de textura variando de subcoriáceas a coriáceas, glabras verde-escura na parte superior e mais clara na porção inferior, limbo foliar obovado, medindo de 5 a 10 cm de comprimento e 3 a 4 cm de largura, com margem irregularmente serrilhada ou denteada, sendo, na maioria das vezes, o terço da base liso. O pecíolo mede de 7 a 15 mm, sendo considerado relativamente curto e suas nervuras laterais são pouco impressas na face adaxial e salientes na abaxial (Figura 2) (Reitz e Edwin, 1967; Reitz et al., 1988; Carvalho, 2003; Carvalho, 2009).



FOTO: Friedrich, 2004.

Figura 2 - Folha de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).

As flores são pequenas, pedunculadas e dispostas nas axilas das folhas superiores, apresentando um cálice gamossépalo com quatro sépalas de cor verde clara e uma corola composta de quatro pétalas brancas, sendo que entre as pétalas existem quatro estames (Mazuchowski, 1989). O período de floração ocorre entre os meses de setembro a dezembro, predominando em outubro (Reitz et al., 1988; Sousa et al., 2003).

Esta é uma espécie dióica críptica ($2n = 40$), com flores díclinas, sendo um dos sexos abortivo (flores masculinas e femininas em indivíduos separados). Ou seja, as flores masculinas apresentam ovário rudimentar não funcional (pistilódio) e as femininas estames rudimentares estéreis. O sistema reprodutivo é obrigatoriamente alógamo e, embora possa ocorrer transferência de pólen pelo

vento, a polinização é basicamente entomófila, sem existir polinizadores específicos, sendo efetuada por diversos insetos das ordens Hymenoptera, Coleoptera, Hemiptera e Diptera (Ferreira et al., 1983; Mazuchowski, 1989; Carvalho, 2009).

O fruto, por sua vez, é uma baga-dupla globular muito pequena, medindo de 6 a 8 mm. Quando novo, possui cor verde (Figura 3), passando a vermelho-arroxeadado ao amadurecer. A drupa madura é composta de uma película violácea que recobre a polpa glutinosa e envolve quatro pequenas sementes de tegumento áspero e duro. Na fase de frutinhas, os pássaros são atraídos e, após se alimentarem, expõem as sementes de modo a disseminar as plantas (Mazuchowski, 1989).



FOTO: Friedrich, 2004.

Figura 3 - Fruto imaturo de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).

2.2.2. Distribuição natural

A distribuição natural da espécie *Ilex paraguariensis* concentra-se nas regiões tropicais e temperadas, com exceção de zonas desérticas. Sua abrangência estende-se desde a latitude 21° S até 30° S e longitude 48°30' W até 56°10' W, compreendendo cinco Estados brasileiros: Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul; e parte do Paraguai e Argentina (Figura 4), numa superfície de aproximadamente 540 mil Km². Deste

total, 450 mil Km² situa-se em território brasileiro, o que corresponde a 83,3% de toda faixa de terra (Reitz e Edwin, 1967; Oliveira e Rotta, 1985; Mazuchowski, 1989; Giberti, 1995; Neumann, 2000).

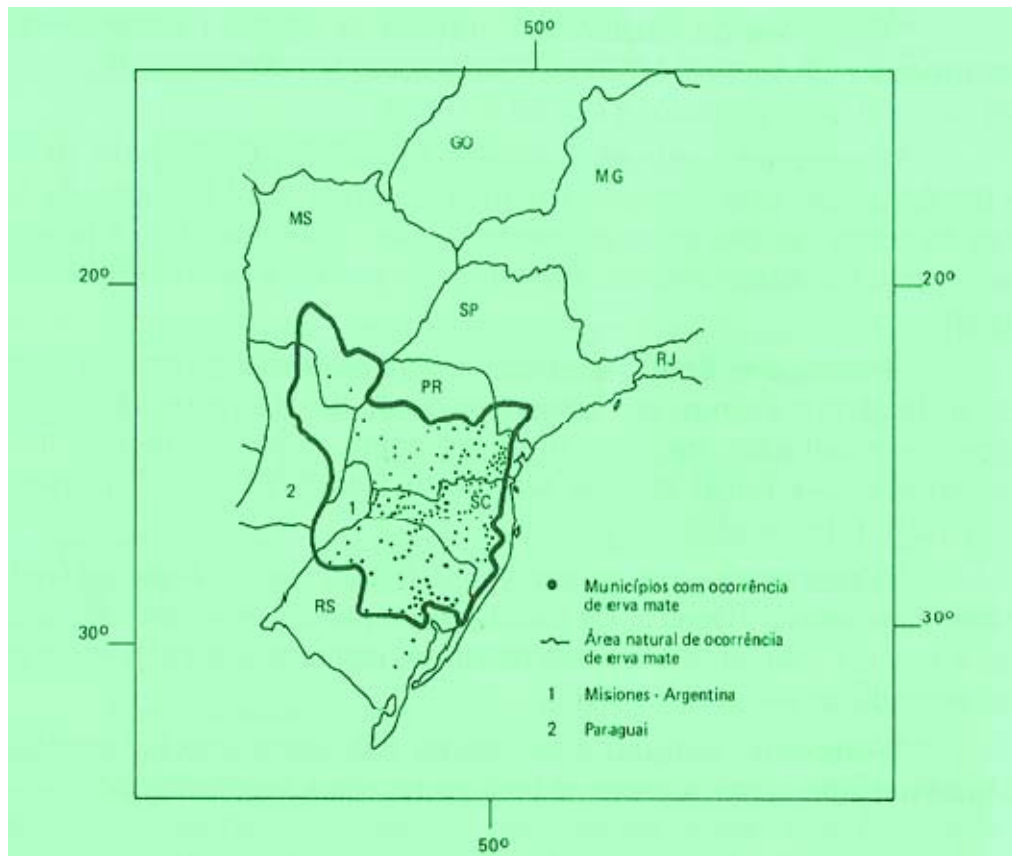


Figura 4 - Área de distribuição natural da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) (Embrapa-CNPQ, 1985 apud Mazuchowski, 1989).

No Brasil, esta espécie cresce espontaneamente em regiões constituídas por floresta com *Araucaria angustifolia* e matas subtropicais. Todavia, não é encontrada em zonas constituídas por campos naturais e de mata branca, caracterizada pela ausência de *A. angustifolia*. Na Argentina e Paraguai, a erva-mate apresenta-se, especialmente, nos sub-bosques das matas do rio Paraná e afluentes, onde a presença de araucária não é descrita (Reitz e Edwin, 1967; Oliveira e Rotta, 1985; Mazuchowski, 1989).

A ocorrência desta espécie no Estado do Paraná concentra-se abaixo do paralelo 24° S (região Centro Sul), cujas microrregiões responsáveis por mais de 80% da erva-mate paranaense produzida encontra-se na região dos Campos de Guarapuava e Médio Iguaçu (Paraná, 1997).

Em relação à caracterização climática, pode-se dizer que, de acordo com o mapeamento climático de Köppen (Figura 5), a distribuição natural predominante da erva-mate abrange os tipos climáticos Cfb (clima temperado propriamente dito; temperatura média no mês mais frio abaixo de 18 °C, com verões frescos, temperatura média no mês mais quente inferior a 22 °C e sem estação seca definida), seguido pelo Cfa (clima subtropical; temperatura média no mês mais frio inferior a 18 °C e temperatura média no mês mais quente acima de 22 °C, com verões quentes, geadas pouco frequentes e tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, mas sem estação seca definida) (Oliveira e Rotta, 1985; Caviglione et al., 2000). As temperaturas médias anuais nos locais de ocorrência oscilam entre 12 e 24 °C, sendo que a temperatura média mais favorável ao desenvolvimento da espécie varia de 20 a 23 °C (Oliveira e Rotta, 1985).

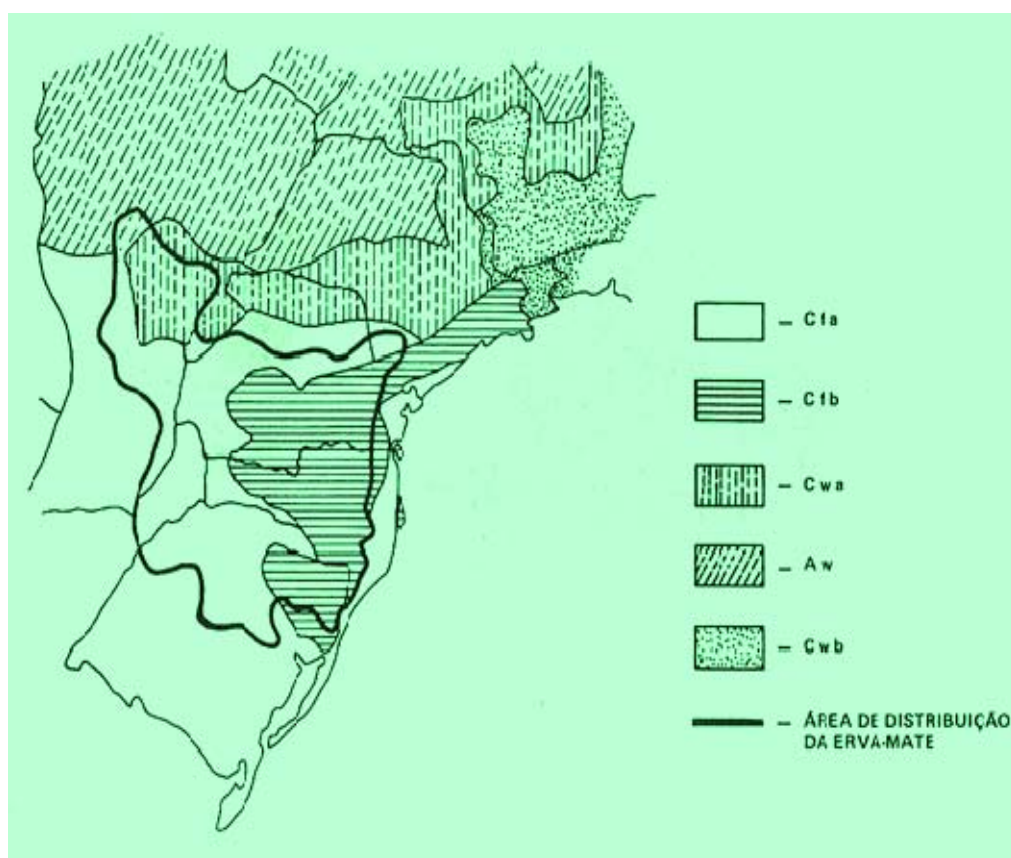


Figura 5 - Tipos climáticos de Köppen para a área de ocorrência natural da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) (Embrapa-CNPQ, 1985 apud Mazuchowski, 1989).

O tipo de solo no qual a erva-mate aparece com maior frequência caracteriza-se por apresentar alto teor de alumínio e baixo teor de nutrientes trocáveis e com textura média (entre 15 e 35% de argila) e argilosa (acima de 35% de argila). Esta espécie vegeta em locais onde não ocorre deficiência hídrica, sendo tolerante a solos de baixa fertilidade, isto é, resiste a solos degradados (Mazuchowski, 1989).

2.2.3. Importância sócio-econômica

A erva-mate integra um dos mais importantes e tradicionais sistemas agroflorestais, sendo considerada uma das culturas que contribuem na manutenção do pequeno produtor no meio rural (Mazuchowski, 1991; Wendt, 2005). O contingente de mão-de-obra envolvido na produção da erva-mate é superior a 151 mil empregos diretos, cuja mão-de-obra constitui um indicador fundamental de desenvolvimento econômico e de benefícios sociais (Emater, 2009).

No Brasil, a produção nacional de erva-mate na safra de 2006/2007 alcançou a cifra de 438.474 toneladas de folha verde, cultivadas em uma área de aproximadamente 89.874 ha e, desse total, a região Sul contribuiu com 433.492 toneladas, ou seja, 98,9% (IBGE, 2007).

O Estado do Paraná destaca-se como o segundo maior produtor nacional de erva-mate, atingindo uma produção de 136.266 toneladas de folha verde em uma área plantada de 38.380 ha, resultando em uma produtividade de 3.550 kg ha⁻¹ (IBGE, 2007). Aproximadamente 283 mil hectares de toda a extensão territorial do Paraná são ocupados por ervais, dos quais 85% são nativos (Emater, 2009).

Dentre todos os municípios do Estado, um total de 155 atuam no cultivo da erva-mate e, destes, tem-se como principais produtores os municípios de União da Vitória (56.000 ton), Cascavel (18.433 ton), Prudentópolis (16.648 ton), Guarapuava (8.454 ton), São Mateus do Sul (8.250 ton), Pato Branco (4.614 ton), Lapa (3.142 ton) e Francisco Beltrão (3.039 ton), os quais concentram 87,4% da produção no Estado (IBGE, 2007).

2.3. Composição química e atividades biológicas da erva-mate

Grande parte da produção brasileira de erva-mate destina-se ao mercado interno (80%), sendo 96% deste total consumido como chimarrão e 4% como chás e refrigerantes (Mazuchowski et al., 1996). Todavia, os estudos efetuados com o produto erva-mate têm demonstrado uma rica composição química, a qual desempenha propriedades nutritivas, fisiológicas e medicinais que podem ser aproveitadas para o consumo “in natura”, como também para aplicação industrial (Mazuchowski, 2004). Dentre os exemplos de usos alternativos, tem-se a produção de medicamentos, conservantes alimentares, corantes, cosméticos, produtos higiênicos, entre outros (Paraná, 1997).

Para a exploração e manejo deste recurso genético nativo, existe a necessidade de compreender detalhadamente os componentes químicos produzidos (Donaduzzi et al., 2000; Cardozo Junior et al., 2003; Zanoelo et al., 2004a).

Trommsdrff, em 1836, ao estudar pela primeira vez a constituição química da erva-mate, verificou a presença de substâncias resinosas, matéria corante e também ácido tânico (Valduga, 1995). Veronese (1944) indicou como constituintes da espécie os compostos: água, celulose, gomas, dextrina, mucilagem, glicose, pentose, substâncias graxas, resinas aromáticas, legumina, albumina, cafeína, cafearina, cafamarina, ácido matetânico, ácido fólico, ácido cafeico, ácido virídico, clorofila, colessterina e óleos essenciais.

Alikaridis (1987), ao avaliar quimicamente o gênero *Ilex*, citou a presença de metilxantinas, fenóis e ácidos fenólicos, aminoácidos e outros compostos nitrogenados, ácidos graxos, antocianinas, flavonóides, compostos terpênicos, alcanos e álcoois, carboidratos, vitaminas e carotenóides. Tanto em folhas quanto na infusão da planta, também foram encontradas quantidades significativas de potássio, sódio, manganês e magnésio (Sanz e Isasa, 1991).

Kawakami e Kobayashi (1991), ao analisarem produtos comerciais à base de erva-mate por meio da cromatografia gasosa e espectrometria de massa, identificaram um total de 196 constituintes voláteis. Destes compostos, foram destacados os álcoois terpênicos, como linalool, α -terpineol, geraniol e nerolidol, componentes relacionados com a ionona (β -ionona e 2,6,6-trimetil-2-

hidroxiciclohexanona) e ainda, teores elevados de 2-butoxietanol e 3,3,5-trimetilciclohexanona.

Outros constituintes existentes na espécie e que merecem destaque são as saponinas e os flavonóides. Schenkel et al. (1995) observaram que a fração saponínica em espécies de *Ilex* é composta basicamente de compostos triterpênicos onde estão presentes os derivados glicosilados do ácido oleanólico e do ácido ursólico, sendo este último o predominante. Destes núcleos triterpênicos ainda originam-se dez saponinas, contendo os açúcares arabinose, glicose e rhamnose. Os flavonóides, em contra partida, caracterizam-se por serem compostos que sofrem pouca variação estrutural e estão ligados à quercetina livre e seus derivados glicosilados, além da presença de caempferol (Ricco et al., 1995).

Filip et al. (2001), ao determinarem o teor de flavonóides em diferentes espécies de *Ilex*, obtiveram maior conteúdo de rutina (0,030%) para *I. pseudobuxus* que, por sua vez, foi inferior ao teor determinado para *I. paraguariensis* (0,060%), enquanto concentrações semelhantes de quercetina e caempferol foram encontradas nas outras espécies de *Ilex*.

2.3.1. Metilxantinas

Sem dúvida, as metilxantinas são os compostos mais conhecidos desta espécie, uma vez que os estudos destas substâncias remetem ao final do século XIX (Alikaridis, 1987). Estes componentes são bases nitrogenadas associadas aos alcalóides, com ocorrência restrita em regiões tropicais e subtropicais e, raramente, em zonas temperadas, como China e Japão. Cerca de 60 espécies vegetais contêm metilxantinas e estas se distribuem principalmente nos gêneros *Coffea* (Rubiaceae), *Cola* e *Theobroma* (Sterculiaceae), *Paullinia* (Sapindaceae), *Ilex* (Aquifoliaceae) e *Camellia* (Theaceae = Ternstroemiaceae) (Rates, 1999).

Dentre as principais propriedades farmacológicas das metilxantinas, podem-se citar a estimulação do sistema nervoso central, vasoconstrição periférica, relaxamento da musculatura lisa e estimulação miocárdica (Kikatani et al., 1993; Da Croce, 2002; Lorist e Tops, 2003).

A estrutura mais simples referida como xantina corresponde a 2,6-

dioxipurina. O grupo das xantinas inclui vários compostos onde elas se encontram ligadas a outros resíduos. Entre eles, tem-se a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), a teobromina (3,7-dimetilxantina) e a teofilina (1,3-dimetilxantina) (Goodman e Gilman, 1996) (Figura 6).

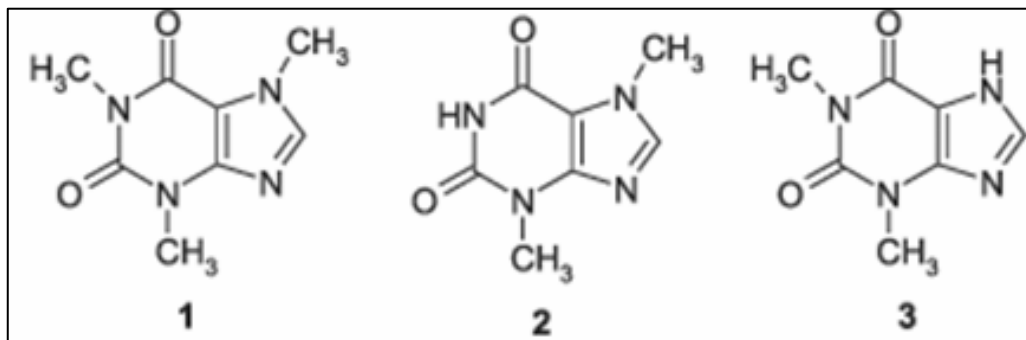


Figura 6 - Fórmula estrutural das metilxantinas: cafeína (1), teobromina (2) e teofilina (3) (Gnoatto et al., 2007).

A cafeína teve sua presença constatada no mate em 1843, quando Stenhouse determinou o teor de apenas 0,13%. Contudo, estudos subsequentes do pesquisador, datados de 1854, determinaram uma variação de 1,10 até 1,23% para o composto, que foi novamente estudado por Peckolt em 1883 (Rolim, 1920; Valduga, 1995; Donaduzzi et al., 2003).

Além destes, vários trabalhos foram desenvolvidos relatando a presença e as determinações quantitativas de cafeína e teobromina, bem como a existência da teofilina. Clifford e Ramirez-Martinez (1990) encontraram 0,89 a 1,73% de cafeína, 0,26 a 0,88% de teobromina e pequenas quantidades de teofilina em erva-mate. Estes dados foram confirmados por Bruneton (1999), que obteve 0,9-1,7% de cafeína, 0,45-0,9% de teobromina, 1,4-2,6% de flavonóides e bases de purina ao analisar as folhas desta espécie.

Diversos são os fatores que podem interferir na concentração destes compostos químicos. Mazzafera (1994), por exemplo, determinou o conteúdo das três xantinas em folhas adultas e jovens, na casca, no córtex e em frutos maduros e imaturos de erva-mate, e percebeu que a cafeína (0,91%) e a teobromina (0,16%) foram notadas em níveis maiores nos tecidos jovens. A teofilina não foi detectada na casca, no córtex e nos frutos, sendo encontrada apenas nas folhas velhas da planta (0,014%).

Athayde et al. (2000) identificaram e determinaram o teor de cafeína e teobromina na cera epicuticular das folhas de erva-mate oriundas de três Estados brasileiros (Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio Grande do Sul) e notaram que as metilxantinas acumulam-se tanto intracelularmente como na cera epicuticular das folhas. Os resultados obtidos foram 0,16 a 127,6 µg de cafeína por mg de cera e de 0 a 9,5 µg de teobromina por mg de cera.

Além do estágio de desenvolvimento, o teor das metilxantinas pode ser influenciado por variáveis ambientais, por métodos silviculturais ou agrônômicos e pela época de colheita, pois se tratam de compostos envolvidos no metabolismo do nitrogênio e do carbono, ou seja, nas reações de transmetilação-desmetilação (Rates, 1999).

Bertoni et al. (1992), em estudo com folhas de erva-mate, constatou que as condições climáticas que acometem a planta durante o desenvolvimento vegetativo, tais como a chuva e a umidade, podem afetar a concentração de cafeína.

Coelho et al. (2000) observaram que o sombreamento influenciou nos teores de metilxantinas, já que ocorreu uma variação de 2,63 a 2,98 mg/g de cafeína em condições naturais, medindo 7,17% de sombreamento, e uma variação de 2,31 a 14,31 mg/g de cafeína, em 95,33% de sombreamento.

Além do sombreamento, foi constatada diferença estatisticamente significativa para teores foliares de cafeína, considerando diferentes formas de adubação. Verificou-se forte influência da presença da matéria orgânica no aumento do teor foliar de cafeína e as médias variaram de 1,10% a 1,32% nos tratamentos orgânicos (Zampier, 2001).

Scherer et al. (2002), analisando cinco plantações de erva-mate em Misiones, no ano de 1998, encontraram 0,74 a 1,51% de cafeína e 0,51 a 1,12% de teobromina após doseamento por cromatografia gasosa. Perceberam ainda a existência de correlação fenotípica significativa entre estes compostos ($r = 0,63$).

Da Croce (2002), por sua vez, empregando amostras de erva-mate cancheadas provenientes de quatro locais de Santa Catarina, obteve teores médios de cafeína entre 0,19 g e 1,46 g/100 g. No mesmo trabalho, foi evidenciado que não existe diferença significativa no teor de cafeína em relação ao tipo de solo dos locais de coleta das amostras, porém, esta diferença é evidente quando se trata de época de colheita das folhas de erva-mate. Isto

porque no período de maior crescimento vegetativo (setembro a dezembro), o teor de cafeína foi mais baixo e, à medida que as folhas foram envelhecendo, o teor aumentou.

Esmelindro et al. (2003) analisaram a influência das variáveis de manejo no rendimento e composição química do extrato de erva-mate proveniente de Barão de Cotegipe/RS. Usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, notaram que as plantas sem adubação, sob sombreamento e secas em microondas, tiveram aumento no rendimento da extração à medida que ocorreu a poda das folhas (6, 12 e 18 meses). Entretanto, a partir de 2 anos de idade, ocorreu uma diminuição no rendimento dos compostos passíveis de serem extraídos.

Se os fatores naturais são capazes de alterar de maneira direta os componentes físico-químicos da erva-mate (Reissmann et al., 1999), não menos importantes são os métodos de processamento do mate, que também estão intimamente relacionados com a qualidade do produto e de suas características organolépticas (Donaduzzi et al., 2000). Em outras palavras, as variáveis operacionais, tais como sapeco e secagem, podem interferir na concentração de compostos, os quais influenciam no sabor característico da erva-mate brasileira (Zanoelo et al., 2004b; Cardozo Junior, 2006).

Donaduzzi et al. (2000), ao observarem variação de 0,53% de cafeína em amostras comerciais da região de Guarapuava/PR e 0,95% em amostras comerciais originárias de Toledo/PR, destacaram a necessidade de se estabelecer um controle dos compostos químicos da erva-mate, especialmente aqueles que estão intimamente relacionados com as características comerciais do produto final.

Diferenças nos conteúdos de cafeína e teobromina também podem ocorrer dependendo da variedade analisada. Reginatto et al. (1999) verificaram que *I. paraguariensis* var. *paraguariensis* contém em média 0,65% de cafeína e 0,12% de teobromina, enquanto *I. paraguariensis* var. *vestita*, uma variedade de erva-mate pubescente de pequena dispersão geográfica nativa do Brasil, contém 0,003% de cafeína e 0,22% de teobromina. Em contra partida, foi observada ausência de metilxantinas em *I. brevicuspis*, *I. dumosa* e *I. microdonta*.

O método extrativo é outro fator que pode influenciar na quantificação dos compostos presentes em extratos de matérias-primas vegetais (Cardozo Junior,

2006). A obtenção dos compostos químicos contidos no extrato da erva-mate geralmente é realizada por meio da extração com solventes orgânicos. No caso de pequenas amostras, esta extração pode apresentar alguns entraves, tais como a alta temperatura que está envolvida no processo de extração, a qual pode modificar características fundamentais dos compostos presentes na planta “in natura” (Esmelindro et al., 2002).

A determinação do teor de compostos químicos e a padronização dos métodos analíticos seria uma das maneiras a serem empregadas para se determinar a variação destes componentes intimamente relacionados com a qualidade do produto final. Como consequência, seria possível identificar indivíduos com características desejáveis para a multiplicação clonal (Donaduzzi et al., 2000; Sturion et al., 2004).

Dentre os métodos utilizados no doseamento destes alcalóides pode-se citar a espectrometria, a titulometria e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As vantagens da CLAE em relação às demais metodologias incluem eficiência, especificidade, sensibilidade e rapidez (Naik, 2001), além de quantificar cada um dos compostos em apenas uma corrida cromatográfica (Alves e Bragagnolo, 2002).

Valduga (1995) ao extrair cafeína de folhas de erva-mate com clorofórmio e analisar o teor obtido por espectrometria, constatou valores médios de 1,38% em amostras provenientes de União da Vitória/PR e 0,82% em amostras de Paula Freitas/PR.

No estudo de Saldaña et al. (2000), foram encontrados teores de 7.474,4 mg/kg para cafeína, 258,9 mg/kg para teobromina e 30 mg/kg para teofilina. O método empregou extração com dióxido de carbono supercrítico e quantificação utilizando CLAE.

Gnoatto et al. (2000) testaram quatro métodos de extração para metilxantinas em amostras de erva-mate coletadas em Mato Leitão/RS e canheadas em indústria ervateira. Os resultados encontrados após análise por CLAE foram de 0,0199% de teobromina e 0,3468% de cafeína, quando foi efetuada extração por decocção e consequente separação com clorofórmio e isopropanol, e 0,0825% de teobromina e 0,2912% de cafeína, após decocção com solução de ácido sulfúrico 2 M. Os outros dois métodos envolveram extração por Soxhlet e tratamento prévio com solução de hidróxido de amônio a 25% no

primeiro caso, onde foram encontrados 0,0174% de teobromina e 0,3390% de cafeína e 0,0261% de teobromina e 0,3680% de cafeína, respectivamente.

Até os dias atuais, são escassas as informações sobre os componentes genéticos envolvidos na variabilidade destes compostos químicos. Assim, é de extrema importância conhecer as diferenças genéticas existentes entre os indivíduos, as quais podem ser exploradas para o melhoramento de uma característica (Cardozo Junior, 2006; Nakamura et al., 2009). Com este objetivo, Cardozo Junior (2006) determinou os teores de cafeína e teobromina por CLAE em cinquenta e uma progênies de erva-mate, oriundas de cinco procedências (Ivaí/PR, Barão de Cotegipe/RS, Quedas do Iguaçu/PR, Pinhão/PR e Cascavel/PR), cultivadas na região de Ivaí/PR - Brasil. O autor observou diferenças estatísticas nos teores de cafeína (0,248 a 1,663%) e de teobromina (0,106 a 0,807%). Além disso, verificou diferenças significativas entre as cinco procedências, com menor e maior produção de cafeína e teobromina nas progênies de Pinhão/PR e Cascavel/PR e, nas progênies de Barão de Cotegipe/RS e Pinhão/PR, respectivamente. As estimativas de herdabilidade individual, no sentido restrito, e do coeficiente de variação genética aditiva foram altas para ambos os compostos.

Cardozo Junior et al. (2007) avaliaram o conteúdo de metilxantinas em dezesseis progênies de erva-mate oriundas de quatro procedências (Ivaí/PR, Barão de Cotegipe/RS, Quedas do Iguaçu/PR e Cascavel/PR), e cultivadas em três diferentes localidades do Estado do Paraná (Ivaí/PR, Guarapuava/PR e Rio Azul/PR). Os métodos de extração de metilxantinas, que se basearam na extração ácida e na maceração hidroalcoólica, não demonstraram diferença estatística na obtenção dos valores médios. Quanto aos teores de metilxantinas, de cafeína e de teobromina, foram constatadas variações nas progênies de erva-mate em relação à localidade de cultivo e à procedência.

De forma detalhada, em termos de local de cultivo, pôde-se observar que a maior produção de metilxantinas ocorreu em progênies cultivadas em Guarapuava/PR (0,739%), seguidas por Ivaí/PR (0,678%) e Rio Azul/PR (0,574%). De acordo com a procedência, os teores de metilxantinas (0,560 a 0,734%) e cafeína (0,490 a 0,611%) foram menores em Ivaí/PR < Quedas do Iguaçu/PR < Barão de Cotegipe/RS < Cascavel/PR, enquanto os teores de

teobromina (0,132 a 0,068%) foram inversos aos teores relatados para cafeína (Cardozo Junior et al., 2007).

A partir das conclusões obtidas por Cardozo Junior (2006), Nakamura et al. (2009) selecionaram oito progênies de erva-mate, as quais foram avaliadas quanto à concentração de metilxantinas e evidenciaram diferença significativa entre as progênies para os teores de cafeína (0,226-1,377%) e teobromina (0,176-0,831%). Os autores notaram ainda correlação negativa entre teobromina com cafeína e o coeficiente de herdabilidade para cafeína (75,19%) e teobromina (66,87%) indicou a possibilidade de ganhos genéticos por seleção para estas características.

2.3.2. Compostos fenólicos

Outro grupo que parece ter importância nas propriedades da erva-mate e de seus produtos comerciais são os compostos fenólicos (Donaduzzi et al., 2003). Os polifenóis, como também são conhecidos, estão amplamente distribuídos no reino vegetal, nos microorganismos e no metabolismo de animais, e encontram-se reunidos em um grupo de substâncias com enorme diversidade de estruturas químicas, a qual possui um número variável de grupamentos hidroxilas (Simões et al., 2001; Cokuzras e Bodur, 2003; Santos et al., 2004).

Internamente, os compostos fenólicos exercem influência sobre o metabolismo da planta, como por exemplo, no crescimento do vegetal, no processo de germinação das sementes e nos mecanismos de transdução dos sinais luminosos em resposta fototrópica das plantas. Além disso, eles participam nas relações do vegetal com o meio ambiente e se relacionam com a função alelopática, proteção contra os raios ultravioletas e contra insetos, herbívoros e patógenos (Donaduzzi et al., 2003).

Os polifenóis também estão presentes na dieta regular e desempenham um papel benéfico na saúde humana por diminuir a incidência de câncer, doenças cardiovasculares, problemas gastrintestinais e proliferação de fungos (Soares, 2002; Nishino et al., 2005; Rasmussen et al., 2005; Schinella et al., 2005), além de exercerem ação eupéptica e colerética (Gorzalczany et al., 2001). Sem contar que várias propriedades nutricionais descritas para frutos, folhas e sementes

estão relacionadas à atividade antioxidante desempenhada pelos flavonóides e compostos fenólicos totais presentes nos vegetais. Neste caso, eles atuam como agentes redutores e, juntamente com outras substâncias redutoras do tipo vitamina C, vitamina E e carotenóides, protegem os tecidos contra o estresse oxidativo (Scalbert e Williamson, 2000; Lima et al., 2002).

Os trabalhos de Anesini et al. (2006) e Bastos et al. (2006) confirmaram esta atividade, pois verificaram que extratos de erva-mate apresentam atividade similar à ação da enzima peroxidase e que as infusões das folhas da planta possuem o mesmo poder antioxidante (*in vitro*) que um antioxidante fenólico de uso alimentar, conhecido como Hidroxitolueno Butilado (BHT).

Segundo Santos et al. (2004), a erva-mate tem efeito hipocolesterolêmico que é atribuído aos compostos fenólicos presentes em suas folhas. Eles atuam diminuindo o processo oxidativo das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), reduzindo a formação de ateroma.

Dentre as principais classes de polifenóis definidas conforme suas estruturas hidrocarbônicas podem-se citar aquelas designadas de ácidos fenólicos, flavonóides e, menos comumente, estilbenos e lignanas (Scalbert e Williamson, 2000).

2.3.3. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são compostos aromáticos subdivididos em voláteis e não voláteis. No primeiro caso, uma das vias mais importantes de formação destes compostos é a degradação de ácidos fenólicos livres, tais como o ácido *p*-cumárico, ferúlico, cafeico e quínico, cuja variedade formada e conseqüente concentração dependem do tratamento térmico. Já os compostos não voláteis possuem como principal representante o ácido clorogênico (Simões et al., 2001).

De Maria e Moreira (2004) dizem que o termo ácido clorogênico (ACG) é empregado para designar uma família de ésteres formados pela esterificação de um ou mais derivados do ácido trans-cinâmico com o ácido quínico (Figura 7). Tais compostos são subdivididos de acordo com a identidade do derivado do ácido cinâmico, número e posição dos resíduos acila, formando os seguintes grupos majoritários:

- 1) éster do ácido cafeico com o ácido quínico (ácido cafeoilquínico - ACQ) (isômeros 3-, 4-, 5-);
- 2) éster de dois resíduos do ácido cafeico com um de ácido quínico (ácido dicafeoilquínico - diACQ) (isômeros 3,4-, 3,5-, 4,5-);
- 3) éster do ácido ferúlico com o ácido quínico (ácido feruloilquínico - AFQ) (isômeros 3-, 4-, 5-).

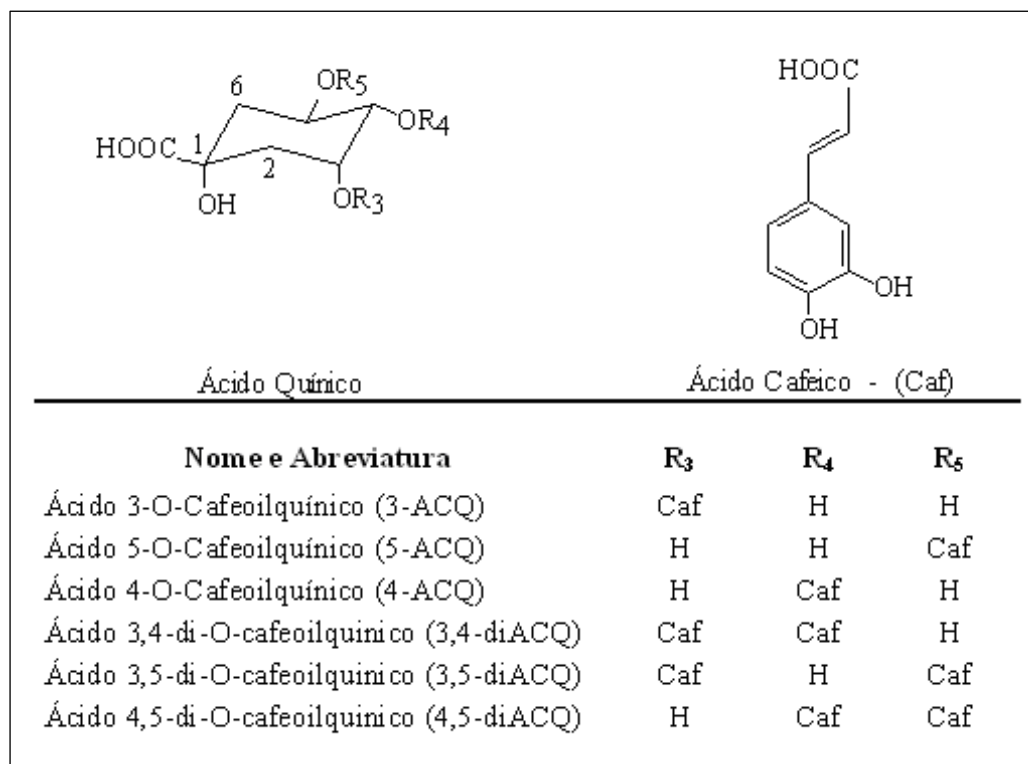


Figura 7 - Compostos fenólicos da família do ácido clorogênico (ACG) presentes na erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) (Cardozo Junior, 2006).

Os compostos de maior abundância na natureza pertencem ao grupo do ACQ, que são alvos de um grande número de pesquisas a seu respeito (De Maria e Moreira, 2004). Conteúdos significativos destes componentes na erva-mate foram descritos por Alikaridis (1987), onde predominaram os derivados do ácido clorogênico. Este achado foi comprovado por Clifford e Ramirez-Martinez (1990) quando demonstraram a presença de derivados da quercetina e principalmente derivados do ácido clorogênico, como o ácido 3-cafeoilquínico e o ácido 3,5-dicafeoilquínico, ocorrendo variação no perfil destes derivados entre os extratos provenientes de amostras de erva-mate verde e tostada.

Outro estudo que envolveu a análise química da erva-mate verde e tostada foi o de Kawakami e Kobayashi (1991). Por meio do uso da cromatografia gasosa e da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, os pesquisadores revelaram a existência de 250 compostos voláteis, dos quais 196 foram identificados e, destes, 11 foram fenóis, apresentando semelhança com os compostos observados no chá preto (*Camellia sinensis* L.).

Do mesmo modo, Campos (1991) verificou a presença abundante de polifenóis hidrossolúveis, como os ácidos isoclorogênico, cafeico e clorogênico, ao analisar o balanço nutricional em amostras de erva-mate obtidas de diferentes safras.

Carini et al. (1998), por sua vez, desenvolveu uma metodologia analítica para a determinação de derivados cafeoil em extratos de erva-mate, utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, onde identificaram dez compostos.

Posteriormente, Filip et al. (2001), analisando a presença de flavonóides e compostos fenólicos em sete espécies sul-americanas de *Ilex*, comprovaram que a espécie *Ilex paraguariensis* possui maior concentração destes compostos quando comparada às demais. Neste trabalho, foi determinada a concentração de 0,064% dos flavonóides rutina, quercetina e caempferol e de 9,608% de derivados fenólicos no extrato seco com a presença de ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico.

As concentrações destes compostos apresentam variações entre as diferentes partes da planta, idade da folha e procedência (Maccari Junior e Mazuchowski, 2000). Donaduzzi et al. (2003), por exemplo, utilizaram a espectrofotometria e avaliaram o teor de polifenóis totais e taninos em dezesseis progênies de erva-mate provenientes de quatro localidades diferentes e cultivadas em Ivaí/PR, Rio Azul/PR e Guarapuava/PR. Estes autores notaram que os teores de polifenóis apresentaram diferença significativa entre as três localidades, onde a maior produção de compostos foi verificada em Guarapuava/PR (9,59%), enquanto no município de Rio Azul/PR foi de 8,74% e em Ivaí/PR foi de 7,91%. Quando compararam as procedências, perceberam a ocorrência de diferença estatística apenas nas progênies nativas de Ivaí/PR (8,60%), quando cultivadas neste mesmo local.

Cardozo Junior (2006) determinou os teores de ácido clorogênico e ácido cafeico por meio da CLAE em cinqüenta e uma progênies de erva-mate, oriundas de cinco procedências (Ivaí/PR, Barão de Cotegipe/RS, Quedas do Iguaçu/PR, Pinhão/PR e Cascavel/PR) e cultivadas na região de Ivaí/PR. Os valores de ácido clorogênico oscilaram entre 1,365 e 2,281%, e os teores de ácido cafeico foram de 0,027 a 0,037%. O teor de ácido clorogênico para a procedência de Pinhão/PR apresentou valores maiores que aqueles de outras procedências.

Além disso, o autor verificou que os valores dos coeficientes de determinação dos efeitos de parcela (c_2^2) foram de média a alta magnitude para o ácido clorogênico e para o ácido cafeico, indicando que grande parte da variabilidade existente para estes compostos se deve à variação ambiental entre parcelas. Os valores do coeficiente de variação genética aditiva de indivíduos (C_{vg}) permaneceram próximos de 15% para ácido clorogênico e de 30% para o ácido cafeico. Observou-se ainda que ambos os compostos apresentaram valores de média a baixa magnitude para o coeficiente de herdabilidade.

Bravo et al. (2007) propôs um método utilizando cromatografia líquida associada à espectrometria de massa para determinar a composição de polifenóis em extratos de erva-mate. Na seqüência, Silva et al. (2007) validou um método de doseamento dos mesmos compostos, obtendo excelente desempenho na separação, repetibilidade e acurácia dos picos referentes aos derivados do ACQ e diACQ. Além de ácido clorogênico e rutina, com base em dados bibliográficos, nos espectros de absorção do visível e no tempo de retenção, foram detectados os isômeros do ácido clorogênico (ácido 5-O-cafeoilquínico), conhecidos como ácido neoclorogênico (ácido 3-O-cafeoilquínico) e ácido criptoclorogênico (ácido 4-O-cafeoilquínico), bem como os isômeros do ácido dicafeoilquínico, chamados de 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico.

Cardozo Junior et al. (2007), dando continuidade às pesquisas realizadas por Donaduzzi et al. (2003), realizaram a análise de fenóis totais por espectrofotometria e de ácido clorogênico e ácido cafeico utilizando a cromatografia líquida. Os resultados mostraram que o teor de fenóis totais variou entre 7,910 e 9,591%, sendo maior em Guarapuava/PR, seguido de Rio Azul/PR e, em menor concentração, por Ivaí/PR. Os conteúdos mais elevados de ácido clorogênico ocorreram nas progênies cultivadas em Rio Azul/PR (0,953%) e Guarapuava/PR (0,911%) e, para o ácido cafeico, estes valores foram verificados

nas progênies cultivadas em Guarapuava/PR (0,020%) e Ivaí/PR (0,018%). Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas quando se compararam os teores de compostos fenólicos entre as quatro procedências, o que reforça a idéia da importância dos fatores ambientais sobrepondo a influência genética, o ácido clorogênico apresentou teores menores (0,786%) nas progênies de Cascavel/PR quando relacionados às demais procedências (0,861 a 0,915%).

Além de avaliarem as metilxantinas, Nakamura et al. (2009) determinaram o conteúdo de ácido clorogênico, por cromatografia líquida, nas oito progênies selecionadas a partir dos dados fitoquímicos descritos por Cardozo Junior (2006). Os autores obtiveram teores variando de 1,344% a 2,031% para ácido clorogênico, com herdabilidade estimada de 52,86%. Quanto aos coeficientes de correlação determinados, notou-se correlação negativa (-0,43) entre os teores de cafeína e ácido clorogênico, enquanto que esta correlação foi positiva com a teobromina (0,43).

2.4. Programas de melhoramento e conservação genética da erva-mate

A erva-mate é uma espécie produzida sob cultivo ou por extrativismo e possui importância socioeconômica fundamental no Brasil, especialmente na região Sul (Simeão et al., 2002). Apesar de este país deter mais de 80% da área de ocorrência natural de erva-mate (Winge et al., 1995), nos dias atuais, o aumento do seu consumo tem impossibilitado o atendimento do mercado interno e externo, motivando o plantio desta espécie tanto em cultivos homogêneos puros quanto em associação (Simeão et al., 2002; Wendt, 2005).

Além disso, a elevada taxa de destruição dos biomas naturais, em virtude da expansão da fronteira agrícola e a substituição das extensas áreas contínuas de vegetação por reflorestamentos monoespecíficos, monoculturas e pastagens (Mittermeier et al., 1992), bem como a exploração predatória e o desmatamento, tem favorecido a perda da variabilidade genética da erva-mate (Wendt, 2005).

A baixa qualidade fisiológica e genética das sementes e as deficientes técnicas empregadas no cultivo e na colheita também contribuem para uma baixa produtividade dos ervais (Zanon, 1988; Resende et al., 1995; Maccari Junior e

Mazuchowski, 2000). Estudos mostram que, em ervais produtivos, 35% das plantas são responsáveis por mais de 50% de toda a produção foliar por unidade de área (Belingheri e Prat Kricun, 1995).

Para que seja possível contornar estes entraves e, ainda, obter clones e sementes geneticamente superiores, é preciso lançar mão de estratégias de coleta e conservação genética, formação de bancos de germoplasma e aprimoramento dos programas de melhoramento. Neste caso, é necessário conduzir os estudos de genética de populações, que permitem estimar os diversos parâmetros que influenciam a estrutura genética dentro e entre populações naturais (Nei, 1987; Frankel et al., 1995; Resende et al., 2000; Wendt et al., 2007).

Embora esta variabilidade seja introduzida por mutações ou migrações de indivíduos de populações distintas e perdida em função da deriva genética, de endocruzamentos e por meio dos diferentes tipos de seleção natural (Cole, 2003), uma maneira de maximizar os ganhos genéticos das características de interesse é realizar testes combinados de progênies e procedências (Resende et al., 2000).

Segundo Resende et al. (2000), estes testes contribuem para a seleção de populações adaptadas e produtivas para os determinados locais de plantio e, também, para a escolha das melhores progênies dentro de cada procedência. Para avaliar esta variação genética devem-se conhecer ainda os fatores intrínsecos à espécie, a saber, os mecanismos envolvidos na dispersão do pólen e das sementes, o sistema de reprodução e de cruzamento, e os fatores ambientais que influenciam nesta variabilidade (Hamrick e Godt, 1989).

Os programas de melhoramento desta cultura são bastante recentes. Tiveram início a partir de 1970 na Argentina e, na década de 1990, no Brasil (Prat Kricun e Belingheri, 1995; Da Croce e Floss, 1999; Resende et al., 2000). Dentre os programas em andamento, pode-se citar o do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA) na Argentina (Belingheri e Prat Kricun, 1997); o da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), onde o primeiro trabalho voltado à conservação e melhoramento genético começou em 1986, com a avaliação de dezesseis procedências dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (Floss, 1997); e o da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (Sturion e Resende, 1997). Neste último programa, os testes foram iniciados em 1995, na Embrapa Florestas, com 175

progênies de oito procedências de erva-mate em sete localidades do Paraná e uma em Santa Catarina.

De forma geral, estes programas buscam analisar as procedências e progênies de meio-irmãos de erva-mate em diferentes localidades, constituindo as populações base do melhoramento (Simeão et al., 2002). Dentre as características que se tem dado ênfase estão a produção de massa foliar, a adaptação, o desfolhamento, a resistência a pragas e doenças e o tipo de ramificação (Resende et al., 2000), sendo o parâmetro básico de seleção destes projetos baseados em apenas um fator quantitativo, a produção de massa foliar (Cardozo Junior, 2006).

Entretanto, as características vinculadas à qualidade do produto final também devem ser consideradas nos programas de melhoramento. As análises fitoquímicas com o objetivo de identificar e quantificar os componentes químicos presentes na erva-mate podem ser empregadas a fim de selecionar plantas com determinados padrões de interesse para a indústria como, por exemplo, o sabor suave (Donaduzzi et al., 2000; Cansian et al., 2003).

Geralmente, a análise da variabilidade genética é determinada por meio de caracteres quantitativos. Todavia, este estudo exige tempo prolongado de experimentação pelo fato de depender de caracteres fenotípicos como variáveis de resposta, os quais são expressões do genótipo em condições ambientais específicas, que podem ser influenciados com mudanças ambientais (Vidor et al., 2002a; Wendt et al., 2007).

Assim, sabendo que o genótipo ou a constituição do DNA de um determinado indivíduo permanece inalterado durante o ciclo de vida (Vidor et al., 2002a), a caracterização molecular da diversidade genética do germoplasma pode fornecer subsídios úteis aos geneticistas, no sentido de selecionar genitores de populações básicas no momento do desenvolvimento de programas de melhoramento. Quando associados aos fatores fenotípicos, como a qualidade do produto, a composição química, o requerimento de nutrientes e a resistência a doenças e pragas, podem ser fundamentais na determinação da diversidade genética (Allard, 1971).

Neste caso, os marcadores genéticos podem ser utilizados como ferramentas para estimar os padrões da variabilidade genética de certa população e, ainda, possibilitam quantificar a variabilidade intrapopulacional ou usar estes

dados para determinar a distribuição da variabilidade entre as populações (Sebbenn, 2001).

2.5. Marcadores moleculares

Com o advento das técnicas moleculares e bioquímicas, os marcadores moleculares passaram a ser empregados tanto no estudo da variabilidade genética em nível de DNA, quanto nos programas de melhoramento. Tais marcadores apresentam eficácia na análise da divergência genética dentro e entre populações de plantas, bem como na elucidação de parentescos existentes entre os acessos dentro de uma espécie (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Vidor et al., 2002a, 2002b; Cansian, 2003; Wendt et al., 2007).

Quando comparados aos marcadores morfológicos, os marcadores de DNA possuem algumas vantagens, como a obtenção de um grande número de locos de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo, um alto nível de polimorfismo, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente e a possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento da planta ou a partir de culturas de células e tecidos (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Outros benefícios relacionam-se ao fato destes marcadores permitirem avaliar um número elevado de genótipos (Costa et al., 2003), revelarem polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados (Lopes et al., 2002) e possibilitarem a obtenção de informações satisfatórias em um período curto de tempo e por um custo acessível (Xavier, 2001).

O emprego inicial dos marcadores moleculares no melhoramento genético ocorreu a partir da década de 80, por meio do surgimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). O princípio básico desta técnica relaciona-se à síntese enzimática *in vitro* de milhares de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e fundamenta-se na síntese enzimática de um determinado fragmento de DNA, empregando dois oligonucleotídeos inicializadores (*primers*), os quais se anelam nas fitas opostas

de um fragmento de DNA molde, flanqueando regiões de interesse (Mullis e Faloona, 1987).

Os principais tipos de marcadores disponíveis podem ser classificados em dois grupos: um se refere àqueles que podem ser evidenciados por métodos que combinam o uso de enzimas de restrição à hibridização entre seqüências complementares de DNA, como no caso do RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) e Minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*); e o outro àqueles revelados por amplificação. Neste caso, podem-se incluir os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) ou ASA (*Amplified Specific Amplicon*), Microsatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Alzate-Marin et al., 2005; Milach, 2009).

2.5.1. Polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD)

Até o início da década de 90, os marcadores mais comumente utilizados nas análises de espécies de interesse agrônômico eram as isoenzimas (Tingey et al., 1993). A partir de então, dois grupos de pesquisadores, trabalhando independentemente, desenvolveram um tipo de marcador molecular baseado em PCR que utiliza um único iniciador mais curto, normalmente de dez nucleotídeos e de seqüência arbitrária para realizar a amplificação. Esta estratégia eliminou a necessidade do conhecimento prévio dos fragmentos a serem amplificados (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Os idealizadores da técnica batizaram-na com o nome de RAPD (Williams et al., 1990), denominação mais utilizada, e AP-PCR (*Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction*) (Welsh e McClelland, 1990).

Os fragmentos de DNA amplificados estão distribuídos ao acaso no genoma e a detecção dos produtos de amplificação é feita, normalmente, em gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV (Williams et al., 1990; Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Em razão da seqüência de cada iniciador ser determinada de modo aleatório, este pode encontrar várias regiões complementares à sua seqüência, distribuídas em diversos pontos do genoma e, por isso, revelar muitas bandas no

gel. A análise de diferentes espécies de plantas tem evidenciado que locos RAPD estão dispersos pelo genoma. As seqüências dos fragmentos amplificados incluem desde DNA cópia única até altamente repetitivo (Williams et al., 1990; Ferreira e Grattapaglia, 1995; Borém e Caixeta, 2006).

As bases moleculares do polimorfismo revelado pelo RAPD podem ser mutações de ponto no sítio de pareamento do *primer*, que impedem o seu pareamento e a conseqüente amplificação do fragmento de DNA. Deleções ou inserções entre dois sítios de pareamento de *primers* são outras fontes de polimorfismo geradas por esses marcadores (Borém e Caixeta, 2006).

Os marcadores RAPD apresentam como característica básica a dominância, ou seja, este tipo de marcador não permite distinguir indivíduos homozigotos dominantes de heterozigotos em uma população. A sensibilidade da técnica não permite discriminar quantitativamente os dois casos. Portanto, ausência da banda no gel é atribuída ao genótipo homozigoto recessivo, enquanto a presença da banda é denotada pelos genótipos homozigoto dominante e heterozigoto (Cruz e Milach, 1998; Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Apesar da grande maioria dos marcadores RAPD apresentarem comportamento dominante, em alguns casos, pode ocorrer amplificação de marcadores co-dominantes, isto é, amplificação de ambos os alelos de um loco de um indivíduo diplóide heterozigoto com o mesmo *primer*. A co-dominância, nesta ocasião, resulta de inserções ou deleções de poucos pares de bases entre os dois sítios adjacentes de pareamento do *primer*. Em princípio, a detecção de marcadores RAPD co-dominantes só é possível pela análise de progênies segregantes para o loco em questão, devendo-se analisar, no mesmo gel, os produtos da amplificação do DNA dos dois genitores, que deram origem à população segregante em investigação, para efeito de comparações (Borém e Caixeta, 2006).

Em comparação com outras técnicas moleculares, a técnica RAPD possui as vantagens de ser de simples execução e baixo custo, obter rapidamente os marcadores, o que tem contribuído para seu emprego nos programas de melhoramento e conservação genética da erva-mate (Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Cansian, 2003). Além do mais, necessita de pequenas quantidades de DNA e possibilita que um número ilimitado de marcadores com alto nível de polimorfismo seja gerado. Em contrapartida, as limitações consistem

na alta sensibilidade da técnica, o que ocasiona baixa reprodutibilidade e, principalmente, o baixo conteúdo de informação genética por loco (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Halldén et al., 1996; Zhivotovsky, 1999; Lacerda et al., 2001).

As pesquisas relacionadas à diversidade genética da erva-mate no Brasil ainda são insuficientes para elucidar as bases genéticas da espécie, principalmente porque estão limitadas apenas às regiões específicas onde os materiais são coletados (Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Vidor et al., 2002a, 2002b; Wendt, 2005).

Gauer e Cavalli-Molina (2000) caracterizaram a diversidade genética de quatro populações de erva-mate, usando 15 *primers* para RAPD e obtiveram 341 bandas amplificadas com um número médio de 22,7 fragmentos por *primer*. Alta variabilidade genética foi observada dentro de cada população, com uma diversidade média de 0,163. A maioria das bandas foi comum para todas as populações, enquanto bandas específicas para determinada população foram visualizadas com menor frequência. Os resultados ainda mostraram que a variabilidade genética foi maior dentro das populações (85%) do que entre elas (15%).

Vidor et al. (2002a, 2002b) realizaram estudos agronômicos preliminares na coleção de erva-mate da Epagri, destacando-se as procedências de Barão de Cotegipe/RS e Água Doce/SC. Dentre elas, verificaram diferenças no sabor do mate em função do tipo da folha. Deste modo, tentaram associar os padrões obtidos por marcadores moleculares com as procedências e as características fenotípicas desejáveis (altura da planta, diâmetro da copa, densidade foliar, sobrevivência das plantas e comportamento de rebrota), dentro do caráter sabor em erva-mate. Eles notaram que, embora exista um agrupamento entre as folhas do tipo curta e larga e do tipo longa e estreita, não foi possível confirmar a existência de um marcador que identifique o caráter analisado. Já no segundo estudo, estes autores buscaram caracterizar geneticamente a variabilidade dos germoplasmas provenientes destas duas procedências utilizando marcadores RAPD. Os resultados encontrados não permitiram diferenciar geneticamente as procedências, e a similaridade entre elas foi superior a 80%.

Em trabalho realizado por Cansian (2003) também foram efetuados diferentes estudos com marcadores RAPD. Em um primeiro estudo foram analisadas 20 populações nativas de erva-mate coletadas no Mato Grosso do Sul,

Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e de duas espécies do gênero, *I. dumosa* e *I. theezans*. Nas comparações dentro de *I. paraguariensis*, os 24 *primers* selecionados geraram 291 bandas e, destas, 26,11% foram polimórficas. O índice de polimorfismo entre as três espécies estudadas foi de 75,51%, em um total de 392 fragmentos avaliados. O autor obteve 37 bandas específicas para *I. dumosa*, 21 para *I. theezans* e 76 para *I. paraguariensis*, concluindo, ao final, que a base genética da erva-mate é relativamente estreita, o que coloca a espécie em potencial risco de extinção.

Cansian (2003) ainda avaliou a variabilidade genética intrapopulacional em três populações de erva-mate, totalizando 30 amostras de plantas de cada população (Erechim, Barão de Cotegipe e Áurea, no Rio Grande do Sul). Ele encontrou um total de 189, 181 e 175 fragmentos gerados nas populações de Erechim, Barão de Cotegipe e Áurea, respectivamente. O polimorfismo variou entre 24,9% e 36% nas três populações. Este autor constatou que existe maior variância intrapopulacional (0,0703-0,1277) do que interpopulacional (0,0420-0,0467). A separação das populações em três diferentes grupos demonstrou a necessidade de conservação de um número máximo possível de fragmentos de mata para garantir a manutenção da variabilidade genética da espécie.

Recentemente, Wendt et al. (2007) avaliaram a diversidade genética em um teste combinado de procedências e progênies de erva-mate utilizando marcadores RAPD. Para isso, empregaram folhas jovens oriundas de três procedências do Estado do Paraná: Ivaí, Pinhão e Cascavel. Os 15 *primers* utilizados geraram 159 fragmentos, sendo 70,4% polimórficos. Verificou-se maior variabilidade dentro de procedências (88,3%) do que entre procedências (11,7%), e a maior parte da variação dentro de procedências foi devido à diferença genética entre as progênies (55,5%). Estes dados sugeriram que maiores ganhos podem ser encontrados por meio da seleção entre progênies do que entre procedências.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

O germoplasma utilizado neste trabalho pertence ao teste combinado de procedências e progênes de meio-irmãos do Programa de Melhoramento Genético da erva-mate conduzido pela Embrapa Florestas, em área experimental da fazenda Vila Nova, Ervateira Bitumirim, no município de Ivaí/PR (Figura 8).



FOTO: Friedrich, 2004.

Figura 8 - Unidade experimental de cultivo da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) mantido pela Embrapa Florestas, situada na fazenda Vila Nova, da Ervateira Bitumirim, no município de Ivaí/PR.

As sementes das progênes que compõem este programa foram coletadas em 1995, em cinco procedências distintas: (1) Pinhão/PR, (2) Quedas do Iguaçu/PR, (3) Ivaí/PR, (4) Cascavel/PR e (5) Barão de Cotegipe/RS (Figura 9). Estas foram estratificadas e as mudas geradas foram implantadas em março de 1997.

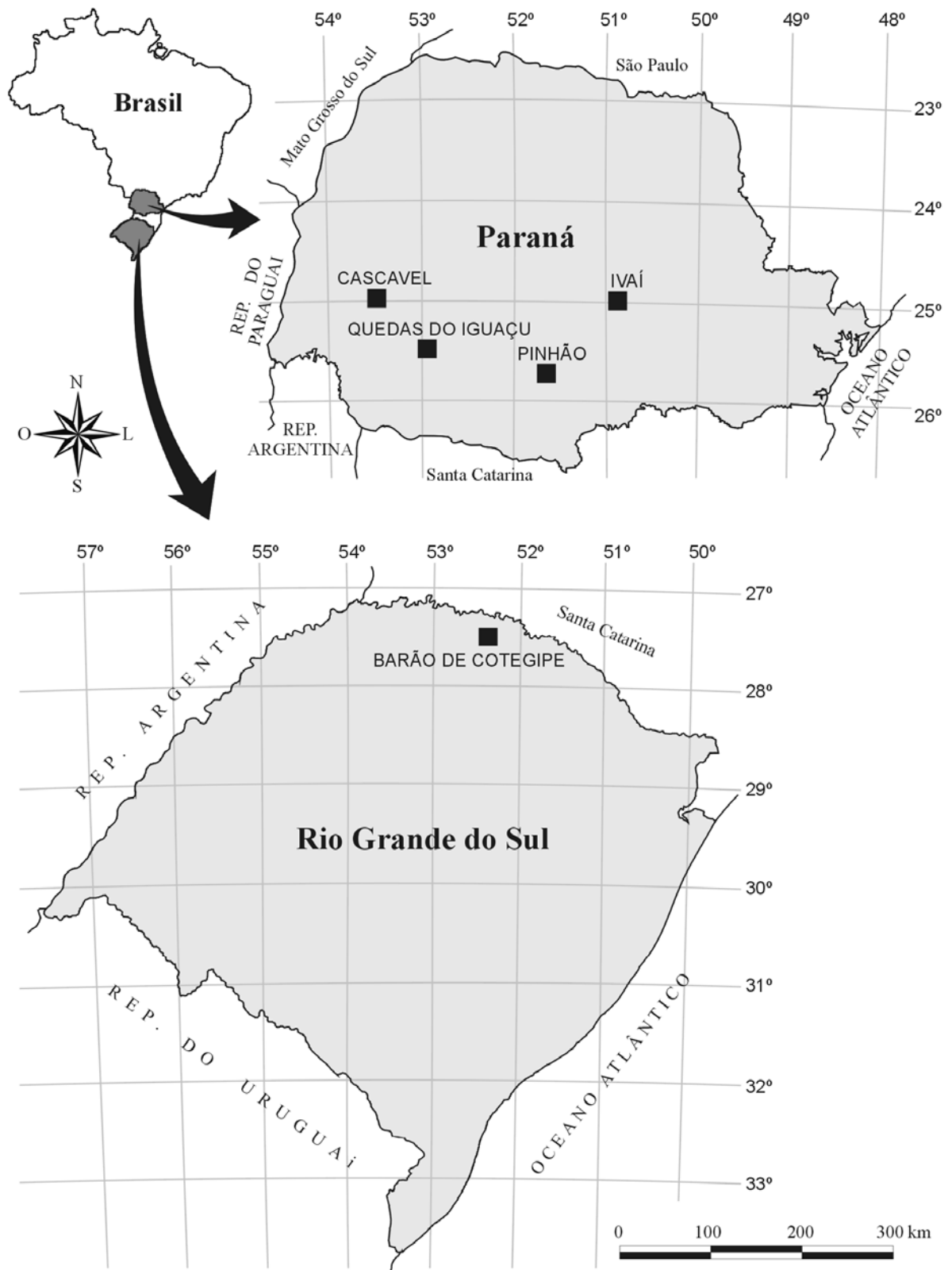


Figura 9 - Localização geográfica das cinco procedências de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) nas quais foram coletadas as sementes utilizadas no teste combinado de procedências e progênies conduzido pela Embrapa Florestas, no município de Ivaí/PR, e analisadas no presente trabalho. São elas: Pinhão/PR, Quedas do Iguaçu/PR, Ivaí/PR, Cascavel/PR e Barão de Cotegipe/RS.

3.2. Delineamento e caracterização da área experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com dez repetições, todas com seis plantas por parcela linear (Figura 10). As progêneses foram aleatorizadas independentemente das procedências, não se empregando o arranjo hierárquico de progêneses dentro da procedência. O espaçamento adotado foi de 3 m entre linhas, 2 m entre árvores e 3 m entre blocos. A poda de formação foi efetuada por volta de dois anos de idade e a segunda poda foi realizada dois anos após a primeira (Sturion et al., 2003).

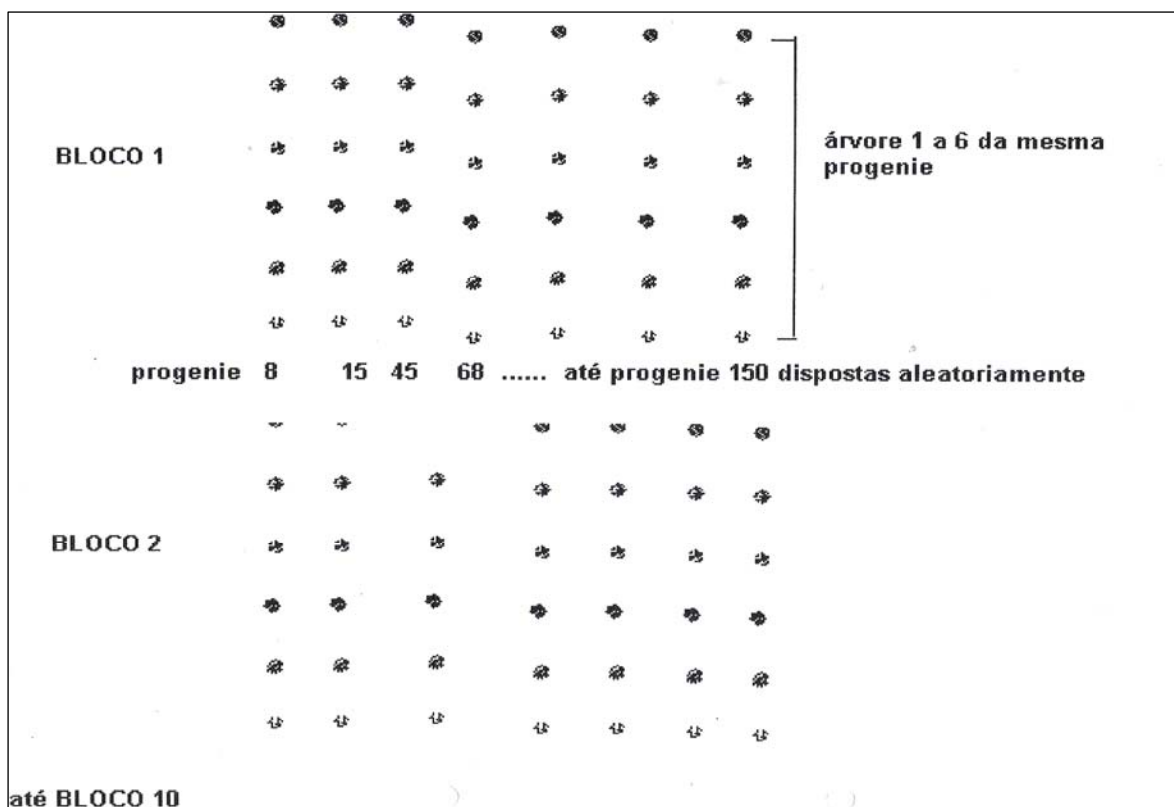


Figura 10 - Delineamento experimental em blocos casualizados, do teste combinado de procedências e progêneses de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), conduzido pela Embrapa Florestas, Ivaí/PR.

O solo e o clima da área experimental instalada em Ivaí/PR foram caracterizados por Fasolo et al. (1998). As determinações morfológicas foram efetuadas de acordo com o manual de descrição e coleta de solo no campo (Lemos e Santos, 1996). Visando facilitar a correlação e transferência de dados, os solos foram classificados segundo Embrapa (1999).

O solo predominante na área experimental é da classe latossolo vermelho distrófico, textura argilosa. Apresenta a característica de ser profundo, acentuadamente drenado, poroso, muito argiloso (72% de argila) e de coloração bruno avermelhada-escura. Quimicamente é ácido, com saturação de bases baixa e de alumínio elevada. Ocorre em relevo suave ondulado com declives em torno de 4% e em altitudes que variam de 700 a 750 metros, originários de rochas sedimentares (argilito).

A área do teste está sob a influência do tipo climático Cfb (clima subtropical úmido mesotérmico), com verões quentes e geadas pouco frequentes, com tendência a ocorrer concentração de chuvas nos meses de verão, sem estação seca definida. A temperatura média anual encontra-se entre 17°C e 18°C, sendo a média das temperaturas dos meses mais quentes superior a 22°C e a dos meses mais frios, inferior a 18°C. A precipitação média anual está em torno dos 1.500 mm e excedente hídrico variando de 500 a 800 mm (Caviglione et al., 2000).

3.3. Seleção das progênies de erva-mate

A seleção das progênies de erva-mate foi conduzida com base em uma avaliação preliminar do conteúdo de metilxantinas e compostos fenólicos realizada por Cardozo Junior (2006), utilizando 51 progênies do Programa de Melhoramento Genético de erva-mate da Embrapa Florestas, instalado em Ivaí/PR. Por meio da Distância Generalizada de Mahalanobis (D_{ii}^2), estas progênies foram agrupadas em oito grupos distintos (Nakamura et al., 2009) (Figura 11).

A partir dos grupamentos formados, buscou-se selecionar duas progênies de cada grupo, com exceção do grupo 3, formado por apenas um constituinte (progênie BA 25) e do grupo 7, que teve três progênies elegidas em função de o grupo apresentar um maior número de representantes. Além disso, optou-se pela escolha de materiais divergentes em relação aos outros integrantes do grupo e ainda, pertencentes a localidades distintas, de modo a amostrar materiais provenientes das cinco localidades.

DISTÂNCIA GENÉTICA

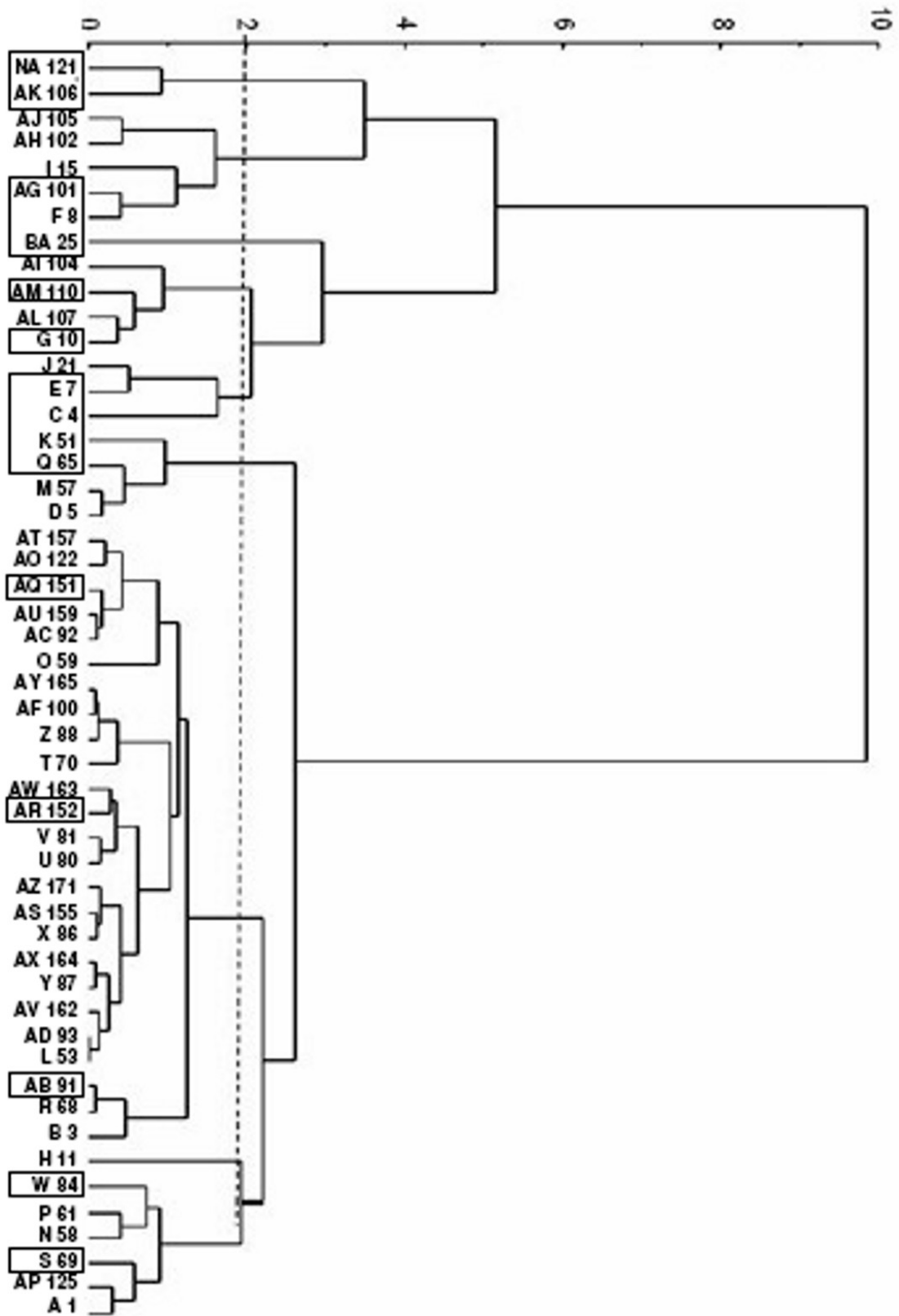


Figura 11 - Dendrograma obtido por Nakamura et al. (2009) a partir dos dados relacionados à concentração de metilxantinas e compostos fenólicos de 51 progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) determinados por Cardozo Junior (2006).

Neste sentido, foram selecionadas as progênies NA 121 e AK 106 (grupo 1); AG 101 e F 8 (grupo 2); BA 25 (grupo 3); AM 110 e G 10 (grupo 4); E 7 e C 4 (grupo 5); K 51 e Q 65 (grupo 6); AQ 151, AR 152 e AB 91 (grupo 7) e W 84 e S 69 (grupo 8), perfazendo um total de 16 progênies. Destas, cinco progênies foram de Ivaí/PR, quatro de Pinhão/PR, três de Barão de Cotegipe/RS, duas de Quedas do Iguaçu/PR e duas de Cascavel - PR, sendo cada uma delas representada por cinco indivíduos, totalizando 80 acessos (Quadro 2).

Quadro 2 - Descrição das progênies selecionadas para análise da divergência genética e quantificação de metilxantinas e compostos fenólicos, com as respectivas procedências, blocos de coleta e indivíduos amostrados na área experimental da fazenda Vila Nova, Ervateira Bitumirim, Ivaí/PR

Acesso	Procedência	Progênie	Bloco de coleta	Nº de identificação dentro do bloco
01	Pinhão/PR	AM 110	I	03
02	Pinhão/PR	AM 110	I	04
03	Pinhão/PR	AM 110	I	06
04	Pinhão/PR	AM 110	III	01
05	Pinhão/PR	AM 110	III	04
06	Pinhão/PR	AG 101	I	02
07	Pinhão/PR	AG 101	I	05
08	Pinhão/PR	AG 101	I	06
09	Pinhão/PR	AG 101	III	02
10	Pinhão/PR	AG 101	III	03
11	Pinhão/PR	NA 121	I	01
12	Pinhão/PR	NA 121	I	03
13	Pinhão/PR	NA 121	I	04
14	Pinhão/PR	NA 121	III	04
15	Pinhão/PR	NA 121	III	05
16	Pinhão/PR	AK 106	I	01
17	Pinhão/PR	AK 106	I	02
18	Pinhão/PR	AK 106	I	03
19	Pinhão/PR	AK 106	III	01
20	Pinhão/PR	AK 106	III	04
21	Quedas do Iguaçu/PR	W 84	I	02
22	Quedas do Iguaçu/PR	W 84	I	05
23	Quedas do Iguaçu/PR	W 84	I	06
24	Quedas do Iguaçu/PR	W 84	III	01
25	Quedas do Iguaçu/PR	W 84	III	02
26	Quedas do Iguaçu/PR	AB 91	I	01
27	Quedas do Iguaçu/PR	AB 91	I	03
28	Quedas do Iguaçu/PR	AB 91	I	04
29	Quedas do Iguaçu/PR	AB 91	III	01
30	Quedas do Iguaçu/PR	AB 91	III	06
31	Ivaí/PR	E 7	I	01
32	Ivaí/PR	E 7	I	04
33	Ivaí/PR	E 7	I	06
34	Ivaí/PR	E 7	III	01

Quadro 2, Cont.

35	Ivaí/PR	E 7	III	04
36	Ivaí/PR	G 10	I	02
37	Ivaí/PR	G 10	I	04
38	Ivaí/PR	G 10	I	05
39	Ivaí/PR	G 10	III	02
40	Ivaí/PR	G 10	III	05
41	Ivaí/PR	F 8	I	01
42	Ivaí/PR	F 8	I	04
43	Ivaí/PR	F 8	I	05
44	Ivaí/PR	F 8	III	01
45	Ivaí/PR	F 8	III	02
46	Ivaí/PR	C 4	I	03
47	Ivaí/PR	C 4	I	04
48	Ivaí/PR	C 4	I	06
49	Ivaí/PR	C 4	III	02
50	Ivaí/PR	C 4	III	05
51	Ivaí/PR	BA 25	I	01
52	Ivaí/PR	BA 25	I	04
53	Ivaí/PR	BA 25	I	05
54	Ivaí/PR	BA 25	III	03
55	Ivaí/PR	BA 25	III	04
56	Cascavel/PR	AR 152	I	01
57	Cascavel/PR	AR 152	I	04
58	Cascavel/PR	AR 152	I	06
59	Cascavel/PR	AR 152	III	02
60	Cascavel/PR	AR 152	III	05
61	Cascavel/PR	AQ 151	I	02
62	Cascavel/PR	AQ 151	I	03
63	Cascavel/PR	AQ 151	I	04
64	Cascavel/PR	AQ 151	III	01
65	Cascavel/PR	AQ 151	III	04
66	Barão de Cotegipe/RS	Q 65	I	02
67	Barão de Cotegipe/RS	Q 65	I	04
68	Barão de Cotegipe/RS	Q 65	I	06
69	Barão de Cotegipe/RS	Q 65	III	01
70	Barão de Cotegipe/RS	Q 65	III	02
71	Barão de Cotegipe/RS	S 69	I	02
72	Barão de Cotegipe/RS	S 69	I	04
73	Barão de Cotegipe/RS	S 69	I	05
74	Barão de Cotegipe/RS	S 69	III	02
75	Barão de Cotegipe/RS	S 69	III	03
76	Barão de Cotegipe/RS	K 51	I	01
77	Barão de Cotegipe/RS	K 51	I	02
78	Barão de Cotegipe/RS	K 51	I	03
79	Barão de Cotegipe/RS	K 51	III	02
80	Barão de Cotegipe/RS	K 51	III	03

3.4. Divergência genética entre progênes de erva-mate mediante o uso de marcadores moleculares RAPD

3.4.1. Coleta das amostras e extração de DNA

Folhas jovens de cada um dos 80 acessos de erva-mate foram coletadas, envoltas em papel alumínio, identificadas e acondicionadas em recipiente contendo nitrogênio líquido. Feito isso, o material foi levado ao Laboratório de Biotecnologia da Universidade Paranaense (UNIPAR), campus Toledo, onde foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C até o momento da extração.

A extração do DNA genômico foi efetuada com base na metodologia proposta por Dellaporta et al. (1983), com modificações (Mühlen, 1999). As amostras foram retiradas do ultrafreezer e, depois, cerca de 100 a 250 mg do tecido foi pulverizado em um almofariz com nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em microtubos de 2 mL e, então, foi adicionado 1 mL de tampão de extração (CTAB a 2,5%; 2 β -mercaptoetanol a 1%; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1% de PVP-40).

Os microtubos foram acondicionados em suportes adequados e incubados em banho-maria a 65°C , durante 30 minutos, procedendo-se a agitações ocasionais durante toda etapa. A seguir, as amostras foram retiradas do banho-maria e resfriadas à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a desproteinização da suspensão por meio da adição de solvente orgânico composto por clorofórmio:octanol (24:1), procedendo-se agitação dos tubos por 5 minutos, mediante suaves inversões, com subsequente centrifugação das amostras (14.000 rpm/15 min., 4°C).

A fase aquosa recuperada foi transferida para outro tubo eppendorf, acrescentando-se a seguir 1 mL de isopropanol gelado com a finalidade de precipitar os ácidos nucleicos. Depois de agitar os tubos suavemente, eles foram armazenados em geladeira por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação (14.000 rpm/15 min., 4°C) e o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram secos à temperatura ambiente.

Após a secagem do precipitado, efetuou-se o processo de lavagem, adicionando-se 1 mL de solução composta por etanol 76% v/v e acetato de amônio 10 mM, a qual ficou agindo por aproximadamente 30 minutos. Depois

disso, as amostras foram novamente centrifugadas (14.000 rpm/10 min., 4°C) e tiveram o sobrenadante descartado. Os tubos foram secos à temperatura ambiente, sendo a seguir realizada a ressuspensão do precipitado em 100 µL de TE (0,010 M Tris Base pH 8,0, 0,001 M EDTA).

Posteriormente, foi realizada a precipitação do DNA com 50 µL de acetato de amônia 7,5 M e 375 µL de etanol absoluto gelado, sendo as amostras incubadas por 30 minutos em geladeira. Após este período, procedeu-se à centrifugação das amostras (14.000 rpm/15 min., 4°C).

Finalizada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as amostras foram lavadas com etanol a 70% e secas à temperatura ambiente. A seguir, foi realizada a ressuspensão do precipitado com 200 µL de TE contendo RNase na concentração final de 40 µg mL⁻¹, incubando as amostras por 30 minutos, a 37°C. Nos casos em que o precipitado não se encontrava totalmente ressuspensionado, as amostras foram incubadas a 65°C por 10 minutos, sendo submetidas a suaves agitações. Logo após, as amostras foram acondicionadas em geladeira para quantificação.

Ao final do processo de extração, as amostras foram submetidas a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8% a fim de se avaliar a integridade do DNA.

3.4.2. Quantificação do DNA e diluição das amostras

A quantificação do DNA e análises posteriores foram realizadas no laboratório de Biotecnologia do Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri), Universidade Estadual de Maringá (UEM), em Maringá.

A quantificação do DNA foi efetuada em espectrofotômetro Femto 700S. O tampão TE 1/10 foi utilizado como branco. A leitura do material foi realizada a 260 nm de absorbância, adicionando-se 20 µL da amostra a 1980 µL de TE 1/10.

Após a quantificação, fez-se o cálculo para a obtenção da concentração de DNA na amostra (ηg µL⁻¹). O DNA foi então diluído, utilizando-se água *milli-Q* autoclavada para que se obtivesse uma concentração final de 10 ηg µL⁻¹.

3.4.3. Reações de amplificação, separação dos fragmentos por eletroforese e detecção das bandas polimórficas

Os DNAs extraídos foram utilizados como molde para reações de amplificação. Cada reação (15 µL) possuía: 30 ng de DNA; 1,25 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 4,5 mM de MgCl₂; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM de KCl; 1,15 µM do *primer* (Operon Technologies) e 1,1 U de Taq polimerase. Os *primers* para RAPD usados nas reações de amplificação, perfazendo um total de 20, estão relacionados no Quadro 3.

Quadro 3 - Relação de *primers* para RAPD utilizados nas análises de divergência genética em erva-mate e suas respectivas seqüências nucleotídicas

<i>Primer</i>	Seqüências nucleotídicas (5'- 3')
OPA-18	5'-AGGTGACCGT-3'
OPA-19	5'-CAAACGTCGG-3'
OPB-12	5'-CCTTGACGCA-3'
OPC-8	5'-TGGACCGGTG-3'
OPE-4	5'-GTGACATGCC-3'
OPF-5	5'-CCGAATTCCC-3'
OPF-10	5'-GGAAGCTTGG-3'
OPF-16	5'-GGAGTACTGG-3'
OPG-5	5'-CTGAGACGGA-3'
OPG-19	5'-GTCAGGGCAA-3'
OPI-3	5'-CAGAAGCCCA-3'
OPI-16	5'-TCTCCCGCCT-3'
OPM-12	5'-GGGACGTTGG-3'
OPR-20	5'-ACGGCAAGGA-3'
OPZ-4	5'-AGGCTGTGCT-3'
OPY-20	5'-AGCCGTGGAA-3'
OPAA-3	5'-TTAGCGCCCC-3'
OPAK-20	5'-TGATGGCGTC-3'
OPAL-9	5'-CAGCGAGTAG-3'
OPAZ-20	5'-CATCACCCCT-3'

As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador Techne, modelo TC-412. Os ciclos de amplificação foram constituídos das seguintes etapas: 3 ciclos (94°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos); 34 ciclos (94°C por 10 segundos, 40°C por 20 segundos, 72°C por 2 minutos) seguidos por uma etapa a 72°C durante 5 minutos (Williams et al., 1990).

Concluída a amplificação, os fragmentos de DNA produzidos foram fracionados em gel de agarose 1,2% preparado com tampão TAE 1X (40 mM Tris-

acetato, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA), contendo brometo de etídio (0,02%) em cuba de eletroforese com o mesmo tampão. Os géis foram submetidos a um campo elétrico de 3 V cm^{-1} e o processo de migração do DNA durou aproximadamente 3 horas.

Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz UV em fotodocumentador Endurance TC 412 e as imagens foram capturas em câmera digital Kodak. Utilizou-se como padrão de tamanho o DNA *ladder* de 100 pb.

3.4.4. Caracterização da variabilidade genética entre e dentro de progênes e procedências de erva-mate utilizando marcadores RAPD

a) Medida de dissimilaridade obtida por meio do complemento aritmético do Coeficiente de Jaccard

A divergência genética entre as procedências e progênes de erva-mate foi avaliada mediante à construção de uma matriz de dados binários referente aos fragmentos polimórficos amplificados que apresentaram grande intensidade. A presença de cada banda foi representada pelo número 1 (um), enquanto a ausência desta foi codificada pelo número 0 (zero) (Cruz e Regazzi, 2001).

A partir do emprego destes valores, foi possível obter os coeficientes de similaridade entre os pares de genótipos levando em consideração os valores de:

a : valor que quantifica o número relacionado à coincidência “1-1” para cada um dos pares de genótipos;

b : valor que quantifica o número relacionado à discordância “1-0” para cada um dos pares de genótipos;

c : valor que quantifica o número relacionado à discordância “0-1” para cada um dos pares de genótipos;

d : valor que quantifica o número relacionado à coincidência “0-0” para cada um dos pares de genótipos.

Neste caso, considerando que a ausência de amplificação de uma determinada banda em dois genótipos não está atrelada à similaridade genética entre eles, excluiu-se a co-ocorrência negativa (*d* : 0,0), de forma que apenas a coincidência “1-1” foi adotada como fator de similaridade entre dois acessos (Duarte et al., 1999; Cruz e Carneiro, 2003).

Partindo deste pressuposto, a similaridade entre i e i' dada por $s_{ii'}$ foi estimada utilizando o Coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908) exemplificado a seguir:

$$s_{ii'} = \frac{a}{a + b + c}$$

Todavia, como se trata de uma medida de similaridade, ao realizar a análise de agrupamento, foi preciso usar uma medida de dissimilaridade, a qual é representada pelo complemento aritmético (Cruz e Carneiro, 2003) dado por:

$$d_{ii'} = 1 - s_{ii'}$$

Em que: $d_{ii'}$ corresponde à dissimilaridade entre os genótipos i e i' e $s_{ii'}$ é a similaridade entre os genótipos i e i' .

Método de agrupamento

Através da estimativa de dissimilaridade, pôde-se determinar o grau de semelhança ou de diferença apresentado entre dois genótipos quaisquer. Porém, como o número de estimativas é consideravelmente grande (igual a $n(n-1)/2$, em que n = número de indivíduos), torna-se impraticável reconhecer grupos homogêneos por meio do simples exame visual daquelas estimativas. Para tanto, foi adotado o método hierárquico UPGMA (*Unweighed Pair Group with Mean Average*) (Cruz e Carneiro, 2003).

Neste caso, para a formação de um único grupo foi utilizada a média aritmética da distância entre todos os pares de genótipos (Elias et al., 2007), o que impede a caracterização da dissimilaridade por valores extremos (máximo ou mínimo) entre os genótipos avaliados (Cruz e Carneiro, 2003). Estas análises estatísticas foram realizadas por meio do programa computacional Genes (Cruz, 2001).

Método UPGMA

No método UPGMA (Sokal e Michener, 1958), o dendograma é formado pelos genótipos que possuem maior similaridade e a distância entre o indivíduo k e um grupo constituído pelos indivíduos i e j é dada pela equação abaixo (Cruz e Carneiro, 2003):

$$d_{(ij)k} = \text{média}\{d_{ik}; d_{jk}\} = \frac{d_{ik} + d_{jk}}{2}$$

Isto é, $d_{(ij)k}$ é dada pela média do conjunto das distâncias dos pares de indivíduos (i e K) e (j e k).

Sendo a distância entre dois grupos gerada por meio de:

$$d_{(ij)(kl)} = \text{média}\{d_{ik}; d_{il}; d_{jk}; d_{jl}\} = \frac{d_{ik} + d_{il} + d_{jk} + d_{jl}}{4}$$

A distância entre os dois grupos formados pelos indivíduos (i e j) e (k e l), respectivamente, é obtida pela média do conjunto, em que os elementos são as distâncias entre os pares de indivíduos (i e k), (i e l), (j e k) e (j e l).

Uma vez obtido o dendrograma, sua confiabilidade pôde ser avaliada por meio da análise co-fenética, a qual informa o grau de concordância entre o dendrograma e a matriz de dissimilaridade/similaridade original, mediante estabelecimento de uma correlação entre os valores reais da matriz e os valores do dendrograma. A análise co-fenética foi realizada usando o teste de correspondência de Mantel (Mantel, 1967).

O procedimento de *bootstrap* foi aplicado para calcular a variância das similaridades genéticas obtidas a partir dos marcadores e, assim, verificar a consistência do dendrograma gerado. O coeficiente de variância foi determinado mediante 1.000 sorteios de *bootstraps* a partir do "Simple Matching Coefficient" (Gover, 1985), usando o programa Genes (Cruz, 2001). Para a avaliação do dendrograma, com base em estimativas de similaridades genéticas por meio de sorteios de *bootstrap*, foi utilizado o programa Genes (Cruz, 2001).

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 (ϕ_{ST}) e progênies (ϕ_{SP}). A significância estatística dos valores de divergência genética entre procedências e progênies foi testada por reamostragem *bootstraps* (foram usados 5.000 sorteios). Adicionalmente, foram calculadas as distâncias genéticas entre as procedências e progênies com base no método de Nei (1972, 1978). Estas distâncias genéticas foram utilizadas para construir o dendrograma por análise de agrupamentos do tipo UPGMA, desenvolvido por Sokal e Michener (1958). A consistência dos

agrupamentos foi verificada por 5.000 reamostragens *bootstraps*. Todas as estimativas foram realizadas utilizando-se o programa TFPGA (*Tools for Populations Genetic Analysis*) - versão 1.3 (Miller, 1997).

3.5. Análise da composição fitoquímica

O material vegetal foi coletado no inverno (junho/2008), durante o período matutino, onde foram retirados dois ramos do terço mediano da planta, em direção leste, a fim de obter cerca de 100 g de folhas. Depois de acondicionadas em sacos devidamente identificados, as mesmas foram transportadas ao laboratório de Fitoterapia e Farmacognosia da Universidade Paranaense (UNIPAR), campus Toledo, para o beneficiamento.

3.5.1. Beneficiamento e extração

Primeiramente, foram separadas as folhas dos galhos, selecionando manualmente as partes aéreas verdes, sem manchas e sujeiras. Logo após, para a inativação enzimática, as folhas foram submetidas individualmente a um banho em água fervente por 10 segundos e levadas à estufa com circulação de ar a 45°C por 48 horas.

Uma vez secas, realizou-se a trituração das folhas, que foram então acondicionadas em embalagens plásticas identificadas e armazenadas em ambiente refrigerado. A extração foi efetuada por meio da maceração de 1,0 g da amostra com metanol: água, na proporção de 70: 30 (5x de 10 mL). Por fim, as amostras foram filtradas e o volume final do extrato foi completado para 50 mL (Cardozo Junior et al., 2007).

3.5.2. Quantificação de metilxantinas e compostos fenólicos

A determinação dos teores de metilxantinas e compostos fenólicos foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Cardozo Junior et al. (2007), com modificações. O cromatógrafo (Shimadzu Mod. SCL-20A) estava equipado

com injetor (SIL-20AHT), bomba (LC-20AT), degaseificador (DGU-20A₅) e forno (CTO-20A). A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se coluna C-18 (Supelco LC-18 - 4,6 x 250 mm, 5 µm), com 20 µL de injeção. A fase móvel empregada foi um gradiente de (A): água acidificada com ácido acético pH 3,0 e (B): metanol. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL min.⁻¹ na temperatura constante de 30°C. Gradiente: 8-20% de B em 20 min.; 20-85% de B em 5 min. e 85% de B em 5 min. A detecção foi conduzida a 265 nm para cafeína e teobromina (metilxantinas) e 325 nm para os ácidos clorogênico, neoclorogênico e criptoclorogênico (compostos fenólicos) em um detector ultravioleta UV-PDA (Photodiode Array) (SPD-M20A).

As amostras foram injetadas em duplicata e as áreas dos picos comparadas com padrões de cafeína, teobromina e ácido clorogênico (Sigma Chemical Co, USA).

A curva de calibração foi preparada mediante diluição dos padrões na fase móvel. Depois de injetadas, as áreas dos respectivos picos foram analisadas, sendo que os coeficientes de correlação obtidos foram de $r^2 = 1$ ($y = 5E + 07x - 13109$) para cafeína, com escala linear de 0,025 a 0,4 mg mL⁻¹; $r^2 = 0,9934$ ($y = 8E + 07x - 875707$) para teobromina, com escala linear de 0,05 a 0,4 mg mL⁻¹ e $r^2 = 0,9999$ ($y = 6E + 07x - 35898$) para ácido clorogênico, com escala de 0,025 a 0,4 mg mL⁻¹.

3.5.3. Análises estatísticas

3.5.3.1. Análise da variância

Os teores determinados para metilxantinas e compostos fenólicos em cada um dos 80 acessos avaliados foram primeiramente transformados em % sobre a matéria seca e, então, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para cada característica estudada, a fim de avaliar a existência de variabilidade genética significativa entre os tratamentos. Para isso, utilizou-se o delineamento experimental de blocos com informação dentro da parcela, considerando as esperanças dos quadrados médios para o modelo desbalanceado, isto é, com número desigual de indivíduos dentro da parcela (Cruz, 2001).

Os resultados da análise da variância foram obtidos conforme o modelo estatístico descrito por Cruz (2001), dado por:

$$Y_{ijk} = \mu + g_i + b_j + \varepsilon_{ij} + \delta_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} refere-se à observação no k-ésimo indivíduo, avaliado no i-ésimo genótipo da j-ésima repetição; μ é a média geral do ensaio; g_i compreende o efeito do genótipo i; b_j corresponde ao efeito do bloco j; ε_{ij} é o efeito da parcela ij; δ_{ijk} é o efeito do indivíduo k, o i-ésimo genótipo no j-ésimo bloco.

3.5.3.2. Teste comparativo de médias entre progênies de erva-mate

Os testes de agrupamento de médias referentes aos teores de cafeína, teobromina, ácido neoclorogênico, ácido clorogênico e ácido criptoclorogênico foram realizados de acordo com a proposta de Scott e Knott (1974), ao valor nominal de 5% de probabilidade, para as 16 progênies de erva-mate analisadas.

Este teste utiliza a razão de verossimilhança para testar a significância de que g tratamentos podem ser separados em dois grupos que maximizem a soma de quadrados entre grupos. Entretanto, sabendo que a aplicação deste teste se torna difícil quando o número de tratamentos é grande, já que o número de grupos aumenta exponencialmente, é necessário ordenar as médias dos tratamentos (Ramalho et al., 2000).

Assim, segundo Cruz (2001), para a realização do teste de agrupamento de Scott e Knott, é preciso obter:

$$\lambda = \frac{\pi B_0}{2(\pi - 2)\hat{\sigma}_0^2}$$

Em que: B_0 refere-se ao valor máximo da soma de quadrados entre grupos, levando em conta todas as partições possíveis dos g tratamentos (neste caso genótipos) em dois grupos. Existem $2^{g-1}-1$ partições possíveis das g médias dos tratamentos em dois grupos. Porém, conforme cita Fisher (1958), pode-se encontrar B_0 mediante análise de $g-1$ partições que se formam pela ordenação

das g médias, das quais um grupo é estabelecido. $\hat{\sigma}_o^2$ é a variância obtida por meio de $\hat{\sigma}_o^2 = \left[\sum_{i=1}^g (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2 + v s \frac{2}{y} \right]$.

Em que: \bar{Y}_i é a média do tratamento i ($i = 1, 2, \dots, g$); \bar{Y} é a média geral dos tratamentos a serem separados; g refere-se ao número de médias a serem separadas; v corresponde ao número de graus de liberdade do resíduo; e $s \frac{2}{y} = \frac{QMR}{r}$; QMR refere-se ao quadrado médio do resíduo e r significa o número de observações que deram origem às médias a serem reunidas.

Para a formação dos grupos deve-se adotar o seguinte critério (Cruz, 2001):

- Se $\lambda < \chi_{(\alpha, v_o)}^2$, todas as médias são consideradas homogêneas, não ocorrendo mais partições dentro do grupo considerado;
- Se $\lambda \geq \chi_{(\alpha, v_o)}^2$, os dois grupos diferem significativamente. Estes dois grupos precisam ser testados isoladamente, para que novas divisões ocorram. O teste continua até a obtenção de grupos com apenas uma média e/ou grupos de médias homogêneas.

Vale lembrar que o valor de qui-quadrado referencial é dado em função do nível de significância α pré-estabelecido e, também, do número de graus de liberdade encontrados por:

$$v_o = \frac{g}{\pi - 2}$$

Além deste, foi empregado o teste de Tukey ($\alpha = 0,01$) para confrontar as médias entre progênies. Conforme cita Cruz (2001), o seu princípio básico é avaliar a diferença significativa entre duas médias oriundas de um mesmo número de repetições, tendo como parâmetro a diferença mínima significativa, a qual é dada por:

$$\Delta = q \sqrt{(1/2) \hat{V}(\hat{Y})}$$

Onde:

q : valor da amplitude total estudentizada, para utilização no teste de Tukey, que é a função de n e n' , sendo n o número de tratamentos e n' o número de graus de liberdade do resíduo;

$\hat{V}(\hat{Y})$: variância do contraste $\hat{Y} = \hat{m}_1 - \hat{m}_2$, sendo

$$\hat{V}(\hat{Y}) = \frac{2QMR}{r}$$

Tendo:

QMR : quadrado médio do resíduo;

r : número de repetições que originaram as médias.

3.5.3.3. Correlação genética entre caracteres

Falconer (1987) e Vencovsky e Barriga (1992) relataram que a associação entre duas determinadas características pode ser analisada, de maneira bem simples, por meio da correlação fenotípica, genotípica e ambiental. Entretanto, como as correlações não são medidas de causa e efeito, preconiza-se o emprego de métodos específicos, tais como o cálculo das covariâncias entre dois caracteres (X e Y), recomendado por Kempthorne (1973).

Para tanto, empregou-se:

$$V(X + Y) = V(X) + V(Y) + 2CoV(X, Y)$$

e

$$CoV(X, Y) = \frac{V(X + Y) - V(X) - V(Y)}{2}$$

Devido à semelhança com os quadrados médios, foi obtido:

$$PM(X, Y) = \frac{QM(X + Y) - QM(X) - QM(Y)}{2}$$

Sendo $PM(X, Y)$ o produto médio entre X e Y.

Conseqüentemente, as covariâncias foram encontradas utilizando as seguintes equações:

- Covariância fenotípica: $C\hat{O}V_F(X,Y) = \frac{PMG(X,Y)}{r}$
- Covariância genotípica: $C\hat{O}V_G(X,Y) = \hat{\Phi}_g(X,Y) = \frac{PMG(X,Y) - PMR(X,Y)}{r}$
- Covariância ambiental: $C\hat{O}V_A(X,Y) = PMR(X,Y)$

Por fim, foram estimados os valores da:

- Correlação fenotípica: $r_F = \frac{PMG_{XY}}{\sqrt{QMR_X \cdot QMR_Y}}$
- Correlação genotípica: $r_G = \frac{(PMG_{XY} - PMR_{XY})/r}{\sqrt{\hat{\Phi}_{g_X} \cdot \hat{\Phi}_{g_Y}}} = \frac{\hat{\Phi}_{g(X,Y)}}{\sqrt{\hat{\Phi}_{g_X} \cdot \hat{\Phi}_{g_Y}}}$
- Correlação ambiental: $r_A = \frac{PMR_{XY}}{\sqrt{QMR_X \cdot QMR_Y}}$

3.5.3.4. Medida de dissimilaridade entre progênies de erva-mate por meio da Distância Generalizada de Mahalanobis (Mahalanobis, 1936)

A distância de Mahalanobis, denominada $D_{ii'}^2$, é uma técnica empregada para avaliar a divergência genética quando vários caracteres de diferentes genótipos são determinados aos pares e simultaneamente. Esta medida pode ser encontrada de acordo com diferenças morfológicas, agrônômicas e fisiológicas analisadas a partir de um dado grupo de genótipos (Elias et al., 2007).

A vantagem desta técnica relaciona-se ao fato de levar em conta a correlação entre os caracteres avaliados. Ou seja, quando vários caracteres estão envolvidos, o valor de $D_{ii'}^2$ pode ser, alternativamente, obtido a partir das médias dos dados originais e da matriz de covariâncias residuais ou, ainda, a partir dos dados transformados (Cruz e Regazzi, 2001).

Segundo Cruz (2001), as distâncias generalizadas de Mahalanobis ($D_{ii'}^2$) são estimadas empregando a seguinte equação:

$$D_{ii'}^2 = \delta' \psi^{-1} \delta$$

Em que:

$D_{ii'}^2$: distância de Mahalanobis entre os genótipos i e i' ;

ψ : matriz das variâncias e covariâncias residuais;

δ : $[d_1, d_2 \dots d_v]$ sendo $d_j = Y_{ij} - Y_{i'j}$; e

Y_{ij} : média do i -ésimo genótipo em relação a j -ésima variável.

Além disso, as distâncias são determinadas a partir das variáveis transformadas por condensação pivotal, onde se tem:

$$D_{ii'}^2 = \sum_j (Z_{ij} - Z_{i'j})^2$$

Em que: Z_{ij} : média do i -ésimo genótipo em relação a j -ésima variável com variância residual igual a 1.

Deve-se ressaltar que a transformação das variáveis originais (X) em variáveis padronizadas (Y) é efetuada por meio de:

$$Z = XV'$$

Em que: V é a matriz de transformações.

Em seguida, estas são padronizadas utilizando:

$$Z_j = \frac{Z_j}{\sqrt{\hat{V}(Z_j)}}$$

E, ao final, a matriz V é obtida, as variâncias das variáveis transformadas $V_{(Z_j)}$, as médias das variâncias não-correlacionadas (Z_j) determinadas pela condensação pivotal e as estimativas das distâncias generalizadas.

Empregando o critério proposto por Singh (1981), que se baseia na estatística $S_{.j}$, pode-se calcular ainda a contribuição relativa dos caracteres para a divergência genética, dada pela expressão:

$$D_{ii'}^2 = \delta' \psi^{-1} \delta = \sum_{j=1}^n \sum_{j'=1}^n \varpi_{jj'} d_j d_{j'}$$

Sendo:

$\varpi_{jj'}$: o elemento da j -ésima linha e j' -ésima coluna da inversa da matriz de variâncias e covariâncias residuais.

d_j : a diferença entre as médias do j-ésimo caráter nas duas populações ou indivíduos considerados.

Com base na matriz de dissimilaridade genética gerada, aplicou-se o método de agrupamento de Tocher (Rao, 1952) e foi construído um dendrograma pelo método de agrupamento da distância média (UPGMA). Todas as análises estatísticas foram efetuadas com o auxílio do programa Genes (Cruz, 2001).

3.5.3.5. Método de otimização de Tocher

O método de otimização de Tocher (Rao, 1952) adota o critério do maior entre os mínimos, ou seja, o acréscimo médio na distância intragrupo, por meio da inclusão de um novo cruzamento a um dado grupo, deve ser menor ou igual ao limite adotado. Assim, a distância média intragrupos deve ser inferior a qualquer distância intergrupos (Cruz e Regazzi, 2001).

Neste caso, utilizando a matriz de dissimilaridade, primeiro deve-se identificar o par de parentais mais similares. Estes parentais, por sua vez, formarão o grupo inicial, a partir do qual será analisada a hipótese de inclusão de novos parentais ao grupo (Cruz e Regazzi, 2001).

Sabendo, então, que a entrada de um genitor em um dos grupos aumenta o valor médio da distância intragrupo, é possível incluir o genitor em um grupo pela comparação entre o acréscimo no valor médio da distância dentro do grupo e um nível máximo permitido, que pode ser obtido arbitrariamente ou adotando o valor máximo (θ) da medida de dissimilaridade achado no conjunto das menores distâncias envolvendo cada um dos genitores (Cruz e Regazzi, 2001).

De acordo com Cruz e Carneiro (2003), a inclusão ou não do indivíduo k no grupo é realizada levando em consideração:

$$\text{- Se } \frac{d_{(grupo)k}}{n} \leq \theta \text{ inclui-se o indivíduo k no grupo;}$$

$$\text{- Se } \frac{d_{(grupo)k}}{n} > \theta \text{ o indivíduo k não é incluído no grupo.}$$

A partir disso, o modelo usado para calcular a distância entre o indivíduo k e o grupo é dado por (Cruz e Carneiro, 2003):

$$d_{(ij)k} = d_{ik} + d_{jk}$$

Em que: $d_{(ij)k}$ representa a distância entre o grupo (i e j) em relação ao genótipo k; d_{ik} refere-se à distância entre os genótipos i e k; d_{jk} expressa a distância entre os genótipos j e k.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da divergência genética por meio de marcadores moleculares RAPD entre e dentro de procedências e progênes

Com base na análise co-fenética e de *bootstrap* a que foram submetidos os 80 acessos de erva-mate, verificou-se que quatro deles apresentavam baixa consistência de agrupamento, devido a problemas de amplificação em um ou mais *loci* analisados. Portanto, esses acessos foram retirados das análises com o intuito de aumentar a confiabilidade dos dados obtidos.

No total, 76 acessos provenientes das 16 progênes foram submetidos às análises de diversidade genética com os marcadores RAPD (Quadro 4).

Quadro 4 - Relação dos 76 acessos de erva-mate analisados com os 20 *primers* para RAPD

Acesso	Procedência	Progênie/nº de identificação dentro do bloco
01	Pinhão/PR	AM 110/3
02	Pinhão/PR	AM 110/4
03	Pinhão/PR	AM 110/6
04	Pinhão/PR	AM 110/1
05	Pinhão/PR	AM 110/4
06	Pinhão/PR	AG 101/2
07	Pinhão/PR	AG 101/5
08	Pinhão/PR	AG 101/6
09	Pinhão/PR	AG 101/2
10	Pinhão/PR	AG 101/3
11	Pinhão/PR	NA 121/1
12	Pinhão/PR	NA 121/3
14	Pinhão/PR	NA 121/4
15	Pinhão/PR	NA 121/5
16	Pinhão/PR	AK 106/1
17	Pinhão/PR	AK 106/2
18	Pinhão/PR	AK 106/3
19	Pinhão/PR	AK 106/1
20	Pinhão/PR	AK 106/4
21	Quedas do Iguaçu/PR	W 84/2
23	Quedas do Iguaçu/PR	W 84/6
24	Quedas do Iguaçu/PR	W 84/1
25	Quedas do Iguaçu/PR	W 84/2
26	Quedas do Iguaçu/PR	AB 91/1
27	Quedas do Iguaçu/PR	AB 91/3
28	Quedas do Iguaçu/PR	AB 91/4
29	Quedas do Iguaçu/PR	AB 91/1
30	Quedas do Iguaçu/PR	AB 91/6

Quadro 4, Cont.

31	Ivaí/PR	E 7/1
32	Ivaí/PR	E 7/4
33	Ivaí/PR	E 7/6
34	Ivaí/PR	E 7/1
35	Ivaí/PR	E 7/4
36	Ivaí/PR	G 10/2
37	Ivaí/PR	G 10/4
38	Ivaí/PR	G 10/5
39	Ivaí/PR	G 10/2
41	Ivaí/PR	F 8/1
42	Ivaí/PR	F 8/4
43	Ivaí/PR	F 8/5
45	Ivaí/PR	F 8/2
46	Ivaí/PR	C 4/3
47	Ivaí/PR	C 4/4
48	Ivaí/PR	C 4/6
49	Ivaí/PR	C 4/2
50	Ivaí/PR	C 4/5
51	Ivaí/PR	BA 25/1
52	Ivaí/PR	BA 25/4
53	Ivaí/PR	BA 25/5
54	Ivaí/PR	BA 25/3
55	Ivaí/PR	BA 25/4
56	Cascavel/PR	AR 152/1
57	Cascavel/PR	AR 152/4
58	Cascavel/PR	AR 152/6
59	Cascavel/PR	AR 152/2
60	Cascavel/PR	AR 152/5
61	Cascavel/PR	AQ 151/2
62	Cascavel/PR	AQ 151/3
63	Cascavel/PR	AQ 151/4
64	Cascavel/PR	AQ 151/1
65	Cascavel/PR	AQ 151/4
66	Barão de Cotegipe/RS	Q 65/2
67	Barão de Cotegipe/RS	Q 65/4
68	Barão de Cotegipe/RS	Q 65/6
69	Barão de Cotegipe/RS	Q 65/1
70	Barão de Cotegipe/RS	Q 65/2
71	Barão de Cotegipe/RS	S 69/2
72	Barão de Cotegipe/RS	S 69/4
73	Barão de Cotegipe/RS	S 69/5
74	Barão de Cotegipe/RS	S 69/2
75	Barão de Cotegipe/RS	S 69/3
76	Barão de Cotegipe/RS	K 51/1
77	Barão de Cotegipe/RS	K 51/2
78	Barão de Cotegipe/RS	K 51/3
79	Barão de Cotegipe/RS	K 51/2
80	Barão de Cotegipe/RS	K 51/3

Os 20 *primers* utilizados geraram um total de 254 fragmentos amplificados (bandas), com uma média de 12,7 bandas por *primer*. Desses, 242 foram

polimórficos (12,1 por *primer*) e 12 foram monomórficos (0,6 por *primer*) (Quadro 5).

Quadro 5 - Relação dos *primers* para RAPD, com seus respectivos números de fragmentos totais, polimórficos e monomórficos, e tamanho do fragmento (pb)

<i>Primer</i>	Nº total de fragmentos	Nº de fragmentos polimórficos	Nº de fragmentos monomórficos	Tamanho do fragmento (pb)
OPA-18	33	33	0	300-2.000
OPA-19	3	3	0	683-1.150
OPB-12	15	15	0	350-2.199
OPC-8	13	11	2	417-2.000
OPE-4	8	8	0	600-1.383
OPF-5	17	16	1	396-3.533
OPF-10	11	10	1	316-1.211
OPF-16	14	14	0	300-2.100
OPG-5	13	13	0	379-2.736
OPG-19	11	8	3	350-2.870
OPI-3	12	12	0	410-1.068
OPI-16	11	10	1	450-1.470
OPM-12	13	13	0	380-1.611
POR-20	10	10	0	427-1.701
OPZ-4	13	12	1	430-1.563
OPY-20	15	15	0	450-2.231
OPAA-3	10	9	1	700-1.500
OPAK-20	9	9	0	450-2.173
OPAL-9	13	12	1	443-1.803
OPAZ-20	10	9	1	575-1.500
Total	254	242	12	-
Média	12,7	12,1	0,6	-

A figura 12 apresenta o padrão de bandas amplificadas por meio do *primer* OPI-16. Como se pode observar, este *primer* produziu fragmentos monomórficos de 700 pb e 1470 pb em todos os acessos analisados.

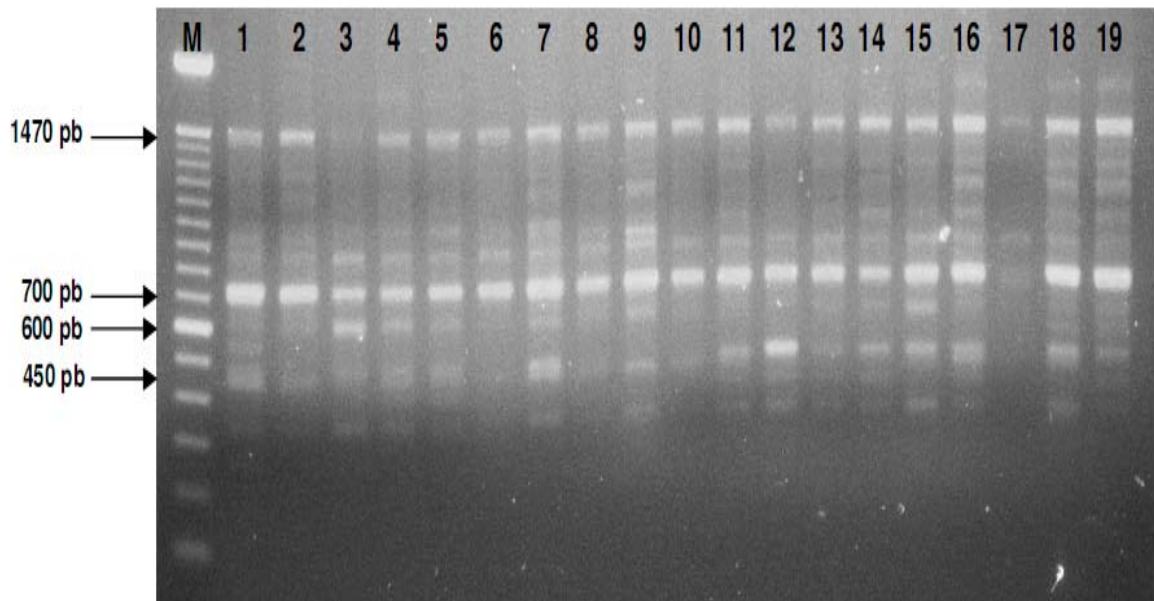


Figura 12 - Padrão de amplificação de DNA genômico em acessos de erva-mate utilizando o *primer* OPI-16. As progênies estão ordenadas conforme descrito: M, marcador de peso molecular 100 pb; 1, G10/4; 2, G10/5; 3, AR152/1; 4, AR152/4; 5, AR152/6; 6, F8/1; 7, F8/4; 8, F8/5; 9, C4/3; 10, C4/4; 11, C4/6; 12, AQ151/2; 13, AQ151/3; 14, AQ151/4; 15, Q65/2; 16, Q65/4; 17, Q65/6; 18, S69/2.

O tamanho das bandas (em pares de bases) variou de 300 pb a 3.533 pb, nos *primers* OPA-18 e OPF-16, e OPF-5, respectivamente. O *primer* que apresentou maior número de bandas foi o OPA-18 (33 bandas), seguido pelo OPF-5 (17 bandas); enquanto o OPA-19 gerou apenas três bandas.

Quando comparamos os dados obtidos com aqueles encontrados por Cansian (2003) em três procedências de erva-mate, pôde-se notar que houve semelhança quanto ao número médio de fragmentos por *primer*. Isto porque ao avaliar 30 representantes das populações de Erechim, Barão de Cotegipe e Áurea, no Rio Grande do Sul, o número médio de fragmentos por *primer* foi de 11,7, 12,1 e 12,6, respectivamente, com tamanho variando de 50 pb a 2.200 pb, sendo relatados 36% de polimorfismo para Erechim, 33,7% para Áurea e somente 24,9% para Barão de Cotegipe.

Em contrapartida, Gauer e Cavalli-Molina (2000), utilizando 15 *primers* para RAPD para avaliar plantas de erva-mate provenientes de populações de quatro Estados do Brasil (Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio

Grande do Sul), encontraram 341 bandas diferentes, com uma média de 22,7 fragmentos com tamanhos que variaram de 280 pb a 2.800 pb.

O nível de polimorfismo obtido (94,89%) foi superior a alguns relatos encontrados na literatura. Por exemplo, Wendt et al. (2007), quando caracterizaram geneticamente procedências e progênies de erva-mate utilizando 15 *primers* para RAPD, sendo estes semelhantes àqueles empregados por Gauer e Cavalli-Molina (2000), obtiveram 70,4% de *loci* polimórficos. Deve-se ressaltar que, diferente do observado no presente trabalho, o *primer* OPF-5 demonstrou-se o menos polimórfico, gerando apenas cinco bandas.

Portanto, o nível de polimorfismo a ser obtido depende do grau de divergência existente entre os genótipos estudados.

a) Avaliação da divergência genética entre procedências

A análise da variância molecular (AMOVA) foi utilizada para estimar a divergência genética entre e dentro das procedências (Quadro 6). Constatou-se maior variabilidade genética dentro das procedências (92,00%) do que entre as procedências (8,00%).

Uma provável explicação para a grande variabilidade encontrada dentro de uma mesma população está relacionada às características da história da erva-mate (Hamrick e Godt, 1989; Gauer e Cavalli-Molina, 2000). Este fato já havia sido comentado por Hamrick (1979), que demonstrou associação positiva entre caracteres de fecundação e ciclo de vida desta planta e a variação genética. Hamrick et al. (1992) também afirmaram que, em espécies dióicas como a erva-mate, este resultado é esperado, pois a taxa de recombinação é alta em função da fecundação cruzada obrigatória.

Além disso, Hamrick et al. (1979) disseram que espécies lenhosas, perenes, de ciclo longo, pertencentes a estágios sucessionais tardios, predominantemente alógamas, de ampla distribuição geográfica, polinizadas pelo vento, com fluxo gênico intenso e de elevada fecundidade, possuem maior variabilidade intrapopulacional do que espécies que apresentam combinações diferenciadas.

Assim, sabendo que a erva-mate é uma espécie perene, com ciclo de vida longo, dióica críptica e fecundação cruzada obrigatória, polinização efetuada

por insetos e de ampla distribuição natural, é de se esperar que a diversidade genética da espécie seja alta (Wendt, 2005).

Quadro 6 - Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro das cinco procedências de erva-mate

Fonte de variação	GL	EQM	Varição genética (%)
Entre procedências (ϕ_{ST})	4	3,49	8,00**
Dentro de procedências ($\phi_{d\text{ proc}=1}-\phi_{ST}$)	71	37,65	92,00**
Total	75	41,14	100,00

**significativo a 1%

Os valores obtidos estão em concordância com aqueles encontrados por Gauer e Cavalli-Molina (2000), ao avaliar a variabilidade genética de quatro populações de erva-mate. Os autores citam a ocorrência de 85% de diversidade genética dentro de uma mesma população e 15% entre as populações. Os dados referentes à variabilidade genética interpopulacional ainda assemelham-se àqueles obtidos por Vidor et al. (2002b), que apontam uma similaridade em nível de 80% para os germoplasmas de erva-mate provenientes de Barão de Cotegipe e Água Doce, e por Wendt et al. (2007), os quais descrevem uma variação genética de 88,3% dentro das procedências de erva-mate (Ivaí/PR, Pinhão/PR e Cascavel/PR), enquanto apenas 11,7% desta diversidade encontram-se entre as procedências.

Trabalhos realizados com outras espécies arbóreas, nos quais foi avaliada a variabilidade genética utilizando marcadores moleculares RAPD, confirmam que o nível de variabilidade genética apresenta-se maior dentro das populações e, conseqüentemente, menor entre as populações (Loveless e Hamrick, 1984, 1987; Yun et al., 1998; Aagaard et al., 1998).

Gillies et al. (1999), por exemplo, estudando populações de *Swietenia macrophylla* King. com marcadores moleculares RAPD, observaram que 87,43% da divergência genética ocorreu dentro das populações e 12,01% entre as populações dentro de regiões e 0,57% entre regiões. Lacerda et al. (2001) constataram que 12,3% da variação genética de *Plathymenia reticulata*, que foi determinado por AMOVA, refere-se a diferenças entre populações. Em *Trema*

micrantha (L.) B., a variabilidade foi de 92,2% dentro de populações, 3,0% entre subpopulações e 4,8% entre populações (Kageyama et al., 2003).

Em *Maytenus aquilofia* Mart. e *Esenbeckia leiocarpa* Engl., a diversidade observada foi de 81,1% e 97,7% dentro de populações, 18,6% e 7,7% entre subpopulações e, 0,2% e 2,3% entre populações, respectivamente (Kageyama et al., 2003). De maneira similar, o índice de divergência foi de 61,5% dentro de populações de *Coffea arabica* (Silveira et al., 2003); em *Trichilia pallida* Swartz, a variabilidade observada foi de 12,5% entre as populações e de 87,5% dentro das populações (Zimback et al., 2004) e, em *Eremanthus erythropappus* MacLeish, 12,38% da variabilidade existente foi interpopulacional, enquanto 87,62% foi verificada dentro das populações (Moura, 2005).

Quanto ao índice de divergência genética (Quadro 7), o maior número de *loci* polimórficos foi encontrado na população de Pinhão/PR (83,06%), enquanto a menor porcentagem de polimorfismo foi visualizada em Cascavel/PR (68,59%).

De forma geral, as espécies arbóreas possuem um elevado número de *loci* polimórficos e maior nível de variabilidade genética intrapopulacional do que interpopulacional, além de um sistema de cruzamento misto (Berg e Hamrick, 1997), onde há predomínio da alogamia (Ward et al., 2005).

As espécies arbóreas, de forma geral, possuem um elevado número de *loci* polimórficos e maior nível de variabilidade genética intrapopulacional do que interpopulacional, além de um sistema de cruzamento misto (Berg e Hamrick, 1997), onde há predomínio da alogamia (Ward et al., 2005). Porém, como a diversidade de espécies florestais é muito grande, os sistemas reprodutivos são diferenciados e as interações com os dispersores de sementes e os agentes polinizadores são complexas (Oliveira e Gibbs, 2000; Machado e Lopes, 2004; Gross, 2005).

Devido aos fatores expostos, diversos estudos realizados com estas espécies têm demonstrado variação em relação ao número de *loci* polimórficos, podendo ser encontrado níveis baixos, como o observado no trabalho de Seoane et al. (2000), com *Esenbeckia leiocarpa* Engl., que obtiveram 36,36% de *loci* polimórficos, até índices elevados, variando de 90,3% a 97,3% em *Trichilia pallida* Swartz (Zimback et al., 2004) e 90,48 a 92,86% em *Eremanthus erythropappus* MacLeish (Moura, 2005).

Quadro 7 - Diversidade genética (Nei, 1972, 1978) para as cinco procedências de erva-mate

Procedência	Locí polimórficos (%)	H_T
Pinhão/PR	83,06	0,277
Quedas do Iguaçu/PR	75,21	0,285
Ivaí/PR	75,62	0,281
Cascavel/PR	68,59	0,254
Barão de Cotegipe/RS	71,07	0,274
Média	74,71±3,91	0,274±0,006

A heterozigosidade total (H_T) estimada foi baixa (0,274), evidenciando que a erva-mate apresenta nestas procedências pouca reserva de variabilidade genética, o que não é interessante para os programas de melhoramento. É provável que este resultado esteja vinculado ao número restrito de progênies analisadas dentro das procedências, o que influencia negativamente na capitalização de altos níveis de ganhos genéticos.

Estudos realizados com outras espécies arbóreas, a citar *Trichilia pallida* Swartz (Zimback et al., 2004), *Calophyllum brasiliense* (Mendonça, 2006) e *Eremanthus erythropappus* MacLeish (Estopa et al., 2006), contrastam com o valor determinado nesta análise, um vez que a heterozigosidade total (H_T) foi mais elevada, sendo de 0,334, 0,402 e 0,404, respectivamente.

A variação nas estimativas de dissimilaridade entre as cinco procedências de erva-mate também foi baixa (Quadro 8), confirmando que a maioria das bandas são comuns a todas as populações e as bandas específicas ocorrem em menor frequência. A procedência de Pinhão/PR foi a mais dissimilar em relação a Barão de Cotegipe/RS ($d_{ij} = 0,073$) e Cascavel/PR ($d_{ij} = 0,058$). Por outro lado, as procedências de Ivaí/PR e Cascavel/PR foram as mais similares ($d_{ij} = 0,022$).

A partir dos valores exibidos, pôde-se ainda estimar a média da dissimilaridade genética entre as procedências, que foi igual a 0,043. Os resultados encontrados por Gauer e Cavalli-Molina (2000) entre as quatro populações de erva-mate foram superiores em comparação com este levantamento, no qual a média da distância interpopulacional foi de 0,433, sendo a maior dissimilaridade determinada entre as procedências do Mato Grosso do

Sul e Santa Catarina (0,459), e a maior similaridade entre Paraná e Rio Grande do Sul (0,412).

Quadro 8 - Matriz de dissimilaridade genética entre as cinco procedências de erva-mate com base na distância de Nei (1972,1978)

	Pinhão/PR	Quedas do Iguaçu/PR	Ivaí/PR	Cascavel/PR	Barão de Cotegipe/RS
Pinhão/PR	0,000				
Quedas do Iguaçu/PR	0,029	0,000			
Ivaí/PR	0,035	0,037	0,000		
Cascavel/PR	0,058	0,047	0,022	0,000	
Barão de Cotegipe/RS	0,073	0,038	0,046	0,046	0,000

A média da dissimilaridade entre as populações foi inferior ao trabalho feito com a leguminosa arbórea *Gliricidia sepium*, cuja estimativa foi de 0,337 (Chalmers et al., 1992). As distâncias genéticas obtidas entre as populações, no entanto, mostraram-se próximas aos estudos com a espécie *Trichilia pallida* Swartz, cujo valor de dissimilaridade entre as populações das localidades de Bofete e Campinas foi de 0,049, enquanto Gália apresentou uma distância com Campinas de 0,107 e com Bofete de 0,118, evidenciando baixa divergência entre as populações (Zimback et al., 2004).

Embora o agrupamento genético realizado pelo método UPGMA tenha resultado na formação de dois grupos (Figura 13), a similaridade entre eles foi bastante elevada (95%). Neste caso, o primeiro grupo subdividiu-se em dois ramos, sendo um deles formado pelas procedências de Ivaí/PR e Cascavel/PR, que apresentaram a maior semelhança em termos genéticos, com valor de *bootstrap* de 97,8%, e o outro foi composto por Pinhão/PR e Quedas do Iguaçu/PR (97,1%). Barão de Cotegipe/RS, por sua vez, ficou em um grupo isolado, pois se trata do local mais dissimilar dos demais.

Ao correlacionar este dendograma com a localização geográfica de cada um dos cinco locais originários das progênies, pôde-se verificar que mesmo com a determinação de um alto nível de similaridade entre as localidades do Paraná, a alocação das procedências para formar os ramos ocorreu entre localidades

distantes uma das outras. Ou seja, mesmo que Cascavel e Quedas do Iguaçu apresentem maior proximidade a nível geográfico, a ligação genética foi maior entre as procedências de Cascavel e Ivaí.

No dendograma apresentado por Wendt et al. (2007), que analisaram progênies oriundas de três procedências semelhantes às avaliadas neste estudo, os resultados foram diferenciados. H houve maior similaridade genética entre procedências de maior proximidade territorial, como Ivaí/PR e Pinhão/PR, enquanto Cascavel/PR encontrou-se mais distante geneticamente dessas.

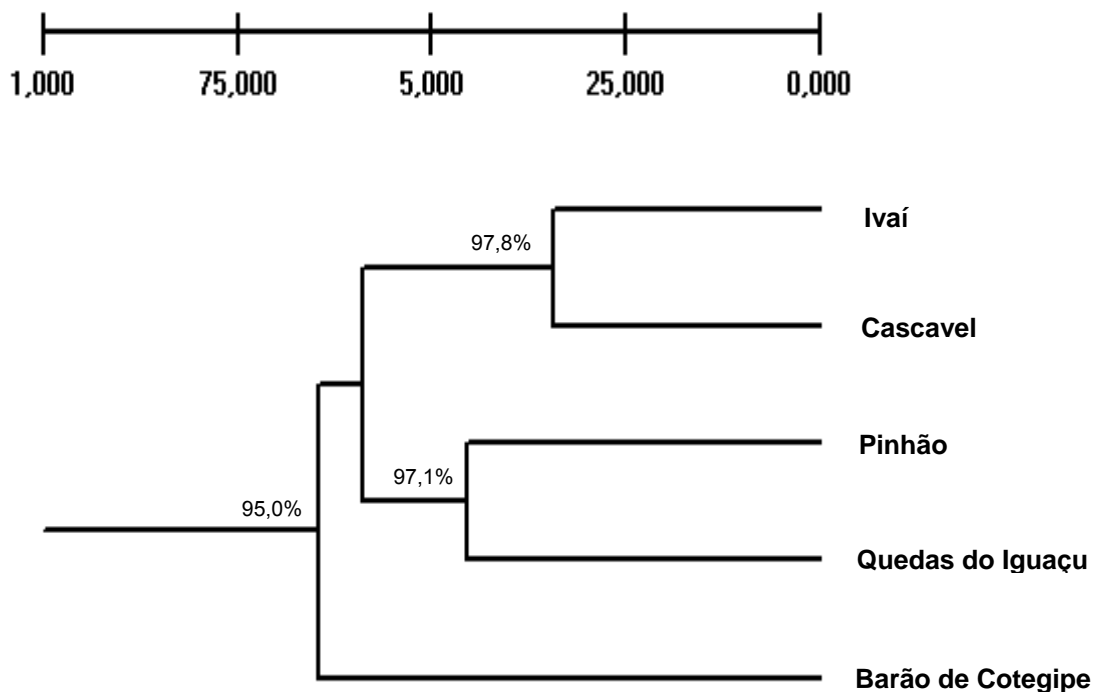


Figura 13 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA com base nas distâncias genéticas de Nei (1972, 1978), entre as procedências de erva-mate de Ivaí/PR, Cascavel/PR, Pinhão/PR, Quedas do Iguaçu/PR e Barão de Cotegipe/RS. Os valores entre os ramos indicam os valores de *bootstrap* (1000 repetições, CI = 95%).

Ainda que os autores afirmem que a magnitude da distância genética determinada entre as procedências tenha sido pequena e que a avaliação *bootstrap* tenha apresentado baixa consistência no agrupamento das procedências de Ivaí/PR e Pinhão/PR (28,3%), alguns fatores podem explicar a diferença entre o estudo de Wendt et al. (2007) e o presente trabalho. Isto é, além

do curso da história da erva-mate, que pode afetar na estrutura genética das populações e na sua variabilidade genética (Hamrick e Godt, 1989), as diferentes progênies e acessos selecionados nos respectivos estudos podem ter influenciado nesta variação, uma vez que o padrão de distribuição da diversidade genética tem demonstrado uma maior variabilidade dentro, mais especificamente entre progênies, do que entre procedências e esta circunstância pode ter um efeito de grande importância nos programas de melhoramento.

Todavia, os dados mostraram que houve razoável diferença entre as procedências, até mesmo entre aquelas presentes em regiões de ocorrência restrita, evidenciando que a capitalização de recursos genéticos pode ser viável por meio da análise de um número maior de procedências e, ainda, de localidades variadas de distribuição da espécie.

b) Avaliação da divergência genética entre progênies

No Quadro 9 estão apresentadas 15 das combinações mais similares e 15 das combinações mais divergentes, com suas respectivas estimativas de dissimilaridade (d_{ij}). A matriz completa de dissimilaridade genética entre os 76 acessos pode ser visualizada no Quadro 1A do Apêndice.

A variação nas estimativas de dissimilaridade entre todos os acessos de erva-mate avaliados foi elevada. Os valores dos coeficientes de similaridade de Jaccard estiveram entre 0,282 e 0,913 e, conseqüentemente, seu complemento demonstrou valores de 0,087 até 0,718, indicando a presença de uma ampla variabilidade genética entre determinados acessos e progênies estudadas.

A maior similaridade genética foi obtida entre os acessos 47 e 48 ($s_{ij} = 0,913$), cuja dissimilaridade foi de apenas 8,7%, o que permite afirmar que entre estes acessos existe uma grande proximidade genética, principalmente porque se tratam de representantes de uma mesma progênie (C 4) e procedência (Ivaí/PR). Os acessos 71 (S 69/2) e 72 (S 69/4), que pertencem à progênie localizada em Barão de Cotegipe/RS, também mostraram elevada similaridade ($s_{ij} = 0,905$).

Além destes, os acessos 29 (AB 91/1) e 30 (AB 91/6) oriundos de Quedas do Iguaçu/PR tiveram similaridade de 86,1%; os acessos 49 (C 4/2) e 50 (C 4/5) demonstraram semelhança de 86,0%; os acessos 42 (F 8/4) e 43 (F 8/5) de Ivaí/PR apresentaram 85,7% de similaridade; os acessos 79 (K 51/2) e 80 (K 51/3) localizados em Barão de Cotegipe/RS assemelharam-se em 84,4%; os

acessos 59 (AR 152/2) e 60 (AR 152/5) provenientes de Cascavel/PR tiveram valor de 83,6% de similaridade; os acessos 74 (S 69/2) e 75 (S 69/3) foram similares em 82,5% e os acessos 69 (Q 65/1) e 70 (Q 65/2) de Barão de Cotegipe/RS se assemelharam em 82,4%.

Quadro 9 - Resumo da matriz de coeficientes de similaridade de Jaccard (s_{ij}) e de seus complementos (d_{ij}), obtidos com 242 bandas mediante a utilização do marcador molecular RAPD em 76 acessos de erva-mate coletados na fazenda Vila Nova, Ervateira Bitumirim, no município de Ivaí/PR

Combinções entre os acessos mais similares		s_{ij}	d_{ij}	Combinções entre os acessos mais divergentes		s_{ij}	d_{ij}
47 (C4/4)	48 (C4/6)	0,913	0,087	4 (AM110/1)	68 (Q65/6)	0,282	0,718
71 (S69/2)	72 (S69/4)	0,905	0,095	11 (NA121/1)	53 (BA25/5)	0,289	0,711
43 (F8/5)	46 (C4/3)	0,865	0,135	1 (AM110/3)	55 (BA25/4)	0,296	0,704
29 (AB91/1)	30 (AB91/6)	0,861	0,139	11 (NA121/1)	55 (BA25/4)	0,296	0,704
49 (C4/2)	50 (C4/5)	0,860	0,140	11 (NA121/1)	45 (F8/2)	0,298	0,702
42 (F8/4)	43 (F8/5)	0,857	0,143	11 (NA121/1)	72 (S69/4)	0,300	0,700
39 (G10/2)	50 (C4/5)	0,854	0,146	55 (BA25/4)	78 (K51/3)	0,300	0,700
79 (K51/2)	80 (K51/3)	0,844	0,156	53 (BA25/5)	68 (Q65/6)	0,300	0,700
24 (W84/1)	75 (S69/3)	0,841	0,159	3 (AM110/6)	55 (BA25/4)	0,306	0,694
42 (F8/4)	46 (C4/3)	0,837	0,163	1 (AM110/3)	25 (W84/2)	0,306	0,694
70 (Q65/2)	79 (K51/2)	0,837	0,163	11 (NA121/1)	71 (S69/2)	0,308	0,692
45 (F8/2)	49 (C4/2)	0,837	0,163	5 (AM110/4)	68 (Q65/6)	0,310	0,690
59 (AR152/2)	60 (AR152/5)	0,836	0,164	11 (NA121/1)	76 (K51/1)	0,317	0,683
74 (S69/2)	75 (S69/3)	0,825	0,175	11 (NA121/1)	67 (Q65/4)	0,318	0,682
69 (Q65/1)	70 (Q65/2)	0,824	0,176	11 (NA121/1)	35 (E7/4)	0,320	0,680

Deve-se ressaltar que dentre estas combinações, houve ainda elevada similaridade entre acessos oriundos de procedências diferentes, como no caso dos acessos 24 (W 84/1) de Quedas do Iguaçu/PR e 75 (S 69/3) de Barão de Cotegipe/RS, com 84,1% de similaridade, bem como de progênies diferentes, mas de mesma localidade. Como exemplares, podem-se citados os acessos 43 (progênie F 8/5) e 46 (C 4/3) de Ivaí/PR ($s_{ij} = 0,865$); os acessos 39 (G 10/2) e 50 (C 4/5) de Ivaí/PR ($s_{ij} = 0,854$); e os acessos 42 (F 8/4) e 46 (C 4/3) de Ivaí/PR,

70 (Q 65/2) e 79 (K 51/2) de Barão de Cotegipe/RS e 45 (F 8/2) e 49 (C 4/2) de Ivaí/PR que apresentaram 83,7% de semelhança genética.

Quanto às progênes, pode-se afirmar que a C 4, F 8, S 69 e K 51 evidenciaram as maiores similaridades médias em relação às demais, visto que estiveram presentes várias vezes nas combinações entre os acessos menos divergentes. Constatou-se também que mesmo que a análise de variância molecular (AMOVA) tenha revelado uma elevada variação entre as progênes dentro das procedências, pôde-se verificar que a dissimilaridade genética entre as mesmas foi bastante restrita, tendo ocorrido uma tendência ao agrupamento de progênes pertencentes à mesma localidade.

Um possível esclarecimento sobre este fato vem em concordância com o trabalho de Cansian (2003) que, ao determinar a variabilidade intra e interpopulacional em três populações nativas de erva-mate, geograficamente próximas da microrregião de Erechim/RS, constatou elevada similaridade entre o material, pressupondo a ocorrência de intercruzamentos entre as plantas da população. Não se conhecem os critérios adotados na seleção do germoplasma instalado no município de Ivaí/PR e isto pode ter interferido na estrutura genética de cada população, acarretando em resultados de proximidade genética até mesmo entre acessos provenientes de localidades distantes geograficamente.

É interessante salientar que a escolha das progênes baseou-se na divergência em termos de constituição química, o que não foi observado em nível genético. Para os programas de melhoramento da espécie, os resultados em relação às combinações similares não são viáveis, pois colocam a espécie em potencial risco de erosão genética. Sendo assim, para a conservação da base genética da erva-mate, deve-se manter o máximo possível de fragmento de mata, onde há presença de material nativo para a manutenção da variabilidade *in situ* ou formação de um banco de germoplasma *ex situ* a partir da coleta de um grande número de populações que tenham elevada divergência genética (Cansian, 2003).

Neste último caso, pode-se optar preferencialmente pelos acessos 11 (NA 121/1 de Pinhão/PR) e 55 (BA 25/4 de Ivaí/PR), os quais formaram o maior número de combinações dissimilares. Pôde-se notar que nestas combinações, houve a presença de acessos específicos, enquanto, nas combinações mais similares, apenas certas progênes apareceram com maior frequência.

Por exemplo, o acesso 11 combinou-se com os acessos 53 (BA 25/5), 55 (BA 25/4), 45 (F 8/2 - Ivaí/PR), 72 (S 69/4 - Barão de Cotegipe/RS), 71 (S 69/2), 76 (K 51/1 - Barão de Cotegipe/RS), 67 (Q 65/4 - Barão de Cotegipe/RS) e 35 (E 7/4 - Ivaí/PR), com dissimilaridade genética de 71,1%, 70,4%, 70,2%, 70,0%, 69,2%, 68,3%, 68,2% e 68,0%, respectivamente.

O acesso 55, por sua vez, formou pares altamente divergentes com o acesso 1 (AM 110/3 - Pinhão/PR), com valor de 70,4%; com o acesso 78 (K 51/3), demonstrando 70,0% de dissimilaridade e com o acesso 3 (AM 110/6), de percentual igual a 69,4. Todavia, dentre todas as combinações, o par de maior divergência genética foi formado entre os acessos 4 (AM 110/1) e 68 (Q 65/6), com d_{ij} = 0,718.

De acordo com Morales (1995), independente do objetivo de uma coleção, é necessário que haja sempre o máximo de variabilidade original em um pequeno número de plantas. Isso significa que se deve formar um banco de germoplasma que represente 70 a 80% da variabilidade de um reservatório genético da população em aproximadamente 10 a 15% do total das plantas ou acessos.

Neste sentido, sabendo que o conhecimento da distribuição da diversidade genética dos materiais a serem empregados no melhoramento genético é extremamente importante para delinear estratégias que sejam úteis para maximizar o ganho genético de uma determinada característica (Resende et al., 2000; Wendt, 2005), a opção por acessos altamente dissimilares, como foi supracitado, favorece a obtenção de clones e sementes geneticamente superiores, que evitam o estreitamento da base genética desta espécie.

O método hierárquico UPGMA foi aplicado com a finalidade de se obter um grau de confiabilidade mais elevado no agrupamento dos acessos pela dissimilaridade genética. Com base na matriz de distâncias ponderadas pelo complemento de Jaccard tornou-se possível a obtenção do dendrograma (Figura 14).

Ao traçar uma linha limítrofe de demarcação de grupos sobre a marca de 60% no dendrograma, pôde-se verificar um elevado grau de ramificação, que originaram 17 grupos distintos. Destes, os mais numerosos foram o VII (25,0%), I (19,7%), VI (15,8%) e V (12,0%).

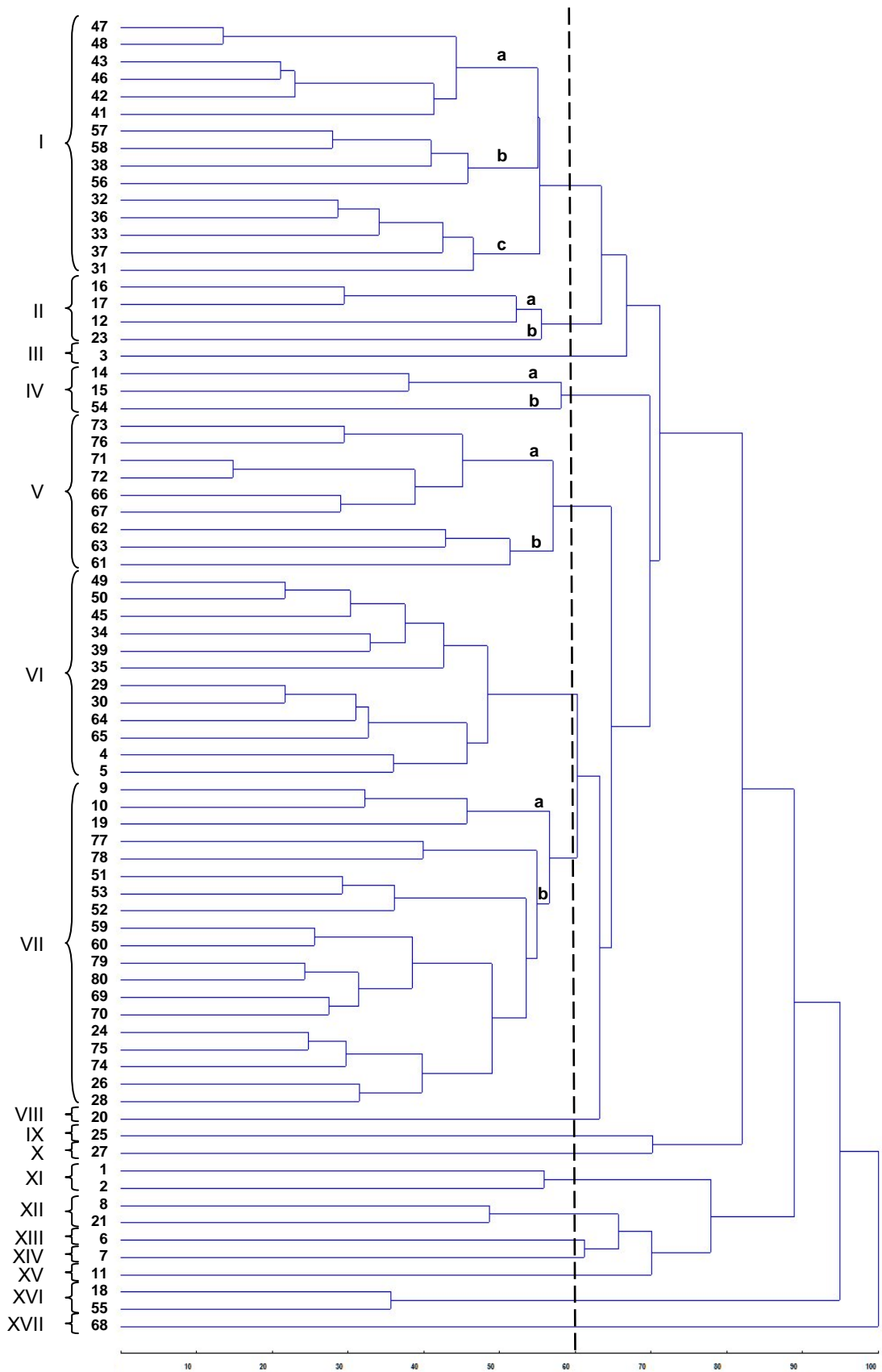


Figura 14 - Dendrograma ilustrativo do padrão de dissimilaridade estabelecido pelo método hierárquico UPGMA, baseado no complemento de similaridade de Jaccard, em 76 acessos de erva-mate.

Analisando minuciosamente cada um dos grupos formados (Quadro 10), nota-se que, com exceção dos subgrupos Ib, VIb e VIIb e dos grupos XII e XVI, houve uma tendência à junção de materiais vindos de um mesmo local, embora também tenha ocorrido o agrupamento de acessos oriundos de uma mesma localidade, mas descendentes de progênes diferentes.

Além disso, a similaridade observada em termos de procedência foi mantida entre os acessos, isto é, houve maior proximidade entre materiais de Ivaí/PR e Cascavel/PR e de Pinhão/PR e Quedas do Iguaçu/PR. Da mesma maneira, os acessos que se combinaram para formar pares altamente dissimilares apareceram, de certa forma, distantes um dos outros.

O grupo I, então, foi composto pelos subgrupos Ia (acessos 41, 42, 43, 46, 47 e 48), referentes às progênes F 8 e C 4 de Ivaí/PR; Ib (acessos 38, 56, 57 e 58), sendo o primeiro representante de Ivaí/PR e o restante de Cascavel/PR; e Ic (acessos 31, 32, 33, 36 e 37) composto exclusivamente por progênes de Ivaí/PR (E 7 e G 10).

Os grupos II, IV, V, VI e VII formaram dois subgrupos cada um. Sendo que o grupo II dividiu-se em um ramo contendo os acessos 12 (NA 121), 16 (AK 106) e 17 (AK 106), que são provenientes de Pinhão/PR, enquanto o outro ramo teve a presença apenas de acessos da progênie W 84, de Quedas do Iguaçu/PR. O grupo IV contou com a participação de dois acessos da progênie NA 121, de Pinhão/PR (subgrupo IVa), e de um acesso da progênie BA 25, de Ivaí/PR (subgrupo IVb). Quanto ao grupo V, os subgrupos foram constituídos restritamente pelos acessos descendentes das progênes Q 65, S 69 e K 51 de Barão de Cotegipe/RS, no primeiro ramo, e pelos acessos da progênie AQ 151 de Cascavel/PR, no segundo ramo.

Em continuidade, o grupo VI alocou acessos de Ivaí/PR (progênes E 7, G 10, F 8 e C 4), no subgrupo VIa e, no subgrupo VIb, contou com acessos de três localidades do Paraná, sendo eles acessos da progênie AM 110 de Pinhão/PR, AB 91 de Quedas do Iguaçu/PR e AQ 151 de Cascavel/PR. Por fim, o grupo VII subdividiu-se em VIIa, representado por acessos das progênes AG 101 e AK 106 de Pinhão/PR, e VIIb, formado por acessos das demais procedências. Ou seja, por acessos originados das progênes W 84 e AB 91 (Quedas do Iguaçu/PR), BA 25 (Ivaí/PR), AR 152 (Cascavel/PR) e Q 65, S 69 e K 51 (Barão de Cotegipe/RS).

Quadro 10 - Representação do agrupamento obtido pelo método hierárquico UPGMA a partir da amplificação de 242 bandas geradas com a utilização de marcadores RAPD em 76 acessos de erva-mate coletados na fazenda Vila Nova, Ervateira Bitumirim, no município de Ivaí/PR

Grupo	Subgrupo	Acessos	Procedência	(%)
I	la	41 (F 8/1), 42 (F 8/4), 43 (F 8/5), 46 (C 4/3), 47 (C 4/4), 48 (C 4/6)	Ivaí	
	lb	38 (G 10/5), 56 (AR 152/1), 57 (AR 152/4), 58 (AR 152/6)	Ivaí e Cascavel	19,7
	lc	31 (E 7/1), 32 (E 7/4), 33 (E 7/6), 36 (G 10/2), 37 (G 10/4)	Ivaí	
II	IIa	12 (NA 121/3), 16 (AK 106/1), 17 (AK 106/2)	Pinhão	
	IIb	23 (W 84/6)	Quedas do Iguaçu	5,3
III		3 (AM 110/6)	Pinhão	1,3
IV	IVa	14 (NA 121/4), 15 (NA 121/5)	Pinhão	
	IVb	54 (BA 25/3)	Ivaí	4,0
V	Va	66 (Q 65/2), 67 (Q 65/4), 71 (S 69/2), 72 (S 69/4), 73 (S 69/5), 76 (K 51/1),	Barão de Cotegipe	12,0
	Vb	61 (AQ 151/2), 62 (AQ 151/3), 63 (AQ 151/4)	Cascavel	
VI	VIa	34 (E 7/1), 35 (E 7/4), 39 (G 10/2), 45 (F 8/2), 49 (C 4/2), 50 (C 4/5)	Ivaí	
	VIb	4 (AM 110/1), 5 (AM 110/4), 29 (AB 91/1), 30 (AB 91/6), 64 (AQ 151/1), 65 (AQ 151/4)	Pinhão, Quedas do Iguaçu, Cascavel	15,8
VII	VIIa	9 (AG 101/2), 10 (AG 101/3), 19 (AK 106/1)	Pinhão	25,0
	VIIb	24 (W 84/1), 26 (AB 91/1), 28 (AB 91/4), 51 (BA 25/1), 52 (BA 25/4), 53 (BA 25/5), 59 (AR 152/2), 60 (AR 152/5), 69 (Q 65/1), 70 (Q 65/2), 74 (S 69/2), 75 (S 69/3), 77 (K 51/2), 78 (K 51/3), 79 (K 51/2), 80 (K 51/3)	Quedas do Iguaçu, Ivaí, Cascavel, Barão de Cotegipe	
VIII		20 (AK 106/4)	Pinhão	1,3
IX		25 (W 84/2)	Quedas do Iguaçu	1,3
X		27 (AB 91/3)	Quedas do Iguaçu	1,3

Quadro 10, Cont.

XI	1 (AM 110/4), 2 (AM 110/4)	Pinhão	2,6
XII	8 (AG 101/6), 21 (W 84/2)	Pinhão, Quedas do Iguaçu	2,6
XIII	6 (AG 101/2)	Pinhão	1,3
XIV	7 (AG 101/5)	Pinhão	1,3
XV	11 (NA 121/1)	Pinhão	1,3
XVI	18 (AK 106/3), 55 (BA 25/4)	Pinhão, Ivaí	2,6
XVII	68 (Q 65/6)	Barão de Cotegipe	1,3

Os grupos XI, XII e XVI foram compostos por dois representantes. Dois acessos de Pinhão/PR (AM 110) representaram o primeiro grupo; um acesso de Pinhão/PR (AG 101) e um acesso de Quedas do Iguaçu/PR (W 84) constituíram o segundo grupo, enquanto o terceiro grupo foi formado por um acesso de Pinhão/PR (AK 106) e um acesso de Ivaí/PR (BA 25), o qual teve participação em um grande número de combinações dissimilares.

De maneira semelhante, o acesso 11 (NA 121/1) de Pinhão/PR apresentou elevada capacidade de formar pares divergentes e, no dendograma, foi o único representante do grupo XV. Outros grupos que tiveram apenas um acesso alocado foram o III, VIII, IX, X, XIII, XIV e XVII.

O trabalho realizado por Gauer e Cavalli-Molina (2000), investigando os níveis de diversidade entre e dentro de populações de erva-mate distribuídas em quatro Estados brasileiros por meio de marcadores RAPD, além de demonstrar que as populações mais similares foram do Paraná e Santa Catarina, e que a do Mato Grosso do Sul foi a mais distante geneticamente, visualizaram que muitos grupos incluíram árvores de diferentes populações, indicando que algumas plantas podem ser mais similares a plantas de outros locais do que de sua própria procedência. Este fato também foi observado em alguns grupos apresentados no dendograma do presente trabalho, principalmente nos mais numerosos, como é o caso dos grupos VI e VII.

Segundo Ramalho et al. (1990), uma população pode ser definida como um conjunto de indivíduos de uma mesma espécie, ocupantes do mesmo local,

que possuem uma continuidade no tempo e apresentam a capacidade de se intercasalar ao acaso. As variedades de plantas alógamas, como é o caso da erva-mate, devido à sua forma de polinização se enquadram perfeitamente nessa definição.

Sem contar que diferentemente do que é encontrado para culturas autógamias, onde todas as plantas possuem a mesma constituição genética e estão em homocigose, a variabilidade existente entre as plantas de uma espécie alógama, como foi observado no presente estudo, pode ser explicada pela razão de que cada planta tem uma constituição genética distinta e, para a formação da geração seguinte, é necessário coletar sementes de muitas plantas para que se possa representar todo o conjunto gênico existente naquela determinada população (Araújo e Paterniani, 1999).

Apesar dos marcadores RAPD não estimarem com grande precisão certos parâmetros genéticos, em função de seu caráter dominante, eles se mostraram eficientes na caracterização das procedências, progênies e dos acessos analisados. Por ser uma técnica de simplicidade, rapidez e baixo custo tem sido utilizada na determinação da variabilidade molecular existente na espécie.

Desta forma, pode-se dizer que o conhecimento proporcionado por estes marcadores em relação à quantidade e distribuição da variabilidade genética existente em um material conhecido da espécie, pode contribuir com os programas de melhoramento e conservação dos recursos genéticos desta cultura, no que diz respeito ao delineamento de estratégias que busquem maximizar o ganho genético das características de interesse.

4.2. Análise da composição fitoquímica

Por meio do emprego da cromatografia líquida, foi possível avaliar o perfil cromatográfico dos extratos metanólicos originários das folhas de erva-mate. Na Figura 15 (a) pode-se visualizar os cromatogramas obtidos para teobromina e cafeína e, (b) do ácido clorogênico com o uso de padrões externos, nas absorvâncias de 265 nm e 325 nm, respectivamente.

Os tempos de retenção (TR) dos padrões, em minutos, foram de 7,9 para teobromina, 18,1 para cafeína e de 11,4 para ácido clorogênico. Estes valores

estão próximos daqueles encontrados por Filip et al. (2001), Cardozo Junior et al. (2007) e Nakamura et al. (2009).

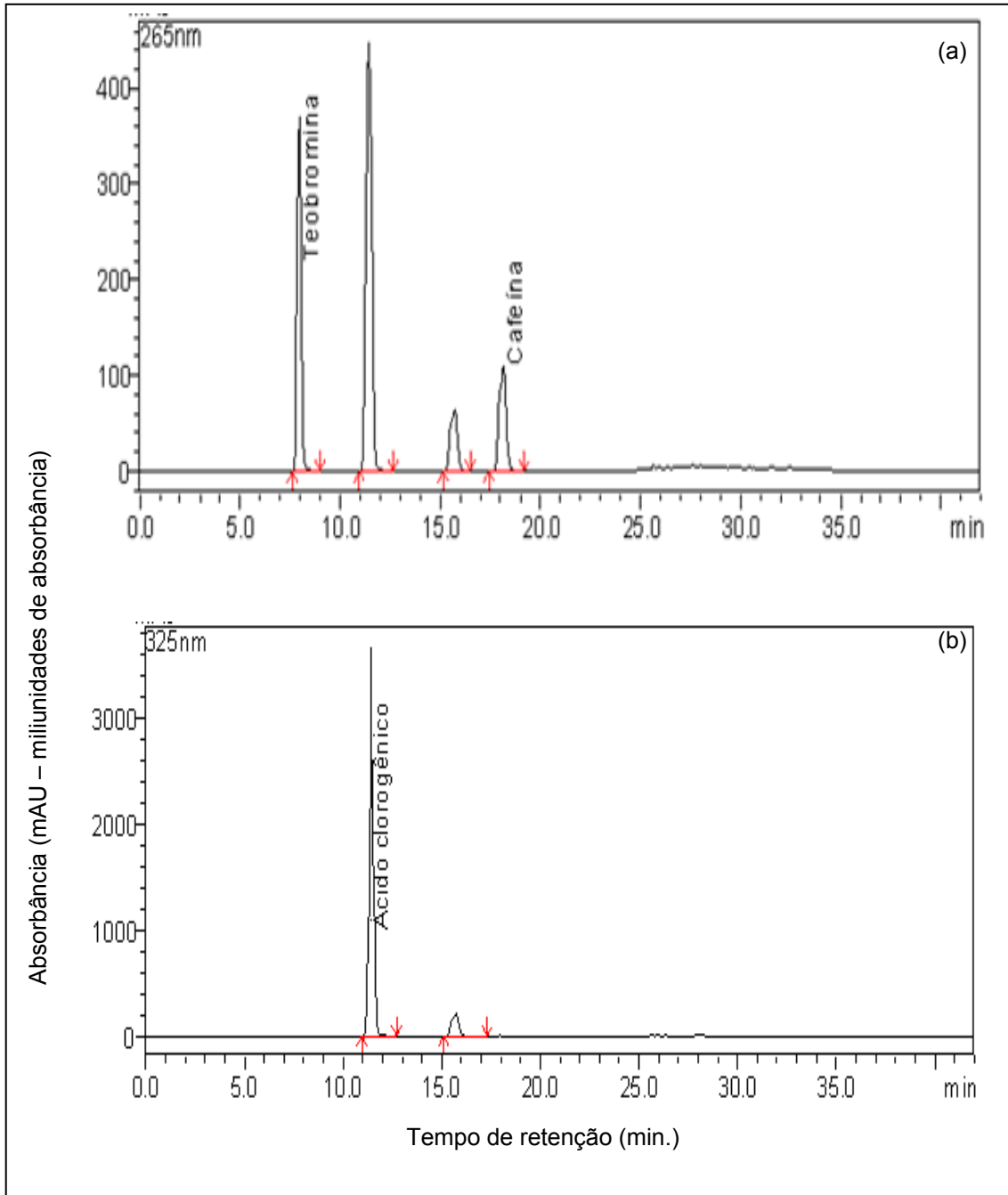
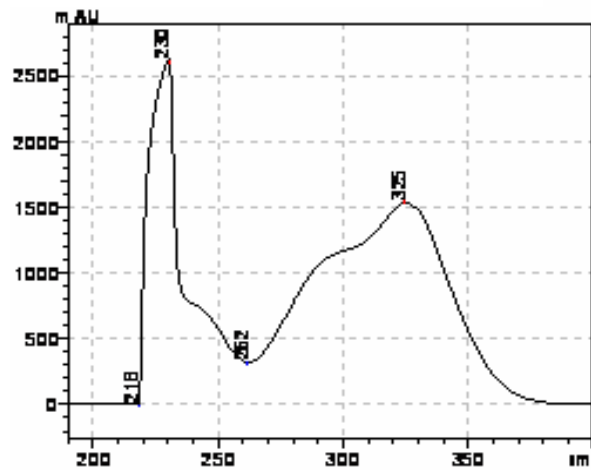


Figura 15 - (a) Perfil cromatográfico dos padrões de teobromina e cafeína obtido por CLAE e detecção em absorvância de 265 nm; (b) Perfil cromatográfico do padrão de ácido clorogênico obtido por CLAE e detecção em absorvância de 325 nm. Condições cromatográficas: Coluna C-18 (Supelco LC-18 - 4,6 x 250 mm, 5 µm); fase móvel composta por gradiente MeOH:H₂O (acidificada com AcOH), fluxo de 1,0 mL/min. e temperatura de 30°C.

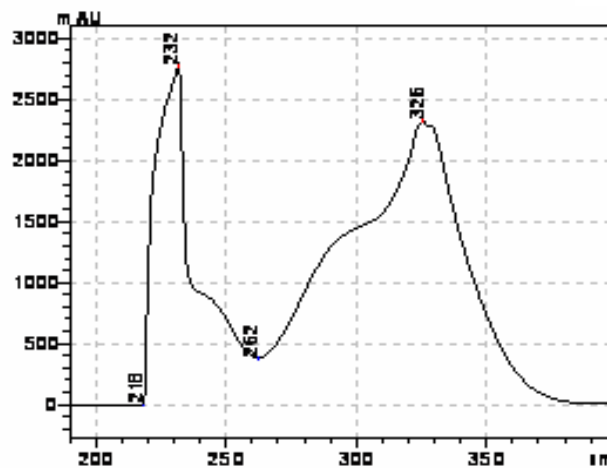
Na fração fenólica da erva-mate existe o predomínio de isômeros dos ácidos mono e dicafeoilquínico. Um dos trabalhos relatando a presença destes compostos foi descrito por Clifford e Ramirez-Martinez (1990). Posteriormente, Filip et al. (2001), Bravo et al. (2007) e Silva et al. (2007) confirmaram essas observações. No estudo de Silva et al. (2007), foi desenvolvido e validado um método de identificação e doseamento de polifenóis em extratos de erva-mate, usando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. Os isômeros do ácido clorogênico, conhecidos como ácido neoclorogênico (ácido 3-O-cafeoilquínico) e ácido criptoclorogênico (ácido 4-O-cafeoilquínico) e também os ácidos 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico, foram determinados por meio dos tempos de retenção e dos espectros ultravioleta.

Os autores também testaram quatro métodos extrativos e observaram que os derivados mono e dicafeoilquínicos são extraídos com maior facilidade por solventes polares. Isto pôde ser notado porque a turbólise empregando água como solvente foi menos eficiente na extração destes compostos quando comparada com a infusão e decocção que, por sua vez, foram menos eficazes que a turbólise com etanol 40%. Além disso, a quantificação dos compostos contidos nos extratos evidenciou que o ácido neoclorogênico é o componente majoritário, seguido do ácido clorogênico e, em menor proporção, pelo ácido criptoclorogênico. Os valores variaram de 1,72 a 2,90 mg/mL para o ácido neoclorogênico, de 1,18 a 2,06 mg/mL para o ácido clorogênico e de 0,69 a 1,17 mg/mL para o ácido criptoclorogênico.

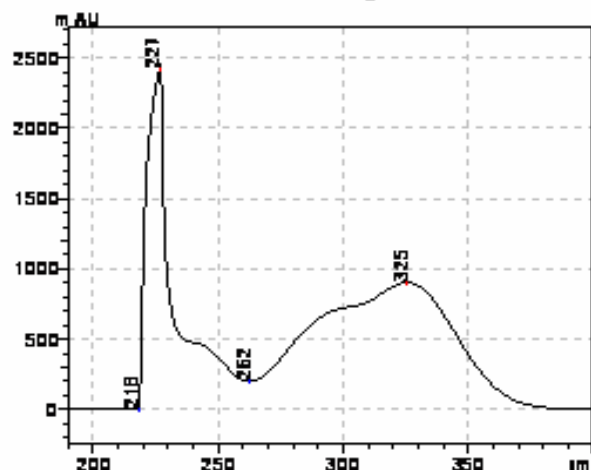
Assim, utilizando estes dados como referência e comparando com a varredura dos espectros de absorção de 200 a 400 nm (Figura 16), os ácidos neoclorogênico e criptoclorogênico foram quantificados empregando o ácido clorogênico como padrão externo. Cabe salientar que estas análises trazem dados inéditos sobre a espécie, principalmente porque se pôde determinar o teor de uma família de compostos fenólicos (derivados cafeoilquínicos) em um germoplasma pertencente a um dos programas de melhoramento da erva-mate, os quais permitem que esta planta seja utilizada como colerética, antioxidante e hipocolesterolêmica (Clifford e Ramirez-Martinez, 1990; Filip et al., 2001; De Maria e Moreira, 2004).



ácido neoclorogênico



ácido clorogênico



ácido criptoclorogênico

Figura 16 - Varredura dos espectros de absorção de 200 a 400 nm para o ácido neoclorogênico, ácido clorogênico e ácido criptoclorogênico, observados para os 80 acessos de erva-mate avaliados. Condições cromatográficas: Coluna C-18 (Supelco LC-18 - 4,6 x 250 mm, 5 µm); fase móvel composta por gradiente MeOH:H₂O (acidificada com AcOH), fluxo de 1,0 mL/min. e temperatura de 30°C.

Os picos cromatográficos dos ácidos neoclorogênico e criptoclorogênico, identificados por P1 e P3, respectivamente, encontram-se expostos na Figura 17. Os TR obtidos foram de 6,7 minutos para P1 e 12,8 minutos para P3.

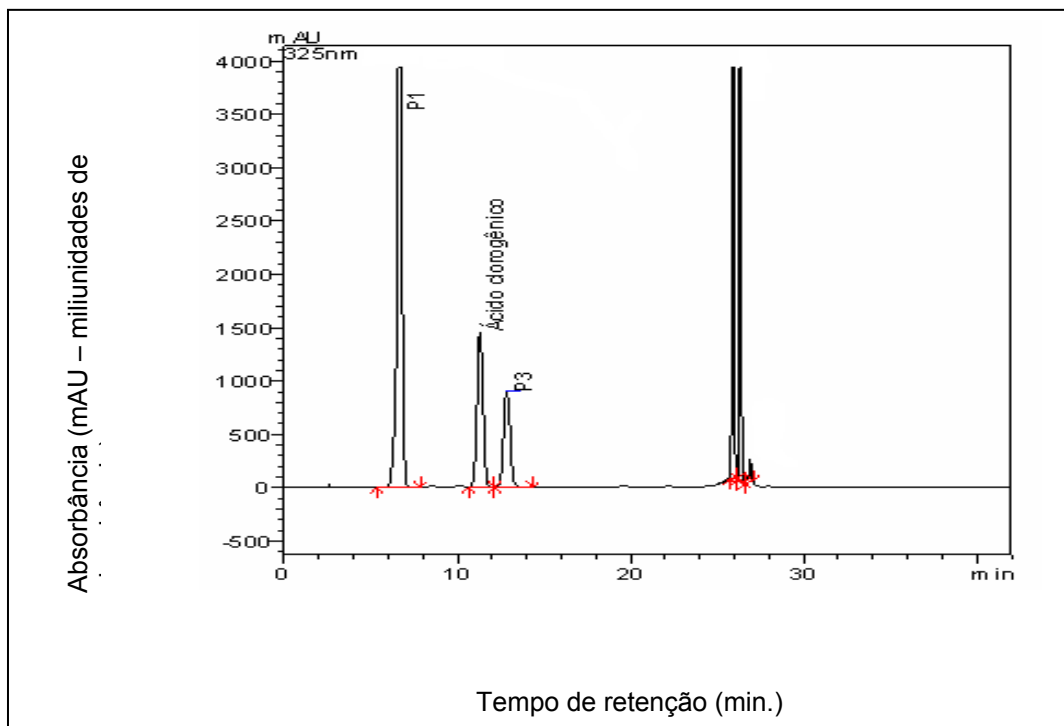


Figura 17 - Cromatograma correspondente à progênie AM 110, oriunda de Pinhão/PR. Picos: P1 (ácido neoclorogênico), ácido clorogênico e P3 (ácido criptoclorogênico) detectados a 325 nm. Condições cromatográficas: Coluna C-18 (Supelco LC-18 - 4,6 x 250 mm, 5 μ m); fase móvel composta por gradiente MeOH:H₂O (acidificada com AcOH), fluxo de 1,0 mL/min. e temperatura de 30°C.

Neste estudo foram notadas variações estatísticas entre as progênes nas localidades de Ivaí/PR, Pinhão/PR e Barão de Cotegipe/RS para o teor de cafeína, teobromina e ácido criptoclorogênico, respectivamente, no nível de significância de 5%. Além disso, ocorreu variância para 1% de probabilidade, entre as progênes de Quedas do Iguaçu/PR em relação ao conteúdo de ácido neoclorogênico. Contudo, não ocorreu diferença entre as progênes em termos de concentração de ácido clorogênico, cujos resultados mostraram analogia ao trabalho de Nakamura et al. (2009).

No Quadro 11, podem-se observar os quadrados médios para efeito de progênes dentro de procedências, gerado a partir da análise de variância do delineamento em blocos com informação de parcela para as cinco características

analisadas (cafeína, teobromina, ácido neoclorogênico, ácido clorogênico e ácido criptoclorogênico).

Quadro 11 - Resumo da análise de variância para as cinco características avaliadas nos 80 acessos de erva-mate oriundos das procedências de Pinhão/PR, Quedas do Iguaçu/PR, Ivaí/PR, Cascavel/PR e Barão de Cotegipe/RS

F.V. ^{1/}	GL	Quadrados Médios				
		Cafeína	Teobromina	Ácido Neoclorogênico	Ácido Clorogênico	Ácido Criptoclorogênico
Prog./Proc.1	3	0,2457 ^{ns}	0,2459 ^{**,*}	0,5572 ^{ns}	0,1102 ^{ns}	0,0270 ^{ns}
Prog./Proc.2	1	0,0089 ^{ns}	0,0127 ^{ns}	4,6272 [*]	0,0107 ^{ns}	0,0884 ^{ns}
Prog./Proc.3	4	0,8856 ^{**,*}	0,1172 ^{ns}	2,3240 ^{ns}	0,3238 ^{ns}	0,1294 ^{ns}
Prog./Proc.4	1	0,4859 ^{ns}	0,0031 ^{ns}	0,0131 ^{ns}	0,2622 ^{ns}	0,0940 ^{ns}
Prog./Proc.5	2	0,0039 ^{ns}	0,0108 ^{ns}	2,3005 ^{ns}	0,5983 ^{ns}	0,7933 ^{**,*}
Média		0,7086	0,3050	4,2922	2,0793	1,8204
CVg (%)		71,3262	62,2880	12,1600	15,3424	10,1511

^{1/}Prog./Proc.1 = progênies dentro da procedência de Pinhão/PR; Prog./Proc.2 = progênies dentro da procedência de Quedas do Iguaçu/PR; Prog./Proc.3 = progênies dentro da procedência de Ivaí/PR; Prog./Proc.4 = progênies dentro da procedência de Cascavel/PR; Prog./Proc.5 = progênies dentro da procedência de Barão de Cotegipe/RS.

**significativo no nível de significância de 1% pelo teste F; *significativo no nível de significância de 5% pelo teste F; ^{ns} não significativo.

Quanto ao coeficiente de variação genética (CVg), pôde-se verificar valores elevados para cafeína e teobromina, enquanto esta variância foi de baixa magnitude para ácido clorogênico e seus isômeros, estando de acordo com o observado por Cardozo Junior (2006) e Nakamura et al. (2009). Segundo os autores, a explicação para estes valores elevados está relacionada à alta herdabilidade das metilxantinas, onde a variação genética representa a maior parte da variação fenotípica em relação à variação ambiental, diferente dos compostos fenólicos, em que grande parte da variabilidade existente para o teor destes compostos se deve à variabilidade ambiental.

De modo similar, valores elevados de herdabilidade para os teores de cafeína foram encontrados por Scherer et al. (2002), quando avaliaram progênies de erva-mate na região de Misiones, na Argentina.

No Quadro 12, estão expostos os conteúdos de cafeína e teobromina determinados nas dezesseis progênes de erva-mate. Como se pode evidenciar, houve formação de diferentes grupos pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,01$) e Scott-Knott ($\alpha = 0,05$), confirmando a existência de variabilidade significativa para a concentração dos dois compostos químicos nas progênes desta espécie.

Quadro 12 - Teores médios de cafeína e teobromina nas 16 progênes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em Ivaí/PR. Valores expressos em %

Progênie	Cafeína ^{1/}			Teobromina ^{1/}		
	Média	Letras	Letras	Média	Letras	Letras
AM 110	0,4858	abcd	c	0,3046	ab	c
AG 101	0,0155	d	c	0,5343	ab	b
NA 121	0,2221	bcd	c	0,8499	a	a
AK 106	0,4789	abcd	c	0,4920	ab	b
W 84	1,3210	ab	a	0,1027	b	c
AB 91	1,3821	a	a	0,1755	b	c
E 7	0,7226	abcd	b	0,3088	ab	c
G 10	0,1172	cd	c	0,5985	ab	b
F 8	0,0153	d	c	0,3766	ab	c
C 4	0,9153	abcd	b	0,1812	b	c
BA 25	0,0129	d	c	0,2790	ab	c
AR 152	0,8955	abcd	b	0,1833	b	c
AQ 151	1,3455	a	a	0,1473	b	c
Q 65	1,2318	abc	a	0,1969	b	c
S 69	1,2098	ab	a	0,1021	b	c
K 51	1,1755	abc	a	0,1497	b	c

^{1/}Médias seguidas por mesma letra na primeira coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,01$). Médias seguidas por mesma letra na segunda coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 0,05$).

O menor teor de cafeína foi encontrado na progênie BA 25 (0,0129%) e o maior teor (1,3821%), na progênie AB 91. Enquanto isso, para a teobromina, os valores mínimos e máximos foram obtidos para as progênes S 69 e NA 121, com 0,1021% e 0,8499%, respectivamente.

Trabalhos anteriores voltados à composição química da espécie, como o de Clifford e Ramirez-Martinez (1990), determinaram teores de 0,89 a 1,73% para cafeína e de 0,26 a 0,88% para teobromina. Da mesma forma, Bruneton (1999) observou valores com a magnitude de 0,9-1,7% para cafeína e 0,45-0,9% para teobromina quando avaliou o conteúdo foliar da mesma planta. Resultados

semelhantes foram encontrados para teobromina, mas as concentrações de cafeína obtidas pelos autores se mostraram superiores às do presente trabalho.

Os teores médios de metilxantinas determinados nas dezesseis progênes condizem com aqueles descritos por Cardozo Junior (2006), que também analisou amostras coletadas em Ivaí/PR no teste combinado de progênes e procedências de meio-irmãos. O autor encontrou conteúdos de cafeína e teobromina variando entre 0,248-1,663% e 0,106-0,807%, respectivamente.

Além deste, pode-se citar o trabalho de Nakamura et al. (2009), que se mostrou análogo em relação aos valores mínimos e máximos obtidos para cafeína e teobromina. Neste caso, as concentrações oscilaram entre 0,23% (F 8) e 1,38% (Q 65) para cafeína e entre 0,176% (Q 65) e 0,83% (NA 121) para teobromina.

Porém, embora as progênes selecionadas por Nakamura et al. (2009) sejam semelhantes às aquelas avaliadas no presente trabalho, foi possível notar diferença no teor de cafeína e teobromina quando as progênes foram analisadas individualmente. A progênie C 4 teve teor determinado de 0,440% para cafeína e 0,361% para teobromina, enquanto neste estudo as concentrações foram de 0,9153% para o primeiro composto e 0,1812% para o segundo. O mesmo foi observado nas progênes F 8, G 10 e BA 25, onde os autores obtiveram concentrações de 0,230%, 0,607% e 0,226% para cafeína e 0,515%, 0,468% e 0,504% para teobromina, respectivamente. Na presente análise, as concentrações destes compostos, na mesma seqüência, foram de 0,0153 e 0,3766% para a progênie F8, 0,1172% e 0,5985% para a progênie G 10 e 0,0129% e 0,2790% para a progênie BA 25. Isto comprova que a variabilidade genética é maior dentro das populações e, principalmente, em nível de acessos e, ainda, que ganhos consideráveis podem ser conseguidos mediante seleção destes materiais (Sturion et al., 2003).

Dentre as metilxantinas, a cafeína é considerada a maior responsável pela atividade de estimulação do Sistema Nervoso Central (SNC), podendo causar, também, alguns sintomas transitórios, como insônia, excitação, agitação, distúrbios gastrintestinais e aumento da pressão arterial (Sawynok, 1995).

Nos dias atuais, os consumidores dos produtos derivados da erva-mate, em especial os idosos, estão preocupados em fazer o uso de uma quantidade cada vez menor de cafeína, com o intuito de evitar os efeitos estimulantes provocados pelas metilxantinas, além da elevação transitória da pressão arterial.

Neste sentido, do mesmo modo que se tem verificado com o café, a busca por produtos descafeinados ou plantas selecionadas com baixo conteúdo de cafeína, como é o caso das progênies F 8, G 10, BA 25, AG 101 e NA 121, oriundas de Ivaí/PR (nos três primeiros casos) e de Pinhão/PR, para as duas últimas progênies, podem ser obtidas e destinadas a segmentos específicos do mercado (Ashihara e Crozier, 2001).

As progênies provenientes de Quedas do Iguaçu/PR (AB 91 e W 84), Cascavel/PR (AQ 151) e Barão de Cotegipe/RS (Q 65 e S 69), no entanto, demonstraram maior teor para este composto, o que permite a seleção e conseqüente emprego destas plantas no desenvolvimento de produtos com efeito estimulante e tônico.

A concordância em relação às progênies com teores altos e baixos de teobromina também foi relatada por Cardozo Junior (2006) e Nakamura et al. (2009). Nos três trabalhos houve semelhança entre as progênies NA 121, G 10, F 8 e BA 25, ditas com teores elevados do composto, e as progênies Q 65 e W 84 com concentração baixa para teobromina. Entre o estudo de Cardozo Junior (2006) e o presente trabalho obtiveram-se ainda alto e baixo conteúdo para as progênies AK 106 e AG 101 em termos de cafeína e para as progênies AQ 151, K 51 e AB 91 no que se refere à teobromina.

Outro trabalho demonstrando a existência de variabilidade no teor destes compostos foi efetuado por Reginatto et al. (1999) que, ao analisarem a concentração de metilxantinas em folhas de erva-mate e outras espécies de *Ilex*, evidenciaram que a *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* possui maior teor de cafeína (0,65%) e menor teor de teobromina (0,12%) em relação à *Ilex paraguariensis* var. *vestita*, a qual apresenta 0,003% de cafeína e 0,22% de teobromina.

Scherer et al. (2002) visualizaram diferenças no conteúdo de cafeína e teobromina ao analisarem progênies, bem como indivíduos pertencentes a uma mesma progênie de erva-mate, cultivadas na região de Misiones, na Argentina.

A avaliação dos teores de cafeína e teobromina permitem estimar parâmetros genéticos e selecionar indivíduos para serem utilizados no melhoramento genético da espécie, buscando aperfeiçoar as características químicas de interesse e conseqüentemente, desenvolver produtos inéditos

partindo da erva-mate (Sturion et al., 2003; Costa et al., 2005; Cardozo Junior, 2006; Cardozo Junior et al., 2007; Kras et al., 2007).

No Quadro 13, estão sumarizados os teores médios de ácido neoclorogênico, ácido clorogênico e ácido criptoclorogênico de dezesseis progênies de erva-mate cultivadas em Ivaí/PR. A análise de comparação de médias por Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, resultou em dois grupamentos diferentes somente para o ácido clorogênico. Entretanto, os três compostos não diferiram entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 1%.

A ausência de diferença estatística entre os teores destes compostos reforça a idéia de que os fatores ambientais sobrepõem a influência genética. Isto porque os ACGs são produtos do metabolismo dos fenilpropanóides e a presença destes compostos está vinculada às respostas do vegetal frente às condições de estresse provocadas pelo ambiente (Campa et al., 2003).

Como na análise de procedências, a variação em termos estatísticos para os teores de ácido clorogênico proporcionou a alocação das progênies em dois diferentes grupos. Um grupo foi formado pelas progênies com maior concentração deste composto, sendo elas: progênies AM 110, AG 101, NA 121 e AK 106, oriundas de Pinhão/PR; a progênie BA 25 de Ivaí/PR e as progênies Q 65 e K 51 de Barão de Cotegipe/RS, e o segundo grupamento constituiu-se pelas demais progênies (W 84 e AB 91 de Quedas do Iguaçu/PR; E 7, G 10, F 8 e C 4 de Ivaí/PR; AR 152 e AQ 151 de Cascavel/PR e S 69 de Barão de Cotegipe/RS). A concentração do ácido clorogênico variou de 1,5924% (AQ 151) a 2,8046% (NA 121).

Apesar de haver semelhança tanto entre as progênies selecionadas, quanto na metodologia empregada para a extração e quantificação, os teores recuperados neste estudo foram próximos daqueles encontrados por Cardozo Junior (2006), porém, foram superiores aos determinados por Nakamura et al. (2009).

Analisando minuciosamente os dados, notou-se que nos três trabalhos, as progênies que mais se aproximaram em relação aos baixos e elevados conteúdos de ácido clorogênico foram as progênies W 84 e, NA 121 e Q 65, respectivamente, além das progênies S 69 e AQ 151 com baixo teor e AG 101 e K 51 com alto teor, notadas apenas entre este estudo e o de Cardozo Junior (2006).

Quadro 13 - Teores médios de ácido neoclorogênico, ácido clorogênico e ácido criptoclorogênico de 16 progênes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em Ivaí/PR. Valores expressos em %

Progênes	Ácido Neoclorogênico ^{1/}			Ácido Clorogênico ^{1/}			Ácido Criptoclorogênico ^{1/}		
	Média	Letra	Letra	Média	Letra	Letra	Média	Letra	Letra
AM 110	4,7180	a	a	2,4940	a	a	2,0523	a	a
AG 101	4,2580	a	a	2,5094	a	a	1,9912	a	a
NA 121	5,0193	a	a	2,8046	a	a	1,9375	a	a
AK 106	4,3960	a	a	2,5021	a	a	1,8764	a	a
W 84	3,9648	a	a	1,6464	a	b	1,5086	a	a
AB 91	5,3533	a	a	1,7131	a	b	1,7005	a	a
E 7	4,8326	a	a	1,6173	a	b	1,5841	a	a
G 10	4,5611	a	a	1,8184	a	b	1,8073	a	a
F 8	4,3636	a	a	2,0194	a	b	1,7583	a	a
C 4	3,4835	a	a	1,8581	a	b	1,7656	a	a
BA 25	5,3795	a	a	2,3128	a	a	2,0420	a	a
AR 152	3,7852	a	a	1,9229	a	b	1,4685	a	a
AQ 151	3,7114	a	a	1,5924	a	b	1,6664	a	a
Q 65	4,2817	a	a	2,3180	a	a	2,1997	a	a
S 69	2,9743	a	a	1,6951	a	b	1,4260	a	a
K 51	4,0229	a	a	2,2944	a	a	2,0292	a	a

^{1/}Médias seguidas por mesma letra na primeira coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,01$). Médias seguidas por mesma letra na segunda coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 0,05$).

Estes resultados confirmam a possibilidade de ocorrer variações nas concentrações destes compostos em função de variáveis ambientais (Donaduzzi et al., 2003). No entanto, é de extrema importância determinar os parâmetros genéticos destes compostos químicos pelo fato da qualidade dos produtos explorados basearem-se na presença dos mesmos (Montagnon et al., 1998).

Avaliando ainda o Quadro 13, pode-se observar que o maior teor de ácido neoclorogênico e criptoclorogênico foi detectado na progênie proveniente de

Ivaí/PR (BA 25), com 5,3795%, e na progênie oriunda de Barão de Cotegipe/RS (Q 65), com 2,1997%, respectivamente. A progênie S 69, vinda de Barão de Cotegipe/RS, apresentou a capacidade de produzir baixo teor de ambos os compostos, com 2,9743% de ácido neoclorogênico e 1,4260% de ácido criptoclorogênico.

De forma geral, as progênies com maior teor de ácido clorogênico foram aquelas que tiveram teores elevados de ácidos neoclorogênico e criptoclorogênico, sendo o contrário também correto. Assim, a seleção de progênies de erva-mate com alta concentração de compostos antioxidantes possibilita formar clones capazes de resultar em um produto com maior benefício ao sistema de defesa do organismo dos consumidores (Borille, 2004), desde que seja levado em consideração o fator ambiental.

No Quadro 14, são demonstradas as estimativas das correlações fenotípicas, genotípicas e de ambiente, entre as cinco características avaliadas nas dezesseis progênies de erva-mate. Com exceção de um dos pares de características (teobromina x ácido neoclorogênico), as correlações genotípicas foram maiores do que as fenotípicas e ambientais, o que comprova que o fator genético teve maior influência do que o ambiente.

A erva-mate é considerada uma espécie com ampla variação fenotípica no conteúdo de metilxantinas, o que pode interferir na qualidade da matéria-prima. Como se pode notar, houve correlação negativa e significativa ao nível de 1% pelo teste t, entre cafeína e teobromina (-0,7573), e ao nível de 5% de probabilidade, entre cafeína e ácido clorogênico (-0,5420). Por outro lado, houve correlação positiva e com significância a 5% entre a teobromina e o ácido clorogênico (0,6183), e entre este último composto e o ácido criptoclorogênico (0,7742) a 1% de probabilidade.

Quanto às correlações ambientais, pôde-se verificar que o ambiente exerceu estímulo negativo em relação ao acúmulo de cafeína. Para os demais compostos e também para o acúmulo de cafeína e ácido neoclorogênico, esta influência foi em mesmo sinal (+), sendo a intensidade, neste último caso, de aproximadamente 37,6%.

Apesar disso, sabe-se que a variação genética é herdável e interessante para os melhoristas no processo de seleção dos materiais. Assim, notou-se que a correlação genética da cafeína em relação aos demais compostos foi negativa,

onde os valores foram de -0,8643 e -0,6806 entre os teores de cafeína com teobromina e com ácido clorogênico, respectivamente, além dos seus isômeros, cujos estimadores foram de -0,6755 com o ácido neoclorogênico e de -0,4264 com o ácido criptoclorogênico.

Quadro 14 - Estimadores dos coeficientes de correlações fenotípicas (r_F), genotípicas (r_G) e de ambiente (r_A) entre as cinco características fitoquímicas avaliadas em 16 progênies de erva-mate

Características	r	Ácido			
		Teobromina	Neoclorogênico	Clorogênico	Criptoclorogênico
Cafeína	r_F	-0,7573**	-0,4432	-0,5420*	-0,3758
	r_G	-0,8643	-0,6755	-0,6806	-0,4264
	r_A	-0,0909	0,3758	-0,0574	-0,2895
Teobromina	r_F		0,4575	0,6183*	0,3540
	r_G		0,4245	0,7106	0,3937
	r_A		0,5856	0,3787	0,2727
Ácido Neoclorogênico	r_F			0,3638	0,4538
	r_G			0,4515	0,6407
	r_A			0,2046	0,1374
Ácido Clorogênico	r_F				0,7742**
	r_G				1,0610
	r_A				0,2396

** , * : Significativo a 1 e 5%, pelo teste t, respectivamente.

Dentre as correlações, cafeína e teobromina apresentaram o maior coeficiente de correlação (-0,8643) e comprovaram o descrito em outros estudos (Cardozo Junior, 2006; Gnoatto et al., 2007; Nakamura et al., 2009) sobre a relação inversa entre estas variáveis. Isto pode ser explicado, pois uma das mais importantes vias de biossíntese destes compostos ocorre por xantosina → 7-metilxantosina → 7-metilxantina → teobromina → cafeína (Ashihara e Crozier, 2001) e, conforme a necessidade da planta, tem-se produção de maior conteúdo de cafeína ou então, de teobromina (Nakamura et al., 2009).

Valores coincidentes de correlação entre estas duas variáveis foram observados por Cardozo Junior (2006), que determinou intensidade de 84,10%.

A teobromina apresentou correlação positiva com os derivados cafeoil, com correlação de 0,4245; 0,7106 e 0,3937 para o ácido neoclorogênico, ácido clorogênico e ácido criptoclorogênico, respectivamente. Semelhantemente, os derivados cafeoil se correlacionaram positivamente entre si, de modo que o acúmulo de ácido clorogênico e de seus isômeros se torna facilitado.

As medidas de dissimilaridade genética para as cinco características avaliadas estão expostas no Quadro 15, utilizando-se a Distância Generalizada de Mahalanobis (D_{ii}^2). Pela análise do quadro, pode-se verificar que as progênes mais dissimilares foram a NA 121 e a C 4, que apresentaram o máximo valor de D_{ii}^2 , ou seja, 102,557%, e pertencem a locais diferentes. A primeira progênie é originária de Pinhão/PR e a segunda progênie nativa de Ivaí/PR. A menor magnitude de distância, em virtude do valor de D_{ii}^2 (1,081%), foi observada nas progênes AM 110 e AG 101, sendo ambas oriundas de Pinhão/PR.

Dentre as combinações mais similares entre todas as progênes, a S 69 (Barão de Cotegipe/RS), AK 106 (Pinhão/PR) e AB 91 (Quedas do Iguaçu/PR) apareceram em três ou mais combinações. Neste caso, verificou-se que a progênie S 69 participou da combinação com a progênie NA 121 (Pinhão/PR), AK 106, W 84 (Quedas do Iguaçu/PR) e AB 91 com suas respectivas magnitudes de 5,165%, 2,361%, 5,701% e 4,757%. A progênie AK 106 ainda combinou-se com as progênes NA 121 (3,880%) e AB 91 (4,750%), enquanto esta última progênie formou outra combinação com a progênie W 84 (4,103%). A progênie BA 25 (Ivaí/PR), por sua vez, juntou-se com as progênes G 10 (Ivaí/PR) e AR 152 (Cascavel/PR), gerando similaridade de 5,735% e 5,087%, respectivamente.

Em contrapartida, os dez pares de combinações mais dissimilares foram formados pela progênie C 4 (Ivaí/PR) com as progênes AK 106 (Pinhão/PR), S 69 (Barão de Cotegipe/RS), AG 101 (Pinhão/PR), AM 110 (Pinhão/PR) e AB 91 (Quedas do Iguaçu/PR), com D_{ii}^2 de 94,807%, 77,244%, 76,754%, 70,518% e 65,378%, respectivamente. Além destas, houve a junção da progênie AG 101 com as progênes G 10 (Ivaí/PR), F 8 (Ivaí/PR) e Q 65 (Barão de Cotegipe/RS) com respectivas magnitudes de 62,121%, 62,048% e 61,116%. A progênie Q 65 ainda combinou-se com a progênie AK 106, dando D_{ii}^2 igual a 61,756% e com a progênie K 51 (Barão de Cotegipe/RS), cuja dissimilaridade foi de 60,928%.

Com base na medida de dissimilaridade da Distância Generalizada de Mahalanobis (D_{ii}^2), as progênes foram agrupadas por meio do método de otimização de Tocher, ocorrendo a formação de cinco grupos distintos. Este agrupamento está apresentado no Quadro 16.

Quadro 15 - Medidas de dissimilaridade entre as 16 progênies de erva-mate, em relação a cinco caracteres químicos avaliados (cafeína, teobromina, ácido neoclorogênico, ácido clorogênico e ácido criptoclorogênico), com base na Distância Generalizada de Mahalanobis (D_{ii}^2)

Progênie	AM 110	AG 101	NA 121	AK 106	W 84	AB 91	E 7	G 10	F 8	C 4	BA 25	AR 152	AQ 151	Q 65	S 69	K 51
AM 110	0,000	1,081	16,204	9,362	14,877	7,070	29,545	53,625	55,578	70,518	43,945	22,867	20,455	55,983	9,815	14,569
AG 101		0,000	22,677	12,342	22,460	11,484	35,874	62,121	62,048	76,754	50,259	28,135	24,460	61,116	14,713	16,915
NA 121			0,000	3,880	8,972	5,762	30,228	59,612	52,584	102,557	53,535	29,731	43,837	59,939	5,165	27,046
AK 106				0,000	11,292	4,750	26,127	60,460	52,310	94,807	55,033	30,006	38,288	61,756	2,361	15,356
W 84					0,000	4,103	8,669	24,939	26,005	53,295	24,662	10,564	17,023	34,633	5,701	15,100
AB 91						0,000	15,868	35,148	32,015	65,378	29,529	13,405	19,915	39,997	4,757	16,612
E 7							0,000	12,061	12,847	30,682	19,088	12,206	13,350	30,111	17,341	13,300
G 10								0,000	7,291	14,316	5,735	13,080	12,938	21,983	48,872	44,572
F 8									0,000	36,224	7,374	11,630	23,374	11,679	46,573	47,318
C 4										0,000	25,763	36,724	16,705	52,990	77,244	53,948
BA 25											0,000	5,087	11,129	8,536	48,428	49,306
AR 152												0,000	7,958	9,196	25,433	29,009
AQ 151													0,000	27,530	29,912	22,008
Q 65														0,000	57,881	60,928
S 69															0,000	8,788
K 51																0,000

Progênies de Pinhão/PR: AM 110; AG 101; NA 121 e AK 106;
 Progênies de Quedas do Iguaçu/PR: W 84 e AB 91;
 Progênies de Ivaí/PR: E 7; G 10; F 8; C 4 e BA 25;
 Progênies de Cascavel/PR: AR 152 e AQ 151;
 Progênies de Barão de Cotegipe/RS: Q 65; S 69 e K 51.

O grupo I foi o mais expressivo, sendo formado por 43,75% das amostras, totalizando sete progênies: AM 110 (Pinhão/PR), AG 101 (Pinhão/PR), AB 91 (Quedas do Iguaçu/PR), AK 106 (Pinhão/PR), S 69 (Barão de Cotegipe/RS), NA 121 (Pinhão/PR) e W 84 (Quedas do Iguaçu/PR). O grupo II incorporou cinco progênies, correspondendo a 31,25%, enquanto o grupo III foi composto por 12,50% das progênies. Neste caso, no grupo II foram alocadas as progênies BA 25 (Ivaí/PR), AR 152 (Cascavel/PR), Q 65 (Barão de Cotegipe/RS), F8 (Ivaí/PR) e G 10 (Ivaí/PR) e, no grupo III, a progênie E 7 (Ivaí/PR) e K 51 (Barão de Cotegipe/RS).

Quadro 16 - Representação do agrupamento gerado pelo método de otimização de Tocher com base na dissimilaridade entre as 16 progênies de erva-mate, oriundas das procedências de Pinhão/PR, Quedas do Iguaçu/PR, Ivaí/PR, Cascavel/PR e Barão de Cotegipe/RS

Grupo	Progênies	(%)
I	AM 110, AG 101, AB 91, AK 106, S 69, NA 121, W 84	43,75
II	BA 25, AR 152, Q 65, F 8, G 10	31,25
III	E 7, K 51	12,50
IV	AQ 151	6,25
V	C 4	6,25

Os grupos que agregaram apenas uma progênie, compreendendo 6,25%, foram o IV (progênie AQ 151 de Cascavel/PR) e o V (progênie C 4 de Ivaí/PR).

Os resultados gerados pelo agrupamento de Tocher são concordantes com aqueles apresentados pela Distância Generalizada de Mahalanobis (D_{ii}^2), em que os indivíduos mais dissimilares por Mahalanobis estão alocados em grupos distintos. As progênies mais divergentes por Mahalanobis foram a NA 121 (Pinhão/PR) e a C 4 (Ivaí/PR), que estão localizadas nos grupos I e V, respectivamente. As mais similares, AM 110 e AG 101, de Pinhão/PR, estão dispostas no mesmo grupo (I).

Dentre as progênies que apareceram com maior frequência em combinações similares por Mahalanobis, podem-se citar a S 69 (Barão de Cotegipe/RS), AK 106 (Pinhão/PR) e AB 91 (Quedas do Iguaçu/PR), que compuseram o mesmo grupo (I) pelo Método de Tocher.

Entretanto, quando comparado com o Método de Tocher, o Método UPGMA (Figura 18) apresentou-se parcialmente semelhante, pois, apesar de ter ocorrido concordância na alocação de progênies pertencentes a uma mesma localidade, neste último método não se observou concordância com a Distância Generalizada de Mahalanobis para as progênies que formaram o maior número de combinações similares, já que estas se apresentaram em grupos distintos.

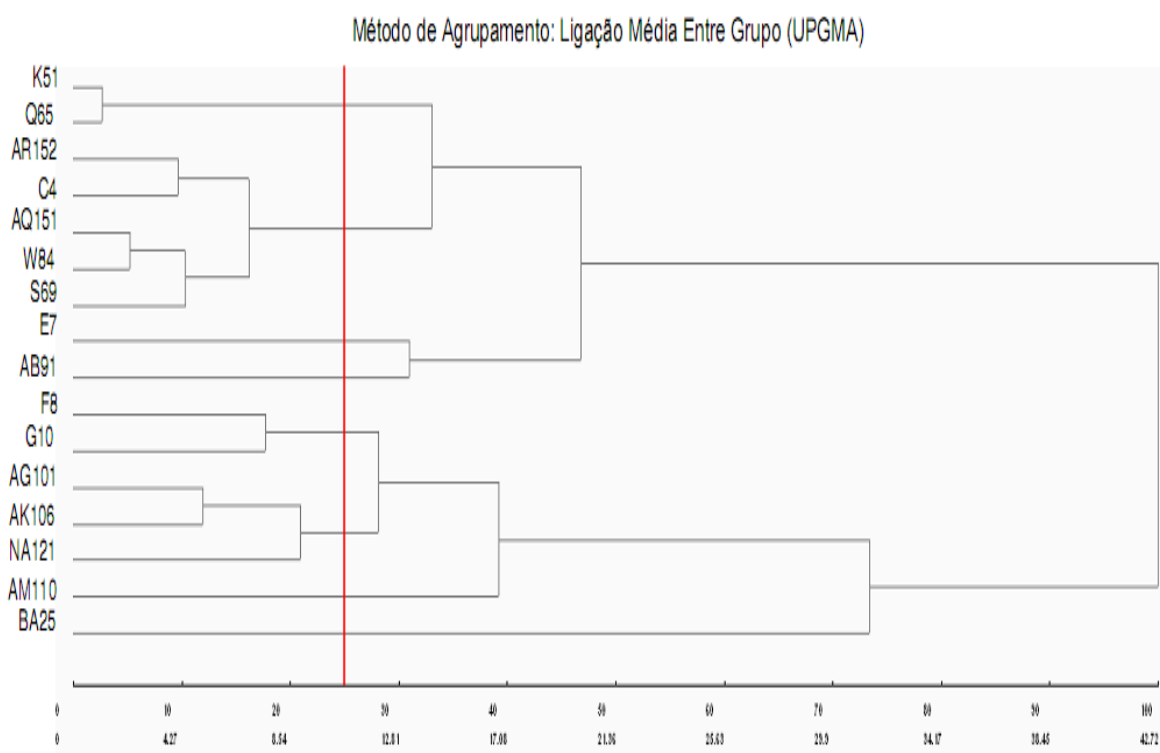


Figura 18 - Dendrograma ilustrativo do padrão de dissimilaridade estabelecido pelo método hierárquico UPGMA, baseado na Distância Generalizada de Mahalanobis, nas 16 progênies de erva-mate.

Além disso, quando foi traçada uma linha limítrofe sobre a marca de 25%, houve a formação de oito grupos distintos. Os grupos I e o V foram formados por dois representantes cada, sendo as progênies AM 110 e AG 101, de Pinhão/PR, e as progênies G 10 e F 8, de Ivaí/PR, respectivamente.

O grupo II foi constituído por um número maior de progênies, seguido pelo grupo VI. O primeiro foi composto por cinco constituintes, a progênie W 84 (Quedas do Iguaçu/PR), AB 91 (Quedas do Iguaçu/PR), AK 106 (Pinhão/PR), S 69 (Barão de Cotegipe/RS) e NA 121 (Pinhão/PR); e no segundo foram

agrupadas as progênies BA 25 (Ivaí/PR), AR 152 (Cascavel/PR) e Q 65 (Barão de Cotegeipe/PR).

Os grupos III, IV, VII e VIII apresentaram apenas um integrante. Sendo o grupamento III representado pela progênie E 7 (Ivaí/PR), o grupo IV formado pela progênie K 51 (Barão de Cotegeipe/RS), o grupo V constituído pela progênie AQ 151 (Cascavel/PR) e o último grupo, composto pela progênie C4 (Ivaí/PR).

As diferenças nos grupos formados podem ser explicadas pelo fato de que, na otimização dos agrupamentos, as progênies são reunidas formando grupos mais ou menos homogêneos. Para os métodos hierárquicos, a delimitação dos grupamentos leva em consideração pontos de alta mudança de nível no diagrama de árvore (Pereira e Cruz, 2003).

No entanto, quando o dendograma gerado pelo Método UPGMA do presente estudo foi correlacionado com o dendograma obtido por Nakamura et al. (2009) com base nos dados de Cardozo Junior (2006), houve semelhança em relação à formação de dois grupos. O Método UPGMA foi composto pelas progênies AM 110, AG 101, W 84, AB 91, AK 106, S 69, NA 121, E 7 e K 51 no grupo I, enquanto o segundo grupo foi incorporado pelas progênies G 10, F 8, BA 25, AR 152, Q 65, AQ 151 e C 4.

Contudo, ao mesmo tempo em que foi possível notar que progênies distantes das demais anteriormente se mantiveram assim neste dendograma, como é o caso da progênie C 4 (de Ivaí/PR), a alocação de algumas amostras também foi diferenciada. Observou-se uma mudança bastante significativa em relação às progênies S 69 de Barão de Cotegeipe/RS e W 84 e AB 91 de Quedas do Iguaçu/PR, agrupadas próximas daquelas progênies que estavam distantes no dendograma anterior como, por exemplo, a progênie NA 121 de Pinhão/PR.

Assim, embora os dados da quantificação dos compostos tenham sido obtidos por meio da média entre os acessos dentro das progênies, o que impediu sua correlação com os resultados moleculares, pôde-se comprovar a existência de uma divergência genética quantitativa entre as dezesseis progênies analisadas, o que permite obter subsídios para o desenvolvimento de um programa de melhoramento eficiente.

Além disso, foi possível confirmar dados já descritos em literatura (Scherer et al., 2002; Sturion et al., 2003; Cardozo Junior, 2006; Nakamura et al., 2009), os quais relatam que as metilxantinas possuem características herdáveis,

úteis nos programas para a obtenção de ganhos genéticos consideráveis para estes compostos, enquanto os compostos fenólicos são fortemente influenciáveis pelo ambiente. Neste último caso, o estudo da variação quantitativa dos fenóis é fundamental para a compreensão das transformações que ocorrem com estes compostos durante o processamento e suas relações com a qualidade do produto comercial, a fim de beneficiar a cadeia produtiva da erva-mate, tanto em termos de variáveis de qualidade quanto de estratégias voltadas à produção.

Desta forma, pode-se afirmar que a caracterização molecular da diversidade genética do germoplasma, associada aos dados fenotípicos, como a composição química, pode fornecer subsídios para auxiliar os melhoristas na seleção de genitores que serão utilizados em programas de melhoramento da espécie, aumentando assim a eficiência dos programas.

5. CONCLUSÕES

As seguintes conclusões foram possíveis:

a) Os marcadores RAPD foram eficientes em detectar diversidade genética e parentesco entre os acessos de erva-mate.

b) A utilização de marcadores moleculares, juntamente com caracteres fitoquímicos na avaliação de progênies de erva-mate, forneceu informações relevantes para nortear os programas de melhoramento, manejo e conservação dos recursos genéticos e químicos da espécie.

c) Os resultados obtidos poderão auxiliar os melhoristas durante a seleção do material a ser empregado, além de reduzir o tempo na execução do teste de progênies e permitir que seja agregado o maior número de caracteres desejáveis ao novo material selecionado.

6. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGAARD, J.E.; KRUTOVSKII, K.V.; STRAUSS, S.H. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. **Heredity**, 81:69-78, 1998.

ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **Journal of Ethnopharmacology**, 20:121-144, 1987.

ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1971. 381p.

ALVES, A.B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 38:237-243, 2002.

ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, 30:333-342, 2005.

ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. **Food Chemistry**, 97:459-464, 2006.

ARAÚJO, P.M.; PATERNIANI, E. Aspectos gerais de plantas alógamas. In: DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. **Melhoramento genético de plantas**. Londrina: UEL, 1999. p.299-310.

ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. **Trends in Plant Science**, 6:407-413, 2001.

ATHAYDE, M.L.; COELHO, G.C.; SCHENKEL, E.P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Phytochemistry**, 55:853-857, 2000.

BASTOS, D.H.M.; ISHIMOTO, E.Y.; MARQUES, M.O.M.; FERRI, A.F.; TORRES, E.A.F.S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex*

paraguariensis) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19:538-543, 2006.

BELINGHERI, L.D.; PRAT KRICUN, S.D. Evaluación preliminar de clones y progenies policlonales de yerba-mate en San Vicente - Misiones (Argentina). In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E.A.; TARASCONI, L.C. (eds.). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. p.151-156.

BELINGHERI, L.D.; PRAT KRICUN, S.D. Programa de mejoramiento genetico de la yerba mate en el INTA. In: 1º CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE; 2ª REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, Curitiba, 1997. **Anais...** Colombo: Embrapa-CNPQ, 1997. p.267-278. (Documentos, n. 33).

BERG, E.E.; HAMRICK, J.L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal of Forest Research**, 27:415-424, 1997.

BERTONI, M.H.; PRAT KRICUN, S.D.; KANZIG, R.G.; CATTANEO, Y.P. Effect of different stages of the traditional process for yerba mate production on the composition of fresh leaves. **Anales de la Asociación Química Argentina**, 80:493-501, 1992.

BOGUSZEWSKI, J.H. **Uma história cultural da erva-mate: o alimento e suas representações**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007. 123p. Dissertação (Mestrado em História).

BONDARIK, R.; KOVALESKI, J.L.; PILATTI, L.A. **A produção de erva-mate e a iniciação industrial do Paraná**. In: 19º CONGRESSO INTERNACIONAL DE ADMINISTRAÇÃO, Ponta Grossa, 2006. p.1-8. Disponível em: <http://www.fiepr.org.br/sindicatos/sindimate/uploadAddress/A%20Produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20Erva%20Mate%20e%20a%20Inicia%C3%A7%C3%A3o%20Industrial%20do%20Paran%C3%A1%5B37677%5D.pdf>. Acesso em: 11, dezembro, 2008.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374p.

BORILLE, A.M.W. **Relação entre compostos fitoquímicos e o nitrogênio em morfotipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.)**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004. 110p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo).

BRAGAGNOLO, N.; PAN, W.; KLOSOVSKI FILHO, L. **Manual técnico de erva-mate**. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura/Emater-PR/Instituto de Terras e Cartografia, 1980. 40p.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, 40:393-405, 2007.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy: phytochemistry medicinal plants**. França: Technique & Documentation, 1999. 1119p.

CAMPA, C.; NOIROT, M.; BOURGEOIS, M.; PERVENT, M.; KY, C.L.; CHRESTIN, H.; HAMON, S.; KOCHKO, A. Genetic mapping of a caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase gene in coffee trees. Impact on chlorogenic acid content. **Theoretical and Applied Genetics**, 107:751-756, 2003.

CAMPOS, A.M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E.A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. **Journal Brazilian Chemical Society**, 7:43-49, 1996.

CAMPOS, M.A.A. **Balço de biomassa e nutrientes em povoamentos de *Ilex paraguariensis*: avaliação na safra e na safrinha**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1991. 106p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais).

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**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2003. 82p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais).

CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.J.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CECHET, M.L.; CARVALHO, A.Z.; ECHEVERRIGARAY, S. Diversidade genética de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) na área de distribuição da espécie no Brasil. In: 3º CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE; 1ª FEIRA DO

AGROCENGÓCIO DA ERVA-MATE, Chapecó, 2003. **Anais...** Chapecó: EPAGRI, 2003. p.1-10.

CARDOZO JUNIOR, E.L. **Teores de metilxantinas e compostos fenólicos em extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2006. 124p. Tese (Doutorado em Agronomia).

CARDOZO JUNIOR, E.L.; DONADUZZI, C.M.; STURION, J.A.; CORREA, G. Variação nos teores de metilxantinas em dezesseis progênies de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em três municípios do Paraná. In: 3º CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE; 1ª FEIRA DO AGROCENGÓCIO DA ERVA-MATE, Chapecó, 2003. **Anais...** Chapecó: EPAGRI, 2003. p.41.

CARDOZO JUNIOR, E.L.; FERRARESE-FILHO, O.; CARDOZO FILHO, L.; FERRARESE, M.L.L.; DONADUZZI, C.M.; STURION, J.A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, 20:553-558, 2007.

CARINI, M.; FACINO, R.M.; ALDINI, G.; CALLONI, M.; COLOMBO, L. Characterization of phenolic antioxidants from maté (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 12:1813-1819, 1998.

CARNEIRO, C.; REISSMANN, C.B.; MARQUES, R. Comparação de métodos de análise química de K, Ca, Mg e Al, em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Cerne**, 12:113-122, 2006.

CARPANEZZI, A.C. Cultura da erva-mate no Brasil: conflitos e lacunas. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E.A.; TARASCONI, L.C. (eds.). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 1995. p.43-46.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília/Colombo: Embrapa - Informação Tecnológica/Embrapa Florestas, 2003. 1039p.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Disponível em: http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/index_especies.htm. Acesso em: 05, janeiro, 2009.

CAVIGLIONE, J.H.; KIIHL, L.R.B.; CARAMORI, P.H.; OLIVEIRA, D. **Cartas climáticas do Paraná**, 2000. Disponível em: <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=863>. Acesso em: 25, janeiro, 2009.

CHALMERS, K.J.; WAUGH, R.; SPRENT, J.I.; SIMONS, A.J.; POWELL, W. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. **Heredity**, 69:465-472, 1992.

CLIFFORD, M.N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J.R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, 35:13-21, 1990.

COELHO, G.C.; ATHAYDE, M.L.; SCHENKEL, E.P. Methylxantines of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. var. *vestita* Loes. and var. *paraguariensis*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 37:153-158, 2001.

COELHO, G.C.; RACHWAL, M.; SCHNORRENBERGER, E.; SCHENKEL, E.P. Efeito do sombreamento sobre a sobrevivência, morfologia e química da erva-mate. In: 2º CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA-MATE, 3ª REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, Encantado, 2000. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado/RS, 2000. p.396-399.

COKUZRAS, A.N.; BODUR, E. Comparative effects of two plant growth regulators: indole-3-acetic acid and chlorogenic acid on human and horse serum butyrylcholinesterase. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 77:24-33, 2003.

COLE, T.C. Genetic variation in rare and common plants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 34:213-237, 2003.

COSTA, M.R.; CARDOSO, E.R.; OHAZE, M.M.M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, 27:158-164, 2003.

COSTA, R.B.; RESENDE, M.D.V.; CONTINI, A.Z.; REGO, F.L.H.; ROA, R.A.R.; MARTINS, W.J. Avaliação genética de indivíduos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) na região de Caarapó, MS, pelo procedimento REML/BLUP. **Ciência Florestal**, 15:371-376, 2005.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia Univ. Press, 1981. 1262p.

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

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2003. 585p.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2001. 390p.

CRUZ, R.P.C.; MILACH, S.C.K. Análise de RAPD. In: MILACH, S.C.K. (ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.107-116.

DA CROCE, D.M. Características físico-químicas de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) no Estado de Santa Catarina. **Ciência Florestal**, 12:107-113, 2002.

DA CROCE, D.M.; FLOSS, P.A. **Cultura da erva-mate no Estado de Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 1999. 81p. (Boletim Técnico, n.100).

DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A. Analytical methods for chlorogenic acid. **Química Nova**, 27:586-592, 2004.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.R. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, 1:19-21, 1983.

DÍAZ, M.R.; TONON, S.A. Aplicabilidad de herramientas moleculares a la selección, mejoramiento y estudios de diversidad en *Ilex paraguariensis* (yerba mate). In: 4º CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4º REUNIÓN TÉCNICA DE LA YERBA MATE, 2º EXPOSICIÓN DE AGRONEGOCIOS DE LA

YERBA MATE, Posadas, 2006. **Anais...** Posadas: INYM/INTA/UNaM/EPAGRI, 2006. p.172-177.

DONADUZZI, C.M.; CARDOZO JUNIOR, E.L.; DONADUZZI, E.M.; SILVA, M.M.; STURION, J.A.; CORREA, G. Variação nos teores de polifenóis totais e taninos em dezesseis progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) cultivadas em três municípios do Paraná. **Arquivo de Ciências da Saúde da Unipar**, 7:129-133, 2003.

DONADUZZI, C.M.; COELHO, S.R.M.; CARDOZO JUNIOR, E.L.; GALLO, A.G.; HUPPES, G.K.; KUHN, I.M.V.; SCHICHEL, C. Teores de cafeína, polifenóis totais e taninos em amostras de erva mate comercializadas na região de Toledo, Paraná. In: 2º CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA-MATE, 3ª REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, Encantado, 2000. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado/RS, 2000. p.158-161.

DUARTE, J.M.; SANTOS, J.B.; MELO, L.C. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, 22:427-432, 1999.

ELIAS, H.T.; GONÇALVES VIDIGAL, M.C.; GONELA, A.; VOGT, G.A. Variabilidade genética em germoplasma tradicional de feijão-preto em Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42:1443-1449, 2007.

EMATER. Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural. **Ações da extensão:** erva-mate. Disponível em: <http://www.emater.pr.gov.br/emater.php?emater=1&mid=73>. Acesso em: 02, fevereiro, 2009.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília/Rio de Janeiro: Embrapa Produção de Informação/Embrapa Solos, 1999. 412p.

ENGLER, A. **Syllabus der Pflanzenfamilien**. Berlin: Gedrunder Borntraeger, 1964. 666p.

ESMELINDRO, A.A.; GIRARDI, J.S.; MOSELE, S.; DARIVA, C. Efeito da intensidade de luz e idade de folha sobre o extrato de erva-mate obtido por CO₂ a altas pressões. In: 3º CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE; 1ª FEIRA DO AGROCENGÓCIO DA ERVA-MATE, Chapecó, 2003. **Anais...** Chapecó: EPAGRI, 2003. p.6.

ESMELINDRO, M.C.; TONIAZZO, G.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D.; LOPES, D. The effects of manufacturing steps on the chemical characteristics of the extracts from SCFE of mate tea leaves. **Chemical Engineering Transactions**, 2:241-246, 2002.

ESTOPA, R.A.; SOUZA, A.M.; MOURA, M.C.O.; BOTREL, M.C.G.; MENDONÇA, E.G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em populações naturais de cadeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, 70:97-106, 2006.

FAGUNDES, G. **Cevando mate**. Porto Alegre: Habitasul, 1980. 135p.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 1987. 279p.

FASOLO, P.J.; POTTER, R.O.; STURION, J.A. **Classificação dos solos de testes de progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Colombo: Embrapa-CNPQ, 1998. 4p. (Embrapa-CNPQ, Comunicado Técnico n .29).

FERREIRA, A.G.; KASPARY, R.; FERREIRA, H.B.; ROSA, L.M. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Brasil Florestal**, 53:29-33, 1983.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1995. 220p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. Brasília: Embrapa-CERNAGEN, 1998. 220p.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, 72:774-778, 2001.

FISHER, W.D. On grouping for maximum homogeneity. **Journal of the American Statistical Association**, 53:789-798, 1958.

FLOSS, A. Programa de melhoramento genético da erva-mate na EPAGRI. In: 1º CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE; 2ª REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, Curitiba, 1997. **Anais...** Colombo: Embrapa-CNPf, 1997. p. 279-284.

FOWLER, J.A.P.; STURION, J.A. **Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 5p. (Embrapa-CNPf, Comunicado Técnico, n.45).

FRANKEL, O.H.; BROWN, A.H.D.; BURDON, J.J. **The conservation of plant biodiversity**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 299p.

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

GIBERTI, G.C. Aspectos oscuros de la corologia de *Ilex paraguariensis* St. Hil. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E.A.; TARASCONI, L.C. (eds.). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: UFRS, 1995. p. 289-300.

GILLIES, A.C.M.; NAVARRO, C.; LOWE, A.J.; NEWTON, A.C.; HERNÁNDEZ, M.; WILSON, J.; CORNELIUS, J.P. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. **Heredity**, 83:722-732, 1999.

GNOATTO, S.C.B.; BASSANI, V.L.; COELHO, G.C.; SCHENKEL, E.P. Análise da influência de diferentes métodos de extração sobre a quantificação de metilxantinas em *Ilex paraguariensis*. In: 2º CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA-MATE, 3ª REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, Encantado, 2000. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado/RS, 2000. p. 400-402.

GNOATTO, S.C.B.; BASSANI, V.L.; COELHO, G.C.; SCHENKEL, E.P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex*

paraguariensis A. St.-Hil., Aquifoliaceae). **Química Nova**, 30:304-307, 2007.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 1996. 1436p.

GORZALCZANY, S.; FILIP, R.; ALONSO, M.R.; MIÑO, J.; FERRARO, G.E.; ACEVEDO, C. Choleric effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. **Journal of Ethnopharmacology**, 75:291-294, 2001.

GOVER, J.C. Measures of similarity, dissimilarity, and distance. In: KOTS, S.; JOHNSON, N.L. **Encyclopedia of Statistical Sciences**. New York, 1985. p.397-405.

GROSS, C.L. A comparison of the sexual systems in the trees from the Australian tropics with other tropical biomes-more monoecy but why? **American Journal of Botany**, 92:907-919, 2005.

HALLDÉN, C.; HANSEN, M.; NILSSON, N.O.; HJERDIN, A.; SÄLL, T. Competition as a source of errors in RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, 93:1185-1192, 1996.

HAMRICK, J.L. Genetic variation and longevity. In: SOLBRIG, O.T.; JAIN, S.; JOHNSON, G.B.; RAVEN, P.H. (eds.). **Topics in plant population biology**. New York: Columbia University Press, 1979. p. 84-113.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plants species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L. WEIR, B.S. (eds.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer Associates, 1989. p. 43-63.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.; SHERMAN-BROYLES, S.L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forests**, 6:95-124, 1992.

HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B.; MITTON, J.B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 10:173-200, 1979.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola**, 2007. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1613&z=p&o=22>. Acesso em: 15, janeiro, 2009.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturalles**, 44:223-270, 1908.

KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M.; RIBAS, L.A.; GANDARA, F.B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M.B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, 64:93-107, 2003.

KAWAKAMI, M.; KOBAYASHI, A. Volatile constituents of green mate roasted mate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 39:1275-1279, 1991.

KEMPTHORNE, O. **An introduction to genetic statistics**. Ames: Iowa State University Press, 1973. 545p.

KIKATANI, T.; WATANABE, Y.; SHIBUYA, T. Different effects of methylxanthines on central serotonergic postsynaptic neurons in a mouse behavioral model. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 44:457-461, 1993.

KRAS, S.M.; COSTA, R.B.; RESENDE, M.D.V.; ROA, R.A.R. Vigor juvenil em progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) nativas do estado de Mato Grosso do Sul. **Ciência Florestal**, 17:33-41, 2007.

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

LEMOS, R.C.; SANTOS, R.D. **Manual de descrição e coleta de solo no campo**. Campinas/Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/ Embrapa-CNPF, 1996. 83p.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; LIMA, D.E.S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agricola**, 59:447-450, 2002.

LINHARES, T. **História econômica do mate**. Rio de Janeiro: José Olímpio, 1969. 522p.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.O.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares dominantes (Rapid e Aflp). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 29:56-60, 2002.

LORIST, M.M.; TOPS, M. Caffeine, fatigue, and cognition. **Brain and Cognition**, 53:82-94, 2003.

LOVELLES, M.D.; HAMRICK, J.L. Distribución de la variación en especies de árboles tropicales. **Revista de Biología Tropical**, 35:165-175, 1987.

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

MACCARI JUNIOR, A.; MAZUCHOWSKI, J.Z. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba: Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate/ Ministério da Ciência e Tecnologia - PADCT, 2000. 176p.

MACHADO, I.C.; LOPES, A.V. Floral traits and pollination systems in the Caatinga, a brazilian tropical dry forest. **Annals of Botany**, 94:365-376, 2004.

MAHALANOBIS, P.C. On the generalised distance in statistics. **Proceedings of the National Institute of Sciences of India**, 2:49-55, 1936.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, 27:209-220, 1967.

MARX, F.; JANSSENS, M.J.J.; URFER, P.; SCHERER, R. Caffeine and theobromine composition of mate (*Ilex paraguariensis*) leaves in five plantations of Misiones, Argentina. **Plant Foods for Human Nutrition**, 58:1-8, 2003.

MAZUCHOWSKI, J.Z. **A cultura da erva-mate**. Curitiba: Emater-Paraná, 1989. 36p.

MAZUCHOWSKI, J.Z. **Influência de níveis de sombreamento e de nitrogênio na produção de massa foliar da erva-mate *Ilex paraguariensis* St. Hil.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo).

MAZUCHOWSKI, J.Z. **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill).** Curitiba: Emater-Paraná, 1991. 104p.

MAZUCHOWSKI, J.Z.; CROCE, D.M.; WINGE, H. **Diagnóstico e perspectivas da erva-mate no Brasil.** Chapecó: Comissão Nacional da Erva-Mate, 1996. 28p.

MAZUCHOWSKI, J.Z.; RÜCKER, N.G.A. **Diagnóstico e alternativas para a erva-mate *Ilex paraguariensis*.** Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento/Departamento de Economia Rural, 1993. 141p.

MAZZAFERA, P. Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguayensis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 6:149-151, 1994.

MENDONÇA, E.G. **Análise da divergência genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. por marcadores RAPD em populações de mata ciliar.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 67p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal).

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas.** Disponível em: <<http://www.cpatia.embrapa.br/catalogo/livro/marcadormolecular.pdf>> Acesso em: 03, fevereiro, 2009.

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: 14, dezembro, 2008.

MITTERMEIER, R.A.; AYRES, J.M.; WERNER, T.; FONSECA, G.A.B. O país da megadiversidade. **Ciência Hoje**, 14:20-27, 1992.

- MONTAGNON, C.; GUYOT, B.; CILAS, C.; LEROY, T. Genetic parameters of several biochemical compounds from green coffee, *Coffea canephora*. **Plant Breeding**, 117:576-578, 1998.
- MORALES, E.A.V. "Genepools" e "core collections" como estratégias para conservação e uso dos recursos genéticos. In: 1º SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, Campinas, 1995. **Resumos...** Campinas: IAC, 1995. p.7-8.
- MOURA, M.C.O. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish por isoenzimas e RAPD**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. 165p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal).
- MÜHLEN, G.S. **Avaliação da diversidade genética de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com marcadores de DNA: RAPD, AFLP e microssatélites**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999. 176p. Tese (Doutorado em Agronomia).
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, 155:335-350, 1987.
- NAIK, J.P. Improved high-performance liquid chromatography method to determine theobromine and caffeine in cocoa and cocoa products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49:3579-3583, 2001.
- NAKAMURA, K.L.; CARDOZO JUNIOR, E.L.; TAKEMURA, O.S.; DONADUZZI, C.M.; SCHUSTER, I. Variação genética nos teores de compostos fitoquímicos em progênies de *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 2009. in press.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89:583-590, 1978.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, 106:283-292, 1972.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512p.

NEUMANN, R.I. **Anuário brasileiro da erva-mate - 1999**. Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2000. 79p.

NISHINO, H.; MURAKOSHI, M.; MOU, X.Y.; WADA, S.; MASUDA, M.; OHSAKA, Y.; SATOMI, Y.; JINNO, K. Cancer prevention by phytochemicals. **Oncology**, 69:38-40, 2005.

OLIVEIRA, P.E.; GIBBS, P.E. Reproductive biology of woody plants in a cerrado community of Central Brazil. **Flora**, 195: 11-329, 2000.

OLIVEIRA, Y.M.M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: X SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS: SILVICULTURA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*), Curitiba, 1983. **Anais...** Colombo: Embrapa-CNPQ, 1985. p. 17-36. (Documentos, n.15).

PARANÁ. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. **Diagnóstico e alternativas para a erva-mate *Ilex paraguariensis***. Curitiba: SEAB, 1993. 141p.

PARANÁ. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. **Erva-mate - prospecção tecnológica da cadeia produtiva**. Curitiba: SEAB, 1997. 27p.

PEREIRA, J.J.; CRUZ, C.D. Comparação de métodos de agrupamento para o estudo da diversidade genética de cultivares de arroz. **Ceres**, 50:41-60, 2003.

PRAT KRICUN, S.D. Principales aspectos de la producción e investigación yerbatera Argentina. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, Erechim, 1990. **Anais...** Erechim: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 1990. p. 17-30.

PRAT KRICUN, S.D.; BELINGHERI, L.D. Disposición, distanciamiento y densidade de plantación de yerba mate en las provincias de Misiones y Corrientes, Argentina. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E.A.; TARASCONI, L.C. (eds.). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: UFRS, 1995. p. 73-79.

RAMALHO, M.A.P.; FERREIRA, D.F.; OLIVEIRA, A.C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Lavras: UFLA, 2000. 326p.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo, 1990. 359p.

RAO, R.C. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York: John Wiley & Sons, 1952. 390p.

RASMUSSEN, S.E.; FREDERIKSEN, H.; KROGHOLM, K.S.; POULSEN, L. Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. **Molecular Nutrition & Food Research**, 49:159-174, 2005.

RATES S.M.K. Metilxantinas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCKENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFSC/UFRGS, 1999. p. 723-737.

REGINATTO, F.H.; ATHAYDE, M.L.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Methylxantines accumulation in *Ilex* species - caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 10:443-446, 1999.

REISSMANN, C.B.; RADOMSKI, M.I.; QUADROS, R.M.B. Chemical composition of *Ilex paraguariensis* St. Hill. under different management conditions in seven localities of Parana State. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 42:187-194, 1999.

REITZ, R.; EDWIN, G. **Flora ilustrada catarinense: aquifoliáceas**. Itajaí: R Reitz, 1967. 47p.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues-HBR, 1988. 528p.

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, progênes, indivíduos e clones. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 67p.

RESENDE, M.D.V.; STURION, J.A.; MENDES, S. **Genética e melhoramento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Colombo: Embrapa-CNPF, 1995. 33p. (Documentos, n.25).

RICCO, R.A.; WAGNER, M.L.; GURNI, A.A. Estudio comparativo de flavonóides en especies austrosudamericanas del genero *Ilex*. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E.; TARRASCONI, L.C. (eds.). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. p. 243-249.

RIVELLI, D.P.; SILVA, V.V.; ROPKE, C.D.; MIRANDA, D.V.; ALMEIDA, R.L.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S.B.M. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH reduction. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 43:215-222, 2007.

ROLIM, E. **Contribuição ao estudo da erva-mate**. Curitiba: Faculdade de Medicina do Paraná, 1920. 97p. Tese (Doutorado).

SALDAÑA, M.D.A.; MOHAMED, R.S.; MAZZAFERA, P. Supercritical carbon dioxide extraction of methylxanthines from maté tea leaves. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 17:1-14, 2000.

SANTOS, K.A.; FREITAS, R.J.S.; RAPACCI, M.; WINTER, C.M.G. Polifenóis em chá de erva-mate. **Nutrição Brasil**, 3:47-50, 2004.

SANZ, M.D.T.; ISASA, M.E.T. Elementos minerales en la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. H.). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, 41:441-454, 1991.

SAWYNOK, J. Pharmacological rationale for the clinical use of caffeine. **Drugs**, 49:37-50, 1995.

- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, 130:2073S-2085S, 2000.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; HEINZMANN, B.M.; MONTANHA, J.A.; ATHAYDE, M.L. TAKEDA, A.C. Saponinas em espécies do gênero *Ilex*. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E.; TARRASCONI, L.C. (eds.). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. p. 251-256.
- SCHERER, R.; URFER, P.; MAYOL, M.R.; BELINGHERI, L.D.; MARX, F.; JANSSENS, M.J.J. Inheritance studies of caffeine and theobromine content of mate (*Ilex paraguariensis*) in Misiones, Argentina. **Euphytica**, 126:203-210, 2002.
- SCHERER, R.A. **Early selection of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Bonn: Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universitat, 1997. 58p.
- SCHINELLA, G.R.; FANTINELLI, J.C.; MOSCA, S.M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clinical Nutrition**, 24:360-366, 2005.
- SCHUBERT, A.; ZANIN, F.F.; PEREIRA, D.F.; ATHAYDE, M.L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, 29:1233-1236, 2006.
- SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, 30:507-512, 1974.
- SEBBENN, A.M. **Distribuição da variação genética de populações de jequitibá-rosa [*Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze] por caracteres quantitativos e isoenzimas**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001. 210p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Forestalis**, 57:123-139, 2000.

SILVA, F.A.; PAVEI, C.; ORTEGA, G.G.; LIMA, E.M.; DINIZ, D.G.A.; MOREIRA, J.C.F.; BASSANI, V.L. Validation of an LC method for polyphenol assay in extractive solutions from *Ilex paraguariensis* (mate). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 30:3119-3131, 2007.

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**, 26:329-336, 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**, 37:1589-1596, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001. 833p.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, 41:237-245, 1981.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, 15:71-81, 2002.

SOKAL, R.R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluation systematic relationships. **University of Kansas Science Bulletin**, 38:1409-1438, 1958.

SOUSA, V.A.; DAROS, T.L.; STURION, J.A. Fenologia reprodutiva de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESSO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL, Nova Prata, 2003. **Anais...** Nova Prata: Prefeitura Municipal/Câmara Municipal de Vereadores/Câmara da Indústria e Comércio, 2003. p. 1-10.

STREIT, N.M.; HECKTHEUER, L.H.R.; CANTO, M.W.; MALLMANN, C.A.; STRECK, L.; PARODI, T.V.; CANTERLE, L.P. Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Chemistry**, 102:560-564, 2007.

STURION, J.A.; CORREA, G.; RESENDE, M.D.V.; CARDOZO JUNIOR, E.L.; DONADUZZI, C.M. **Controle genético dos teores de polifenóis totais, taninos e cafeína em progênes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em três classes de solos.** Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 16p.

STURION, J.A.; RESENDE, M.D.V. Programa de melhoramento genético da erva-mate no Centro Nacional de Pesquisa de Florestas da Embrapa. In: 1º CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE; 2ª REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, Curitiba, 1997. **Anais...** Colombo: Embrapa-CNPf, 1997. p.285-297.

STURION, J.A.; RESENDE, M.D.V. **Comparação da produção de massa foliar entre clones de erva-mate.** Colombo: Embrapa-CNPf, 1999. 4p. (Comunicado Técnico, n. 36).

STURION, J.A.; RESENDE, M.D.V. Produção de massa foliar de três procedências de erva-mate e eficiência de seleção em dois tipos de solos na região de Ponta Grossa, PR. **Boletim de Pesquisa Florestal**, 43:87-98, 2001.

STURION, J.A.; RESENDE, M.D.V. Seleção de progênes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) para produtividade, estabilidade e adaptabilidade temporal de massa foliar. **Boletim de Pesquisa Florestal**, 50:37-51, 2005.

STURION, J.A.; RESENDE, M.D.V.; NEIVERTH, D.D.; OLISZESKI, A. Avaliação genética em teste de progênes de erva-mate por meio de software SELEGEN REML/BLUP. In: 3º CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE; 1ª FEIRA DO AGROCENÓCIO DA ERVA-MATE, Chapecó, 2003. **Anais...** Chapecó: EPAGRI, 2003. p.16-19.

STURION, J.A.; RESENDE, M.D.V.; ULBRICH, A.L. **Estimativas de herdabilidade para peso foliar de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) por ocasião da primeira poda de produção.** Colombo: Embrapa-CNPf, 2002. 3p. (Comunicado Técnico, n. 73).

STURION, J.A.; RESENDE, M.D.V.; ULBRICH, A.L. **Seleção para massa foliar em erva-mate com base no coeficiente de repetibilidade.** Colombo: Embrapa-CNPf, 2000. 3p. (Comunicado Técnico, n.40).

TINGEY, S.V.; RAFALSKY, J.A.; WILLIAMS, J.G.K. Genetic analysis with RAPD markers. In: APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING SYMPOSIUM, Madison, 1993. **Proceedings...** Madison: Crop Science Society of America, 1993. p.3-8.

VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1995. 97p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química).

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento.** Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1992. 496p.

VERONESE, A. **Contribuição ao estudo do mate.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1944. 213p.

VIDOR, M.A.; RUIZ, C.P.; MORENO, S.V.; FLOSS, P.A. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): o sabor. **Ciência Rural**, 32:415-420, 2002a.

VIDOR, M.A.; RUIZ, C.P.; MORENO, S.V.; FLOSS, P.A. Variabilidade genética em um ensaio de progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Ciência Rural**, 32:583-587, 2002b.

WARD, M.; DICK, C.W.; GRIBEL, R.; LEMES, M.; CARON, H.; LOWE, A.J. To self, or not to self... a review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. **Heredity**, 95:246-254, 2005.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 18:7213-7218, 1990.

WENDT, S.N. **Genética de populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. 165p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos).

WENDT, S.N.; SOUZA, V.A.; QUOIRIN, M.; SEBBENN, A.M.; MAZZA, M.C.; STURION, J.A. Caracterização genética de procedências e progênies de *Ilex paraguariensis* St. Hil. utilizando marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, 73:47-53, 2007.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535, 1990.

WINGE, H.; WOLLHEIM, C.; CAVALLI-MOLINA, S.; ASSMANN, E.M.; BASSANI, K.L.L.; AMARAL, M.B.; COELHO, G.C.; FREITAS-SACCHET, A.M.O.; BUTZKE, A.; VALDUGA, A.T.; MARIATH, J.E.A. Variabilidade genética em populações nativas de erva-mate e a implantação de bancos de germoplasma. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E.A.; TARASCONI, L.C. (eds.). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**, Porto Alegre: UFRS, 1995. p.323-345.

XAVIER, K.G. **Divergência genética em clones de *Eucalyptus* avaliada por marcadores RAPD, e variações nas propriedades da madeira**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001. 107p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais e Engenharia Florestal).

YUN, R.; ZHONG, M.; WANG, H.X.; WEI, W.; HU, Z.A.; QIAN, Y.Q. Study on DNA diversity of Liaodong oak population at Dongling mountain region, Beijing. **Acta Botanica Sinica**, 40:169-175, 1998.

ZAMPIER, A.C. **Avaliação dos níveis dos nutrientes, cafeína e taninos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) após adubação e sua relação com a produtividade**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2001. 94p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal).

ZANOELO, E.F; MENIN, J.C.; NASCIMENTO FILHO, I.; CARDOZO JUNIOR, E.L.; CARDOZO FILHO, L. Estudo preliminar para determinação de ácidos clorogênicos na erva-mate. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, Curitiba, 2004. **Anais...** Curitiba: COBEQ, 2004a. p.1-7.

ZANOELO, E.F; MENIN, J.C.; ZARKREZEVSKI, C.; CARDOZO FILHO, L. Influence of operating conditions on the drying of mate (*Ilex paraguariensis*) leaves with superheated steam. In: 14TH INTERNATIONAL DRYING SYMPOSIUM, São Paulo, 2004. **Proceedings...** São Paulo: Drying 2004 (IDS 2004), 2004b. p.1577-1583.

ZANON, A. **Produção de sementes de erva-mate**. Curitiba: Embrapa-CNPQ, 1988. 7p. (Embrapa-CNPQ, Circular Técnica, n.16).

ZHIVOTOVSKY, L.A. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. **Molecular Ecology**, 8:907-913, 1999.

ZIMBACK, L.; MORI, E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; VEIGA, R.F.A.; MELLO JUNIOR, J.R.S. Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* Swartz (*Meliaceae*) por marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, 65:114-119, 2004.

APÊNDICE

Quadro 1A - Matriz de similaridade genética (s_{ij}) entre os 76 acessos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), obtida por meio do Coeficiente Aritmético de Jaccard

Acesso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14
1	0,000	0,360	0,402	0,523	0,538	0,430	0,464	0,520	0,570	0,568	0,526	0,444	0,531
2		0,000	0,518	0,545	0,567	0,404	0,514	0,535	0,575	0,606	0,500	0,563	0,602
3			0,000	0,484	0,500	0,413	0,447	0,485	0,556	0,562	0,568	0,385	0,519
4				0,000	0,232	0,577	0,506	0,613	0,421	0,413	0,660	0,518	0,452
5					0,000	0,589	0,467	0,596	0,344	0,368	0,614	0,470	0,422
6						0,000	0,394	0,371	0,604	0,574	0,396	0,445	0,589
7							0,000	0,408	0,506	0,442	0,546	0,433	0,549
8								0,000	0,620	0,564	0,446	0,458	0,567
9									0,000	0,207	0,667	0,553	0,413
10										0,000	0,623	0,484	0,422
11											0,000	0,419	0,602
12												0,000	0,467
14													0,000
15													
16													
17													
18													
19													
20													
21													
23													
24													
25													
26													
27													
28													

Quadro 1A, Cont.

Acesso	15	16	17	18	19	20	21	23	24	25	26	27	28
1	0,591	0,418	0,436	0,651	0,564	0,538	0,554	0,426	0,583	0,694	0,582	0,665	0,562
2	0,620	0,541	0,571	0,565	0,580	0,566	0,557	0,596	0,624	0,639	0,638	0,629	0,608
3	0,529	0,455	0,471	0,635	0,533	0,516	0,526	0,399	0,553	0,677	0,520	0,635	0,523
4	0,401	0,483	0,482	0,625	0,394	0,418	0,675	0,480	0,406	0,558	0,416	0,545	0,388
5	0,392	0,484	0,462	0,617	0,376	0,419	0,656	0,503	0,351	0,516	0,343	0,488	0,351
6	0,589	0,483	0,535	0,630	0,580	0,586	0,438	0,508	0,665	0,649	0,623	0,620	0,621
7	0,573	0,449	0,405	0,606	0,509	0,538	0,473	0,524	0,571	0,618	0,471	0,522	0,534
8	0,567	0,467	0,514	0,628	0,606	0,614	0,313	0,543	0,647	0,627	0,596	0,568	0,602
9	0,409	0,523	0,517	0,612	0,278	0,419	0,656	0,544	0,359	0,470	0,361	0,462	0,340
10	0,403	0,493	0,490	0,641	0,310	0,420	0,594	0,517	0,426	0,440	0,369	0,400	0,377
11	0,618	0,491	0,541	0,588	0,630	0,630	0,421	0,477	0,679	0,634	0,639	0,592	0,634
12	0,506	0,308	0,363	0,529	0,521	0,532	0,452	0,349	0,509	0,587	0,465	0,516	0,476
14	0,244	0,471	0,458	0,593	0,384	0,453	0,587	0,439	0,436	0,596	0,389	0,477	0,368
15	0,000	0,507	0,525	0,645	0,416	0,432	0,604	0,500	0,427	0,517	0,395	0,477	0,346
16		0,000	0,190	0,562	0,473	0,467	0,525	0,333	0,534	0,626	0,484	0,553	0,467
17			0,000	0,571	0,476	0,474	0,532	0,390	0,500	0,636	0,430	0,534	0,477
18				0,000	0,660	0,611	0,582	0,581	0,598	0,602	0,579	0,549	0,554
19					0,000	0,369	0,652	0,483	0,400	0,532	0,382	0,512	0,331
20						0,000	0,624	0,489	0,433	0,504	0,405	0,551	0,374
21							0,000	0,549	0,648	0,638	0,588	0,545	0,611
23								0,000	0,545	0,667	0,506	0,584	0,458
24									0,000	0,462	0,300	0,464	0,276
25										0,000	0,491	0,452	0,464
26											0,000	0,367	0,203
27												0,000	0,408
28													0,000

Quadro 1A, Cont.

Acesso	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	41	42
1	0,518	0,549	0,439	0,452	0,497	0,547	0,537	0,443	0,490	0,488	0,524	0,429	0,486
2	0,594	0,615	0,598	0,579	0,574	0,583	0,610	0,561	0,585	0,606	0,576	0,546	0,602
3	0,474	0,511	0,403	0,375	0,448	0,525	0,534	0,397	0,441	0,406	0,540	0,414	0,395
4	0,256	0,285	0,428	0,421	0,411	0,349	0,370	0,382	0,463	0,410	0,333	0,459	0,460
5	0,221	0,248	0,465	0,421	0,431	0,352	0,402	0,358	0,434	0,384	0,338	0,457	0,411
6	0,584	0,581	0,539	0,497	0,542	0,572	0,638	0,521	0,536	0,556	0,599	0,533	0,553
7	0,486	0,489	0,459	0,381	0,462	0,491	0,509	0,408	0,494	0,401	0,506	0,471	0,481
8	0,608	0,598	0,559	0,517	0,552	0,591	0,627	0,528	0,535	0,528	0,634	0,533	0,521
9	0,331	0,369	0,512	0,477	0,461	0,442	0,479	0,429	0,473	0,438	0,429	0,497	0,479
10	0,373	0,372	0,506	0,440	0,481	0,412	0,494	0,412	0,461	0,423	0,429	0,483	0,481
11	0,655	0,663	0,596	0,574	0,570	0,634	0,680	0,545	0,545	0,591	0,650	0,577	0,596
12	0,489	0,491	0,377	0,360	0,392	0,484	0,549	0,324	0,372	0,383	0,537	0,421	0,390
14	0,398	0,417	0,461	0,443	0,465	0,424	0,455	0,389	0,427	0,450	0,451	0,463	0,454
15	0,348	0,357	0,506	0,491	0,531	0,381	0,444	0,435	0,447	0,468	0,377	0,503	0,513
16	0,465	0,461	0,357	0,399	0,403	0,507	0,469	0,399	0,422	0,388	0,490	0,408	0,406
17	0,455	0,457	0,349	0,416	0,406	0,503	0,475	0,406	0,409	0,306	0,500	0,392	0,416
18	0,616	0,620	0,500	0,560	0,511	0,563	0,630	0,582	0,604	0,596	0,616	0,573	0,625
19	0,372	0,400	0,497	0,452	0,435	0,463	0,463	0,403	0,457	0,423	0,451	0,481	0,453
20	0,364	0,394	0,477	0,449	0,481	0,451	0,461	0,428	0,484	0,465	0,458	0,459	0,490
21	0,649	0,632	0,567	0,524	0,560	0,570	0,628	0,536	0,543	0,563	0,626	0,563	0,582
23	0,481	0,519	0,381	0,413	0,417	0,527	0,540	0,394	0,450	0,432	0,544	0,460	0,486
24	0,301	0,356	0,486	0,416	0,435	0,426	0,471	0,411	0,474	0,441	0,441	0,461	0,462
25	0,497	0,509	0,656	0,593	0,608	0,493	0,553	0,580	0,629	0,614	0,540	0,603	0,609
26	0,313	0,320	0,451	0,361	0,399	0,380	0,427	0,380	0,429	0,363	0,395	0,488	0,471
27	0,489	0,464	0,573	0,481	0,503	0,433	0,549	0,519	0,553	0,503	0,519	0,561	0,550
28	0,269	0,327	0,471	0,408	0,418	0,389	0,418	0,393	0,449	0,434	0,415	0,482	0,491

Quadro 1A, Cont.

Acesso	43	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
1	0,490	0,533	0,469	0,516	0,497	0,483	0,487	0,525	0,580	0,570	0,606	0,704	0,557
2	0,610	0,613	0,617	0,632	0,618	0,568	0,541	0,649	0,645	0,648	0,606	0,618	0,604
3	0,442	0,521	0,421	0,452	0,434	0,485	0,515	0,488	0,530	0,519	0,558	0,694	0,513
4	0,473	0,357	0,460	0,408	0,428	0,342	0,323	0,426	0,467	0,385	0,444	0,593	0,549
5	0,388	0,360	0,383	0,353	0,374	0,294	0,306	0,361	0,411	0,333	0,494	0,597	0,463
6	0,565	0,634	0,542	0,585	0,566	0,575	0,570	0,621	0,632	0,661	0,571	0,667	0,575
7	0,503	0,524	0,465	0,428	0,429	0,470	0,454	0,491	0,533	0,513	0,576	0,632	0,424
8	0,554	0,632	0,545	0,548	0,538	0,574	0,596	0,636	0,656	0,645	0,570	0,651	0,484
9	0,464	0,420	0,436	0,428	0,429	0,404	0,377	0,370	0,401	0,331	0,503	0,605	0,531
10	0,481	0,464	0,452	0,415	0,400	0,446	0,425	0,364	0,369	0,352	0,405	0,621	0,514
11	0,596	0,702	0,584	0,621	0,610	0,633	0,626	0,669	0,655	0,711	0,615	0,704	0,553
12	0,397	0,545	0,381	0,429	0,411	0,482	0,521	0,467	0,518	0,516	0,514	0,631	0,479
14	0,478	0,462	0,474	0,458	0,467	0,424	0,437	0,409	0,462	0,423	0,425	0,574	0,530
15	0,533	0,481	0,528	0,473	0,491	0,434	0,382	0,429	0,452	0,414	0,323	0,590	0,539
16	0,432	0,530	0,426	0,446	0,436	0,477	0,476	0,519	0,540	0,521	0,558	0,670	0,462
17	0,421	0,518	0,406	0,374	0,386	0,455	0,458	0,486	0,535	0,476	0,553	0,637	0,429
18	0,592	0,586	0,600	0,624	0,615	0,569	0,580	0,639	0,655	0,669	0,598	0,229	0,591
19	0,448	0,451	0,435	0,439	0,422	0,435	0,409	0,372	0,363	0,362	0,500	0,638	0,534
20	0,503	0,438	0,509	0,473	0,464	0,430	0,392	0,491	0,459	0,464	0,500	0,602	0,536
21	0,582	0,615	0,586	0,574	0,573	0,564	0,587	0,629	0,649	0,661	0,622	0,646	0,480
23	0,483	0,536	0,479	0,434	0,425	0,513	0,516	0,447	0,506	0,512	0,515	0,667	0,540
24	0,448	0,395	0,423	0,448	0,457	0,361	0,401	0,403	0,415	0,311	0,534	0,603	0,563
25	0,609	0,586	0,615	0,616	0,599	0,538	0,551	0,567	0,558	0,559	0,538	0,622	0,612
26	0,475	0,387	0,457	0,388	0,398	0,353	0,355	0,289	0,319	0,236	0,521	0,610	0,494
27	0,560	0,528	0,564	0,520	0,512	0,463	0,503	0,485	0,471	0,458	0,525	0,586	0,530
28	0,468	0,387	0,462	0,415	0,425	0,331	0,354	0,317	0,316	0,291	0,490	0,639	0,559

Quadro 1A, Cont.

Acesso	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69
1	0,479	0,507	0,583	0,569	0,558	0,535	0,541	0,519	0,516	0,539	0,571	0,676	0,540
2	0,560	0,577	0,631	0,612	0,612	0,595	0,636	0,602	0,589	0,625	0,646	0,598	0,565
3	0,462	0,449	0,568	0,556	0,525	0,506	0,485	0,509	0,524	0,503	0,527	0,653	0,545
4	0,454	0,488	0,396	0,381	0,515	0,455	0,468	0,338	0,356	0,478	0,436	0,719	0,415
5	0,406	0,442	0,353	0,325	0,448	0,444	0,449	0,321	0,329	0,451	0,436	0,690	0,321
6	0,514	0,531	0,636	0,651	0,574	0,615	0,610	0,563	0,587	0,606	0,650	0,634	0,623
7	0,373	0,424	0,513	0,541	0,490	0,538	0,548	0,491	0,482	0,506	0,545	0,631	0,539
8	0,504	0,500	0,609	0,641	0,532	0,616	0,609	0,590	0,604	0,588	0,648	0,608	0,641
9	0,473	0,514	0,315	0,313	0,488	0,469	0,433	0,406	0,417	0,417	0,454	0,625	0,281
10	0,450	0,468	0,353	0,361	0,470	0,477	0,432	0,400	0,447	0,433	0,465	0,664	0,385
11	0,530	0,561	0,653	0,665	0,618	0,652	0,641	0,645	0,654	0,650	0,682	0,641	0,643
12	0,385	0,384	0,521	0,537	0,464	0,473	0,463	0,469	0,512	0,437	0,500	0,661	0,522
14	0,506	0,436	0,326	0,329	0,453	0,470	0,444	0,390	0,428	0,437	0,457	0,593	0,408
15	0,525	0,465	0,322	0,318	0,464	0,480	0,463	0,355	0,397	0,474	0,477	0,639	0,430
16	0,381	0,414	0,520	0,519	0,514	0,481	0,463	0,476	0,466	0,487	0,527	0,648	0,493
17	0,324	0,346	0,481	0,494	0,455	0,468	0,465	0,506	0,485	0,430	0,484	0,667	0,485
18	0,577	0,598	0,629	0,624	0,588	0,511	0,604	0,660	0,619	0,589	0,582	0,578	0,578
19	0,467	0,482	0,361	0,335	0,536	0,468	0,417	0,412	0,429	0,446	0,473	0,654	0,295
20	0,444	0,452	0,412	0,388	0,490	0,438	0,451	0,417	0,383	0,443	0,463	0,603	0,290
21	0,522	0,528	0,610	0,642	0,541	0,597	0,591	0,623	0,595	0,570	0,634	0,576	0,656
23	0,424	0,448	0,510	0,519	0,527	0,489	0,450	0,497	0,526	0,475	0,503	0,642	0,493
24	0,457	0,463	0,350	0,302	0,452	0,400	0,409	0,337	0,374	0,367	0,363	0,647	0,314
25	0,601	0,596	0,507	0,530	0,554	0,551	0,556	0,516	0,541	0,545	0,576	0,626	0,493
26	0,383	0,420	0,312	0,324	0,425	0,443	0,364	0,365	0,357	0,350	0,355	0,655	0,323
27	0,497	0,512	0,404	0,467	0,473	0,560	0,544	0,497	0,485	0,491	0,549	0,678	0,471
28	0,459	0,483	0,361	0,311	0,491	0,421	0,392	0,327	0,345	0,377	0,381	0,603	0,287

Quadro 1A, Cont.

Acesso	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
1	0,553	0,588	0,587	0,545	0,553	0,582	0,571	0,535	0,575	0,527	0,558
2	0,568	0,629	0,633	0,607	0,606	0,625	0,634	0,636	0,612	0,576	0,618
3	0,503	0,543	0,529	0,491	0,541	0,528	0,523	0,506	0,560	0,500	0,512
4	0,399	0,428	0,425	0,414	0,425	0,388	0,435	0,426	0,494	0,377	0,386
5	0,340	0,444	0,417	0,423	0,369	0,324	0,444	0,361	0,454	0,321	0,319
6	0,625	0,642	0,654	0,611	0,640	0,647	0,621	0,621	0,572	0,613	0,634
7	0,542	0,505	0,500	0,460	0,551	0,514	0,464	0,482	0,487	0,518	0,523
8	0,632	0,609	0,615	0,618	0,671	0,629	0,602	0,620	0,571	0,623	0,641
9	0,327	0,446	0,442	0,450	0,348	0,361	0,472	0,427	0,465	0,300	0,306
10	0,413	0,447	0,437	0,439	0,430	0,403	0,459	0,415	0,428	0,357	0,346
11	0,629	0,692	0,700	0,663	0,679	0,669	0,684	0,649	0,603	0,646	0,665
12	0,500	0,500	0,503	0,489	0,521	0,483	0,520	0,485	0,470	0,497	0,526
14	0,400	0,466	0,478	0,444	0,418	0,389	0,448	0,399	0,438	0,347	0,376
15	0,411	0,475	0,484	0,468	0,397	0,379	0,473	0,385	0,390	0,374	0,365
16	0,507	0,527	0,529	0,478	0,510	0,497	0,493	0,487	0,504	0,503	0,513
17	0,463	0,475	0,471	0,409	0,503	0,448	0,412	0,440	0,500	0,476	0,491
18	0,563	0,595	0,603	0,574	0,624	0,553	0,632	0,633	0,680	0,600	0,598
19	0,329	0,440	0,436	0,417	0,350	0,401	0,429	0,382	0,429	0,297	0,319
20	0,317	0,454	0,450	0,422	0,362	0,375	0,435	0,435	0,526	0,326	0,329
21	0,615	0,618	0,631	0,584	0,656	0,622	0,594	0,620	0,581	0,638	0,634
23	0,490	0,491	0,500	0,459	0,510	0,503	0,528	0,484	0,538	0,458	0,490
24	0,356	0,344	0,335	0,365	0,206	0,159	0,394	0,307	0,429	0,342	0,335
25	0,520	0,576	0,576	0,584	0,474	0,462	0,584	0,531	0,500	0,536	0,500
26	0,337	0,337	0,310	0,301	0,265	0,230	0,320	0,289	0,371	0,329	0,327
27	0,461	0,508	0,527	0,471	0,447	0,427	0,503	0,476	0,415	0,490	0,482
28	0,325	0,381	0,380	0,356	0,216	0,247	0,376	0,307	0,370	0,312	0,305

Quadro 1A, Cont.

Acesso	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	41	42
29	0,000	0,139	0,404	0,351	0,407	0,309	0,359	0,355	0,437	0,372	0,325	0,423	0,434
30		0,000	0,413	0,379	0,435	0,284	0,358	0,383	0,456	0,398	0,301	0,452	0,453
31			0,000	0,255	0,287	0,429	0,439	0,297	0,358	0,308	0,484	0,361	0,397
32				0,000	0,236	0,372	0,470	0,184	0,309	0,325	0,448	0,322	0,349
33					0,000	0,463	0,463	0,203	0,317	0,373	0,506	0,343	0,358
34						0,000	0,268	0,391	0,475	0,457	0,212	0,430	0,491
35							0,000	0,424	0,512	0,466	0,237	0,500	0,518
36								0,000	0,196	0,313	0,420	0,326	0,320
37									0,000	0,271	0,509	0,357	0,338
38										0,000	0,472	0,409	0,352
39											0,000	0,468	0,533
41												0,000	0,241
42													0,000
43													
45													
46													
47													
48													
49													
50													
51													
52													
53													
54													
55													
56													

Quadro 1A, Cont.

Acesso	43	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
29	0,429	0,327	0,385	0,369	0,361	0,252	0,264	0,349	0,424	0,314	0,494	0,608	0,517
30	0,457	0,325	0,413	0,386	0,379	0,236	0,259	0,394	0,460	0,366	0,478	0,600	0,512
31	0,404	0,456	0,369	0,406	0,398	0,420	0,432	0,480	0,555	0,478	0,553	0,594	0,473
32	0,388	0,429	0,351	0,391	0,353	0,354	0,396	0,380	0,449	0,413	0,535	0,605	0,455
33	0,377	0,450	0,333	0,370	0,372	0,414	0,455	0,418	0,479	0,448	0,569	0,587	0,487
34	0,476	0,301	0,494	0,456	0,457	0,240	0,217	0,418	0,479	0,440	0,479	0,595	0,516
35	0,512	0,301	0,500	0,474	0,492	0,298	0,265	0,456	0,497	0,448	0,540	0,619	0,544
36	0,336	0,408	0,297	0,316	0,335	0,344	0,377	0,350	0,425	0,381	0,503	0,629	0,426
37	0,368	0,509	0,331	0,363	0,364	0,445	0,457	0,391	0,472	0,442	0,534	0,637	0,371
38	0,388	0,472	0,342	0,275	0,268	0,421	0,424	0,399	0,481	0,387	0,536	0,629	0,307
39	0,518	0,297	0,503	0,471	0,489	0,247	0,146	0,424	0,466	0,410	0,517	0,600	0,551
41	0,266	0,458	0,290	0,355	0,314	0,400	0,413	0,454	0,515	0,481	0,552	0,596	0,455
42	0,143	0,488	0,153	0,283	0,275	0,442	0,463	0,436	0,488	0,464	0,560	0,625	0,401
43	0,000	0,463	0,135	0,282	0,274	0,428	0,458	0,423	0,482	0,452	0,580	0,619	0,440
45		0,000	0,447	0,453	0,454	0,163	0,228	0,416	0,467	0,384	0,536	0,578	0,550
46			0,000	0,258	0,238	0,400	0,442	0,402	0,463	0,425	0,584	0,624	0,450
47				0,000	0,087	0,392	0,404	0,359	0,418	0,359	0,525	0,631	0,390
48					0,000	0,402	0,423	0,360	0,428	0,378	0,543	0,642	0,391
49						0,000	0,140	0,400	0,450	0,361	0,516	0,588	0,484
50							0,000	0,402	0,434	0,381	0,497	0,586	0,506
51								0,000	0,227	0,188	0,538	0,659	0,533
52									0,000	0,238	0,536	0,678	0,567
53										0,000	0,564	0,669	0,543
54											0,000	0,517	0,580
55												0,000	0,625
56													0,000

Quadro 1A, Cont.

Acesso	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69
29	0,420	0,427	0,348	0,305	0,433	0,396	0,391	0,203	0,224	0,386	0,372	0,641	0,304
30	0,411	0,428	0,356	0,312	0,443	0,452	0,436	0,196	0,206	0,446	0,432	0,667	0,368
31	0,349	0,359	0,488	0,497	0,468	0,450	0,430	0,442	0,452	0,442	0,444	0,645	0,491
32	0,300	0,354	0,423	0,429	0,420	0,382	0,386	0,400	0,398	0,361	0,393	0,631	0,432
33	0,320	0,395	0,444	0,439	0,431	0,409	0,405	0,458	0,455	0,389	0,393	0,675	0,423
34	0,437	0,454	0,340	0,392	0,471	0,441	0,424	0,316	0,303	0,418	0,456	0,641	0,436
35	0,466	0,518	0,425	0,420	0,545	0,471	0,452	0,400	0,291	0,472	0,464	0,640	0,465
36	0,295	0,322	0,397	0,392	0,419	0,383	0,356	0,381	0,395	0,333	0,349	0,638	0,386
37	0,322	0,288	0,443	0,459	0,392	0,416	0,398	0,461	0,485	0,382	0,405	0,669	0,472
38	0,274	0,253	0,435	0,435	0,390	0,440	0,404	0,436	0,442	0,381	0,427	0,685	0,424
39	0,463	0,515	0,389	0,368	0,534	0,468	0,467	0,344	0,252	0,451	0,461	0,651	0,436
41	0,324	0,313	0,465	0,455	0,429	0,379	0,421	0,437	0,463	0,395	0,436	0,639	0,465
42	0,329	0,306	0,463	0,456	0,377	0,386	0,373	0,457	0,482	0,398	0,401	0,648	0,475
43	0,359	0,359	0,463	0,460	0,373	0,356	0,360	0,462	0,503	0,365	0,398	0,643	0,460
45	0,453	0,506	0,405	0,380	0,524	0,455	0,440	0,346	0,255	0,424	0,427	0,643	0,410
46	0,327	0,344	0,447	0,429	0,378	0,354	0,350	0,413	0,452	0,360	0,365	0,656	0,453
47	0,333	0,323	0,418	0,417	0,325	0,382	0,384	0,431	0,441	0,322	0,328	0,664	0,441
48	0,325	0,294	0,432	0,426	0,327	0,380	0,357	0,432	0,450	0,304	0,339	0,669	0,433
49	0,407	0,453	0,378	0,345	0,470	0,413	0,415	0,299	0,207	0,382	0,394	0,618	0,373
50	0,400	0,456	0,355	0,327	0,482	0,426	0,427	0,286	0,196	0,402	0,414	0,612	0,372
51	0,422	0,466	0,369	0,370	0,445	0,441	0,313	0,396	0,413	0,329	0,363	0,676	0,373
52	0,473	0,523	0,415	0,409	0,524	0,500	0,404	0,446	0,444	0,434	0,436	0,677	0,375
53	0,443	0,474	0,317	0,296	0,481	0,469	0,372	0,393	0,383	0,349	0,328	0,699	0,353
54	0,571	0,520	0,469	0,471	0,541	0,538	0,562	0,480	0,529	0,560	0,552	0,639	0,527
55	0,643	0,627	0,627	0,593	0,575	0,598	0,639	0,602	0,598	0,646	0,639	0,657	0,575
56	0,289	0,290	0,503	0,557	0,411	0,503	0,503	0,545	0,533	0,467	0,536	0,626	0,538

Quadro 1A, Cont.

Acesso	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
29	0,337	0,389	0,371	0,375	0,298	0,293	0,403	0,310	0,429	0,285	0,268
30	0,356	0,423	0,404	0,410	0,335	0,310	0,403	0,357	0,420	0,325	0,315
31	0,475	0,486	0,481	0,448	0,479	0,451	0,488	0,480	0,567	0,456	0,486
32	0,420	0,393	0,417	0,368	0,417	0,380	0,436	0,399	0,446	0,409	0,396
33	0,410	0,393	0,418	0,377	0,436	0,408	0,418	0,437	0,477	0,403	0,435
34	0,420	0,473	0,476	0,434	0,417	0,370	0,483	0,389	0,427	0,392	0,377
35	0,430	0,464	0,452	0,415	0,407	0,418	0,418	0,446	0,477	0,403	0,425
36	0,362	0,363	0,381	0,333	0,418	0,389	0,416	0,387	0,442	0,320	0,374
37	0,453	0,441	0,446	0,436	0,467	0,429	0,494	0,458	0,471	0,419	0,446
38	0,437	0,419	0,366	0,370	0,433	0,399	0,399	0,417	0,523	0,402	0,414
39	0,417	0,478	0,465	0,430	0,414	0,386	0,452	0,415	0,474	0,388	0,393
41	0,428	0,472	0,467	0,459	0,472	0,443	0,491	0,435	0,497	0,424	0,432
42	0,449	0,455	0,443	0,451	0,464	0,453	0,464	0,446	0,487	0,429	0,424
43	0,463	0,459	0,447	0,446	0,459	0,449	0,477	0,441	0,509	0,441	0,429
45	0,397	0,436	0,432	0,431	0,434	0,424	0,480	0,453	0,522	0,390	0,394
46	0,440	0,424	0,409	0,419	0,442	0,442	0,450	0,409	0,487	0,403	0,413
47	0,417	0,383	0,372	0,339	0,432	0,414	0,378	0,368	0,451	0,387	0,376
48	0,427	0,384	0,382	0,360	0,433	0,415	0,407	0,389	0,461	0,413	0,395
49	0,371	0,412	0,410	0,389	0,370	0,363	0,428	0,391	0,437	0,342	0,359
50	0,353	0,449	0,429	0,391	0,372	0,365	0,430	0,393	0,449	0,329	0,352
51	0,387	0,354	0,344	0,308	0,355	0,368	0,357	0,253	0,327	0,301	0,325
52	0,399	0,436	0,433	0,386	0,356	0,398	0,435	0,348	0,383	0,349	0,376
53	0,366	0,319	0,320	0,339	0,309	0,313	0,357	0,330	0,425	0,291	0,290
54	0,497	0,557	0,556	0,527	0,556	0,533	0,553	0,516	0,504	0,493	0,497
55	0,571	0,615	0,630	0,633	0,650	0,590	0,650	0,650	0,700	0,591	0,590
56	0,522	0,544	0,522	0,491	0,568	0,512	0,524	0,533	0,562	0,532	0,547

Quadro 1A, Cont.

Acesso	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69
57	0,000	0,180	0,452	0,460	0,361	0,381	0,399	0,433	0,440	0,383	0,433	0,654	0,440
58		0,000	0,460	0,492	0,303	0,416	0,407	0,450	0,483	0,373	0,404	0,646	0,485
59			0,000	0,164	0,441	0,458	0,444	0,367	0,359	0,358	0,394	0,648	0,305
60				0,000	0,465	0,407	0,421	0,311	0,309	0,380	0,384	0,642	0,292
61					0,000	0,299	0,361	0,457	0,491	0,314	0,381	0,639	0,478
62						0,000	0,276	0,443	0,460	0,291	0,314	0,576	0,471
63							0,000	0,439	0,428	0,242	0,282	0,667	0,420
64								0,000	0,201	0,441	0,429	0,652	0,406
65									0,000	0,439	0,441	0,642	0,373
66										0,000	0,187	0,623	0,404
67											0,000	0,627	0,452
68												0,000	0,639
69													0,000
70													
71													
72													
73													
74													
75													
76													
77													
78													
79													
80													

Quadro 1A, Cont.

Acesso	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
57	0,424	0,433	0,421	0,400	0,449	0,393	0,440	0,431	0,471	0,434	0,474
58	0,479	0,448	0,436	0,435	0,491	0,410	0,466	0,448	0,506	0,479	0,489
59	0,285	0,365	0,366	0,354	0,342	0,292	0,403	0,338	0,388	0,236	0,242
60	0,253	0,375	0,356	0,369	0,309	0,284	0,389	0,331	0,433	0,179	0,191
61	0,497	0,409	0,425	0,441	0,473	0,416	0,473	0,436	0,456	0,465	0,470
62	0,465	0,366	0,399	0,389	0,410	0,375	0,441	0,438	0,487	0,430	0,409
63	0,431	0,331	0,341	0,353	0,400	0,383	0,420	0,392	0,438	0,375	0,408
64	0,388	0,426	0,403	0,427	0,366	0,359	0,457	0,333	0,429	0,325	0,304
65	0,333	0,432	0,404	0,410	0,344	0,357	0,440	0,375	0,440	0,289	0,302
66	0,415	0,270	0,310	0,291	0,394	0,331	0,368	0,349	0,421	0,380	0,402
67	0,453	0,198	0,222	0,298	0,407	0,337	0,354	0,390	0,451	0,414	0,405
68	0,637	0,648	0,660	0,647	0,608	0,630	0,639	0,667	0,639	0,623	0,632
69	0,176	0,429	0,408	0,356	0,248	0,290	0,407	0,325	0,443	0,179	0,243
70	0,000	0,427	0,415	0,385	0,289	0,327	0,416	0,346	0,434	0,163	0,221
71		0,000	0,095	0,218	0,389	0,309	0,306	0,372	0,424	0,380	0,388
72			0,000	0,211	0,370	0,301	0,278	0,335	0,447	0,343	0,369
73				0,000	0,355	0,301	0,190	0,277	0,389	0,327	0,373
74					0,000	0,175	0,335	0,283	0,368	0,291	0,302
75						0,000	0,329	0,279	0,391	0,313	0,318
76							0,000	0,264	0,381	0,385	0,393
77								0,000	0,257	0,283	0,294
78									0,000	0,403	0,429
79										0,000	0,156
80											0,000