

***Fundamentos para o manejo de
populações naturais de espinheira-santa,
Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss. (Celastraceae)***

Walter Steenbock

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **Maurício Sedrez dos Reis**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Santa Catarina, para
obtenção do título de Mestre em
Recursos Genéticos Vegetais

FLORIANÓPOLIS
Estado de Santa Catarina – Brasil
Fevereiro - 2003

Àqueles
curandeiros e curandeiras,
pretas e pretos velhos,
benzedoras e rezadores,
pajés, xamãs de todos os tempos,
que trazem da Natureza
intuição, simplicidade, ternura e saber
para a cura.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis, amigo e mestre, pela confiança, estímulo, orientação, valorização e companheirismo, e por apontar e lutar por um caminho viável para a sustentabilidade do uso das florestas tropicais.

Aos professores do programa de pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, especialmente aos professores Afonso Inácio Orth, Ademir Reis, Miguel Pedro Guerra e Rubens Onofre Nodari.

Aos professores Ademir Reis e Paulo Yoshio Kageyama pelas valiosas contribuições ao trabalho, como membros da Comissão Examinadora.

Aos agricultores familiares da comunidade do Butiazinho, Guarapuava, PR, em especial aos amigos Roseli (Tia Rose), Pedro, Ivonele, Everton e Marisele Moreira, pela participação e espírito de pesquisa.

Aos amigos Maria Izabel Radomski, Arnaldo de Oliveira Soares, Cristiano Moreira Raimundo, Diogo Klock, Márcia Hoeltgebaum, Christiane Bittencourt, Leandro Zago da Silva, Gabriela Schmitz Gomes e Aline Sens Duarte, pela grande contribuição nos trabalhos de campo.

A Marianne Christina Scheffer, Maria Beatriz Perecin, Maria Cristina Mazza, Ílio Montanari Jr e novamente a Maria Izabel Radomski, pelas idéias trocadas, especialmente em relação à espinheira-santa.

Ao amigo Adelar Mantovani, mestre na paciente arte da eletroforese de isoenzimas e a todos os amigos do Núcleo de Pesquisas em Florestas Tropicais/UFSC, em especial a Ângelo Puchalski, por estar sempre disponível para assessorias na área da informática.

À Patrícia Flores, pela elaboração das pranchas.

Aos colegas de curso e aos funcionários do Centro de Ciências Agrárias, em especial à Bernadete Ribas, por todo o apoio na secretaria, e à Maria Luisa Peixoto, pelo apoio no laboratório.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

À Fundação RURECO, à Empresa Madeireira Nacional (MANASA S.A.) – na pessoa da amiga Fabiana Maia de Andrade - e ao PRODETAB (Projeto de Desenvolvimento de Tecnologias Agropecuárias para o Brasil), pela possibilidade de utilização das áreas e pelo apoio financeiro.

Aos meus pais – Christlieb e Helga – e irmãos – Roberto e Cristiano – por todo o apoio, guarida, companheirismo e estímulo; pelo exemplo de otimismo e por acreditarem nos meus sonhos, desde sempre. Ao Cristiano também pela ajuda nos trabalhos de campo.

À minha filha, Maria Clara, pelo carinho de sempre e por renovar, a cada dia, minha criança interior e a vontade de lutar por um mundo mais solidário.

E, em especial, à minha companheira Greicy, pela paciência e compreensão das horas que não estivemos juntos; pela cumplicidade, companheirismo e aconchego; por segurar a barra em casa; pelo risco assumido; pelo apoio nos trabalhos de campo; pelas idéias no texto; enfim, por existir, ser o que é e ter decidido construir nossa estrada.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 A espécie.....	5
2.2 Manejo de populações naturais de plantas medicinais em florestas tropicais...	12
2.3 Considerações gerais sobre genética de populações.....	14
2.3 Análise da diversidade genética como contribuição ao manejo de populações naturais.....	21
3. METODOLOGIA	
3.1 Áreas de estudo.....	24
3.2 Caracterização fenotípica das populações estudadas.....	27
3.3 Avaliação do incremento a partir de diferentes intensidades de poda.....	28
3.4 Análise de aspectos da biologia floral e da frequência de tipos florais.....	29
3.5 Análise da diversidade genética.....	30
3.5.1 Eletroforese de isoenzimas.....	30
3.5.2 Análise dos dados	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 Caracterização fenotípica das populações estudadas.....	39
4.2 Avaliação do incremento a partir de diferentes intensidades de poda.....	47
4.3 Análise de aspectos da biologia floral e frequência de tipos florais.....	58
4.4 Análise da diversidade genética.....	64
4.4.1 Eletroforese de isoenzimas.....	64
4.4.2 Frequências alélicas.....	70
4.4.3 Índices de diversidade.....	73
4.4.4 Estrutura genética.....	78
4.4.5 Tamanho efetivo populacional.....	83
4.4.6 Sistema de cruzamento.....	86
5. FUNDAMENTOS PARA O MANEJO.....	92
6. CONCLUSÕES.....	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
8 ANEXOS.....	116

Fundamentos para o manejo de populações naturais de espinheira-santa, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae)

Autor: Walter Steenbock
Orientador: Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis

RESUMO

O manejo sustentável dos recursos naturais é atualmente considerado como uma estratégia eficiente para a manutenção da biodiversidade das florestas, na medida em que pode possibilitar retorno econômico a comunidades rurais, aliado à prática da conservação. Não obstante, grande parte dos recursos vegetais vem sendo explorada sem critérios adequados, fato que pode promover a redução dos remanescentes populacionais e da diversidade genética das espécies de interesse. Este é o caso da espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae), espécie que vem sendo amplamente demandada pelo mercado e que carece de critérios para o manejo sustentável. O presente trabalho teve como objetivo contribuir para a geração destes critérios, através da elucidação de aspectos básicos da ecologia de *M. ilicifolia*, avaliados em duas populações naturais da espécie, localizadas no município de Guarapuava, PR, Brasil. Buscou-se avaliar parâmetros fenotípicos não destrutivos para a estimativa do rendimento foliar em indivíduos de *M. ilicifolia*; avaliar o incremento de biomassa foliar, número de ramos, diâmetro a altura do colo (DAC) e altura após diferentes sistemas de poda (poda total dos ramos, poda de 1/3 dos ramos, ausência de poda) de *M. ilicifolia* em populações naturais; avaliar características da biologia floral de *M. ilicifolia*; analisar a diversidade genética e a taxa de cruzamento da espécie em populações naturais, com base na utilização da técnica de eletroforese de isoenzimas. Verificou-se que indivíduos de *M. ilicifolia* apresentam características distintas em ambientes que apresentam diferentes condições edafoclimáticas. Mesmo considerando

estas diferenças, o número de ramos primários com folhas revelou ser uma característica adequada para a avaliação do rendimento foliar em indivíduos da espécie. A poda total de ramos - até o diâmetro aproximado de 0,5 cm - promoveu efetiva reposição de biomassa, dois anos após a aplicação dos tratamentos de poda, sendo mais eficiente neste sentido do que a poda de 1/3 dos ramos. A análise de aspectos da biologia floral de *M. ilicifolia* em populações naturais sugere que há diferentes estratégias de adaptação relacionadas à estrutura floral e à frequência de tipos florais nas diferentes populações, possivelmente relacionadas às condições de solo e luminosidade. A frequência de tipos florais, por sua vez, apresenta elevada relação com a taxa de cruzamento de *M. ilicifolia* em populações naturais; a espécie apresenta sistema de cruzamento misto, sendo preferencialmente alógama ($Tm_{pop01} = 0,954$; $Tm_{pop02} = 0,729$). Populações naturais de *M. ilicifolia* apresentam maior número médio de alelos por loco ($A_{pop01} = 1,9$; $A_{pop02} = 2,0$), maior heterozigosidade esperada ($He_{pop01} = 0,264$; $He_{pop02} = 0,186$) e maior percentagem de locos polimórficos ($P_{pop01} = 75,0$; $P_{pop02} = 87,5$) do que a média de populações naturais de espécies arbóreas perenes de clima tropical estudadas. Não obstante, suas populações apresentam elevados coeficientes de endogamia ($f_{pop01} = 0,140$; $f_{pop02} = 0,328$), gerados por condicionantes do sistema reprodutivo e pela existência de deriva genética como um componente importante no estabelecimento de indivíduos e das populações. A maior parte da variabilidade genética de *M. ilicifolia* está dentro das populações ($F_{ST} = 0,064$; $G_{ST} = 0,032$). Apesar de haver estruturação significativa, porém baixa, entre as populações naturais estudadas, um elevado valor de fluxo gênico ($Nm = 3,64$) foi obtido entre as populações em estudo. Com base nos resultados das avaliações, propôs-se um método de manejo, o qual visa ser adequado às características dos indivíduos e das populações naturais de *M. ilicifolia*, objetivando sua conservação.

SUMMARY

Sustainable management of natural resources is currently considered an efficient strategy for conservation of biodiversity of the forests. However, many plant resources are being exploited without any criteria, which can reduce plant populations in forest fragments and the genetic diversity of the species. This is the case of espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae), species which has a strong market demand and no criteria for its sustainable management. The objective of this work was to contribute for the establishment of these criteria, by studying some aspects of the ecology of *M. ilicifolia*, in two natural populations located in Guarapuava, PR, Brazil. Phenotypic aspects for estimating the yield of *M. ilicifolia* were studied, and different systems of pruning and its influence on foliar yield, number of branches, diameter (DAC) and high of *M. ilicifolia* in natural populations. Floral biology characteristics, genetic structure and outcrossing rate of the species in natural populations, using the technique of isozymes eletrophoresis, were also studied. The results showed that *M. ilicifolia* presents different morphological characteristics in different environmental conditions. Nevertheless, in any situation, the number of primary branches is a good indicator to estimate the yield. Total pruning promoted an effective foliar reposition, two years after the treatments, being a better strategy than pruning 1/3 of the branches. Floral characteristics of *M. ilicifolia* suggest that there are different strategies concerning the frequency of floral types according to the different soil and light conditions in which the plants are submitted. These different frequencies have also a relationship with the outcrossing rate in natural populations of the species. *M. ilicifolia* presents a mixed mating system, being preferentially allogamic ($Tm_{pop01} = 0,954$; $Tm_{pop02} = 0,729$). Natural populations of *M. ilicifolia* present a higher allelic number ($A_{pop01} = 1,9$; $A_{pop02} = 2,0$), expected heterozigosity ($He_{pop01} = 0,264$; $He_{pop02} = 0,186$) and polimorphic locus rate ($P_{pop01} = 75,0$; $P_{pop02} = 87,5$) than the average values founded in natural populations of tropical tree species. On the other hand, its populations present a high inbreeding coefficient ($f_{pop01} = 0,140$; $f_{pop02} = 0,328$), generated by

the mating systems and by genetic drift, which is an important component in the establishment of plants and populations. The highest part of the genetic diversity occurs within the populations, rather than between them ($F_{ST} = 0,064$; $G_{ST} = 0,032$). There was detected also a high number of migrants per generation ($Nm = 3,64$) in the studied populations. Based on the results, we proposed a managing method, with the objective of maintaining the genetic variability of *M. ilicifolia* populations.

1. Introdução

Atualmente, restam apenas 7,3 % da área original coberta com Mata Atlântica no Brasil (Fundação SOS Mata Atlântica/Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais/Instituto Socioambiental, 1998).

A manutenção destes remanescentes é de grande importância, justificando-se por aspectos econômicos, sociais e culturais, que envolvem desde a regularização de mananciais hídricos e a conservação da biodiversidade até a possibilidade de manejo dos recursos florestais múltiplos (plantas medicinais, frutos, madeira, mel, óleos essenciais, etc.) (Reis, 1996a; Reis e Mariot, 2000).

Para que o ambiente seja conservado, faz-se necessário buscar a parceria das populações que nele vivem. Assim, é importante que o ambiente natural possibilite um retorno econômico, considerando o uso múltiplo dos recursos florestais, em regime de manejo sustentável (Gómez-Pompa *et al.*, 1991; Fantini, 1992; Reis, 1996a).

Em pequenas propriedades rurais, o manejo de populações naturais, praticado de forma sustentável, pode ser promovido em áreas de preservação permanente, tais como matas ciliares, de acordo com o Art. 1º, Inciso V, Alínea b, da Medida Provisória nº 2.166-67, de 24 de agosto de 2001 (Brasil, 2001). O manejo, na medida em que possibilite retorno econômico, pode reduzir a pressão sobre estes ambientes.

Desta forma, o manejo de plantas medicinais nativas surge como uma alternativa capaz de promover um incremento de renda aos produtores, ao mesmo tempo em que pode representar uma opção viável de conservação do ambiente natural, bem como o resgate e a difusão do conhecimento tradicional em torno da prática terapêutica com base nos recursos naturais.

Contudo, a maior parte da flora de tradição medicinal, estimada em 75.000 espécies no mundo, é quimicamente desconhecida e está localizada nas florestas tropicais e subtropicais dos países em desenvolvimento (Farnsworth *et al.*, 1986). O Brasil, considerado

o país de maior biodiversidade, apresenta, dentre as 250.000 espécies vegetais estimadas para o mundo, 60.000 espécies nativas (CENARGEN, 1995).

A indústria de medicamentos fitoterápicos encontra na biodiversidade destas florestas a principal fonte de substâncias para a produção dos mesmos. As vendas destes produtos atingem a cifra de 30 bilhões de dólares anuais, em nível mundial, mercado este em ampla expansão (Sears, 1995; dos Reis, 1999). No Brasil, o mercado anual de fitoterápicos gira em torno de US\$ 260 milhões. De 1999 a 2000, o consumo de medicamentos fitoterápicos aumentou 15 %, enquanto o mercado de medicamentos sintéticos cresceu apenas 3 a 4 % (Dal Agnol, 2002)

Entre as espécies medicinais da Mata Atlântica, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. é uma das mais demandadas pelo mercado, fato que vem aumentando a pressão sobre suas populações naturais. Esta pressão é ainda mais facilmente entendida quando se comparam os preços pagos aos extratores por quilo de folhas da espécie e os preços que chegam ao consumidor final. Enquanto um extrator recebe de R\$ 2,50 a R\$ 12,00/Kg de folhas secas (Montanari Jr., 1999; Scheffer, 2001), nos grandes centros urbanos embalagens de 30g de folhas secas da espécie chegam a custar R\$ 4,30, ou seja, um valor de aproximadamente R\$ 140,00/Kg (CERCCOPA, 2001). Na rede mundial de computadores – “internet” – é fácil encontrar endereços eletrônicos de empresas nacionais e internacionais comercializando folhas secas e subprodutos de espinheira-santa, geralmente referenciada como *M. ilicifolia*. A empresa norte-americana *Raintree Nutrition Inc*, por exemplo, oferece embalagens com 50 cápsulas (650 mg cada) de pó de folhas de espinheira-santa por U\$ 25,00 (www.herbaladvisor.com) – neste “site”, é possível encontrar oferta de embalagens de cápsulas de espécies nativas do Brasil, tais como cipó cabeludo, chá de bugre, abuta, embaúba e erva-tostão. Estas espécies, surpreendentemente, assim como *M. ilicifolia*, não podem ser legalmente comercializadas como plantas medicinais ou complementos alimentares no Brasil (Brasil, 2000); o laboratório italiano Bionatus

(www.e2mila.com/BRASILNATURALSHOP), por sua vez, oferece 50 cápsulas de um composto vegetal, no qual a espinheira-santa está incluída, por E 12,39. A empresa alemã Takesun (www.takesun.de/verkaufsliste2000.html) e a empresa australiana Medicine Garden (www.spot.com.au) comercializam folhas secas de espinheira-santa. Esta última oferece 1 Kg de folhas secas da espécie por U\$ 89,60, na seção “Amazon Jungle Herbs”.

Enquanto a demanda por produtos fitoterápicos industrializados cresce, as estatísticas mostram que aproximadamente 80 % da população mundial se utiliza de recursos naturais para o tratamento das doenças (Farnsworth *et al.*, 1985). No Brasil, 60 milhões de pessoas não têm acesso à maior parte dos medicamentos industrializados, apesar do país gastar aproximadamente 8 bilhões de dólares em medicamentos por ano (Carriconde, 2000). Aqui, apenas 20 % da população consome aproximadamente 63 % dos medicamentos disponíveis (Di Stasi, 1996). No município de Guarapuava, PR, onde foi realizado o presente estudo, 87 % da população de classe média baixa se utiliza de plantas medicinais para o tratamento de patologias primárias, antes de recorrer ao atendimento médico (Steenbock, 1999). Especificamente para o tratamento de problemas gástricos, 89 % desta população recorre às plantas medicinais, especialmente à espinheira-santa (Steenbock, 1999) – não somente *M. ilicifolia*, mas também *M. aquifolia*, *Zolernia aquifolia* e *Sorocea bomplandii*. Portanto, enquanto a indústria de medicamentos se esmera em produzir medicamentos caros para poucos, a medicina popular, clandestina e imprescindível, parece ser efetiva para o tratamento da maior parte da população.

De acordo com levantamentos recentes (Battistelli *et al.*, 2001), na região central do Paraná é grande a ocorrência natural de espécies de uso medicinal. Nessa região, as formações florestais são representadas pela Floresta Ombrófila Mista (FOM) – as Florestas com Araucária – componente da Floresta Atlântica.

Desde 1999, vem sendo desenvolvido na região o *Projeto Florestas Mediciniais* (RURECO, 1998; Steenbock, 2000), coordenado pela Fundação RURECO, organização não

governamental que assessora tecnicamente agricultores e suas organizações na área de agroecologia. O projeto vem implementando, de forma multi-institucional, uma cadeia de produção de plantas medicinais desenvolvida de forma a buscar a sustentabilidade ambiental, junto a agricultores familiares da região, associada a um processo de resgate e difusão da medicina popular e da fitoterapia.

Entre as espécies produzidas pelos agricultores envolvidos, encontra-se *M. ilicifolia*. Para fundamentar estratégias de manejo para a espécie, tanto na região quanto em outras áreas de Floresta Ombrófila Mista, faz-se necessário o desenvolvimento do conhecimento acerca de sua autoecologia.

Além disso, em reunião técnica entre pesquisadores de plantas medicinais, em âmbito nacional, *M. ilicifolia* e *M. aquifolia* foram selecionadas como prioritárias para a realização de estudos de conservação e manejo, no ecossistema Mata Atlântica (EMBRAPA/IBAMA, 2001). Estudos envolvendo a elucidação de aspectos do sistema reprodutivo, diversidade genética, dinâmica de populações e cadeia produtiva, bem como ações de coleta de germoplasma, foram considerados de maior prioridade, nesta reunião. O presente trabalho procurou, portanto, contribuir em alguns pontos colocados como prioritários para a geração de critérios de conservação e manejo de *M. ilicifolia*, tendo como objetivo geral elucidar aspectos básicos da ecologia da espécie. Os objetivos específicos foram:

- Avaliar parâmetros fenotípicos não destrutivos para a estimativa do rendimento foliar em indivíduos de *M. ilicifolia* em populações naturais;
- Avaliar o incremento de biomassa foliar, número de ramos, diâmetro a altura do colo (DAC) e altura após diferentes sistemas de poda de *M. ilicifolia* em populações naturais;
- Analisar aspectos da biologia floral de *M. ilicifolia* em populações naturais;
- Analisar a diversidade genética de populações naturais de *M. ilicifolia*;
- Avaliar o sistema de cruzamento de *M. ilicifolia* em populações naturais.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 – A espécie

Popularmente, algumas espécies são conhecidas como espinheira-santa e comercializadas com este nome, tais como *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., *M. aquifolia* Mart., *Pachystroma illiscifolium* Müll.Arg., *Zollernia* sp. e *Sorocea bomplandii* (Montanari Jr, 2002).

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss., objeto desse estudo, pertence à ordem Celastrales e à família Celastraceae. Segundo Carvalho-Okano (1992), que revisou o gênero *Maytenus* no Brasil extra-amazônico, das 77 espécies deste gênero, apenas 6 são exclusivas ou abundantes na região sub-tropical, dentre as quais *M. ilicifolia*.

A espécie apresenta uso medicinal consagrado. Etnicamente, *M. ilicifolia* tem sido utilizada por comunidades indígenas e rurais da Argentina, Paraguai, Uruguai e da região sul do Brasil, como analgésica, adstringente, anti-úlceras, anti-tumoral, afrodisíaca, contraceptiva e cicatrizante (Alonso, 1998). Sua principal ação, no entanto, tem sido reportada no tratamento de problemas gástricos – especialmente gastrite e úlcera. Para esta finalidade, já em 1922 o Dr. Aluizio França, médico paranaense, receitava a seus pacientes o chá das folhas de espinheira-santa (Stellfeld, 1934).

No início da década de 70, alguns trabalhos demonstraram o efeito anti-neoplásico (Monache, 1972) de *M. ilicifolia* – estes trabalhos, no entanto, não tiveram continuidade. Em 1988, o efeito anti-úlceras gástrica de *M. ilicifolia* foi comprovado por pesquisas da extinta Central de Medicamentos (CEME) (Carlini, 1988), fato que promoveu amplamente a utilização da espécie. Posteriormente, estudos realizados por Souza Formigoni *et al.* (1991) demonstraram que o chá de folhas de *M. ilicifolia* apresenta efeito semelhante à ranitidina e

à cimetidina no tratamento de úlcera gástrica, além de causar incremento do volume e do pH do suco gástrico (Souza Formigoni *et al.*, 1991).

Nos últimos anos, a imprensa (Revista Saúde, fev/2002; Revista Época, jul/1998) vem noticiando o primeiro medicamento produzido integralmente no Brasil, visando o estabelecimento de patente, justamente a base de *M. ilicifolia*. Apesar do “status” adquirido por *M. ilicifolia*, pesquisas recentes vêm demonstrando que outras espécies conhecidas popularmente como espinheira-santa e utilizadas terapeuticamente, bem como outras espécies do gênero *Maytenus*, apresentam ações farmacológicas semelhantes (Gonzalez *et al.*, 2001; Niervo *et al.*, 2001). Estes resultados corroboram a importância e a efetividade do conhecimento popular na utilização de plantas medicinais - 74 % das drogas derivadas de plantas que são hoje utilizadas no mundo têm o mesmo uso ou um uso relacionado ao uso popular das plantas das quais derivaram (Farnsworth, 1988).

De acordo com Carvalho-Okano (1992), *M. ilicifolia* é um sub-arbusto ou árvore, ramificado desde a base, medindo até cerca de cinco metros de altura. Apresenta ramos glabros; estípulas inconspícuas; folhas congestas, coriáceas, glabras, com nervuras proeminentes na face abaxial, forma elíptica ou estreitamente elíptica, base aguda a obtusa, ápice agudo a obtuso, mucronado ou aristado. A margem das folhas pode se apresentar inteira ou com espinhos em número de um a vários, distribuídos regular ou irregularmente no bordo, geralmente concentrados na metade apical de um ou de ambos os semi-limbos. Apresenta inflorescências em fascículos multifloros e frutos do tipo cápsula, bivalvar, orbicular (Carvalho-Okano, 1992). De todas as espécies do gênero *Maytenus*, *M. ilicifolia* é a única que apresenta ramos angulosos tetra ou multicarenados e frutos cujo pericarpo maduro tem coloração vermelho-alaranjada (Carvalho-Okano, 1992), sendo estas características, portanto, importantes para sua identificação (Figura 01).



Figura 01: aspectos das folhas, ramos, flores e frutos de *M. ilicifolia* (A = brotação após poda total; B = brotação na ausência de poda)

M. ilicifolia apresenta flores monóclinas; no entanto, possivelmente estas apresentem comportamento funcional de flores diclinas (Carvalho-Okano, 1992; Scheffer, 2001). Existem flores de estames praticamente sésseis, de coloração pardacenta, adpressos na parede do ovário, o qual se apresenta súpero ou semi-ífero, proeminente (Carvalho-Okano, 1992). Os frutos produzidos a partir dessas flores são numerosos e não apresentam vestígios do perianto na parte apical. Supõe-se que estas flores sejam funcionalmente pistiladas (Carvalho-Okano, 1992). Outras flores se apresentam com estames maiores, de cor amarelo-forte, e com o ovário ífero; provavelmente, estas atuam como doadoras de pólen e atrativas à polinização, uma vez que, na antese, o disco dessas flores secreta néctar (Carvalho-Okano, 1992; Scheffer, 2001).

Calago (1996), citada por Scheffer (2001), observando os visitantes florais da espécie, identificou a presença de pequenas vespas e formigas, que podem atuar como polinizadores ou como simples pilhadoras de néctar.

O florescimento de *M. ilicifolia* começa no início da primavera e permanece durante o verão (Scheffer, 2001). A frutificação ocorre nos meses de novembro, dezembro e janeiro (Carvalho-Okano, 1992; Scheffer e Araujo, 1998). Scheffer e Araujo (1998) observaram a ocorrência de frutos somente em árvores que recebem insolação direta durante pelo menos parte do dia. Segundo estes autores, mesmo recebendo luz direta, nem todos os indivíduos da população frutificam no mesmo ano.

As sementes são de comportamento ortodoxo, perdendo rapidamente a viabilidade quando armazenadas fora da câmara fria. (Scheffer *et al.*, 1994; Rosa, 1994). Quanto à forma de dispersão natural das mesmas, *M. ilicifolia* apresenta síndrome de dispersão zoocórica, especialmente realizada por aves (Tabarelli *et al.*, 1993).

A espécie ocorre predominantemente nos estados da região sul do Brasil e nos países vizinhos (Paraguai, Uruguai e leste da Argentina) (Carvalho-Okano, 1992). *M. ilicifolia* ocorre especialmente no sub-bosque de remanescentes de Floresta Ombrófila Mista. Na Floresta

Ombrófila Densa, a espécie parece ocorrer somente nas porções superiores da Serra do Mar (Klein, 1968; Tabarelli *et al.*, 1993).

Rosa (1994) observou que *M. ilicifolia* é uma planta seletiva esciófila, desenvolvendo-se bem sob luz difusa, no interior de sub-bosques, onde a floresta não é muito densa, bem como a pleno sol. Segundo o mesmo autor, a espécie é seletiva higrófila, preferindo solos úmidos em ambientes ciliares.

Radomski (1998) coloca que nas plantas que crescem a pleno sol, o teor de taninos, polifenóis totais e polifenóis não tanantes é maior do que naquelas que ocorrem em ambientes semi-sombreados, ocorrendo o inverso em relação a teores de nitrogênio, potássio, boro e silício. Bernardi e Wasicki (1959) afirmam ainda que, a pleno sol, as folhas são menores e com menor número de espinhos nas margens.

Em relação à diversidade genética de populações naturais de *M. ilicifolia*, poucos trabalhos foram desenvolvidos. Bittencourt (2000), analisando diferentes populações naturais de *M. ilicifolia*, por meio de marcadores RAPD, identificou que há menores distâncias genéticas entre populações que estão inseridas em paisagens semelhantes, mesmo que geograficamente distantes, se comparado a populações geograficamente mais próximas porém em paisagens com características distintas.

Perecin (2001) avaliou índices de diversidade em cinco populações naturais de *M. aquifolia* e em uma população natural de *M. ilicifolia*. De acordo com os dados obtidos pela autora, *M. ilicifolia* compartilha com *M. aquifolia* grande parte dos alelos, sugerindo que estas espécies podem ser filogeneticamente muito próximas. Na população de *M. ilicifolia* avaliada neste estudo, a autora identificou grande diferença entre as heterozigosidades esperada e observada ($f=0,562$), muito embora haver alta percentagem de locos polimórficos ($P=70,0\%$) e elevado número médio de alelos/loco ($A=2,1$), bem como elevada diversidade genética ($H_E=0,255$) Estes resultados foram obtidos a partir da avaliação das freqüências de 21 alelos em 10 locos alozímicos.

Analisando a diversidade genética e o sistema de cruzamento em populações de progênies de espinheira-santa, Scheffer (2001) verificou uma alta taxa de cruzamento ($T_m=0,996$), comprovando a expressiva alogamia da espécie. A autora obteve também elevada percentagem de locos polimórficos ($P=80,0\%$) e elevadas heterozigosidades esperada ($H_E=0,422$) e observada ($H_O=0,396$), a partir da avaliação de 19 alelos em 5 locos, utilizando a técnica da eletroforese de isoenzimas. Neste trabalho, foi verificado que a maior parte da variabilidade da espécie está dentro, e não entre as populações ($F_{ST}=0,065$).

A baixa estruturação genética entre populações naturais de *M. ilicifolia* é uma característica de espécies que ocorrem em estágios finais de sucessão, de acordo com Hamrick (1983), citado por Kageyama e Lepsch-Cunha (2001). De fato, *M. ilicifolia* é encontrada em sub-bosques de florestas em fase de sucessão secundária tardia ou climática (Carvalho-Okano, 1992; Tabarelli *et al.*, 1993).

No entanto, em plantio de mudas da espécie no interior de capoeirão foi observado um desenvolvimento praticamente nulo das mesmas (Rachwal *et al.*, 2002), o que parece indicar que o estabelecimento das populações não se dê em estágios avançados de sucessão. Possivelmente, o estabelecimento se dê em áreas abertas ou clareiras, apresentando a espécie plasticidade suficiente para a sobrevivência nos estágios mais avançados.

Populações de *M. ilicifolia* ocorrem freqüentemente em ambientes com restrições edáficas, tais como matas ciliares, agrupamentos arbóreos em campos e afloramentos de rochas (Klein, 1968; ITCF, 1985; Cervi *et al.*, 1989; observação pessoal), geralmente em alta densidade e em pequenas áreas (observação pessoal). Radomski (1998) observou a ocorrência de populações de *M. ilicifolia* sobre cambissolo gleico distrófico epieutrófico, cambissolo profundo álico e solo litólico. Na região central do Paraná, a espécie ocorre com freqüência em afloramentos de rochas e solos litólicos, ocupando o dossel da paisagem florestal, em clímax edáfico (observação pessoal). Possivelmente, portanto, a espécie

apresente adaptação á condições de baixa fertilidade natural, pedregosidade e elevada acidez dos solos.

Apesar da elevada densidade observada em algumas populações (observação pessoal), a ocorrência de populações da espécie é pouco freqüente, considerando as estratégias de amostragem geralmente utilizadas. Em 63 levantamentos do componente arbóreo da Mata Atlântica, revisados por Siqueira (1994), *M. ilicifolia* nunca foi relatada.

A raridade das espécies tropicais é classificada por Bawa e Asthon (1991) em quatro níveis: 1. espécies que são uniformemente raras (densidades populacionais pequenas); 2. espécies que são comuns em alguns locais mas raras entre estes locais; 3. espécies localmente endêmicas, representadas por diferentes formas de vida (epífitas, ervas rasteiras, arbustos); 4. espécies que apresentam-se agrupadas, algumas vezes ocorrendo em altas densidades, mas com densidade da população total muito baixa, tornando as populações fragmentadas dentro de ilhas de vários tamanhos – os agrupamentos podem ser muito grandes, como na categoria 2, ou muito pequenos, representados por poucos indivíduos. Possivelmente, *M. ilicifolia* esteja enquadrada nesta última categoria.

As pequenas áreas ocupadas por populações da espécie e sua aparente associação com ambientes de restrição edáfica, bem como a forte ameaça de eliminação dos remanescentes florestais na sua área de ocorrência, provavelmente são fatores que promovem sua classificação como espécie rara e ameaçada de extinção no estado do Paraná (SEMA/GTZ, 1995).

2.2 – Manejo de populações naturais de plantas medicinais em florestas tropicais

O manejo de populações naturais pode ser entendido como a exploração controlada das populações de uma dada espécie, visando a obtenção de um produto direto (palmito, madeira, flores, frutos, etc) ou indireto (metabólitos secundários) (Reis, 1996b). Para que este manejo seja sustentável, deve ser economicamente viável, ecologicamente defensável e socialmente justo (Kageyama, 2000). As estratégias para o manejo devem se basear em informações sobre os componentes da diversidade biológica e em uma participação efetiva das comunidades locais, tanto no planejamento, na implementação e nas decisões que envolvam o acesso aos recursos genéticos nas áreas onde vivem (Lenaud & Lebot, 1997; Arunachalan, 2000), quanto no reconhecimento do direito de se beneficiarem pelo conhecimento e pela própria conservação dos recursos (Brasil, 1999).

Várias organizações governamentais e não governamentais consideram o manejo sustentável dos recursos naturais como uma estratégia eficiente de conservação da biodiversidade das florestas (ICRAF, 1989; IUCN, 1989; BID, 1990; CGIAR, 1990; FAO, 1991; WRI/IUCN/PNUMA, 1991; WRI, 1992; IICA 1993; FAO, 1993; BRASIL 1998).

Neste contexto, diversos autores têm estudado métodos de manejo que visam o rendimento sustentável na utilização de essências florestais. Alguns propõem a exploração e favorecimento de determinadas espécies, outros apresentam modelos baseados na distribuição de classes diamétricas ou produção de biomassa das espécies desejadas, havendo aqueles ainda que sugerem o favorecimento de uma determinada espécie em detrimento da diversidade do ecossistema, de forma a se obter maior retorno econômico (Gómez-Pompa & Burley, 1991).

Fantini *et al.*(1992) propõem um modelo adaptado às condições das florestas tropicais, o qual se fundamenta em dois aspectos: o caráter cíclico da exploração e o equacionamento da exploração de cada espécie individualmente. Em outras palavras, para que o manejo

seja sustentável, este modelo propõe que a retirada de um número de indivíduos (ou parte destes), a cada ciclo de exploração, deve ser reposta pelo próprio dinamismo da espécie (Reis, 1996b). Assim, para atender à exploração contínua, faz-se necessário conhecer aspectos relacionados à demografia, produção de biomassa, capacidade de regeneração, estrutura genética e biologia reprodutiva das espécies a serem manejadas.

A avaliação periódica do incremento de biomassa das espécies de interesse deve ser procedida, visando determinar estratégias como intensidade e intervalo de poda (Reis, 1996a). Para produtos não madeiráveis, esta avaliação deve ser promovida considerando também os indivíduos podados, a fim de se avaliar a reposição de biomassa após a intervenção.

O incremento mencionado deve ser considerado em termos da variável de interesse (associada com o desenvolvimento do órgão da planta a ser explorado). Caso os órgãos de interesse sejam as folhas, a variável pode ser o número de folhas, a matéria seca acumulada, o comprimento dos ramos ou outra variável associada; caso seja a raiz, a variável pode ser o comprimento da raiz; no caso das lianas, onde quase todo o organismo é utilizado, poderia se avaliar o incremento em termos de comprimento do ramo ou matéria seca acumulada (Godoy e Bawa, 1993; Reis e Mariot, 2000).

Neste sentido, no caso de *M.ilicifolia*, na qual os órgãos de interesse são as folhas, a determinação do rendimento foliar de cada indivíduo a partir de características fenotípicas de fácil análise pode ser um parâmetro interessante para o desenvolvimento de estratégias de exploração sustentável. A correlação entre características fenotípicas e rendimento tem sido avaliada, com este objetivo, para o manejo de populações naturais de plantas medicinais (Pavan-Fruehauf, 2000) e de palmiteiro (*Euterpe edulis* Mart.) (Bovi *et al.*, 1991; Fantini *et al.*, 1997).

Não obstante, a garantia de continuidade do processo exploratório e da conservação da biodiversidade não está relacionada somente à manutenção da regeneração e do

incremento de biomassa dos indivíduos da espécie de interesse. A prática do manejo de determinada espécie geralmente promove alterações no tamanho populacional e nos padrões espaciais dos indivíduos dentro de suas populações (Bawa e Krugman, 1990 *apud* Sebben *et al.*, 2000; Murawski, 1995 *apud* Sebben *et al.*, 2000). Estas alterações podem afetar negativamente a estrutura genética das mesmas, através da perda de alelos raros e do aumento da endogamia, elementos estes potencialmente geradores de redução na produtividade e na adaptação das gerações subseqüentes (Sebben *et al.*, 2000).

Vários sistemas de manejo de florestas se baseiam na regeneração natural das espécies exploradas, mas geralmente não se apóiam no conhecimento e monitoramento da diversidade genética, reduzindo assim a biodiversidade e aumentando os níveis de endogamia das populações naturais (Reis, 1996b).

Portanto, para que o manejo seja efetivamente sustentável, faz-se necessário a manutenção da estrutura genética e do dinamismo demográfico de populações naturais, processos nos quais a interação dos indivíduos de interesse com outras espécies animais e vegetais é um ponto de especial importância (Reis, 1996b). Na prática do manejo, o conhecimento destes aspectos deve fundamentar a definição do número e distribuição dos indivíduos em fase reprodutiva que permanecerão - não serão retirados - para dar continuidade à regeneração natural pela produção periódica de sementes (Reis, 1996b; Reis *et al.*, 1997). Neste sentido, é de grande importância a avaliação das forças micro-evolutivas e dos processos ecológicos que estão atuando sobre as populações naturais.

2.3 Considerações gerais sobre genética de populações

A diversidade de uma população, em nível genético, pode ser mensurada por meio da riqueza de alelos e da equitabilidade na freqüência dos mesmos (Frankel *et al.*, 1995). A riqueza alélica pode ser caracterizada pelo número total de alelos presentes na amostra,

bem como pela percentagem de locos polimórficos; a equitabilidade, por sua vez, pode ser estimada pelo coeficiente de diversidade genética (H_E) de Nei (1973):

$$H_E = 1 - \sum p_i^2$$

onde:

H_E = coeficiente de diversidade genética (heterozigosidade esperada)

p_i = freqüência do alelo i

Hamrick e Godt (1990) revisaram 653 estudos que envolveram a obtenção de índices de diversidade para 449 espécies vegetais. Apesar da grande variação destes índices entre as espécies, em média, as mesmas apresentaram coeficiente de diversidade genética (H_E) em torno de 0,15, e 50 % dos locos polimórficos. Espécies perenes, de final de sucessão e polinizadas pelo vento em geral apresentaram os maiores índices.

Em uma população grande, com acasalamento ao acaso (panmixia), as freqüências alélicas e genotípicas devem ser constantes, geração após geração. Esta é a premissa básica do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Futuyma, 1992). No entanto, forças micro-evolutivas podem afastar as populações naturais deste equilíbrio. Desvios da condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg implicam que a população esteja subdividida reprodutivamente em grupos com um certo grau de parentesco (Futuyma, 1992). Uma das formas de caracterizar este desvio é através da comparação entre o número de heterozigotos observado (H_O) em determinada população e a diversidade genética (H_E), esperada caso a mesma esteja em panmixia. Esta comparação pode ser procedida pela estimativa do coeficiente de endogamia de Wright (f) (Wright, 1951):

$$f = (H_E - H_O)/H_E$$

onde:

f = coeficiente de endogamia de Wright

H_E = diversidade genética (heterozigosidade esperada)

H_O = heterozigosidade observada

O coeficiente de endogamia (f) expressa a existência de autofecundação ou de cruzamentos entre aparentados na população. Quanto maior a ocorrência destes fenômenos, menor o número de heterozigotos observado e, conseqüentemente, maior o coeficiente de endogamia. Caso a população tenha um nível de endogamia estável, ao longo das gerações, como conseqüência de características do sistema reprodutivo da espécie, diz-se que a mesma está em equilíbrio de endogamia (Wright, 1951).

No entanto, no coeficiente de endogamia está embutida a atuação de outra força microevolutiva - a deriva genética. Esta força não é condicionada diretamente apenas por características do sistema reprodutivo da espécie, mas sim por variações aleatórias da contribuição de cada indivíduo da população no processo reprodutivo. Futuyma (1992) define a deriva genética como uma flutuação aleatória das freqüências alélicas, que tem como conseqüência a perda e/ou a fixação de alelos. A deriva pode promover a perda de alelos da população e, a longo prazo, pode gerar um aumento da endogamia, em função da maior probabilidade de autofecundação e cruzamento entre indivíduos aparentados (Kageyama *et al.*, 1998). O aumento da endogamia pode afetar a conservação da diversidade genética da população. Sebben *et al.* (2000), referenciando vários autores (Crow e Kimura, 1970; Allard, 1971; Mettler e Gregg, 1973; Geburek, 1986; Falconer e Mackay, 1997) colocam que a endogamia expõe gens deletérios à homozigose, fato que pode promover redução da produtividade, fertilidade, viabilidade das sementes, vigor e adaptação.

Por outro lado, algumas vezes os indivíduos heterozigotos apresentam vantagens adaptativas (“fitness”) e tendem a ser selecionados no processo de recrutamento, reduzindo o coeficiente de endogamia (f). A seleção de heterozigotos entre indivíduos adultos é um fenômeno importante para a conservação da variabilidade genética em populações naturais, e foi detectada em populações de várias espécies arbóreas, revisadas por Sebbenn *et al.* (2001).

Entre populações de uma mesma espécie (subpopulações), as forças micro-evolutivas podem atuar em diferentes intensidades, afetando de formas distintas os coeficientes de endogamia de cada uma. Quando isso ocorre, diz-se que há uma estruturação genética entre as populações, a qual pode ser avaliada por meio das estatísticas-F de Wright (Wright, 1951, 1965), bem como por meio de outros métodos, tais como a análise da diversidade em populações subdivididas (Nei, 1973) e os coeficientes de coancestralidade de Cockerham (Cockerham, 1969).

As estatísticas-F de Wright são medidas do efeito de endogamia em diferentes níveis populacionais: na média de cada subpopulação (F_{IS}), no conjunto das subpopulações (F_{IT}) e entre as subpopulações (F_{ST}). Os coeficientes de coancestralidade (Cockerham, 1969), por sua vez, são obtidos a partir da decomposição das variâncias das freqüências alélicas em cada nível populacional. Estes são definidos como a correlação entre as freqüências alélicas entre indivíduos de um mesmo grupo (θ), a correlação entre alelos de indivíduos de diferentes grupos (F) e a correlação entre alelos de indivíduos dentro de populações (f) (Cockerham, 1969).

A análise da diversidade em populações subdivididas (Nei, 1973) está fundamentada na distribuição da heterozigosidade do conjunto das subpopulações - H_T - entre (D_{ST}) e dentro (H_S) das mesmas. Nesta análise, G_{ST} é a medida da relação entre a heterozigosidade entre as subpopulações (D_{ST}) a heterozigosidade total (H_T).

Apesar de apresentarem características específicas, os coeficientes F_{ST} , G_{ST} e θ são similares, assim como F_{IT} é similar a F e F_{IS} é similar à f .

Quando os valores de F_{ST} , G_{ST} ou θ são elevados, a variação genética entre os grupos populacionais (subpopulações) da espécie é maior do que dentro dos grupos, e diz-se que há uma grande estruturação genética entre os mesmos. Caso estes coeficientes sejam relativamente baixos, a maior parte da variabilidade está dentro de cada subpopulação, e não entre as mesmas. Quando isso ocorre, geralmente existe um elevado fluxo gênico entre as subpopulações, determinado pela polinização e pela dispersão de sementes.

O fluxo gênico pode ser definido como um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam no movimento de alelos de uma população (subpopulação) para outra (Slatkin, 1985). Existe grande associação entre o fluxo gênico e a estrutura genética das populações das espécies arbóreas tropicais, de forma que a distância de vôo dos polinizadores e dispersores de sementes pode prever a variação genética das espécies em questão (Kageyama e Lepsch-Cunha, 2001). Hamrick (1987), citado por Kageyama e Lepsch-Cunha (2001), mostrou que a diversidade genética entre populações (G_{ST}) era crescente no sentido dos agentes polinizadores das espécies em questão, da seguinte forma: morcegos ($G_{ST}=0,021$), abelhas grandes ($G_{ST}=0,035$), abelhas médias ($G_{ST}=0,041$), abelhas pequenas ($G_{ST}=0,062$) e vento ($G_{ST}=0,065$). Hamrick e Loveless (1986) também detectaram diversidades genéticas crescentes entre populações de espécies arbóreas com dispersão de sementes na seguinte ordem: morcegos ($G_{ST}=0,028$), pássaros ($G_{ST}=0,040$) e autopropulsão ($G_{ST}=0,065$). Quanto maior o potencial de vôo do polinizador ou do dispersor das sementes, menor a divergência genética (Kageyama e Lepsch-Cunha, 2001).

O fluxo gênico é a principal força que atua de forma contrária ao efeito de deriva, promovendo o aumento da riqueza alélica e do número de heterozigotos em cada população. Segundo Wright (1951), quando um ou mais indivíduos migram por geração, a divergência entre populações por deriva é impedida.

O fluxo gênico entre subpopulações tende a diminuir a estruturação genética entre as mesmas, e é fortemente determinado pelo sistema de cruzamento da espécie. No entanto, o sistema de cruzamento está intimamente relacionado também com a capacidade de troca alélica dentro de cada população. Uma das formas de avaliar o sistema de cruzamento é por meio da estimativa da taxa de cruzamento (Ritland e Jain, 1981), a qual indica a proporção de cruzamentos alogâmicos que ocorre na população.

Várias populações naturais de espécies arbóreas tropicais têm sido estudadas quanto à taxa de cruzamento, empregando-se em geral modelos multilocos, os quais levam em consideração as combinações genotípicas de todos os locos avaliados (O'Malley e Bawa, 1987; O'Malley *et al.*, 1988; Murawski *et al.*, 1990; Murawski e Hamrick, 1991; Murawski *et al.*, 1994; Murawski e Bawa, 1994; Hall *et al.*, 1994; Reis, 1996c; Scheffer, 2001). O modelo proposto por Ritland e Jain (1981) tem sido amplamente utilizado, e encontra-se disponível no programa MLTR (Ritland, 1997).

Para espécies arbóreas tropicais, os valores das taxas de cruzamento são geralmente elevados, revelando uma alta taxa de alogamia (Reis, 1996b). Esta elevada alogamia, aliada à expressiva diversidade genética estimada para a maioria destas espécies, são fatores que apresentam especial importância, uma vez que a geração posterior poderá apresentar novos recombinantes ou mais recombinantes, permitindo a adaptação a microambientes e a manutenção da dinâmica populacional (Reis, 1996b).

A estimativa do fluxo gênico e da taxa de cruzamento traz uma perspectiva dinâmica aos estudos de estrutura genética em populações naturais (Reis, 1996b). A integração das informações relativas aos níveis de diversidade, distribuição da variabilidade, taxa de cruzamento e fluxo gênico obtidas em diferentes anos e em diferentes populações permite uma caracterização efetiva da dinâmica da movimentação dos alelos em populações naturais (Reis, 1996b).

Quanto maior o fluxo gênico e a taxa de cruzamento, maior tende a ser o tamanho efetivo das populações naturais. O tamanho efetivo (N_e) indica a representatividade genética dentro das populações, sendo inversamente proporcional ao coeficiente de endogamia.

Esta estimativa é máxima em populações idealmente grandes, perfeitamente panmíticas – ou seja, nestas condições o número de indivíduos da população tende a ser o mesmo do tamanho efetivo populacional. No entanto, os efeitos de deriva e endogamia, que geralmente ocorrem em populações naturais, tendem a diminuir a representatividade genética das populações. Assim, o número de indivíduos não endogâmicos que efetivamente participam dos processos reprodutivos em cada geração - tamanho efetivo populacional - geralmente é menor do que o tamanho demográfico da população. Estudos de manejo que levam em conta a conservação da diversidade genética das populações naturais das espécies de interesse vêm propondo a necessidade de conservação de um tamanho efetivo de pelo menos 50 indivíduos na população, os quais devem servir como porta-sementes (Sebben *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 1997). Este número é recomendado para conter os efeitos de endogamia nas populações, consideradas 100 gerações (Kageyama e Lepsch-Cunha, 2001).

O sistema reprodutivo das espécies, o qual é determinante do fluxo gênico e da taxa de cruzamento, é um dos fatores mais diretamente ligados aos níveis de diversidade genética e à sua distribuição dentro e entre populações (Hamrick *et al.*, 1979; Hamrick & Godt, 1990). Neste sistema, a fauna representa um importante papel em ambientes tropicais (Bawa, 1990; Therborgh, 1986), especialmente através da polinização e da dispersão de sementes. Em espécies tropicais, apesar das flores serem em geral hermafroditas, estas normalmente apresentam algum mecanismo de auto-incompatibilidade (Bawa, 1985a, 1985b). As elevadas taxas de cruzamento observadas nestas espécies são consequência principalmente da atuação da fauna no processo de polinização (Bawa, 1990). Em relação à

dispersão das sementes de espécies tropicais, a atuação da fauna também é fundamental. Howe e Smallwood (1982) revisaram diversos estudos relativos à síndrome de dispersão de espécies arbóreas tropicais, revelando que a zoocoria é o principal mecanismo envolvido.

De acordo com o exposto, aspectos ecológicos e genéticos estão profundamente interligados na promoção das forças micro-evolutivas e na definição da estrutura genética de populações naturais. Considerando-se que a conservação da diversidade genética é uma premissa básica do manejo sustentável de populações naturais, o conhecimento da biologia reprodutiva e dos mecanismos micro-evolutivos envolvidos são de grande importância.

2.4 Análise da diversidade genética como contribuição ao manejo de populações naturais

Recentemente, o estudo da genética de populações vêm contribuindo para a fundamentação de propostas de manejo de espécies tropicais.

Reis (1996c) caracterizou a distribuição da variabilidade genética do palmiteiro (*Euterpe edulis*), em nível geográfico local e regional. Os valores de F_{ST} obtidos demonstraram haver baixa divergência entre as populações estudadas, tanto entre progênies quanto entre indivíduos adultos. A avaliação das frequências alélicas e a análise de agrupamento indicaram também uma adequação ao modelo de isolamento por distância, reforçado pelo gradiente altitudinal, como a forma básica da distribuição geográfica da variabilidade genética na espécie (Reis, 1996c; Reis *et al.*, 2000). A estimativa do tamanho efetivo populacional em diferentes populações da espécie possibilitou a indicação da necessidade da manutenção de um número de 60 indivíduos/ha, como porta-sementes, na prática do manejo (Reis *et al.*, 1997).

Moraes (1998), estudando a estrutura genética de *Cryptocarya moschata*, identificou aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, predominantemente, nas populações avaliadas.

A divergência genética foi bastante baixa, ocorrendo no entanto expressivos efeitos de deriva e/ou seleção entre regiões diferentes. A partir da estimativa de tamanho de vizinhança, o autor coloca a necessidade da manutenção de 5 indivíduos/ha, em média, para manter a estrutura genética atual das populações da espécie.

Sebben *et al.* (2000) estudaram os efeitos do manejo tradicional da caixeta (*Tabebuia cassinoides*) sobre a variabilidade genética intrapopulacional e o sistema reprodutivo da espécie, a partir da comparação destes parâmetros entre uma população manejada e uma população não manejada. Os resultados indicaram elevados valores de F_{IS} (0,259) e F_{IT} (0,282), sugerindo forte endogamia nas populações. A divergência genética entre as populações (F_{ST}) foi baixa, indicando que aproximadamente 97 % da variabilidade genética encontra-se dentro das mesmas. Neste estudo, a população manejada apresentou menor quantidade de alelos, menores heterozigosidades observada e esperada, menor percentagem de locos polimórficos, maior coeficiente de endogamia e menor taxa de cruzamento do que na população não manejada, evidenciando os efeitos negativos do manejo sobre a variabilidade genética da espécie. A partir da estimativa do tamanho efetivo populacional, os autores propõem a manutenção de 60 plantas reprodutivas/ha, para que o manejo da espécie seja sustentável.

Auler (2000) caracterizou a estrutura genética de populações naturais de *Araucaria angustifolia* no estado de Santa Catarina. Neste estudo, foi verificada uma baixa divergência genética entre as populações ($F_{ST} = 0,044$) – indicando que a maior parte da variabilidade genética está dentro das populações - e um relativamente elevado fluxo gênico entre as mesmas ($Nm = 5,43$). No entanto, foram encontrados baixos valores de número médio de alelos/loco, percentagem de locos polimórficos e heterozigosidade esperada. Estes índices foram menores nas populações mais degradadas, indicando que a fragmentação e a degradação vêm contribuindo para a alteração da freqüência e da dinâmica dos alelos nas

populações estudadas, e que o manejo da espécie, para ser sustentável, deve levar em conta a conservação da estrutura genética de suas populações.

Mariot *et al.*, 2002, estudando populações naturais de pariparoba (*Piper cernuum*) nos estados de Santa Catarina e São Paulo, identificaram elevada divergência genética entre populações ($F_{ST} = 0,380$) e menor divergência genética entre regiões ($F_{ST} = 0,069$) e entre clareiras da mesma região ($F_{ST} = 0,062$). Foi identificado também um excesso de heterozigotos ($F_{IS} = -0,170$), indicando seleção em favor dos mesmos. Os resultados obtidos e o fato da espécie depender constantemente da formação de clareiras para a manutenção do seu dinamismo, sugerem que o efeito fundador é fortemente responsável pela estruturação das populações. Para o manejo sustentável da espécie, os autores propõem que é fundamental a manutenção de plantas e de ramos reprodutivos nas clareiras durante a prática do mesmo, uma vez que os genótipos ali encontrados e produzidos são responsáveis pela entrada da espécie em novas clareiras, mantendo a dinâmica da movimentação alélica (Mariot *et al.*, 2002)

Estes trabalhos, entre outros, têm gerado informações que fundamentam estratégias de conservação e manejo de populações naturais de espécies tropicais, utilizando a análise da diversidade genética como ferramenta.

3. Metodologia

3.1 - Áreas de estudo

O estudo foi realizado em duas populações naturais de *M. ilicifolia* no município de Guarapuava, região central do Paraná, Brasil.

O município de Guarapuava está localizado no Terceiro Planalto paranaense, a uma altitude média de 1.040 m, em região de domínio da Floresta Ombrófila Mista.

O clima é considerado do tipo Cfb (classificação de Koeppen), com temperatura média anual em torno de 16° C, sendo a temperatura média do mês mais quente inferior a 22° C e do mês mais frio entre 6°C e 8°C. A ocorrência de geadas severas é freqüente – entre 10 e 25 por ano. A precipitação média anual varia entre 1.500 e 1.700 mm e apresenta distribuição praticamente uniforme durante todo o ano.

Uma das populações estudadas - a população 01 - está localizada na Fazenda da Costa, propriedade da Empresa Madeireira Nacional - MANASA S.A. A área fica próxima à comunidade do Butiazinho, distrito da Palmeirinha. Agricultores familiares desta comunidade identificaram a população e solicitaram à MANASA S.A. permissão para extrair folhas de *M. ilicifolia*, para fins comerciais. A solicitação foi acatada, desde que a extração estivesse inserida em um contexto de desenvolvimento de critérios para o manejo sustentável da espécie, com acompanhamento técnico constante. Um projeto específico, articulado entre a MANASA S.A., a Fundação RURECO e os agricultores envolvidos foi desenvolvido, considerando as ações deste estudo. Na implementação deste projeto, considerou-se que na geração de conhecimento, especialmente em relação ao manejo do ambiente florestal, é de fundamental importância o envolvimento do público-alvo (agricultores-extratores) no processo de experimentação, dando desta forma validade e eficácia aos métodos de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) (Chambers *et al*, 1989). Assim, permite-se gerar um

conjunto de tecnologias que seja socialmente apropriado às condições da população local (Carvalho, 1990). Com base nesta premissa, buscou-se implementar ações e discutir resultados deste trabalho com a participação dos agricultores, por meio de estratégias de pesquisa participante (Figura 02).

A população 01 está exposta à intensa luminosidade e apresenta elevada densidade de indivíduos de *M. ilicifolia*, vegetando em reboleiras (ilhas), os quais estão inseridos em uma formação arbustiva-arbórea, de baixo porte, que se desenvolve sobre uma associação de neossolo litólico hístico e afloramento de rocha, em clímax edáfico. Populações de aroeira (*Schinus trebinthifolius*), carqueja (*Baccharis trimera*), vassoura (*Baccharis dracunculifolia*) e outras espécies ocupam o espaço em conjunto com a população de *M. ilicifolia*. A área em que a população 01 ocorre é de aproximadamente 20 ha.

A população 02, por sua vez, está localizada na sede da Fundação RURECO, organização não governamental que atua na área de assessoria em agroecologia junto a agricultores familiares da região. A Fundação RURECO coordena o *Projeto Florestas Medicinais*, citado anteriormente, no qual o presente estudo está inserido. Na sede desta instituição, existe uma área de floresta secundária de aproximadamente 1 ha, no estágio de capoeirão, em cujo interior se desenvolve a população de *M. ilicifolia* em questão. Indivíduos de bugreiro (*Lithraea brasiliensis*), pimenteira (*Cordia curassavica*) e guaçatonga branca (*Casearia decandra*), em um dossel de aproximadamente 10 m de altura, promovem o sombreamento parcial dos indivíduos de *M. ilicifolia*. O solo em que ocorre esta população foi classificado como do tipo cambissolo hálico Tb distrófico.

As duas populações em estudo estão distantes aproximadamente 30 Km entre si. Entre as mesmas, o solo é ocupado por áreas de lavoura, pastagens, estradas, assentamentos humanos e fragmentos florestais.



Figura 02: Participação comunitária nas ações de pesquisa

3.2 – Caracterização fenotípica das populações estudadas

Em cada população, foram identificados e marcados com placa metálica 30 indivíduos, os quais foram avaliados em relação às seguintes características: número de folhas, número de ramos primários com folhas, número de ramos primários sem folhas, altura da planta (por meio de régua dendrométrica), altura da primeira ramificação (por meio de régua dendrométrica) e diâmetro à altura do colo (por meio de paquímetro florestal).

Neste trabalho, considerou-se como ramos primários aqueles provenientes das ramificações mais distais de cada indivíduo.

As médias de cada característica medida foram comparadas entre as populações, através do teste-t (Steel & Torrie, 1980).

Do conjunto total das plantas de cada população, foram coletadas 500 folhas. Estas folhas foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas à pesagem. Posteriormente, as mesmas foram submetidas à secagem em estufa, até apresentarem umidade de 11 % - condição média em que o produto é normalmente comercializado. A partir da média do peso seco/folha, estimou-se o rendimento, multiplicando-se a mesma pelo número de folhas de cada indivíduo. As folhas coletadas serviram ainda para a determinação da área foliar média, em cada população, por meio da utilização de planímetro modelo LI-COR Modelo L1 3.000.

Após a obtenção dos dados, foram estimados os coeficientes de correlação linear simples (r^2) entre as características medidas, bem como entre as características e o rendimento de cada indivíduo, conforme Steel & Torrie (1980).

Foram também estimados modelos lineares de regressão (Steel & Torrie, 1980), para determinar o rendimento como função das características medidas, com auxílio do programa estatístico SAS (SAS, 1998).

3.3 – Avaliação do incremento a partir de diferentes intensidades de poda

Visando avaliar o incremento das características avaliadas após diferentes sistemas de poda, em cada população foram procedidos os seguintes tratamentos:

- Tratamento 01: sem poda (testemunha)
- Tratamento 02: poda de 1/3 dos ramos primários com folhas
- Tratamento 03: poda de todos os ramos com folhas, até o diâmetro máximo de aproximadamente 0,5 cm (o diâmetro aproximado de um lápis).

Os tratamentos foram implantados em 10 indivíduos (unidades experimentais) de cada população, havendo portanto 10 repetições/tratamento.

O tratamento 02 consiste na prática de poda utilizada por agricultores-extratores da região central do Paraná, em função de recomendação técnica adotada, porém sem dados científicos que a corroborem. Neste tratamento, no momento da poda procurou-se selecionar ramos de tamanho e número de folhas representativo de cada indivíduo.

Um e dois anos após a aplicação dos tratamentos, foram avaliados novamente os parâmetros analisados na caracterização fenotípica (nº ramos primários com folhas, nº ramos primários sem folhas, peso verde de folhas, altura da planta e DAC). A partir de cada avaliação, os valores dos parâmetros foram comparados com seus valores antes da aplicação dos tratamentos. Denominou-se taxa de incremento a proporção entre cada valor avaliado e a sua situação antes da aplicação dos tratamentos. De cada unidade experimental foram podados 10% dos ramos primários com folhas. As folhas foram separadas dos ramos, e ambos foram pesados, com o objetivo de estimar o incremento de biomassa foliar e dos ramos em cada tratamento.

As médias das taxas de incremento das características avaliadas em cada tratamento foram comparadas entre si por meio do teste SNK (Sokal e Rohlf, 1997), a 95 % de probabilidade.

Novas equações de regressão para a estimativa do rendimento foram propostas, dois anos após a aplicação dos tratamentos, com base nos indivíduos que receberam poda total dos ramos em cada população, inclusive envolvendo a variável tempo, com auxílio do programa estatístico SAS (SAS, 1998).

3.4 Análise de aspectos da biologia floral e da frequência de tipos florais

A fenologia de florescimento e as características da biologia floral são fatores determinantes da taxa de cruzamento e do fluxo gênico (Kearns e Inouye, 1993). Visando elucidar esta relação, durante o período de florescimento (agosto a novembro/2001), foram avaliadas as seguintes características da biologia floral, em ambas as populações naturais de *M. ilicifolia* selecionadas:

- comprimento e posição dos estames;
- comprimento do estilete;
- local de inserção dos estames;
- forma e inserção do ovário;
- cor das anteras antes da deiscência;
- presença ou ausência de pólen na antera antes da deiscência das mesmas;
- receptividade do estigma;
- viabilidade dos grãos de pólen.

A avaliação foi realizada por meio de observação em lupa e dissecação das flores. Foram observadas 60 flores – 30 em cada população - em diferentes estádios de desenvolvimento. A receptividade do estigma foi avaliada por meio do teste com água oxigenada (Kearns e Inouye, 1993). A viabilidade do pólen, por sua vez, foi testada a partir da coloração ou não dos grãos de pólen com o corante carmim acético (Kearns e Inouye,

1993). Tanto a viabilidade quanto a presença/ausência de grãos de pólen foram avaliadas em 30 anteras em cada população.

As características morfológicas observadas foram desenhadas a partir da observação em microscópio estereoscópico acoplado à câmara clara, com complemento de desenho à mão livre.

Em cada população, foi avaliada também a frequência da ocorrência de tipos florais com características específicas. Para tanto, semanalmente, a partir do início do florescimento, foram observados 43 indivíduos na população 01 e 46 indivíduos na população 02. As observações foram interrompidas em função da ocorrência de duas geadas severas nos meses de setembro e outubro de 2001, na região de estudo, as quais provocaram o abortamento praticamente total das flores nas populações.

Em novembro de 2002, 30 indivíduos - dos 43 avaliados anteriormente população 01 - foram identificados quanto à frequência de ocorrência de tipos florais. Em dezembro de 2002, avaliou-se se houve produção de frutos nestes indivíduos.

3.5 – Análise da diversidade genética

3.5.1 – Eletroforese de isoenzimas

Para caracterizar geneticamente os indivíduos, empregou-se a técnica da eletroforese de isoenzimas. O protocolo básico de eletroforese utilizado foi desenvolvido com base em Soltis *et al.* (1983), Kephart (1990) e Alfenas *et al.* (1998).

Como sistemas de tampão de eletrodo e gel, foram testados Citrato de Morfolina (CM) (Clayton e Tretiak, 1972), Tris-Citrato (TC) (adaptado de Alfenas *et al.*, 1991), Tris-Citrato Borato (TCB) (Ballve *et al.*, 1991) e Histidina (H) (Brown *et al.*, 1975), sempre em gel de

amido (penetrose a 30%). Em cada sistema de tampão de eletrodo e gel, após as corridas eletroforéticas, foram testados os de revelação, dispostos na Tabela 01.

Tabela 01: Sistemas de revelação testados para eletroforese de isoenzimas de populações naturais de adultos e de progênies maternas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.. Florianópolis, RG/UFSC, 2003

<i>Sistema isoenzimático</i>	<i>Código E.C.</i>	<i>Abreviação</i>
Peroxidase	E.C.1.1.1.25	PRX
Malato Desidrogenase	E.C.1.1.1.37	MDH
NADH Desidrogenase	E.C.1.6.99.3	NADHDH
Isocitrato Desidrogenase	E.C.1.1.1.42	IDH
6-Glucose Fosfato Desidrogenase	E.C.1.1.1.49	6PGDH
Leucina Aminopeptidase	E.C.3.4.11.1	LAP
Fosfogluco Isomerase	E.C.5.3.1.9	PGI
Fosfatase ácida	E.C.3.1.3.2	ACP
Alfa-Esterase	E.C.3.1.1.1	α -EST
Glutamato Oxaloacetato Transaminase	E.C.2.6.1.1	GOT
Fosfoglucontato Desidrogenase	E.C.1.1.1.44	G6PDH
Fosfoglucomutase	E.C.5.4.2.2	PGM
Glicerato Desidrogenase	E.C.1.1.1.29	G2DH

A seleção dos tampões de revelação testados foi feita considerando-se os sistemas já testados por Perecin (2001) e Scheffer (2001), bem como a disponibilidade de reagentes no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (CCA/UFSC). As receitas utilizadas para os tampões de revelação que foram efetivamente avaliados estão dispostas no anexo 01.

Após alguns testes, verificou-se que os tecidos foliares que geravam melhores resultados eram provenientes de folhas maduras, porém não muito velhas ou coriáceas. Folhas jovens e folhas velhas promoviam dificuldade para interpretação das bandas eletroforéticas. Para o procedimento das análises, portanto, foram utilizadas folhas maduras.

Outro fato observado, que dificultava a interpretação das bandas, foi o procedimento de lavagem das folhas com água destilada, antes da trituração. Assim, as folhas utilizadas para as análises foram apenas limpas com pano seco, para a utilização de seus tecidos. O bastão utilizado para trituração dos tecidos foliares era lavado e seco com papel toalha, antes da trituração de cada amostra de tecido.

Como solução de extração, foi utilizada a Solução nº 01, descrita em Alfenas *et al.* (1998), sem a presença do 2-mercaptoetanol. Esta solução já havia sido utilizada com sucesso por Scheffer (2001) e Perecin (2001), em eletroforese de isoenzimas de *M. ilicifolia*.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em geladeira, tendo sido a fonte geradora ajustada na seguinte seqüência:

- 70 V, 400 mA, 15 minutos;
- 120 V, 400 mA, 15 minutos;
- 220 V, 400 mA, até o fim da corrida.

Em cada corrida, as amostras de tecidos foliares eram retiradas quinze minutos após o início da mesma. As corridas eletroforéticas duraram, em média, quatro horas.

Após a revelação das bandas e sua interpretação, os géis foram fotografados, utilizando-se câmera digital.

As folhas dos indivíduos adultos foram colhidas nas populações naturais em estudo e acondicionadas sob refrigeração até a sua utilização na eletroforese, que se deu no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, no *campus* do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Para a análise da diversidade

genética das populações de indivíduos adultos, foram utilizadas amostras foliares de 32 indivíduos na população 01 e de 30 indivíduos na população 02.

Adicionalmente, foram colhidas sementes de 10 indivíduos de cada população. Estas foram semeadas em viveiro, no *campus* do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. As sementes foram plantadas em bandejas de isopor, tendo como substrato terra preta preparada, adquirida no comércio. As sementes produziram famílias de progênies maternas, que variaram entre 13 e 35 indivíduos. Para o procedimento da eletroforese de isoenzimas destas progênies, foram utilizados tecidos foliares de 13 a 15 indivíduos por família, totalizando 10 progênies maternas em cada população, 140 e 141 indivíduos da população 01 e da população 02, respectivamente. As folhas das progênies foram coletadas e imediatamente transportadas para o laboratório, para utilização.

3.5.2 – Análise dos dados

A partir da genotipagem dos indivíduos adultos e das progênies maternas, foram estimadas as freqüências alélicas e os índices de diversidade. As freqüências alélicas foram obtidas a partir da expressão:

$$P_{ij} = n_{ij} / n.j$$

onde:

P_{ij} = estimativa do alelo i na população j

n_{ij} = número de ocorrências do alelo i na amostra da população j

$n.j$ = número total de alelos encontrados na amostra da população j

A porcentagem de locos polimórficos (P) foi estimada a partir da relação entre o número de locos polimórficos e o número total de locos observado. Considerou-se como loco

polimórfico, nas populações de indivíduos adultos ($N < 50$), aqueles que apresentaram no máximo 95 % de frequência do alelo mais comum. Nas populações de progênes maternas ($N > 50$), considerou-se como locos polimórficos aqueles que apresentaram no máximo 99 % de frequência do alelo mais comum (Nei, 1987).

A estimativa do número médio de alelos por loco (A) foi procedida dividindo-se o número de alelos em todos os locos pelo número total de locos observados.

A heterozigosidade média observada (H_o) foi estimada a partir da relação entre a média do número de indivíduos heterozigotos e o número total de indivíduos na população em questão, para cada loco.

Já a heterozigosidade média esperada, por sua vez, foi calculada a partir do estimador não viesado de Nei (1978):

$$H_e = 2n(1 - \sum p_i^2)/(2n - 1)$$

onde:

H_E = heterozigosidade média esperada

p_i = frequência alélica do i ésimo alelo, segundo expectativa de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Nei, 1987)

n = número de indivíduos

A avaliação das frequências alélicas, do número médio de alelos por loco, da percentagem de locos polimórficos e das heterozigosidades observada e esperada, bem como a aderência das populações ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram procedidas com auxílio do programa Biosys 2 (Swofford e Selander, 1997).

A aderência das populações de indivíduos adultos e de progênes ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testada, loco a loco, por meio do teste de X^2 (Sokal e Rolph, 1997).

Contudo, a aderência das mesmas ao equilíbrio de endogamia de Wright não foi possível de ser estimada, em função de que, entre os locos que não apresentaram aderência ao equilíbrio de panmixia, apenas dois apresentaram mais de dois alelos – o loco PGI, apenas nas progênes maternas da população 01 e o loco IDH, apenas nas progênes maternas da população 02. Ainda assim, nestes a frequência do terceiro alelo foi bastante baixa, tornando alguns valores praticamente nulos e impossibilitando, portanto, a análise de aderência.

Os índices de fixação (F) foram obtidos pela expressão:

$$F = (H_E - H_O)/H_E$$

A estrutura genética das populações foi caracterizada pelo método de Weir e Cockerham (1984). Este método estima a estrutura a partir da decomposição das variâncias das frequências alélicas em cada nível populacional. Estes são definidos como coeficiente de endogamia total (F), coeficiente de endogamia da população (f) e coeficiente de coancestralidade (θ), o qual é uma estimativa da endogamia gerada pelo efeito de subdivisão, sendo portanto um estimador da divergência genética entre as populações. Os coeficientes foram obtidos com o emprego do programa GDA (Lewis e Zaikin, 1999).

Os valores destes coeficientes foram obtidos loco a loco, sendo os valores médios obtidos pela média ponderada dos mesmos.

Os coeficientes estimados pelo método de Weir e Cockerham (1984) são semelhantes às estatísticas-F de Wright (1951, 1965). Assim, loco a loco, a significância dos três coeficientes (F , f e θ) foi testada empregando-se o teste de X^2 , conforme propõem Li & Horvitz (1953) e Workman e Niswander (1970) para as estatísticas-F:

$F_{IS} \Rightarrow X^2 = N (F_{IS}^2)(k - 1)$, com graus de liberdade (GL) = $(k(k - 1))/2$

$F_{IT} \Rightarrow X^2 = 2 N (F_{IT}^2)(k - 1)$, com graus de liberdade (GL) = $(k(k - 1))/2$

$F_{ST} \Rightarrow X^2 = 2 N (F_{ST})(k - 1)$, com graus de liberdade (GL) = $(n - 1)(k - 1)$

onde:

N = número total de indivíduos

K = número de alelos por loco

n = número de populações em estudo

$F_{IS} = f$

$F_{IT} = F$

$F_{ST} = \theta$

A significância dos valores médios dos locos foi testada através do somatório dos X^2 dos locos e dos graus de liberdade dos locos (Workman e Niswander, 1970)

A análise da diversidade em populações subdivididas (Nei, 1973) foi procedida estimando-se a distribuição da heterozigosidade total (H_T) dentro (H_S) e entre (D_{ST}) as subpopulações, empregando-se as estimativas não viesadas propostas por Nei (1987):

$$H_S = 2n(1 - \sum p_i^2)/(2n - 1);$$

$$H_T = 1 - \sum (p_i)^2 + H_S/(2ns);$$

$$D_{ST} = H_T - H_S;$$

$$G_{ST} = D_{ST}/H_T$$

onde:

H_S = heterozigosidade dentro das subpopulações;

H_T = heterozogidade total

D_{ST} = heterozigosidade entre as subpopulações

n = número de indivíduos amostrados

p_i = frequência do alelo i

s = número de subpopulações

O fluxo gênico foi estimado a partir da equação:

$$F_{ST} = 1/(1 + 4Nm)$$

onde:

F_{ST} = divergência genética entre populações (θ);

Nm = fluxo gênico

A taxa de cruzamento multilocos (t_m) foi estimada com auxílio do programa MLTR (Ritland, 1997), pelo método EM (Expectation-Maximization), a partir do modelo proposto por Ritland e Jain (1981). Este programa também foi utilizado para a estimativa da taxa de cruzamento média unilocos (t_s) e para a estimativa separada das frequências alélicas de pólen e óvulo, a partir da qual se procedeu a avaliação da heterogeneidade destas frequências, através de um teste de X^2 (Workmann e Niswander, 1970):

$$X^2 = N F_{ST} (a-1)$$

onde:

N = número total de gametas

F_{ST} = divergência genética entre a população de grãos de pólen e a população de óvulos

a = número de alelos por loco

O tamanho efetivo populacional foi estimado a partir da expressão proposta por Li (1954):

$$N_e = N/(1 + f)$$

onde:

N_e = tamanho efetivo populacional

N = tamanho real da população ou amostra

f = coeficiente de endogamia

A partir da relação N_e/N , foi estimado o número de indivíduos que representam um tamanho efetivo de 50 plantas, número recomendado para conter os efeitos de endogamia nas populações, consideradas 100 gerações (Kageyama e Lepsch-Cunha, 2001).

4. Resultados e discussão

4.1 Caracterização fenotípica das populações estudadas

A partir da avaliação das características número de folhas, rendimento, número de ramos primários com folhas, número de ramos primários sem folhas, altura, altura da primeira ramificação e diâmetro a altura do colo (DAC), nas populações 01 e 02, é possível observar que, apesar da biomassa foliar (número de folhas e rendimento) dos indivíduos ter sido semelhante nas duas populações, a disposição desta biomassa mostrou-se bastante diferente (Tabela 02).

Tabela 02 – Caracterização fenotípica de plantas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. em duas populações naturais* na região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

<i>Característica/planta</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio</i>	<i>t- teste**</i>
	<i>Pop 01</i>	<i>Padrão</i>	<i>Pop 02</i>	<i>Padrão</i>	
Número de folhas	1926	1705	1323	1034	NS
Número de ramos prim. C/folhas	231	167,3	97	64,4	S
Número de ramos prim. S/folhas	56	43,5	15	16,2	S
Altura da planta	215,4 cm	59,91	180,4 cm	37,46	S
Altura da primeira ramificação	49,4 cm	30,48	37,3 cm	35,02	NS
Diâmetro à altura do colo (DAC)	3,2 cm	0,95	3,5 cm	1,26	S
Rendimento ***	154,06 g		145,57 g		

* - População 01 – Fazenda da Costa/Manasa S.A., população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico e afloramento de rocha; População 02 – sede da Fundação Rureco, população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em solo do tipo cambissolo hálico tb distrófico;

** - NS – diferença não significativa; S – diferença significativa (95 % probabilidade);

*** - Média do peso seco (11 % umidade) das folhas x média do nº folhas. Rendimento da população 01 = 51,6 % do peso verde; rendimento da população 02 = 50,4 % do peso verde.

Enquanto na população 01 existe um grande número de ramos primários, tanto com folhas quanto sem folhas, na população 02 este número é reduzido (Tabela 02). Os indivíduos da população 01 são mais altos, apresentam folhas inseridas praticamente de forma exclusiva nos ramos primários e possuem caule principal com diâmetro menor que os indivíduos da população 02. Por sua vez, os indivíduos da população 02 apresentam altura menor, ramos primários com maior número de folhas e uma maior quantidade de folhas inserida em outros ramos, que não os primários.

Na população 01, é bem maior a quantidade de ramos primários sem folhas do que na população 02, o que indica, provavelmente, a maior reposição periódica de biomassa e/ou uma maior abscisão de folhas na população 01. Os valores das diferentes características avaliadas estão dispostos no anexo 02.

As diferenças entre as características das populações são também ressaltadas pelos dados referentes às áreas foliares médias e aos rendimentos médios por folha (Tabela 03).

Tabela 03: Áreas foliares médias de plantas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. em duas populações naturais* na região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

	Área foliar média (cm ²)	Rendimento/folha (g)
População 01	3,56	0,08
População 02	6,05	0,11
Relação pop 01/pop 02	0,59	0,73

* - População 01 – Fazenda da Costa/Manasa S.A., população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico histórico e afloramento de rocha; população 02 – sede da Fundação Rureco, população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em solo do tipo cambissolo hálico tb distrófico.

De acordo com os dados da Tabela 03, as plantas da população 01 apresentam folhas menores e com menor peso do que as plantas da população 02. A área foliar média das plantas da população 01 é quase a metade da área foliar média das plantas da população 02.

Dados semelhantes foram relatados por Bernardi & Wasicki (1959), os quais afirmam que, a pleno sol, as folhas de espinheira-santa são menores e com menor número de espinhos nas margens. Para a erva-mate (*Ilex paraguariensis*), Andrade (1999) observou uma situação semelhante, ou seja, esta espécie apresenta, a pleno sol, folhas medindo de oito a dez centímetros de comprimento por quatro a cinco de largura. Em áreas de matas nativas, onde há menor intensidade de luz, observou-se que as folhas desta espécie podem chegar a uma dimensão bem superior – cerca de 23 cm de comprimento e 8 a 10 cm de largura (Andrade, 1999). Considerando-se as espécies de forma geral, a lâmina foliar tende a apresentar uma maior expansão em folhas de sombra do que em folhas expostas ao sol (Whatley e Whatley, 1982).

As estimativas de correlação entre as características avaliadas nas duas populações são apresentadas na Tabela 04. Estas estimativas indicam que, na população 01, a altura da planta, o número de ramos primários com e sem folhas e o DAC apresentam, em geral, uma expressiva correlação com as demais características, com exceção da altura da 1ª ramificação. Na população 02, a correlação entre essas características diminuiu. Em ambas as populações, o parâmetro altura da primeira ramificação não apresenta praticamente nenhuma correlação com qualquer outra característica. A correlação que mais se destaca nas duas populações é entre o número de ramos primários com folhas e o número de folhas (0,98 na população 01 e 0,92 na população 02), o que ocorre em virtude da elevada concentração de folhas nos ramos primários e da relativa homogeneidade do número de folhas/ramo.

Tabela 04: Coeficientes de correlação entre as características de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. avaliadas em duas populações naturais* da região de Guarapuava, PR (população 01 = acima da diagonal; população 02 = abaixo da diagonal). Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

	<i>Nº folhas</i>	<i>Nº r. prim</i> <i>c/ folhas</i>	<i>Nº r. prim.</i> <i>S/ folhas</i>	<i>Altura da</i> <i>planta</i>	<i>Altura 1ª</i> <i>ramif.</i>	<i>DAC</i>
<i>Nº folhas</i>	---	0,98 **	0,55 **	0,68 **	-0,15 ***	0,73 **
<i>Nº r. prim. C/ folhas</i>	0,92 **	---	0,61 **	0,65 **	-0,15 ***	0,75 **
<i>Nº r. prim. S/ folhas</i>	0,13 ***	0,33 ***	---	0,56 **	-0,015 ***	0,57 **
<i>Altura da planta</i>	0,62 **	0,57 **	0,11 ***	---	0,22 ***	0,68 **
<i>Altura da 1ª ramif.</i>	0,06 ***	-0,08 ***	-0,35 ***	0,24 ***	---	-0,20 ***
<i>DAC</i>	0,54 **	0,61 **	0,19 ***	0,22 ***	-0,37 ***	---

* - População 01 – Fazenda da Costa/Manasa S.A., população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico e afloramento de rocha; População 02 – sede da Fundação Rureco, população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em solo do tipo cambissolo hálico tb distrófico.

** P < 0,01; *** P < 0,05 pelo t-teste

A determinação do rendimento foliar de cada indivíduo, a partir de características fenotípicas de fácil análise, é um aspecto fundamental para o desenvolvimento de estratégias de exploração sustentável. A correlação entre características fenotípicas e rendimento tem sido avaliada, com este objetivo, para o manejo de populações naturais de plantas medicinais (Pavan-Fruehauf, 2000) e para o palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.) (Bovi *et al.*, 1991; Fantini *et al.*, 1997).

A grande associação entre o número de ramos primários com folhas e o rendimento indica a possibilidade de obtenção de equações de regressão entre estas características. Além disso, o parâmetro número de ramos primários com folhas é facilmente avaliado.

Nas populações 01 e 02, as opções de equações ajustadas para estimar o rendimento, em função do número de ramos primários com folhas, estão indicadas na Tabela 05.

Tabela 05: Equações ajustadas para estimativa do rendimento (Rd) em gramas a partir do número de ramos primários com folhas (RPCF) em duas populações naturais* de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. na região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

Populações	Equações **	R ²
População 01	Rd = (0,59265 x RPCF) + (0,00037 x RPCF ²)	0,9910
	Rd = 0,75205 x RPCF	0,9838
	Rd = (0,80211 x RPCF) – 17,03188	0,9683
	Rd = (0,00126 x RPCF ²) + 62,42453	0,9224
	Rd = 0,00155 x RPCF ²	0,9045
	Rd = (0,56732 x RPCF) + (0,00040 x RPCF ²) + 3,79361	0,9794
População 02	Rd = (0,00621 x RPCF ²) + 61,78136	0,8183
	Rd = 1,53459 x RPCF	0,9425
	Rd = (1,62686 x RPCF) – 12,78076	0,8489
	Rd = 0,00808 x RPCF ²	0,8654
	Rd = (1,29792 x RPCF) + (0,00138 x RPCF ²)	0,9455
	Rd = (1,21053 x RPCF) + (0,00168 x RPCF ²) + 5,03788	0,8534

* - População 01 – Fazenda da Costa/Manasa S.A., população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico e afloramento de rocha; População 02 – sede da Fundação Rureco, população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em solo do tipo cambissolo hálico tb distrófico.

** - Todos os coeficientes são significativamente diferentes de zero (5 %)

Na população 02, os coeficientes de determinação (R²) foram menores na maioria das situações, possivelmente devido a maior quantidade e a maior heterogeneidade do número de folhas em outros ramos que não os primários.

Considerando-se um grande intervalo de dados para o número de ramos primários com folhas, o uso de equações quadráticas pode ser mais apropriado, em função das variações das características biológicas da espécie. No entanto, as equações lineares são

relativamente simples de serem utilizadas pelos agricultores, facilitando a estimativa do rendimento na propriedade (*on farm*). Levando-se em conta estes aspectos e analisando-se o grau de significância e a probabilidade de acerto das opções de equações estimadas, a equação $Rd = 0,75205 \times RPCF$, para a população 01, e $Rd = 1,53459 \times RPCF$, para a população 02, são as mais adequadas.

Na tabela 06 e na Figura 03 está colocada uma estimativa dos rendimentos a partir de valores dentro do intervalo de ocorrência do número de ramos primários com folhas, utilizando-se as equações lineares selecionadas. Na população 01, a relação entre o rendimento total médio dos indivíduos e o número de ramos primários com folhas é inferior – praticamente a metade ($b_1 = 0,75$) à mesma relação na população 02 ($b_1 = 1,53$). Este fato é decorrente da maior incidência de folhas ao longo do caule dos indivíduos da população 02, bem como da ocorrência de ramos com um maior número de folhas nesta população, situação pouco comum nos indivíduos da população 01. Nesta população, a quase totalidade das folhas está inserida nos ramos primários.

Tabela 06: Rendimento (Rd) de plantas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. em duas populações naturais* na região de Guarapuava, PR, a partir da utilização das equações de regressão ajustadas. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

<i>Número de ramos primários com folhas</i>	<i>Rd (g) – População 01*</i>	<i>Rd (g) – População 02*</i>
10	7,52	15,34
50	37,60	76,73
100	75,20	153,46
200	150,41	306,92
300	225,61	460,37
500	376,02	767,29

* - População 01 – Fazenda da Costa/Manasa S.A., população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico e afloramento de rocha ($Rd = 0,75205 \times \text{RPCF}$); População 02 – sede da Fundação Rureco, população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em solo do tipo cambissolo hálico tb distrófico ($Rd = 1,53459 \times \text{RPCF}$).

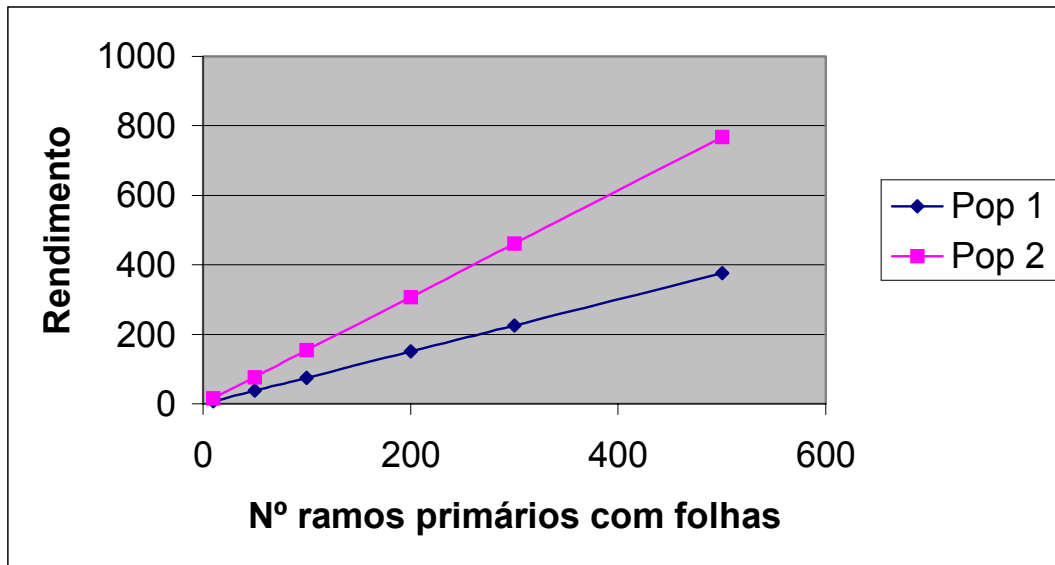


Figura 03: Rendimento (Rd) em gramas de plantas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. em duas populações naturais* na região de Guarapuava, PR, a partir da utilização das equações de regressão ajustadas Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

* - População 01 – Fazenda da Costa/Manasa S.A., população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico e afloramento de rocha ($Rd = 0,75205 \times \text{RPCF}$); População 02 – sede da Fundação Rureco, população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em solo do tipo cambissolo hálico tb distrófico ($Rd = 1,53459 \times \text{RPCF}$).

Em função das diferenças fenotípicas entre populações de *M. ilicifolia* que ocorrem em ambientes distintos, torna-se justificável a utilização de equações de regressão apropriadas a cada situação, o que deve ser levado em conta na prática do manejo de populações naturais da espécie.

Na literatura, o uso de equações de regressão para a estimativa do rendimento, visando o manejo de espécies nativas não madeiráveis, foi observado em poucos trabalhos, envolvendo plantas medicinais (Pavan-Fruehauf, 2000) e o palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.) (Bovi *et al.*, 1991; Fantini *et al.*, 1997). É interessante notar que, apesar da pertinência da estimativa destas equações para o manejo, poucos estudos vêm sendo realizados neste

sentido, mesmo considerando espécies que já vem sendo exploradas há muito tempo em ambientes naturais, tais como a erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

4.2 – Avaliação do incremento a partir de diferentes intensidades de poda

Em função da prática da extração de *M. ilicifolia* se dar através da poda de folhas e ramos, é de fundamental importância o conhecimento da capacidade de rebrota da espécie após a poda, a fim de garantir o manejo sustentável a longo prazo.

Os resultados dos tratamentos de poda foram analisados separadamente nas duas populações, devido às diferenças fenotípicas existentes entre os indivíduos das mesmas. A relação de cada unidade experimental com seu respectivo tratamento de poda é apresentada no Anexo 03. Os valores individuais dos incrementos de cada característica estão dispostos no anexo 04. Considerou-se como incremento as proporções entre a situação de cada característica um ano e dois anos após a poda e a situação destas características antes da poda.

Os resultados da análise de variância e dos testes de separação de médias para os incrementos das características avaliadas na população 01 estão apresentados na Tabela 07. Alguns indivíduos de cada população não foram incluídos no conjunto das avaliações, em função de morte, de poda realizada à revelia do experimento (por outros extratores que não os envolvidos no trabalho) ou da placa de identificação não ter sido encontrada.

Tabela 07: Valores médios e resumo da análise de variância para os incrementos de número de ramos primários com folhas, biomassa de folhas, altura e diâmetro a altura do colo (DAC), bem como para a biomassa média de folhas/ramo primário com folhas e a biomassa média total dos ramos primários com folhas, um ano e dois anos após a implantação dos tratamentos de poda em uma população natural* de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. na região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

<i>Tratamentos</i>	<i>Nº r. primários com folhas</i>		<i>Biomassa de folhas</i>		<i>Altura</i>	
	1ano/sit. Inicial	2anos/sit. Inicial	1ano/sit. Inicial	2anos/sit. Inicial	1ano/sit.inicial	2anos/sit.inicial
01 – testemunha	1,30 a***	1,50 a	1,37 a	0,92 a	1,09 a	1,12 a
02 – poda 1/3 ramos	0,57 b	0,76 b	0,51 b	0,49 a	1,04 a	1,04 a
03 – poda total	0,62 b	0,64 b	0,59 b	0,94 a	0,99 a	1,08 a
<i>Causas de Variação**</i>	QM	QM	QM	QM	QM	QM
Tratamentos	1,108	1,392	1,497	0,509	0,018	0,012
Erro	0,080	0,017	0,338	0,182	0,025	0,027
<i>Coefic. de Variação</i>	34,07 %	13,44 %	70,90 %	54,69 %	15,20 %	15,21 %

<i>Tratamentos</i>	<i>Diâmetro a altura do colo (DAC)</i>		<i>Biomassa média de folhas/ramo</i>		<i>Biomassa média total dos ramos</i>	
	1ano/sit. Inicial	2anos/sit. inicial	1 ano após poda (g)	2anos após poda (g)	1 ano após poda (g)	2 anos após poda (g)
01 – testemunha	1,08 a	1,13 a	1,57 a	0,96 a	2,16 a	1,16 a
02 – poda 1/3 ramos	1,04 a	1,08 a	1,08 a	0,78 a	1,54 a	0,94 a
03 – poda total	1,19 a	1,30 a	1,77 a	1,91 b	2,47 a	2,46 b
<i>Causas de Variação**</i>	QM	QM	QM	QM	QM	QM
Tratamentos	0,047	0,141	1,016	2,710	1,792	4,995
Erro	0,030	0,052	0,497	0,110	0,864	0,183
<i>Coefic. de Variação</i>	15,75 %	19,51 %	47,96 %	27,18 %	45,12 %	28,14 %

* População 01 - Fazenda da Costa/Manasa S.A.; população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico e afloramento de rocha;

** GL trat = 2; GL erro = 19;

*** - Os valores indicados por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste SNK ($p < 0,05$) – comparação na coluna

Os incrementos das características altura e DAC não apresentaram diferença significativa entre tratamentos. Para estas características, o coeficiente de variação foi relativamente baixo, tanto em relação ao incremento destes parâmetros entre o 1º ano e a situação inicial quanto em relação ao incremento destes parâmetros entre o 2º ano e a situação inicial.

Em relação ao número de ramos primários com folhas, observa-se que, um ano após a poda, o tratamento 01 (“testemunha”) apresentou incremento maior que os tratamentos onde houve algum tipo de poda; contudo, esta conclusão deve ser tomada com cautela, pois o coeficiente de variação foi relativamente alto (36 %).

No segundo ano após a aplicação dos tratamentos, observou-se uma diferença mais nítida entre os incrementos de cada tratamento. Nesta avaliação, o tratamento “poda total” apresentou o menor incremento, seguido do tratamento de “poda de 1/3 dos ramos”. Os indivíduos não podados apresentaram novamente um incremento maior.

Em relação à característica biomassa de folhas, no primeiro ano o tratamento “testemunha” apresentou maior incremento que os demais tratamentos, os quais não foram diferentes entre si. No segundo ano, não foram detectadas diferenças entre os incrementos, nos três tratamentos. Contudo, a ausência de diferença estatística entre os tratamentos pode estar relacionada ao elevado coeficiente de variação entre os incrementos desta característica (Tabela 07).

Quando é procedida a poda, a brotação apresenta uma tendência de se mostrar mais vigorosa, produzindo ramos maiores, com folhas maiores e em maior quantidade (Figura 01-A); esta tendência pode ser constatada a partir da análise dos dados referentes às diferenças entre a biomassa média de folhas/ramo e entre a biomassa total média de ramos nos diferentes tratamentos (Tabela 07). Os valores destas características foram obtidos a partir da retirada de 10 % dos ramos, um ano e dois anos após a poda, e estão descritos no anexo 05. Para ambas as características, o tratamento “poda total” apresenta valores expressivamente maiores em relação aos outros tratamentos. Assim, apesar dos incrementos de biomassa de folhas não terem sido diferentes entre si no segundo ano após

a implantação dos tratamentos, o tratamento “poda total” apresentou maior biomassa de folhas que os outros tratamentos, em termos absolutos.

A maior biomassa de folhas no tratamento poda total, dois anos após a poda, pode ser avaliada também a partir da equação de regressão que estima o rendimento de cada indivíduo a partir do número de ramos primários com folhas (Tabela 08). Dois anos após a poda, estimou-se uma equação de regressão que determina o rendimento a partir do número de ramos primários com folhas, considerando-se exclusivamente os indivíduos que receberam poda total. A estimativa de rendimento a partir desta característica já havia sido feita considerando-se todos os indivíduos avaliados, antes da aplicação dos tratamentos de poda (Tabela 05). Comparando-se a equação obtida dois anos após a poda com a equação obtida antes da poda, percebe-se a grande diferença de biomassa de folhas/ramo entre indivíduos podados totalmente e indivíduos não podados, em função da elevada diferença entre os coeficientes (b1) (Tabela 08).

Tabela 08: Equações para a estimativa do rendimento (Rd) em gramas, a partir do número de ramos primários com folhas (RPCF) de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., antes da poda total dos ramos e dois anos após a mesma, em uma população natural* da região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

<i>Situação</i>	<i>Equação para a estimativa do rendimento</i>	<i>R^{2***}</i>
Antes da poda	$Rd = 0,75205 \times RPCF$	0,9838
Dois anos após a poda	$Rd = 1,15112 \times RPCF$	0,9643
Variável tempo envolvida	$Rd = (0,74551 \times RPCF) + 0,18262 (RPCF \times T^{**})$	0,9703

* - População 01 - Fazenda da Costa/Manasa S.A., população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico e afloramento de rocha;

** - tempo em anos após a poda

*** - os coeficientes são significativamente diferentes de zero ($p < 0,05$)

A partir da análise da biomassa de folhas e do número de ramos primários com folhas no tratamento “poda total”, antes da poda, um ano e dois anos após a mesma, é possível a

estimativa do rendimento envolvendo a variável tempo (Tabela 08). Esta equação pode ser muito útil na determinação do rendimento de uma determinada área, quando da prática do manejo de uma população natural da espécie. Porém, para tanto faz-se necessário o acompanhamento dos indivíduos podados durante um maior período de tempo, para um melhor ajustamento da equação proposta.

Em relação à população 02, a análise de variância e o teste de separação de médias dos incrementos de número de ramos primários com folhas, biomassa de folhas, altura e diâmetro a altura do colo (DAC), bem como a biomassa média de folhas/ramo e a biomassa média total dos ramos primários com folhas, avaliados um ano e dois anos após a implantação dos tratamentos de poda, estão dispostos na tabela 09.

Tabela 09: Valores médios e resumo da análise de variância para os incrementos de número de ramos primários com folhas, biomassa de folhas, altura e diâmetro a altura do colo (DAC), bem como para a biomassa média de folhas/ramo primário com folhas e a biomassa média total dos ramos primários com folhas, um ano e dois anos após a implantação dos tratamentos de poda em uma população natural* de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. na região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

<i>Tratamentos/SNK</i>	<i>Nº r. primários com folhas</i>		<i>Biomassa de folhas</i>		<i>Altura</i>	
	1ano/sit. Inicial	2anos/sit. inicial	1ano/sit. inicial	2anos/sit. inicial	1ano/sit.inicial	2anos/sit.inicial
01 – testemunha	1,01 a ***	1,75 a	0,68 a	1,19 ab	1,09 a	1,08 a
02 – poda 1/3 ramos	0,48 b	1,08 b	0,49 ab	0,70 b	1,04 a	1,04 a
03 – poda total	0,65 ab	1,21 b	0,29 b	1,67 a	0,99 a	1,06 a
<i>Causas de Variação**</i>	QM	QM	QM	QM	QM	QM
Tratamentos	0,410	0,750	0,228	1,889	0,135	0,002
Erro	0,137	0,077	0,044	0,179	0,173	0,015
<i>Coefic. de Variação</i>	51,4 %	20,5 %	42,8 %	35,5 %	12,5 %	11,5 %

<i>Tratamentos:</i>	<i>Diâmetro a altura do colo (DAC)</i>		<i>Biomassa média de folhas/ramo</i>		<i>Biomassa média total dos ramos</i>	
	1ano/sit. Inicial	2anos/sit. inicial	1 ano após poda (g)	2anos após poda (g)	1 ano após poda (g)	2anos após poda (g)
01 – testemunha	1,10 a	1,13 a	1,91 a	1,84 a	2,84 a	1,95 a
02 – poda 1/3 ramos	1,15 a	1,22 a	1,59 a	1,58 a	2,26 a	1,91 a
03 – poda total	1,16 a	1,26 a	1,96 a	4,27 b	3,40 a	6,08 b
<i>Causas de Variação**</i>	QM	QM	QM	QM	QM	QM
Tratamentos	0,006	0,024	0,305	15,900	2,557	40,355
Erro	0,013	0,023	1,256	0,416	3,838	1,021
<i>Coefic. de Variação</i>	10,0 %	12,6 %	61,58 %	25,19 %	69,22 %	30,53 %

* População 02 - sede da Fundação RURECO, população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em solo do tipo cambissolo hálico tb distrófico

** - GL trat = 2; GL erro = 18;

*** - Os valores indicados por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste SNK ($p < 0,05$) – comparação na coluna

Da mesma forma que na população 01, não houve diferença significativa dos incrementos de altura e DAC entre os tratamentos.

Em relação ao incremento do número de ramos primários com folhas, nota-se uma grande variação dentro de cada tratamento, um ano após a poda, impossibilitando a verificação de alguma diferença entre os tratamentos (CV = 51,4 %). No segundo ano, esta variação é menor, e os incrementos se dão de forma análoga aos da população 01 - o tratamento “testemunha” apresenta a maior taxa de incremento, seguido de ambos os tratamentos de poda, sem diferença entre eles (Tabela 09). Estes resultados indicam que, apesar de existirem diferenças fenotípicas entre as populações estudadas, o comportamento dos indivíduos de ambas as populações é semelhante, em termos de rebrota, após a aplicação de um mesmo sistema de poda.

O incremento de biomassa de folhas, por sua vez, é também similar ao obtido na população 01. No entanto, na população 02, o tratamento de “poda total” apresenta o maior incremento de biomassa foliar, em conjunto com o tratamento “testemunha”, seguidos ambos pelo tratamento de “poda de 1/3 dos ramos”.

Assim como em relação à população 01, uma nova equação de regressão pode ser estimada para os indivíduos que receberam poda total na população 02 (Tabela 09), a fim de relacionar o número de ramos primários com folhas e o rendimento, dois anos após a poda. Comparando-se esta equação com a obtida a partir de indivíduos não podados, dois anos antes, percebe-se uma grande diferença, indicando que a poda total parece propiciar a formação de brotos maiores e com maior número de folhas, assim como na população 01 (Tabela 10; Figura 01-A).

Tabela 10: Equações para a estimativa do rendimento (Rd) em gramas, a partir do número de ramos primários com folhas (RPCF) de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., antes da poda total dos ramos e dois anos após a mesma, em uma população natural* da região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

<i>Situação</i>	<i>Equação para a estimativa do rendimento</i>	<i>R^{2***}</i>
Antes da poda	$Rd = 1,53459 \times RPCF$	0,9425
Dois anos após a poda	$Rd = 2,31385 \times RPCF$	0,9713
Variável tempo envolvida	$Rd = (1,21660 \times RPCF) + 0,50225(RPCF \times T^{**})$	0,9489

* - População 02 - sede da Fundação RURECO, população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em solo do tipo cambissolo hálico tb distrófico

** - tempo em anos após a poda

*** - os coeficientes são significativamente diferentes de zero ($p < 0,05$)

A produção de brotos mais vigorosos no tratamento “poda total” pode ser constatada também por meio da análise da biomassa de folhas/ramo primário com folha e da biomassa média total dos ramos primários com folhas (Tabela 09). No tratamento “poda total”, ambas as características apresentam valores bem mais elevados do que nos outros tratamentos, especialmente dois anos após a poda. Estes valores são também expressivamente mais altos que em relação ao tratamento “poda total” na população 01. Assim como para a população 01, para a população 02 também pode ser proposta uma equação para a estimativa do rendimento envolvendo “número de ramos primários com folhas” e o “tempo” (Tabela 10). Novamente, é importante frisar que há necessidade de acompanhamento dos indivíduos podados por um maior período de tempo.

Comparando-se as equações de regressão estimadas para as duas populações (Tabelas 08 e 10), é perceptível a maior produtividade de folhas e, conseqüentemente, o maior rendimento na população 02, em função da produção de ramos primários mais vigorosos e com maior peso foliar após a poda ($p < 0,05$ - t-teste para ambas as características). Esta diferença pode ser visualizada na Figura 04.

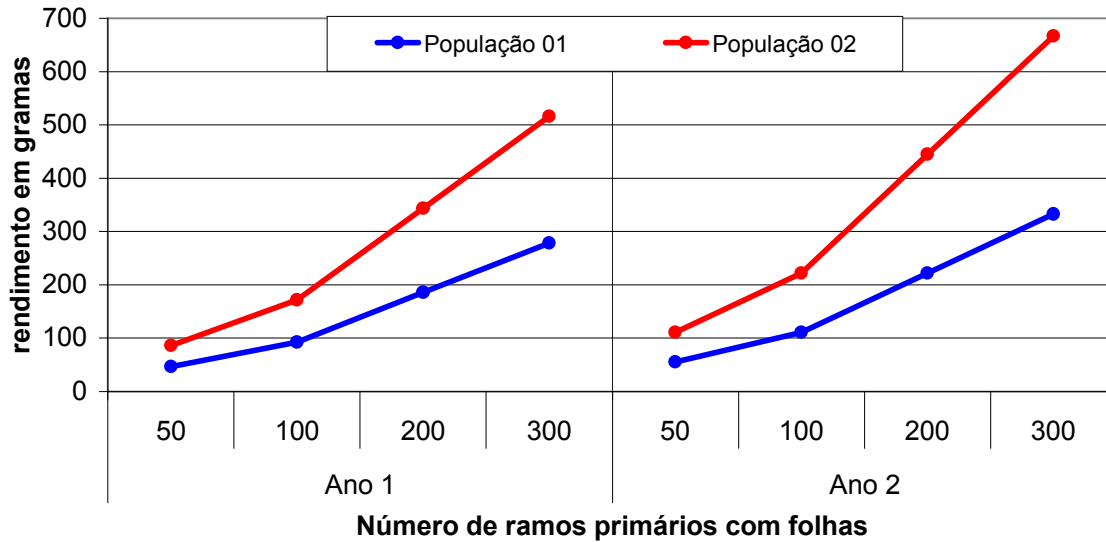


Figura 04: Rendimento foliar de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. em função do número de ramos primários com folhas e do tempo, após poda de todos os ramos até um diâmetro máximo de 0,5 cm, em populações naturais* da espécie na região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

* População 01 - Fazenda da Costa/Manasa S.A.; população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico e afloramento de rocha; $R = (0,74551 \times \text{RPCF}) + 0,18262 (\text{RPCF} \times T)$; $R^2 = 0,9703$; População 02 - sede da Fundação RURECO; população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em solo do tipo cambissolo hálico tb distrófico; $R = (1,21660 \times \text{RPCF}) + 0,50225(\text{RPCF} \times T)$; $R^2 = 0,9489$

Os resultados da avaliação indicam também uma grande variação de taxas de incremento de ramos primários com folhas e especialmente de biomassa de folhas, entre os indivíduos, em ambas as populações (Tabelas 07 e 09). No primeiro ano após a implantação dos tratamentos de poda, esta variação é ainda maior, o que pode ser consequência de adequações próprias de cada indivíduo para a rebrota após a poda. Além disso, no primeiro ano após a poda, a avaliação dos dados a campo foi procedida por várias pessoas, incluindo estudantes, técnicos e agricultores. Como a avaliação da biomassa de folhas se deu a partir da coleta de 10 % dos ramos de cada indivíduo, pode ter havido uma diferença no julgamento da representatividade destes ramos em cada indivíduo, a partir da análise de diferentes pessoas.

Apesar desta variação, os indivíduos que recebem poda total, nas condições edafoclimáticas de ambas as populações, apresentam incremento positivo e expressivo de biomassa de folhas, dois anos após a poda.

A poda bienal é recomendada na cultura de erva-mate (*Ilex paraguariensis* ST.HIL), após o quarto ou quinto ano de plantio, no período de maio a setembro (Mazuchowski, 1991). A prática tecnicamente recomendada para a poda desta espécie é a retirada de aproximadamente 70 % dos ramos e folhas, deixando-se 30 % dos mesmos para a manutenção da estrutura da planta. Desta forma, cada indivíduo produz em torno de 15 a 20 Kg de folhas e ramos/colheita (peso verde); o rendimento, após o cancheamento (secagem própria para a produção da erva-mate para chimarrão), é de aproximadamente 30 % (Mazuchowski, 1991). Segundo Andrade (2002), o período ideal de colheita da erva-mate (safra), é de maio a setembro, se concentrando nos meses de junho a agosto, antes de ocorrer a nova brotação, pois nesta época as folhas estão maduras e a erva está em repouso fisiológico. A autora coloca ainda que o intervalo dado pelos produtores entre uma colheita e outra em ervais nativos é de no mínimo dois anos, visando o não comprometimento do rendimento das ervas.

I. paraguariensis e *M. ilicifolia* são espécies que ocorrem em sub-bosque na Floresta Ombrófila Mista e, apesar de serem de famílias botânicas diferentes, ambas parecem apresentar características similares quanto à capacidade de rebrota. Montanari Jr. (1999) coloca que, em plantio de *M. ilicifolia*, a colheita deve ser feita no início da primavera e no final do verão, épocas relativamente coincidentes com as épocas propostas para a colheita de *Ilex paraguariensis* (Andrade, 2001). Ambas as espécies também parecem apresentar uma boa reposição de biomassa de folhas dois anos após a poda, conforme os resultados deste trabalho e o obtido pelos produtores de *I. paraguariensis* em ervais nativos, conforme Andrade (2001). Em *I. paraguariensis*, recomenda-se deixar 30 % dos ramos, por ocasião da poda. Neste trabalho, nenhum tratamento de poda foi proposto nesta condição, pois optou-se por comparar uma prática de poda de *M. ilicifolia* utilizada por agricultores-extratores (poda de 1/3 dos ramos) com a poda total dos ramos e a ausência de poda.

Em áreas de plantio de *M. ilicifolia*, Montanari Jr. (1999) recomenda a colheita de folhas e ramos a cada seis meses, iniciando-se 18 meses após o plantio. Segundo o autor, na colheita deve-se ter o cuidado de deixar 50 % das folhas, para permitir uma melhor rebrota das plantas (Montanari Jr., 1999). Esta proposta tem como fundamento principal dados obtidos em áreas experimentais do CPQBA/IAC. Em comunicação pessoal (Montanari Jr., 2002), o autor afirma que, a partir da continuidade das observações realizadas nestas áreas, a poda de *M. ilicifolia* a cada seis meses parece não ser interessante, tendo sido substituída pela poda anual.

De acordo com as taxas de incremento avaliadas neste estudo, em ambas as populações naturais a reposição de biomassa foliar ocorreu somente dois anos após a poda, sendo que o tratamento “poda total” apresentou ramos mais vigorosos e com maior biomassa foliar. A poda de 1/3 dos ramos não demonstrou ser tão efetiva quanto a poda total para a reposição de biomassa. No entanto, nenhum tratamento foi proposto neste trabalho para avaliar o incremento a partir de um sistema de poda anual de 50 % das folhas e ramos de *M. ilicifolia*, conforme propõe Montanari Jr (2002).

Seria de grande importância a realização de novos estudos envolvendo outros sistemas de poda de *M. ilicifolia* em populações naturais, bem como o acompanhamento dos indivíduos podados, ao longo de um período maior do que o realizado neste trabalho, a fim de se avaliar se estes sistemas afetam ou não a taxa de florescimento, bem como a vida útil dos indivíduos da espécie.

Contudo, a partir dos dados avaliados neste trabalho, a realização de poda total dos ramos de indivíduos de *M. ilicifolia*, até o limite máximo de 0,5 cm, a cada dois anos, parece ser uma medida que pode estar envolvida em uma proposta de manejo conservativa, considerando-se os indivíduos isoladamente. É interessante notar que extratores da região de Curitiba/PR utilizam esta prática de poda em populações naturais (Scheffer, 2002, comunicação pessoal). Segundo Scheffer (2002), a prática comum nesta região é a retirada de todos os ramos primários com folhas no conjunto de indivíduos da população.

Obviamente, a poda total dos ramos de todos os indivíduos de uma população natural de *M. ilicifolia*, a cada dois anos, não seria a única medida que garantiria a sustentabilidade da exploração, uma vez que vários outros fatores devem ser levados em conta para a prática do manejo, visando a manutenção da regeneração natural e a conservação da diversidade genética, tais como a biologia reprodutiva, o sistema de cruzamento e a ecologia de polinização e de dispersão de sementes. A avaliação destes fatores implica na necessidade de manutenção de indivíduos porta-sementes na população, em distribuição adequada.

4.3 Análise de aspectos da biologia floral e da frequência de tipos florais

Aspectos da biologia floral foram avaliados considerando-se 89 indivíduos em florescimento nas duas populações de *M. ilicifolia* em estudo. A análise morfo-anatômica das flores indicou a ocorrência de dois tipos florais.

Um dos tipos florais – “tipo A” (Figura 05) – apresenta estames horizontalizados (formando um ângulo maior que 120° com o plano do disco), longestilia, ovário em formato oval, disco interceptando o ovário na metade de sua altura, receptividade do estigma desde a antese da flor até o início do secamento e anteras pardacentas. Neste tipo floral, a análise da ocorrência de grãos de pólen em 30 anteras demonstrou a ausência dos mesmos em 83 % das anteras. Nas demais, estes não apresentaram viabilidade a partir do teste do corante carmim acético.

O outro tipo floral observado – “tipo B” (Figura 05) – apresenta estames verticalizados (formando um ângulo menor que 120° com o plano do disco), brevistilia, ovário em formato esférico, disco condescido sobre o ovário, receptividade do estigma após a antese da flor e das anteras (em sua maioria iniciando a receptividade no momento em que restam poucos grãos de pólen aderidos às anteras) e anteras de coloração amarelo-forte. Grãos de pólen de todas as 30 anteras de flores do tipo B analisadas apresentaram viabilidade pelo teste do corante carmim acético. Tanto nas flores do tipo A quanto nas flores do tipo B, a inserção

dos estames se dá na altura da base do ovário. Ambos os tipos florais produzem néctar, em glândulas localizadas no disco. Porém, a produção de néctar em cada tipo floral não foi avaliada quantitativamente.

As diferenças entre os tipos florais estão dispostas na Tabela 11 e na Figura 05.

Tabela 11: Diferenças entre tipos florais de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. avaliados em duas populações naturais* na região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

<i>Flores tipo A</i>	<i>Flores tipo B</i>
Estames horizontalizados	Estames verticalizados
Longestilia	Brevistilia
Ovário em formato oval	Ovário em formato esférico
Disco interceptando o ovário em sua porção média	Disco concrecido sobre o ovário
Anteras pardacentas	Anteras de coloração amarelo-forte
Anteras com ausência de grãos de pólen (83 %) ou com pólen inviável (17 %)	100 % das anteras com presença de grãos de pólen viáveis
Receptividade do estigma desde a antese da flor até o início do secamento	Receptividade do estigma iniciando após a antese da flor e das anteras

* População 01 - Fazenda da Costa/Manasa S.A.; população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico e afloramento de rocha; População 02 - sede da Fundação RURECO; população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em solo do tipo cambissolo hálico tb distrófico

Carvalho-Okano (1992) supõe que as diferenças estruturais observadas em distintos tipos florais de *M. ilicifolia* possam estar relacionadas à funcionalidade das mesmas. Corroborando com esta hipótese, as diferenças entre os tipos florais analisados neste trabalho sugerem, em um primeiro momento, que as flores seriam funcionalmente femininas (tipo A) ou funcionalmente masculinas (tipo B). Contudo, é importante observar que ambos os tipos florais apresentam gineceu e androceu, sendo morfológicamente andróginos.

Em cada população, observou-se uma diferença significativa quanto à frequência dos tipos florais nos indivíduos ($X^2 = 42,99$; $GL=2$; $\alpha<0.05$). Na população 01, em todos os indivíduos avaliados (43) foi verificada a ocorrência de apenas um tipo floral/indivíduo, ou seja, os indivíduos apresentaram somente flores do tipo A (20 indivíduos) ou somente flores do tipo B (23 indivíduos). Já na população 02, dos 46 indivíduos avaliados, 27 apresentaram somente flores do tipo A, 19 apresentaram flores dos dois tipos e nenhum indivíduo apresentou somente flores do tipo B, conforme indicado na Tabela 12.

Tabela 12: Frequência de tipos florais observados em duas populações naturais* de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. na região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

	<i>Flores tipo A</i>	<i>Flores tipo B</i>	<i>Flores tipo A + flores tipo B</i>
População 01	20 indivíduos	23 indivíduos	----
População 02	27 indivíduos	----	19 indivíduos

* - População 01 - Fazenda da Costa/Manasa S.A.; população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico e afloramento de rocha; População 02 - sede da Fundação RURECO; população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em solo do tipo cambissolo hálico tb distrófico

Diferenças nas frequências de tipos florais em populações de *M. ilicifolia* foram observadas por Calago (1996), citada por Scheffer (2001). De acordo com a autora, em uma população plantada de *M. ilicifolia* foi possível observar indivíduos com flores estaminadas e flores pistiladas (*sic*) e outros indivíduos somente com um dos tipos florais (Calago, 1996 *apud* Scheffer, 2001). Carvalho-Okano (1992), que revisou o gênero *Maytenus*, coloca que

esta situação é característica da espécie, bem como de outras espécies do gênero no Brasil extra-amazônico – *M. evonymoides* e *M. patens*. A autora cita que Brizicky (1964) descreve as espécies de *Maytenus* do sudeste dos Estados Unidos como bissexuais (monóclinas) ou unissexuais (díclinas), por aborto; a autora coloca ainda que, de acordo com Sebsebe (1985), espécies africanas de *Maytenus* são bissexuais (monóclinas) ou funcionalmente unissexuais (díclinas), com estaminódios em flores pistiladas e pistilódios em flores estaminadas.

Hartley (1967) cita uma situação semelhante à observada neste trabalho na espécie monóica *Elaeis guineensis* (dendê). Segundo o autor, indivíduos desta espécie expostos a uma baixa intensidade luminosa – condições de sombra sob cobertura florestal - tendem a produzir inflorescências masculinas. Considerando-se as populações de *M. ilicifolia* avaliadas neste estudo, os indivíduos da população 01 recebem uma maior incidência luminosa e encontram-se sob o estresse hídrico e nutricional de uma associação de afloramento de rochas e neossolo hístico. Na população 02, ocorre um perfil de solo mais profundo e menor incidência de luz solar direta sobre os indivíduos da espécie. Na população 02, ocorre a produção de flores do tipo B em conjunto com flores do tipo A na mesma planta – possivelmente, nestes indivíduos o sombreamento promove algum mecanismo de produção de flores com pólen viável (flores tipo B). Contudo, está hipótese precisa ser avaliada em um número maior de populações em condição similar.

Na população 01, a ocorrência de apenas um tipo floral por indivíduo determina a necessidade de polinização cruzada entre indivíduos, no mínimo para a fecundação das flores do tipo A, as quais ou não apresentam grãos de pólen ou os apresentam inviáveis. Ao mesmo tempo, nas flores do tipo B a dicogamia reduz a possibilidade de autofecundação, em função do início da receptividade do estigma se dar depois da antese das anteras e da liberação dos grãos de pólen. Dessa forma, a estratégia de florescimento na população 01 privilegia de forma mais expressiva a polinização cruzada e, conseqüentemente, a maior troca de alelos entre os indivíduos. Na população 02, grande parte dos indivíduos apresenta possibilidade de ocorrência de gueitonogamia, caso não haja algum mecanismo de auto-

incompatibilidade envolvido, fato que deve reduzir a alogamia nesta população. Além disso, é importante lembrar que *M. ilicifolia* produz uma grande quantidade de flores por indivíduo, apresentando estas diferentes fenofases ao mesmo tempo. Assim, indivíduos que produzem flores do tipo B (com pólen viável), ou ambos os tipos florais, podem estar sujeitos à autofecundação por gueitonogamia.

De acordo com observações de agricultores-extratores da região envolvidos no trabalho, ambos os tipos florais parecem produzir frutos com sementes viáveis. A observação da frutificação, no ano de 2001, não foi possível devido ao abortamento praticamente total das flores de todos os indivíduos das populações analisadas, em função da ocorrência de duas geadas severas nos meses de setembro e outubro daquele ano, na região de estudo. Após o abortamento, um novo florescimento ocorreu, porém efêmero, não gerando frutos.

No início de novembro 2002, foram identificados os tipos florais de 30 indivíduos da população 01. Estes indivíduos faziam parte do conjunto de 43 indivíduos avaliados no ano anterior, em relação à frequência de tipos florais. Todos estes indivíduos apresentaram, no ano de 2002, os mesmos tipos florais identificados no ano anterior. Foram identificados 10 indivíduos com flores tipo A e 20 indivíduos com flores tipo B. Todos estes indivíduos apresentaram, igualmente, uma grande quantidade de flores.

Em dezembro de 2002, estes indivíduos foram avaliados quanto à frutificação. Dos 10 indivíduos com flores tipo A, 6 apresentaram frutos, enquanto dos 20 indivíduos com flores tipo B, 12 apresentaram frutos. Estas observações indicam que ambos os tipos florais têm possibilidade de produzir frutos, conforme observações de agricultores-extratores da região. No entanto, de acordo com Scheffer (2002, comunicação pessoal), sementes coletadas de alguns indivíduos isolados não germinaram. Este fato pode estar indicando a produção de frutos com sementes inviáveis, como consequência de um mecanismo de auto-incompatibilidade. Portanto, faz-se necessário o aprofundamento de estudos nesta área, avaliando se os frutos formados a partir de cada tipo floral produzem sementes viáveis. O

fato de que nem todos os indivíduos que florescem acabam frutificando já havia sido relatada por Scheffer e Araújo (1998).

Na avaliação da frutificação, em 2002, percebeu-se também que o número de frutos formados nos indivíduos que frutificaram foi bastante reduzido. Este fato revela uma baixa efetividade da polinização, ao menos naquele ano, o que pode estar relacionado à ecologia de polinização e a outros condicionantes do fluxo gênico. O acompanhamento detalhado da fenologia de florescimento e frutificação, associado a estudos de ecologia de polinização e do sistema reprodutivo, seriam de extrema importância para a geração de critérios de conservação e manejo de populações naturais de *M. ilicifolia*.

Além disso, a análise de aspectos da biologia floral de *M. ilicifolia* em populações naturais sugere que há diferentes estratégias de adaptação relacionadas à estrutura floral da espécie em diferentes condições de solo e luminosidade. A avaliação destes aspectos é de grande importância para a proposição de práticas sustentáveis de manejo de populações naturais da espécie, uma vez que a manutenção de indivíduos reprodutivos, nas áreas manejadas, deve levar em conta as diferenças na estrutura floral e na frequência de tipos florais.

4.4 Análise da diversidade genética

4.4.1 – Eletroforese de isoenzimas

Entre os diferentes tampões de eletrodo e gel testados, o tampão Tris-Citrato (TC) apresentou maior resolução em todos os sistemas enzimáticos que apresentaram bandas com possibilidade de interpretação.

Na tabela 13 são apresentados os diferentes sistemas enzimáticos testados no tampão TC, bem como o número de locos prováveis observado e o número de locos com possibilidade de interpretação genética, considerando tanto a genotipagem dos indivíduos das populações naturais avaliadas, quanto de progênies maternas destes.

Tabela 13: Sistemas enzimáticos testados em plantas de populações naturais de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., bem como em suas progênes maternas, número de locos prováveis observados e número de locos com possibilidade de interpretação genética (tampão utilizado: Tris-Citrato). Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

<i>Sistemas enzimáticos</i>	<i>Número de locos observados</i>	<i>Número de locos c/possibilidade de interpretação genética</i>
PRX	2	1
MDH	2	2
PGI	2	1
NADHDH	1	1
6PGDH	2	1
IDH	1	1
LAP	1	1
α -EST	1	0
ACP	1	0
GOT	1	0
G6PDH	1	0
PGM	1	0
G2DH	1	0

A enzima Peroxidase (PRX) apresentou dois locos. O loco mais lento não se mostrou de forma regular em todos os géis e, quando ocorria, apresentava pouca nitidez. O loco mais rápido, no entanto, se mostrou regular e de fácil interpretação em todos os géis. Este loco apresentou-se sempre polimórfico, com um a três alelos, sendo a enzima monomérica (Tabelas 13 e 14; Figura 06-A).

Para a Malato Desidrogenase (MDH), foram observados dois locos, ambos polimórficos, com um a dois alelos e apresentando enzimas monoméricas, de boa resolução e fácil interpretação (Tabelas 13 e 14; Figura 06-C).

A enzima Fosfogluco Isomerase (PGI) apresentou-se dimérica em um dos locos observados. Neste loco, de fácil interpretação, ocorrendo três alelos, sendo polimórfico em todos os géis analisados. Um outro loco, mais rápido, foi observado, no entanto sem possibilidade de interpretação, por falta de nitidez (Tabelas 13 e 14; Figura 06-B).

Na enzima NADH Desidrogenase (NADHDH) foi observado apenas um loco, de resolução relativamente fraca, porém com possibilidade de interpretação. A enzima mostrou-se monomérica e o loco revelado apresentou-se polimórfico apenas na genotipagem dos indivíduos da população 02, revelando 3 alelos (Tabelas 13 e 14).

A enzima 6-Glucose Fosfato Desidrogenase (6PGDH) apresentou dois locos. O loco mais rápido não se mostrou regular e, quando revelou-se, não apresentava possibilidade de interpretação. O loco mais lento, ao contrário, revelou-se com boa resolução e fácil interpretação em todos os géis analisados; apresentando baixo polimorfismo, este loco revelou três alelos e enzima dimérica (Tabelas 13 e 14; Figura 06-F).

A enzima Isocitrato Desidrogenase (IDH) apresentou um loco, polimórfico, de boa resolução e fácil interpretação. Este loco apresentou três alelos e estrutura dimérica (Tabelas 13 e 14; Figura 06-D).

A enzima Leucina Aminopeptidase (LAP) apresentou um loco, polimórfico, com enzima monomérica, apresentando dois alelos (Tabelas 13 e 14; Figura 06-E).

Os demais sistemas enzimáticos testados não apresentaram locos com nitidez suficiente para a interpretação, conforme indicado na Tabela 13.

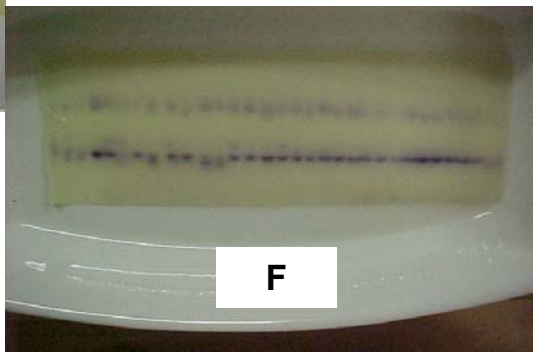
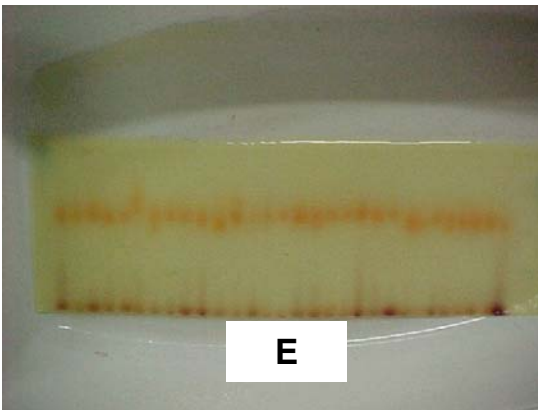
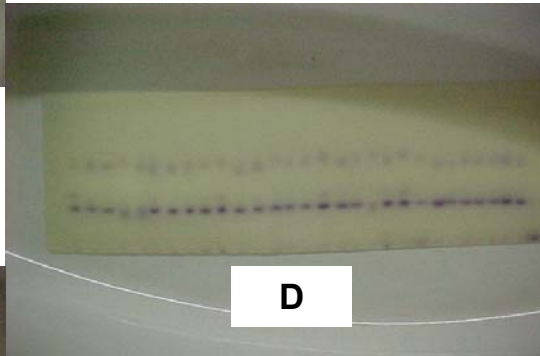
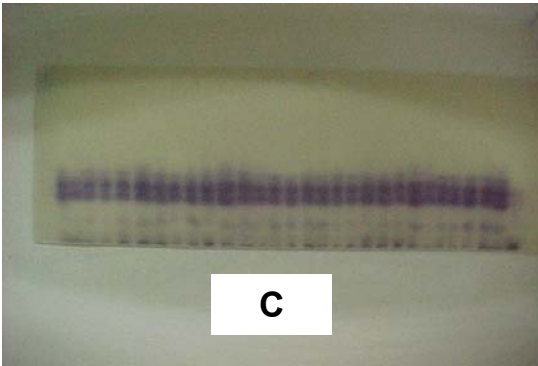
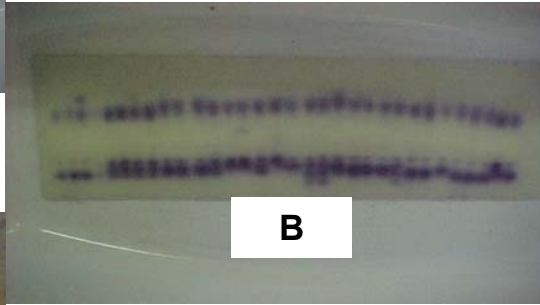
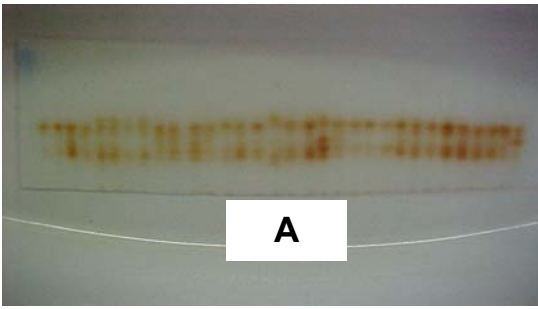


Figura 06: Amostras de géis obtidos após coloração de diferentes sistemas enzimáticos (A=PRX: B=PGI: C=MDH: D=IDH: E=LAP: F=6PGDH)

Tabela 14: Número de alelos e tipos enzimáticos observados em cada loco alozímico de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. avaliado em plantas de populações naturais na região de Guarapuava e em progênies maternas destas. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

<i>Loco</i>	<i>Estrutura da enzima</i>	<i>Nº alelos</i>
PRX	Monomérica	3
MDH 1	Monomérica	3
MDH 2	Monomérica	2
PGI	Dimérica	3
NADHDH	Monomérica	2
6PGDH	Dimérica	3
IDH	Dimérica	3
LAP	Monomérica	2
TOTAL		21

Na Tabela 15 é apresentada uma comparação relativa à interpretação genética dos sistemas enzimáticos utilizados neste trabalho e nos trabalhos de Scheffer (2001) e Percin (2001), considerando os sistemas enzimáticos, o número de locos e o número de locos polimórficos avaliados, bem como o número de alelos observado.

Tabela 15: Número de locos (N^oL), número de locos polimórficos (N^oP) e número total de alelos (N^oA) observados em três trabalhos que envolveram eletroforese de isoenzimas em *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

Sistemas enzimáticos	Scheffer (2001)			Perecin(2001)			Este trabalho		
	N ^o L	N ^o P	N ^o A	N ^o L	N ^o P	N ^o A	N ^o L	N ^o P	N ^o A
PRX	---	---	---	1	1	3	1	1	3
MDH	---	---	---	2	2	5	2	2	5
NADHDH	---	---	---	---	---	---	1	1	2
IDH	1	1	3	---	---	---	1	1	3
6PGDH	1	1	3	2	1	3	2	1	3
LAP	---	---	---	1	0	1	1	1	2
PGI	1	1	5	2	1	4	2	1	3
ACP	---	---	---	1	1	2	---	---	---
α -EST	---	---	---	1	1	3	---	---	---
MnR	1	1	4	---	---	---	---	---	---
GOT	1	1	4	---	---	---	---	---	---
TOTAL	5	5	19	10	7	21	8	8	21

A revelação das enzimas PRX, MDH, PGI, 6PGDH e LAP ocorreu de forma semelhante à revelação obtida por Perecin (2001), tendo sido detectado o mesmo número de alelos, exceção feita a enzima LAP, onde a autora observou apenas um alelo e, neste trabalho, foram identificados dois alelos (Tabela 15).

Na revelação da enzima IDH, o presente trabalho apresentou dados semelhantes aos obtidos por Scheffer (2001). No entanto, para as enzimas 6PGDH e PGI, os resultados obtidos neste trabalho e no trabalho de Perecin (2001) mostraram-se diferentes dos obtidos pela autora citada. Em ambos os sistemas, Scheffer (2001) identificou apenas um loco (Tabela 15), enquanto os dados de Perecin (2001) e deste trabalho demonstram a existência de dois locos. As diferenças na quantidade de locos observados em cada

sistema enzimático podem ser devidas a diferenças nas condições de corrida, especialmente no tampão de extração, nos tampões de eletrodo e gel e na voltagem e amperagem das corridas eletroforéticas.

O número de alelos da enzima 6PGDH foi semelhante nos três trabalhos, sendo identificados três alelos; já o número de alelos da enzima PGI foi maior no trabalho de Scheffer (2001), o qual identificou cinco alelos na revelação desta enzima; Perecin (2001) identificou quatro alelos, e o presente trabalho apenas três alelos neste sistema enzimático.

4.4.2 Freqüências alélicas

Na tabela 16 são apresentadas as freqüências alélicas dos diferentes locos avaliados na eletroforese de izoenzimas, considerando os genótipos dos indivíduos adultos e das progênes maternas das populações naturais de *M. ilicifolia* avaliadas neste trabalho (anexo 06). Nas populações de progênes maternas, não foram avaliados os locos NADHDH e LAP, por apresentaram baixa resolução neste grupo de plantas.

Tabela 16: Freqüências alélicas de locos alozímicos de indivíduos adultos e de progênies maternas de populações naturais de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. na região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

Alelos	<i>Indivíduos adultos</i>		<i>Progênies maternas</i>	
	População 01	População 02	População 01	População 02
PRX	N=32	N=30	N=140	N=141
1	0,828	0,900	0,950	0,929
2	0,094	0,100	0,050	0,071
3	0,078	0,000	0,000	0,000
PGI	N=32	N=30	N=140	N=141
1	0,703	0,500	0,761	0,738
2	0,297	0,500	0,236	0,262
3	0,000	0,000	0,004	0,000
MDH1	N=32	N=30	N=140	N=141
1	0,703	0,850	0,921	0,908
2	0,297	0,150	0,079	0,092
MDH2	N=32	N=30	N=140	N=141
1	0,813	1,000	0,975	0,975
2	0,188	0,000	0,025	0,025
IDH	N=32	N=30	N=140	N=141
1	0,703	0,900	0,893	0,918
2	0,297	0,067	0,075	0,043
3	0,000	0,033	0,032	0,039
6PGDH	N=32	N=30	N=140	N=141
1	1,000	0,950	0,971	0,993
2	0,000	0,050	0,000	0,004
3	0,000	0,000	0,029	0,004
NADHDH	N=32	N=30		
1	1,000	0,933	Não avaliado	Não avaliado
2	0,000	0,067		
LAP	N=32	N=30		
1	0,875	0,933	Não avaliado	Não avaliado
2	0,125	0,067		
Nº total de alelos	15	16	14	14

* - População 01 - Fazenda Costa, população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico e afloramento de rocha; População 02 - sede da Fundação RURECO, população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em solo do tipo cambissolo hálico tb distrófico

O loco PRX apresentou três alelos nos indivíduos adultos da população 01 e apenas dois alelos nos indivíduos adultos da população 02. Em cada população de progênies maternas, apenas dois alelos foram identificados, em freqüências bastante similares.

Tanto o loco PGI quanto o loco MDH1 apresentaram dois alelos, os quais ocorreram nas populações de indivíduos adultos e nas populações de progênies maternas. A freqüência destes alelos foi diferente entre as populações de indivíduos adultos, porém similar entre as populações de progênies maternas.

Nas populações de progênies maternas, o loco MDH2 apresentou dois alelos com freqüências idênticas, sendo um deles de baixa freqüência ($p < 0,05$). A freqüência destes alelos foi diferente nos indivíduos adultos da população 01 e, nos indivíduos adultos da população 02, este loco revelou-se monomórfico.

O loco IDH apresentou dois alelos nos indivíduos adultos da população 01 e um terceiro alelo nos indivíduos adultos da população 02. Este terceiro alelo foi verificado também em ambas as populações de progênies maternas. Sempre que ocorreu, este alelo apresentou baixa freqüência.

O loco 6PGDH apresentou-se monomórfico nos indivíduos adultos da população 01. Nos indivíduos adultos da população 02, um segundo alelo, de baixa freqüência, foi verificado. Este segundo alelo não foi detectado nas progênies maternas da população 01. No entanto, nesta população, um terceiro alelo ocorreu. Nas progênies maternas da população 02 os três alelos citados ocorreram, sendo de baixa freqüência o segundo e o terceiro alelo.

O loco NADHDH mostrou-se monomórfico nos indivíduos adultos da população 01, apresentando dois alelos nos indivíduos adultos da população 02.

No loco LAP, dois alelos foram verificados em cada população de indivíduos adultos, com freqüências distintas.

Apesar do número total de alelos ser semelhante nas duas populações de adultos, a presença ou ausência e a freqüência destes alelos em cada loco apresentaram variação. Na população 01, não foram encontrados três alelos que se apresentaram na população 02; já

nesta última, não foram encontrados dois alelos revelados na população 01. Em geral, no entanto, os alelos que apresentaram elevada ou baixa frequência em uma das populações também o fizeram na outra. Todos os alelos que foram encontrados exclusivamente em uma das populações de adultos apresentaram frequências relativamente baixas (Tabela 16).

Entre as populações de progênies maternas, foram detectados seis alelos de baixa frequência (locos PGI, MDH2, IDH e 6PGDH). Entre as populações de indivíduos adultos, apenas um alelo de baixa frequência foi identificado (no loco IDH – população 02). É interessante notar que, na população 01, a enzima PRX apresentou um alelo entre os adultos que não ocorreu nas progênies maternas. No entanto, em geral ocorreu o contrário, ou seja, nas progênies maternas da população 01, existem três alelos (nos locos PGI, IDH e 6PGDH) que não foram encontrados entre os adultos; na população 02, as progênies maternas também apresentaram dois alelos não encontrados entre os adultos (nos locos MDH2 e 6PGDH).

A presença de alelos em indivíduos jovens que não ocorreram em indivíduos adultos foi observada igualmente por Perecin (2001) em populações naturais de *Maytenus aquifolia*.

A maior quantidade de alelos por loco nas populações de progênies maternas pode estar indicando a ocorrência de um fluxo gênico proveniente de indivíduos reprodutivos não representados na amostra dos indivíduos adultos, existentes nas próprias populações avaliadas ou em outras demes. Outrossim, a amostragem de uma maior quantidade de indivíduos nas populações de progênies maternas (140 indivíduos da população 01 e 141 indivíduos da população 02), em relação às populações de indivíduos adultos (32 indivíduos da população 01 e 30 indivíduos da população 02) pode, por si só, ter promovido a possibilidade da detecção de um maior número de alelos nas primeiras.

4.4.3 Índices de diversidade

A partir do cálculo das frequências alélicas, foram estimados índices de diversidade genética nas populações naturais em estudo, considerando-se indivíduos adultos e

progênies maternas, os quais são apresentados na Tabela 17. Nesta tabela são apresentados também dados referentes ao estudo realizado por Perecin (2001), obtidos a partir de avaliação de indivíduos adultos de uma população natural de *M. ilicifolia* da região de Caçador, SC.

Tabela 17: Índices de diversidade genética estimados em populações naturais* de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. na região de Guarapuava (PR) e Caçador (SC), considerando indivíduos adultos e progênies maternas. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

<i>Indivíduos adultos</i>						
	N**	P	A	H _E	H _O	f
População 01	32 (0,0)***	75,0	1,9 (0,2)	0,264 (0,063)	0,227 (0,057)	0,140
População 02	30 (0,0)	87,5	2,0 (0,2)	0,186 (0,053)	0,125 (0,037)	0,328
Perecin (2001)	31	70,0	2,1	0,255	0,113	0,562
<i>Progênies maternas</i>						
População 01	140 (0,0)	66,7	2,3 (0,2)	0,152 (0,049)	0,126 (0,036)	0,171
População 02	141 (0,0)	66,7	2,3 (0,2)	0,151 (0,054)	0,109 (0,038)	0,278

* População 01: Fazenda Costa, Manasa S.A.- população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico/afloramento de rocha; População 02: sede da Fundação RURECO - população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em cambissolo hálico tb distrófico; Perecin (2001): Reserva Genética de Caçador/SC – população em sub-bosque de Floresta com Araucária

** - N: tamanho da amostra; P: percentagem de locos polimórficos; A: número médio de alelos por loco; H_E : heterozigidade média esperada (diversidade genética); H_O: heterozigidade média observada

*** - os valores entre parêntesis indicam o erro padrão respectivo

As populações de indivíduos adultos de *M. ilicifolia* avaliadas neste estudo e a população avaliada por Perecin (2001) apresentam grande semelhança em relação ao tamanho amostral, à percentagem de locos polimórficos e ao número médio de alelos por loco (Tabela 18)

Os indivíduos adultos da população 01 e a população avaliada por Perecin (2001) apresentam valores de heterozigidade esperada (diversidade genética) similares,

superiores aos obtidos entre os indivíduos adultos da população 02. Os indivíduos adultos da população 02, portanto, apresentam a menor diversidade genética, apesar de apresentarem a maior percentagem de locos polimórficos entre as populações de indivíduos adultos avaliadas.

De acordo com os dados da Tabela 17, pode-se concluir que a diversidade genética em populações naturais de *M. ilicifolia* é elevada. Hamrick e Godt (1990) revisaram 653 estudos que utilizaram a técnica da eletroforese de isoenzimas para a obtenção de índices de diversidade genética em espécies vegetais, envolvendo 449 espécies e 165 gêneros. De acordo com estes estudos, espécies arbóreas perenes apresentaram, em média, polimorfismo em 64,7 % dos locos, 2,19 alelos/loco e heterozigosidade esperada de 0,097. Espécies tropicais, por sua vez, apresentaram 49,2% dos locos com polimorfismo, 1,81 alelos/loco e heterozigosidade esperada de 0,148 (Hamrick e Godt, 1990). As populações naturais de indivíduos adultos de *M. ilicifolia*, indicadas na Tabela 17, apresentam maior número médio de alelos por loco, maior heterozigosidade esperada (diversidade genética) e maior percentagem de locos polimórficos que a média de populações naturais de espécies arbóreas perenes de clima tropical.

Estes elevados índices indicam a possibilidade da ocorrência de grande número de novas combinações genotípicas em cada geração, o que pode ser importante para a manutenção do potencial evolutivo da espécie.

Entre as populações de indivíduos adultos indicadas na Tabela 17, a população 01 apresenta o maior índice de heterozigosidade observada. Na população 02 e na população avaliada por Perecin (2001), este índice é menor. Independentemente dos valores da heterozigosidade observada, em cada população de indivíduos adultos, esta é sempre menor do que a heterozigosidade esperada. Esta diferença é marcante na população avaliada por Perecin (2001), onde a heterozigosidade observada é menor do que a metade da heterozigosidade esperada. Independentemente das diferenças no tamanho das populações avaliadas, os elevados coeficientes de endogamia (f) obtidos neste trabalho e

por Perecin (2001) (Tabela 17) revelam a existência de um forte efeito de endogamia em populações naturais de *M. ilicifolia*.

A população 01 ocupa uma área de aproximadamente 20 ha, enquanto a população 02 ocupa apenas 1 ha. Os maiores coeficientes de endogamia observados na população 02, em relação à população 01, podem ser consequência de uma menor possibilidade de recombinações, em função do reduzido tamanho da população e de um provável maior parentesco entre os indivíduos.

Todavia, é interessante notar que o coeficiente de endogamia (f) é menor na população 01, intermediário na população 02 e bem maior na população avaliada por Perecin (2001). A população 01 encontra-se em ambiente com forte restrição edáfica (afloramento de rocha), a população 02 ocupa o sub-bosque de uma formação secundária (capoeirão) e a população avaliada por Perecin (2001), visitada por este autor, encontra-se no sub-bosque de uma formação secundária bem mais avançada. Na região de ocorrência desta população, o dossel é formado basicamente por pinheiros (*Araucaria angustifolia*) de mais de 20 m de altura, com indivíduos de cedro (*Cedrella fissilis*) e imbuia (*Ocotea porosa*) aparecendo no sub-dossel. Os indivíduos de *M. ilicifolia* da população avaliada por Perecin (2001) se apresentam muito mais espaçados entre si e, visualmente, a regeneração natural é bem mais baixa do que nas populações avaliadas neste estudo. Portanto, os dados obtidos nestas três populações sugerem que o coeficiente de endogamia é crescente no sentido da sucessão natural, reiterando a hipótese de que populações de *M. ilicifolia* são adaptadas a condições de restrição edáfica. Em locais onde esta restrição não é tão forte, a espécie provavelmente se instala no início da sucessão, sendo possivelmente suprimida em estágios mais avançados.

Apesar dos elevados coeficientes de endogamia observados neste trabalho e na população avaliada por Perecin (2001), Scheffer (2001), avaliando índices de diversidade em cinco populações de progênies maternas de *M. ilicifolia*, identificou uma baixa diferença entre as heterozigosidades observada e esperada, e estes índices foram bem superiores aos obtidos neste trabalho e aos valores obtidos por Perecin (2001). Entretanto, a autora

utilizou na avaliação somente locos polimórficos, o que pode ter acarretado uma superestimativa das heterozigosidades. Adicionalmente, houve uma intensa seleção aplicada na escolha das plantas para o teste de progênies (Scheffer, 2001). Este procedimento pode também acarretar uma redução expressiva da endogamia na população.

As populações de progênies maternas indicadas na Tabela 17 são praticamente idênticas entre si quanto ao tamanho amostral, percentagem de locos polimórficos, número médio de alelos por loco e heterozigosidade esperada (diversidade genética). O número médio de alelos por loco é maior nas populações de progênies maternas do que nas populações de indivíduos adultos, em função da maior ocorrência de alelos raros entre as primeiras. Entretanto, as populações de progênies maternas apresentam menores percentagens de locos polimórficos.

Nas populações de progênies maternas, as heterozigosidades – tanto esperada quanto observada – são menores do que nas populações de indivíduos adultos. Tal fato pode estar indicando a ocorrência de seleção em favor de heterozigotos nos indivíduos adultos. A seleção de heterozigotos entre indivíduos adultos é um fenômeno importante em populações naturais de espécies tropicais, e tem sido detectada em várias espécies arbóreas, conforme destaca Sebben *et al.* (2001). Não obstante, a hipótese de seleção para heterozigotos em populações naturais de *M. ilicifolia* necessita ser melhor investigada, uma vez que, neste trabalho, os coeficientes de endogamia (f) são semelhantes nas populações de indivíduos adultos e nas populações de progênies maternas, o que pode estar indicando que a maior diversidade nos adultos é decorrente apenas de efeitos de amostragem.

Entre as progênies maternas das duas populações avaliadas neste estudo, também ocorre o elevado efeito de endogamia verificado entre as populações de indivíduos adultos (Tabela 17), sugerindo a existência de auto-cruzamento ou de cruzamento entre indivíduos aparentados em populações naturais de *M. ilicifolia*.

4.4.4 Estrutura genética

Nas Tabelas 18 e 19 são apresentados, respectivamente, os valores da estatísticas F (Wright, 1951, 1965) e da análise da diversidade nas populações subdivididas (Nei, 1973) para as populações de indivíduos adultos e para as populações de progênies maternas de *M. ilicifolia* avaliadas neste estudo, desmembrados loco a loco.

Tabela 18: Estimativas das estatísticas-F em populações naturais** de indivíduos adultos e entre populações de progênies maternas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. da região de Guarapuava, PR, desmembradas loco a loco. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

<i>Populações de indivíduos adultos</i>			
Locos	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
PRX	0,1481 ns	0,1519 ns	0,0044 ns
PGI	0,2047 ns	0,2561 *	0,0645 *
MDH1	0,1593 ns	0,1945 *	0,0419 *
MDH2	0,3985 *	0,4970 *	0,1638 *
NADHDH	0,4771 *	0,5011 *	0,0459 *
IDH	0,3266 *	0,4029 *	0,1132 *
LAP	0,0846 ns	0,0863 ns	0,0018 ns
6PGDH	-0,0363 ns	0,0016 ns	0,0366 *
MÉDIO	0,2179 *	0,2682 *	0,0643 *
<i>Populações de progênies maternas</i>			
Locos	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
PRX	0,3132 *	0,3126 *	-0,0008 ns
PGI	0,3697 *	0,3677 *	-0,0032 ns
MDH1	-0,0904 ns	-0,0927 *	-0,0020 ns
MDH2	0,7088 *	0,7070 *	-0,0061 ns
IDH	0,0454 ns	0,0466 ns	0,0013 ns
6PGDH	-0,0209 ns	-0,0085 ns	0,0121 *
MÉDIO	0,2238 *	0,2228 *	-0,0014 ns

* valor significativamente diferente de zero ($p=0,05$); ns: valor significativamente não diferente de zero ($p=0,05$) – teste de X^2 (Li & Horvitz, 1953)

** População 01: Fazenda da Costa, Manasa S.A. - população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico/afloramento de rocha; População 02: sede da Fundação RURECO - população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em cambissolo hálico tb distrófico;

Tabela 19: Análise da diversidade genética entre populações naturais* de indivíduos adultos e entre populações de progênies maternas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. da região de Guarapuava, PR, desmembradas loco a loco. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

<i>Populações de indivíduos adultos</i>			
Locos	H _S	H _T	G _{ST}
PRX	0,244	0,246	0,008
PGI	0,466	0,485	0,039
MDH1	0,342	0,351	0,026
MDH2	0,155	0,171	0,093
NADHDH	0,063	0,066	0,045
IDH	0,306	0,327	0,064
LAP	0,175	0,175	0,000
6PGDH	0,049	0,048	- 0,021
MÉDIO	0,225	0,234	0,032
<i>Populações de progênies maternas</i>			
Locos	H _S	H _T	G _{ST}
PRX	0,114	0,114	0,000
PGI	0,376	0,378	0,005
MDH1	0,158	0,158	0,000
MDH2	0,049	0,049	0,000
IDH	0,176	0,177	0,006
6PGDH	0,035	0,036	0,028
MÉDIO	0,151	0,152	0,006

* População 01: Fazenda da Costa, Manasa S.A.- população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico/afloramento de rocha; População 02: sede da Fundação RURECO - população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em cambissolo hálico tb distrófico

Os valores de F_{IS} obtidos (Tabela 18) corroboram os elevados coeficientes de endogamia verificados a partir dos dados da Tabela 17. Esta elevada endogamia ocorre tanto dentro das populações de progênies maternas quanto dentro das populações de indivíduos adultos.

Entre os indivíduos adultos, os locos PRX, PGI, MDH1, LAP e 6PGDH não apresentaram endogamia dentro das populações (F_{IS} não diferente de zero). Os locos PRX e LAP não manifestaram F_{ST} e F_{IT} significativos. O loco 6PGDH também não apresentou F_{IT} significativo (Tabela 18).

Entre as populações de progênies maternas, os locos MDH1, IDH e 6PGDH não apresentaram endogamia significativa dentro de cada população (F_{IS} não diferente de zero). IDH e 6PGDH também não apresentaram F_{IT} significativo e apenas o loco 6PGDH apresentou F_{ST} significativo (Tabela 18).

Naqueles locos que apresentaram endogamia significativamente diferente de zero, detectaram-se valores extremamente elevados. No teste de Li & Horvitz (1953), estes valores elevam expressivamente os valores do qui-quadrado, garantindo a significância da endogamia no conjunto total dos locos, em geral. No entanto, é interessante notar que, enquanto alguns locos têm índices de fixação extremamente elevados, outros praticamente não manifestam a existência de endogamia, fato que também foi identificado em outros trabalhos (Gandara, 1995; Reis, 1996c; Sebben, 1997; Mariot, 2000; Perecin, 2001). Este fenômeno é justificável, na medida em que os efeitos de deriva são independentes nos diferentes locos e, além disso, pode estar havendo seleção em alguns locos. Por outro lado, Coelho (2002) coloca que as variações dos coeficientes de endogamia entre diferentes locos podem ser consideradas como consequência do caráter finito das populações e da variação nas taxas médias de fecundação cruzada entre gerações.

Analisando-se os dados das Tabelas 18 e 19, percebe-se, pelos valores de F_{ST} e G_{ST} , que a maior parte da variabilidade genética está dentro das populações. Este padrão de estruturação é semelhante a várias espécies arbóreas tropicais que se reproduzem por alogamia ou por sistema misto, conforme indica a revisão de trabalhos de Hamrick e Godt, 1990. Trabalhos recentes vêm demonstrando igualmente esta tendência. Populações de progênies maternas de *Euterpe edulis* (palmitreiro) apresentaram 98 % da variabilidade genética distribuída dentro das mesmas (Reis, 1996c). Sebben *et al.* (2000), estudando populações naturais de *Tabebuia cassinoides* (caixeta), identificou aproximadamente 97 % da variabilidade dentro das mesmas. Auler (2000) obteve aproximadamente 96 % de variabilidade dentro de populações naturais de *Araucaria angustifolia*. No trabalho de Perecin (2001), a avaliação da estrutura genética entre populações naturais de *M. aquifolia* detectou aproximadamente 85 % da variabilidade genética dentro das populações. Scheffer (2001), estudando populações de progênies de *M. ilicifolia*, identificou 93,5 % da variabilidade dentro destas populações. Este resultado foi semelhante ao encontrado neste trabalho – de acordo com os dados da Tabela 19, aproximadamente 97 % da variabilidade

se encontra dentro das populações, considerando-se as populações de indivíduos adultos ($G_{ST} = 0,032$).

Entre as populações de progênies maternas avaliadas neste estudo, F_{ST} médio não chega a ser significativamente diferente de zero, enquanto entre as populações de indivíduos adultos este coeficiente é significativo (Tabela 18). Os dados da Tabela 18 demonstram que existe uma maior estruturação entre as populações de adultos do que entre as populações de progênies maternas. Tal fato indica a existência de deriva genética como um componente importante no estabelecimento das populações da espécie. Considerando o fato de que *M. ilicifolia* ocorre em ambientes com restrições edáficas, muitas vezes extremas – como é o caso de afloramentos de rochas – a deriva, durante o processo de dispersão de sementes, germinação e recrutamento, deve ser uma força microevolutiva expressiva.

Populações naturais de *M. ilicifolia* apresentam baixa estruturação genética, o que é característico de espécies que ocorrem em estágios finais de sucessão (Hamrick, 1983 *apud* Kageyama e Lepsch-Cunha, 2001). No entanto, estas parecem não ter condições para se estabelecerem nestes estágios (Rachwal *et al.*, 2002). Independentemente do estágio sucessional em que ocorrem, populações de *M. ilicifolia* são normalmente encontradas em locais com restrições edáficas, tais como matas ciliares, agrupamentos arbóreos em campos e afloramentos de rochas (Klein, 1968; ITCF, 1985; Cervi *et al.*, 1989; observação pessoal), geralmente em alta densidade e em pequenas áreas.

Bittencourt (2000), avaliando a diversidade genética de quatro populações naturais de *M. ilicifolia*, por meio da técnica de RAPD, observou que a estrutura genética das mesmas estava intimamente relacionada com o microambiente no qual se desenvolveram. De acordo com a autora, populações que ocorriam em formações geológicas semelhantes apresentavam menor distância genética entre si, independentemente da distância geográfica entre as mesmas. De acordo com os resultados do presente trabalho, a maior estruturação genética entre populações de indivíduos adultos do que entre populações de

progênies maternas pode estar indicando a existência de fluxo gênico entre as populações ou a partir de demes vizinhas (outros fragmentos florestais).

O fluxo gênico (Nm) entre as populações estudadas é relativamente alto ($Nm = 3,64$), apesar dos elevados coeficientes de endogamia verificados entre as mesmas. Este elevado fluxo gênico pode também ser um indicativo de trocas alélicas existentes com outras populações naturais de *M. ilicifolia* na região.

A região central do Paraná apresenta, ainda hoje, uma grande área com cobertura florestal (SPVS, 1996), uma vez que a substituição de áreas de floresta na região passou a ocorrer de forma expressiva somente a partir da década de 70. A distância geográfica entre as populações estudadas é de aproximadamente 30 Km. Atualmente, a área que separa as duas populações naturais envolvidas neste estudo está ocupada por estradas, assentamentos humanos, culturas agrícolas, pastagens e remanescentes de floresta. Possivelmente, as duas populações naturais avaliadas neste estudo faziam parte de uma mesma deme, no passado recente. A fragmentação da cobertura florestal pode ter provocado a separação geográfica desta população, restando hoje algumas ou várias demes que mantêm o fluxo gênico entre si, seja através da polinização ou da dispersão de sementes.

De acordo com os resultados desse trabalho, é possível considerar a hipótese de que a dinâmica populacional de *M. ilicifolia* seja caracterizada por pequenos agrupamentos de alta densidade e plasticidade a diferentes estágios sucessionais, após a implantação no início da sucessão secundária. Estes agrupamentos estariam associados em geral a áreas com restrição edáfica, trocando alelos entre si por meio de um relativamente elevado fluxo gênico, especialmente através da dispersão de sementes. Caso esta hipótese seja verdadeira, a espécie se enquadraria no grupo 4, na classificação de raridade proposta por Bawa e Asthon (1991), discutida anteriormente. Contudo, é importante lembrar que o fluxo gênico obtido neste estudo está relacionado a apenas duas populações, relativamente próximas entre si. Outrossim, o valor do fluxo gênico obtido neste estudo é aparente, estimado a partir do valor de F_{ST} . Dessa forma, este índice pode estar sendo superestimado.

Estudos relacionados à demografia de *M. ilicifolia*, portanto, são necessários e de grande importância para o esclarecimento desta questão e para a geração de critérios de conservação e manejo da espécie.

4.4.5 Tamanho efetivo populacional

Na tabela 20 estão dispostos o tamanho efetivo (N_e) das populações estudadas, a representatividade genética das mesmas (N_e/N) e o número de indivíduos que representa geneticamente 50 plantas.

Estes dados indicam elevados valores de tamanho efetivo populacional, bem como elevada representatividade genética das amostras. Pode ter havido uma superestimativa destes valores, uma vez que, na determinação do tamanho efetivo populacional, adotou-se o pressuposto de que as populações são grandes (mais de 100 indivíduos) e que o parentesco entre os indivíduos dentro das populações é baixo (próximo a zero) (Venkovsky, 1997). Os elevados coeficientes de endogamia observados nas populações naturais de *M. ilicifolia* estudadas não corroboram este pressuposto, o que tende a elevar os valores de N_e e N_e/N , de acordo com o modelo de estimativa utilizado

Tabela 20: Tamanho efetivo populacional (N_e), relação entre tamanho efetivo e tamanho da amostra (N_e/N) e tamanho efetivo considerando-se amostras de 50 plantas ($N_e(n)$) em populações naturais* de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. na região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

<i>Indivíduos adultos</i>				
	N	N_e	N_e/N	$N_e(50)$
População 01	32	28,07	0,88	57,0
População 02	30	22,59	0,75	66,4
<i>Progênies maternas</i>				
	N	N_e	N_e/N	$N_e(50)$
População 01	140	119,55	0,85	---
População 02	141	110,33	0,78	---

* População 01: Fazenda da Costa, Manasa S.A.- população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico/afloramento de rocha; População 02: sede da Fundação RURECO - população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em cambissolo hálico tb distrófico;

Não obstante, os dados da Tabela 20 indicam que, apesar da elevada endogamia observada, o tamanho efetivo populacional é grande, tanto nas populações de indivíduos adultos quanto nas populações de progênies maternas, provavelmente em função do elevado fluxo gênico estimado. Este elevado fluxo gênico pode ser um fator determinante da manutenção dos altos valores de diversidade genética, número de alelos/loco e percentagem de locos polimórficos, observados nas populações ora estudadas. Contudo, novamente é importante considerar a pequena distância geográfica entre estas populações, bem como a existência de vários fragmentos de floresta entre as mesmas, na região. A continuidade do processo de substituição de áreas de florestas pode promover um aumento da deriva e uma conseqüente redução no tamanho efetivo (N_e) das populações remanescentes, na medida em que haja uma redução no fluxo gênico entre as mesmas. O manejo e a conservação *in situ* de *M. ilicifolia*, portanto, deve levar em consideração a existência de fragmentos florestais relativamente próximos e a necessidade da realização de

estudos relativos ao efeito da fragmentação e conectividade sobre o tamanho efetivo das populações da espécie.

De acordo com os dados da Tabela 20, a representatividade genética é similar entre os indivíduos adultos e as progênes maternas de cada população. Contudo, o tamanho efetivo e a representatividade genética são diferentes entre as populações estudadas – na população 01, estes valores são superiores à população 02, tanto entre os indivíduos adultos quanto entre as progênes maternas. Com base nestes valores, a estimativa do número de indivíduos que deve ser preservado como porta-sementes, na prática do manejo, também é diferente. Na população 01, devem ser mantidos aproximadamente 57 indivíduos, considerando-se a preservação de um tamanho efetivo de 50 indivíduos. Na população 02, o número de indivíduos que deve ser mantido visando a conservação de um tamanho efetivo de 50 indivíduos é maior – aproximadamente 66 indivíduos. Estes valores podem também servir como referência para a coleta de sementes de *M. ilicifolia* em condições ambientais semelhantes às das populações aqui estudadas, visando a conservação *ex situ* de germoplasma – neste caso, deveria ser mantido o tamanho efetivo populacional como número mínimo de indivíduos matrizes.

A diferença entre os valores de tamanho efetivo e representatividade genética estimados para cada população pode estar associada com a área que cada população ocupa – 20 ha e 1 ha, para a população 01 e 02, respectivamente. Maiores coeficientes de endogamia foram observados na população 02, em relação à população 01. A possibilidade de um maior número de combinações na população 01, em função da maior área que ocupa – e do maior número de indivíduos se inter cruzando - pode estar promovendo um maior tamanho efetivo desta população. Populações em áreas pequenas, portanto, estão mais sujeitas à deriva, em função do menor tamanho efetivo populacional. Portanto, a prática do manejo de populações pequenas pode representar um risco à conservação da diversidade da espécie.

Todavia, a diferença nos valores de tamanho efetivo para cada população avaliada pode estar relacionada também a aspectos do sistema de cruzamento da espécie, discutidos a seguir.

4.4.6 Sistema de cruzamento

Os resultados do teste de aderência das populações naturais de *M. ilicifolia* avaliadas neste estudo ao equilíbrio de panmixia estão dispostos na Tabela 21.

Entre os indivíduos adultos da população 01, quatro locos (PRX, PGI, MDH1 e LAP) apresentaram aderência ao equilíbrio de panmixia, dentre os seis locos que apresentaram polimorfismo nesta população. Considerando-se todos os locos avaliados, existe aderência ao equilíbrio de panmixia entre os indivíduos adultos da população 01.

Entre os indivíduos adultos da população 02, bem como entre as progênes maternas de ambas as populações, não foi observada aderência a este equilíbrio. Por outro lado, na população 02, a maior parte dos locos avaliados nos indivíduos adultos não apresentou equilíbrio de panmixia – cinco locos (PRX, PGI, MDH1, NADHDH e LAP) dentre os sete locos polimórficos desta população (Tabela 21).

Entre os seis locos avaliados em cada população de progênes maternas, a população 01 apresentou três locos sem aderência ao equilíbrio de panmixia (PRX, PGI e MDH2), enquanto a população 02 apresentou quatro locos em desequilíbrio (PRX, PGI, MDH2 e IDH) (Tabela 21).

É interessante notar que nas populações de progênes maternas, a não aderência de alguns locos ao equilíbrio de panmixia é caracterizada por valores de X^2 extremamente elevados. Estes valores contribuem para que o somatório de X^2 nas populações de progênes maternas seja bem superior a este somatório nas populações de indivíduos adultos, indicando que as primeiras estão mais distantes do equilíbrio de panmixia. A ocorrência de uma maior aproximação à panmixia em populações de indivíduos adultos, relativamente a populações de progênes, foi também identificada em *Cedrela fissilis*

(Gandara, 1996), *Euterpe edulis* (Reis, 1996c), *Cryptocarya moschata* (Moraes, 1997) e *Chorisia speciosa* (Souza, 1997).

Tabela 21: Aderência ao equilíbrio de panmixia em indivíduos adultos e em progênies maternas de duas populações naturais* de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. na região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

<i>População 01 – indivíduos adultos</i>			
Locos	X ²	GL	P
PRX	1,237	3	0,744
PGI	0,059	1	0,808
MDH1	0,059	1	0,808
MDH2	5,359	1	0,021
IDH	7,846	1	0,005
LAP	0,564	1	0,453
TOTAL	15,124	8	
<i>População 02 – indivíduos adultos</i>			
Locos	X ²	GL	P
PRX	14,333	1	0,000
PGI	3,682	1	0,055
MDH1	4,248	1	0,039
NADHDH	8,816	1	0,003
IDH	0,304	3	0,959
LAP	8,816	1	0,003
6 PGDH	0,055	1	0,815
TOTAL	40,254	9	
<i>População 01 – progênies maternas</i>			
Locos	X ²	GL	P
PRX	9,452	1	0,002
PGI	19,316	3	0,000
MDH1	0,969	1	0,325
MDH2	51,409	1	0,000
IDH	1,943	3	0,584
6PGDH	0,106	1	0,745
TOTAL	83,195	10	
<i>População 02 – progênies maternas</i>			
Locos	X ²	GL	P
PRX	18,800	1	0,000
PGI	20,515	1	0,000
MDH1	1,394	1	0,238
MDH2	119,564	1	0,000
IDH	35,644	3	0,000
6PGDH	0,004	3	1,000
TOTAL	195,921	11	

* População 01: Fazenda Costa, Manasa S.A.- população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico/afloramento de rocha; População 02: sede da Fundação RURECO - população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em cambissolo hálico tb distrófico.

Não obstante, nas populações de indivíduos adultos, existe uma sobreposição de gerações, as quais, trocando alelos entre si, podem promover uma maior aproximação ao equilíbrio de panmixia do que nas populações de progênies maternas, as quais se constituem na amostragem de apenas um evento reprodutivo.

Perecin (2001), avaliando a aderência ao equilíbrio de panmixia de uma população natural de *M. ilicifolia* na região de Caçador/SC, identificou 71 % dos locos em desequilíbrio. Por sua vez, Scheffer (2001) observou aderência ao equilíbrio de panmixia em todos os locos avaliados em cinco populações de progênies maternas de *M. ilicifolia*.

Resultados variáveis, portanto, foram obtidos a partir de diferentes populações e em diferentes trabalhos, no que concerne à aderência de populações de *M. ilicifolia* ao equilíbrio de panmixia. Esta diferença pode estar associada, dentre outros fatores, à frequência de tipos florais que ocorre em cada população. Neste trabalho, conforme descrito anteriormente, na população 01 os indivíduos produzem ou somente flores do tipo A, ou somente flores do tipo B. Já na população 02, existem indivíduos que produzem ambos os tipos florais. Como somente as flores do tipo B produzem pólen viável, a alogamia na população 01 deve ocorrer com maior frequência, promovendo a sua maior proximidade ao equilíbrio de panmixia. Esta maior alogamia na população 01, reflexo de características da frequência de tipos florais, também explica os maiores valores de tamanho efetivo na população 01 do que na população 02 (Tabela 20).

Na Tabela 22 são apresentadas as taxas de cruzamento multilocos (t_m) e as taxas médias de cruzamento dos locos isolados (t_s), estimadas em cada população natural de *M. ilicifolia* avaliada neste estudo. Estas taxas foram estimadas utilizando-se o programa MLTR (Ritland, 1997).

Tabela 22: Taxa de cruzamento* multilocos (t_m) e taxa de cruzamento média dos locos isolados (t_s), estimada em populações naturais** de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. na região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

	t_m	t_s	$t_m - t_s$
População 01	0,954 (0,274)***	0,913 (0,297)	0,041 (0,151)
População 02	0,729 (0,077)	0,680 (0,081)	0,048 (0,021)

* - Estimada a partir da utilização do programa MLTR (Ritland, 1997);

** - População 01: Fazenda Costa, Manasa S.A.- população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico/afloramento de rocha; População 02: sede da Fundação RURECO - população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em cambissolo hálico tb distrófico;

*** - Os valores entre parêntesis correspondem ao erro padrão da média

Observando-se os dados da Tabela 22, nota-se que a população 01 apresenta uma taxa de alogamia bastante elevada, não diferente de 1,0. É interessante notar, todavia, a grande variação da taxa de cruzamento entre os locos nesta população, representada pela magnitude do erro padrão da média da taxa de cruzamento dos locos isolados (0,297).

O grau de alogamia em uma população natural, contudo, pode ser bastante afetado pela densidade de floração, uma vez que variações nesta densidade acabam por gerar contribuições heterogêneas de frequências alélicas em grãos de pólen no processo reprodutivo (Murawsky e Hamrick, 1991), promovendo a ocorrência de cruzamentos não aleatórios. Outrossim, a heterogeneidade de frequências alélicas entre pólen e óvulo é comum em espécies tropicais (Murawski et al., 1990; Murawski e Hamrick, 1991; Gandara, 1996), indicando também a ocorrência de cruzamentos não aleatórios.

Na Tabela 23 são apresentados os resultados da avaliação de heterogeneidade nas frequências alélicas entre grãos de pólen e óvulos, obtidas através do programa MLTR (Ritland, 1997).

Tabela 23: Comparação entre as freqüências alélicas em grãos de pólen e óvulos, obtidas em populações naturais* de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. na região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

<i>População</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	X^2
População 01	14	85,12 **
População 02	13	36,94 **

* População 01: Fazenda Costa, Manasa S.A.- população em clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico/afloramento de rocha; População 02: sede da Fundação RURECO - população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em cambissolo hálico tb distrófico;
 ** valores significativos ($P < 0,05$)

De acordo com os dados da Tabela 23, existe heterogeneidade nas freqüências alélicas entre os diferentes tipos de gametas, em ambas as populações. Estes dados indicam a evidência da existência de cruzamentos não aleatórios nas populações naturais de *M. ilicifolia* avaliadas neste trabalho, que podem estar contribuindo para a promoção da elevada endogamia observada nas mesmas.

Scheffer (2001), avaliando a taxa de cruzamento em uma população de *M. ilicifolia*, encontrou igualmente uma taxa de cruzamento bastante elevada (0,996), comprovando a elevada ocorrência de alogamia na espécie.

No entanto, na população 02 a taxa de cruzamento é bem menor do que na população 01 (Tabela 22). A diferença entre as taxas de cruzamento das duas populações avaliadas neste estudo pode estar relacionada à diferença na freqüência de tipos florais em cada uma das mesmas, responsável também pelas diferenças na aderência ao equilíbrio de panmixia e nos tamanhos efetivos entre as duas populações, discutidas anteriormente (Tabelas 20 e 21). Não obstante, é importante lembrar que cada indivíduo de *M. ilicifolia* produz uma grande quantidade de flores em diferentes fenofases, simultaneamente – portanto, algum mecanismo de auto-incompatibilidade de fecundação entre flores do tipo B pode estar ocorrendo na espécie, o que justificaria as elevadas taxas de cruzamento observadas na população 01.

Contudo, é necessário considerar que a relação entre a frequência de tipos florais e a taxa de cruzamento foi proposta com base no estudo de apenas duas populações naturais de *M. ilicifolia*. Kearns e Inouye (1993) colocam que a taxa de cruzamento em populações naturais pode ser influenciada por diversos fatores ambientais e fenológicos. Segundo estes autores, as plantas localizadas no centro de populações densas podem ser predominantemente alógamas, enquanto que as localizadas nas margens podem ser predominantemente autógamias; as plantas que florescem na extremidade fenológica da floração podem ser predominantemente autógamias, ocorrendo o inverso nas plantas que florescem no pico da floração; populações onde os polinizadores são raros podem apresentar padrões de taxa de cruzamento diferentes daquelas onde os polinizadores são abundantes (Kearns e Inouye, 1993). Assim, a realização de estudos envolvendo relações entre padrões de florescimento e taxa de cruzamento em um maior número de populações naturais de *M. ilicifolia* seria interessante.

Na população 01, pode estar ocorrendo cruzamentos a partir de indivíduos provenientes de outras demes. Este aspecto pode estar contribuindo na aparente contradição entre a elevada taxa de cruzamento e a elevada endogamia, observadas na população 01. Soma-se a isso o fato de que a população 01 ocupa uma área aproximada de 20 ha, enquanto a população 02 ocupa apenas 1 ha.

Não obstante, de acordo com os resultados deste trabalho, é possível considerar que em função das características da biologia floral e das frequências dos tipos florais, da heterogeneidade das frequências entre grãos de pólen e óvulos e do afastamento de populações naturais de *M. ilicifolia* ao equilíbrio de panmixia, o sistema de cruzamento deve ser um dos fatores que influencia fortemente na determinação dos elevados índices de endogamia observados nestas populações. Assim, é de extrema importância o aprofundamento de investigações relacionadas a este aspecto em populações naturais, envolvendo a ecologia de polinização e de dispersão de sementes, bem como os mecanismos de fecundação da espécie, a fim de contribuir para a sustentação de propostas de conservação e manejo de *M. ilicifolia*.

6. Fundamentos para o manejo

Nas populações de *M. ilicifolia* avaliadas neste estudo, há importantes diferenças entre indivíduos que crescem sob intensa luminosidade e sobre afloramentos de rochas e indivíduos que crescem em ambientes semi-sombreados, sobre solos em formação. Considerando-se uma biomassa semelhante entre os indivíduos das duas populações avaliadas, os indivíduos em clímax edáfico são mais altos, apresentam caules principais com menor diâmetro, maior quantidade de ramos e praticamente todas as folhas se inserem nos ramos primários. Em sub-bosque de formações secundárias, os indivíduos apresentam menor número de ramos, grande quantidade de folhas inseridas no caule principal, altura menor e suas folhas são maiores (Tabela 02).

De acordo com os resultados deste trabalho, em ambas as condições ambientais avaliadas, indivíduos de *M. ilicifolia* apresentam uma efetiva reposição de biomassa a partir da poda total dos ramos, até o diâmetro máximo de aproximadamente 0,5 cm (diâmetro de um lápis), dois anos após a mesma. A poda total promove a formação de brotos maiores e com maior quantidade de folhas, comparando-se com indivíduos não podados ou com indivíduos que recebem poda de 1/3 dos ramos. (Tabelas 07 e 09). É interessante notar que a poda total dos ramos de *M. ilicifolia*, a cada dois anos, constitui-se no sistema adotado por extratores da região de Curitiba, PR, em populações naturais da espécie.

A característica “número de ramos primários com folhas” é um parâmetro adequado para indicar o rendimento foliar da espinheira-santa, uma vez que é fácil de ser medido e apresenta um elevado coeficiente de correlação com o rendimento (peso seco de folhas), em ambas as condições edafoclimáticas avaliadas. Especialmente na prática da poda total dos ramos, a utilização das equações de regressão estimadas para a determinação do rendimento a partir do número de ramos primários com folhas pode ser bastante útil, visando a avaliação da produção individual e de populações de *M. ilicifolia*, uma vez que o rendimento estimado é praticamente o rendimento que será obtido após a poda e a secagem.

A estimativa do rendimento, antes da poda, permite ao manejador avaliar a rentabilidade da exploração individual e populacional, bem como dimensionar física e financeiramente fatores como mão-de-obra, secagem, armazenamento e transporte.

Em função das diferenças fenotípicas de indivíduos da espécie, em diferentes ambientes, torna-se justificável o uso de equações de regressão distintas para cada caso. Assim, a equação $Rd = 0,75205 \times RPCF$ (Rd = rendimento; $RPCF$ = número de ramos primários com folhas) pode ser utilizada para a estimativa do rendimento em populações que ocorrem sobre solos litólicos/afloramentos de rochas, recebendo intensa luminosidade. Para populações que ocorrem em sub-bosque, sob luz difusa e em solos com maior profundidade, a equação $Rd = 1,53459 \times RPCF$ (Rd = rendimento; $RPCF$ = número de ramos primários com folhas) é mais apropriada para a estimativa do rendimento (Tabelas 04 e 05; Figura 01).

Verificou-se, neste trabalho, que apesar dos indivíduos que receberam poda total apresentarem, em média, uma reposição efetiva de biomassa dois anos após a poda, a variação desta reposição entre os indivíduos foi bastante grande. Esta variação é representada por elevados valores de coeficientes de variação para os incrementos de biomassa de folhas (Tabelas 07 e 09). Assim, uma prática mais conservacionista para o manejo de populações naturais de *M. ilicifolia* seria a realização de podas individuais a cada três anos, e não a cada dois anos, uma vez que a produção de biomassa foliar três anos após a poda deve ser maior do que dois anos após a mesma. Dessa forma, a reposição de biomassa em cada indivíduo poderia ser mais efetiva; ao mesmo tempo, esta prática de poda promoveria menor “estresse” às plantas, estimulando uma maior longevidade das mesmas. É necessário, no entanto, a avaliação dos indivíduos três anos após a poda, a fim de fundamentar de forma mais sólida esta proposta.

Apesar da poda total dos ramos propiciar potencialmente uma efetiva reposição de biomassa foliar, três anos após a mesma, esta prática aplicada a todos os indivíduos de uma população, a cada três anos, não parece ser interessante, seja pelo grande intervalo de tempo entre uma poda e outra na população – o que representaria uma receita pouco

escalonada para o manejador – seja pelo impedimento total da polinização e da dispersão de sementes nos anos em que a poda fosse realizada, prejudicando a regeneração natural da espécie e o fluxo gênico entre populações e afetando, inclusive, a disponibilidade de recursos para os polinizadores e dispersores de sementes, fato que poderia afetar a demografia populacional dos mesmos.

Recentemente, propostas de manejo de populações naturais de espécies tropicais que levam em conta a conservação da diversidade genética vem sendo desenvolvidas baseando-se na necessidade da manutenção de um número mínimo de indivíduos que devem ser mantidos na população como matrizes (porta-sementes) (Reis, 1996c; Reis *et al.*, 1997; Sebben *et al.*, 2000). O pressuposto básico da manutenção de matrizes é garantir a regeneração natural e o fluxo gênico, paralelamente à conservação dos alelos existentes nas populações. Para tanto, o número de porta-sementes deve ser estimado com base no tamanho efetivo populacional. Para *Tabebuia cassinoides* (caixeta), Sebben *et al.* (2000) propõem a preservação de 60 árvores/ha. Para *Euterpe edulis* (palmitreiro), Reis *et al.* (1997) propõem igualmente este número.

Para produtos madeiráveis ou para produtos que envolvem a retirada total ou a morte dos indivíduos durante a prática do manejo – tais como *Tabebuia cassinoides* e *Euterpe edulis* - as matrizes conservadas atuam como tal durante um período de tempo relativamente longo, ou seja, até que ocorra a senescência e morte das mesmas e/ou novos indivíduos se tornem matrizes. Neste sentido, a manutenção de um número de matrizes proporcional ao tamanho efetivo populacional é uma prática bastante razoável. Para produtos não madeiráveis, no entanto, a manutenção de matrizes pode assumir um caráter mais dinâmico. No caso de *M. ilicifolia*, a prática da poda total não acarreta a morte do indivíduo. No ano seguinte à poda, se esta for procedida no outono, os indivíduos podados tem condições de produzirem flores e frutos. Assim, os indivíduos porta-sementes podem variar ao longo do tempo, na medida em que são manejados.

Mantendo-se diferentes porta-sementes a cada evento reprodutivo, promove-se uma maior dinâmica espacial da troca alélica ao longo do tempo. Do ponto de vista

conservacionista, uma das vantagens do manejo de produtos não madeiráveis, tais como *M. ilicifolia*, em relação ao manejo de produtos que envolvem a destruição dos indivíduos explorados, é que torna-se possível a promoção da troca alélica entre todos os indivíduos da população, ao longo do tempo.

Considerando-se estes aspectos e os resultados obtidos neste estudo, uma proposta razoável para o manejo de populações naturais de *M. ilicifolia* seria a poda anual de todos os ramos (até o diâmetro máximo de 0,5 cm) de um em cada três indivíduos. Dessa forma, a cada ano seriam mantidos 2/3 dos indivíduos como porta-sementes. Idealmente, seria interessante que estes 2/3 fossem constituídos por no mínimo 57 indivíduos em populações com características semelhantes à população 01 (população sob intensa luminosidade, em situação de clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico/afloramento de rocha) e 66 indivíduos em populações com características semelhantes à população 02 (população em sub-bosque de formação secundária), uma vez que, de acordo com os resultados deste trabalho, estes valores são correspondentes a um tamanho efetivo de 50 indivíduos em cada população, número de indivíduos recomendado para conter os efeitos de endogamia nas populações, consideradas 100 gerações (Kageyama e Lepsch-Cunha, 2001). Dessa forma, a cada evento reprodutivo, a população estaria efetivamente representada geneticamente. No entanto, os indivíduos que compõem esta porcentagem seriam variáveis ao longo do tempo, de forma a promover a possibilidade da troca alélica entre todos os indivíduos da população a médio prazo.

De acordo com esta proposta, cada indivíduo podado se constituiria em um indivíduo matriz ao longo dos próximos dois anos após a poda. Considerando a variável tempo, portanto, o número de matrizes conservado seria idêntico ao número de indivíduos reprodutivos da população. Seguindo esta lógica, populações com tamanho real de 57 ou 66 indivíduos, para as respectivas condições colocadas, poderiam até ser manejadas – no entanto, esta forma de exploração, apesar de promover a conservação da diversidade genética, tenderia a aumentar o efeito de endogamia a cada evento reprodutivo. De qualquer forma, populações com um número inferior a 57 e a 66 indivíduos, para as

respectivas condições colocadas, não deveriam de forma alguma ser exploradas, na medida em que estas podem estar expostas à redução da diversidade genética e ao aumento expressivo de endogamia.

O número de 57 ou 66 indivíduos, preferencialmente constituindo 2/3 da população, como tamanho mínimo populacional a ser manejado, pode ser um fator limitante à prática do manejo da espécie, visto que várias populações de *M. ilicifolia* apresentam menor número de indivíduos. Assim, a realização de estudos relativos à demografia e ao fluxo gênico da espécie são de extrema importância, a fim de estabelecer a distância de conectividade entre populações. A partir da existência desta conectividade, pode ser possível o manejo de populações menores da espécie.

Populações naturais de *M. ilicifolia*, apesar de apresentarem elevado número de alelos por loco, elevada percentagem de locos polimórficos, alta diversidade genética e relativamente elevado fluxo gênico entre populações, apresentam igualmente elevada endogamia, bem como efeito de deriva durante o processo de estabelecimento dos indivíduos (Tabelas 18 e 19). Este efeito de deriva pode ser maior na medida em que haja uma maior fragmentação entre os remanescentes populacionais da espécie.

A elevada endogamia em populações naturais da espécie está associada fortemente a condicionantes do sistema reprodutivo. As populações de *M. ilicifolia* estudadas não são panmíticas, apresentam a frequência entre grãos de pólen e óvulos heterogênea e, em ambientes sombreados e com alguma profundidade de solo, apresentam sistema reprodutivo misto. Além disso, o estabelecimento de novos indivíduos na população deve sofrer um efeito de deriva pronunciado, visto as restrições edáficas em que as populações da espécie ocorrem e os dados observados neste trabalho.

O caráter dinâmico da proposta de manejo colocada possibilitaria a manutenção da estrutura e diversidade genética de populações naturais de *M. ilicifolia*. Outrossim, a poda de um indivíduo a cada conjunto de três indivíduos, próximos entre si, provavelmente não promoveria alterações significativas no processo de polinização, em função da manutenção de flores em indivíduos com uma proximidade semelhante às condições naturais. Portanto,

garantiria-se a oferta de néctar, frutos e sementes para os agentes polinizadores e dispersores, todos os anos, promovendo a troca alélica e o fluxo gênico para outras populações. Dessa forma, os efeitos de deriva e endogamia provavelmente não seriam incrementados com a prática do manejo.

É preciso considerar-se que este estudo não avaliou a taxa de florescimento e de frutificação nos indivíduos podados, nem o efeito da poda contínua ao longo do tempo. É possível que os indivíduos podados passem a reduzir a produção de flores e frutos; além disso, a extração periódica de nutrientes através da poda pode promover redução de produtividade e de vida útil dos indivíduos da espécie.

A proposta de manejo colocada está fundamentada em resultados obtidos a partir do estudo de apenas duas populações naturais de *M. ilicifolia*, relativamente próximas entre si, durante o período de dois anos. Assim, faz-se necessário o aprofundamento de investigações em outras populações naturais da espécie, em diferentes regiões e durante maiores períodos de tempo, além de estudos específicos de demografia e relativos ao sistema reprodutivo, envolvendo as estratégias de cruzamento, a ecologia de polinização e a ecologia de dispersão de sementes de *M. ilicifolia*. Seria também de grande pertinência a avaliação do efeito da fragmentação florestal sobre o tamanho efetivo de suas populações naturais. Os resultados destas investigações contribuiriam de forma importante para o aprimoramento e a fundamentação de propostas sustentáveis de manejo de populações naturais da espécie.

7. Conclusões

Alguns aspectos da autoecologia de *M. ilicifolia* foram elucidados neste trabalho, os quais se constituem em elementos a serem considerados em práticas conservacionistas de manejo de populações naturais.

A avaliação de aspectos silviculturais, reprodutivos e genéticos de *M. ilicifolia* possibilitou a proposição de fundamentos para o manejo, visando sua sustentabilidade.

A avaliação de parâmetros fenotípicos não destrutivos para a estimativa do rendimento foliar em indivíduos de *M. ilicifolia* possibilitou a verificação de diferenças morfológicas entre os indivíduos da espécie em distintas condições ambientais. Não obstante, nas diferentes situações, o número de ramos primários com folhas é um bom estimador do rendimento.

Os resultados da avaliação dos incrementos de características da espécie, a partir de diferentes sistemas de poda, indicaram que a poda total de ramos de *M. ilicifolia* (até o diâmetro máximo de 0,5 cm) promove a reposição de biomassa foliar após dois anos da prática da mesma, apesar da grande variação desta reposição entre os indivíduos. A poda total é mais efetiva nesta reposição do que a poda de 1/3 dos ramos.

A análise de aspectos da biologia floral de *M. ilicifolia* em populações naturais sugere que há diferentes estratégias de adaptação relacionadas à estrutura floral e à frequência de tipos florais da espécie em distintas condições de solo e luminosidade.

A frequência de tipos florais apresenta, por sua vez, uma grande associação com a taxa de cruzamento de *M. ilicifolia* em populações naturais. Apesar das diferenças observadas, é possível concluir que *M. ilicifolia* apresenta sistema misto de cruzamento, com tendência a alogamia.

Populações naturais de *M. ilicifolia* apresentam maior número médio de alelos por loco, maior heterozigosidade esperada (diversidade genética) e maior percentagem de locos polimórficos do que a média de populações naturais de espécies arbóreas perenes de clima tropical estudadas. Não obstante, apresentam também elevados coeficientes de endogamia, gerados por condicionantes do sistema reprodutivo e pela existência de deriva

genética como um componente importante no estabelecimento de indivíduos e das populações. A maior parte da variabilidade genética de *M. ilicifolia* está dentro das populações. Apesar de haver estruturação significativa, porém baixa, entre as populações naturais estudadas, um elevado fluxo gênico aparente foi observado, fator que se contrapõe aos efeitos de deriva provenientes da fragmentação florestal. No entanto, é necessário levar-se em conta que as populações estudadas estão relativamente próximas.

Em função das diferenças fenotípicas, de sistema reprodutivo e genéticas entre populações de *M. ilicifolia* que ocorrem em ambientes distintos, torna-se justificável a utilização de práticas e índices técnicos apropriados a cada situação, o que deve ser levado em conta na prática do manejo de populações naturais da espécie.

A realização de estudos relativos à demografia e ao sistema reprodutivo da espécie em populações naturais, envolvendo a elucidação de aspectos relacionados aos mecanismos de fecundação, ecologia de polinização e ecologia de dispersão de sementes seriam de grande importância para a fundamentação e/ou alteração dos fundamentos para o manejo aqui colocados, bem como para o estabelecimento de outras estratégias de conservação para *M. ilicifolia*.

8. Referências bibliográficas

ALONSO, J. **Tratado de fitomedicina – bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires, Isis, 1998.

ANDRADE, F. M. de. Diagnóstico da cadeia produtiva de *Ilex paraguariensis* St. Hill – Erva-Mate. In: Projeto Inventário dos recursos florestais da mata atlântica: a exploração e utilização dos recursos, seus impactos sócio-econômicos atuais e potencialidades de manejo sustentável. **Relatório**. Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 1999.

ANDRADE, F. M. de. Exploração, manejo e potencial socioeconômico da erva-mate. In: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. (org). **Sustentável mata atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo, Ed. SENAC São Paulo, p. 19-34, 2002.

ARUNACHALAM, V. Participatory conservation: a means of encouraging community biodiversity. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n.122, p.1-6, 2000.

ALEXIADES, M. Conservação de recursos genéticos em plantas medicinais e propriedade intelectual. In: 1º Simpósio Latino-Americano de Produção de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares. **Palestra**. São Pedro/SP, 2000.

ALFENAS, A.C. (editor). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa, UFV, 1998, 574p.

ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo, Edgar Blucher, 1971, 381p.

ALLARD, R.W.; KAHLER, A.L.; WIER, B.S. The effect of selection on esterase allozymes in a barley population. **Genetics** (1), v. 73, p. 489-503, 1972.

AULER, N.M.F. Caracterização da estrutura genética de populações naturais de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze no estado de Santa Catarina. **Dissertação (Mestrado)/UFSC**. Florianópolis, UFSC, 2000.

BALANDRIN, M.F. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science** 228, p. 1154-1160, Junho, 1985.

BALLVE, R.M.L.; BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; SIQUEIRA, W.J.; SOBRINHO, J.T. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citrus. **Bragantia**, v. 50, n.1, p. 57-76, 1991.

BARNES, B. V.; ZAK, D. R.; DENTON, S. R.; SPURR, S. H.. **Forest ecology**. New York, J. Willey & Sons, 4 ed , 1998. 753 p.

BATTISTELLI, D.A.; PACHECO, C.V.; SILVA, D. W. da; STEENBOCK, W.; **Plantas da nossa gente – a sabedoria popular no uso de plantas medicinais**. Guarapuava, Fundação Rureco, 2001.

BAWA, K. S.; BULLOCK, S.H.; PERRY, D.R.; COVILLE, R.E.; GRAYUM, M.H. Reproductive biology of tropical rain forest trees. II. Pollination systems. **Am. J. of Botany**, v. 72, p.346-356, 1985a.

BAWA, K. S.; PERR, D.R.; BEACH, J.H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. **Am. J. of Botany**, v. 72, p.331-335, 1985b.

BAWA, K. S. Plant – polinatur interactions in tropical rain forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 21, p 399-422, 1990.

BAWA, K.S.; ASTHON, P.S. Conservation of rare tree in tropical rain forests: a genetic perspective. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (eds) **Genetics and conservation of rare plants**. Center for Plant Conservation, Oxford University Press, p. 62-74, 1991.

BERNARDI, H. H.; WASICKI, M. **Algumas pesquisas sobre a “espinheira-santa” ou “cancerosa” *Maytenus ilicifolia* Martius, usada como remédio popular no Rio Grande do Sul**. Santa Maria, URGs, 1959. 46 p.

BID. BANCO INTERAMERICANO DE DESENVOLVIMENTO; PNUD. PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO. **Nuestra propia agenda**. Washington: Comision de Desarrollo y Medio Ambiente de América Latina y el Caribe, 1990.

BIODIVERSITY SUPPORT PROGRAM, CONSERVATION INTERNATIONAL, THE NATURE CONSERVANCY, WILDLIFE CONSERVATION SOCIETY, WORLD RESOURCES INSTITUTE, AND WORLD WILDLIFE FUND 1995. **A regional analysis of geographic priorities for biodiversity conservation in Latin America and the Caribbean.** Biodiversity Support Program, Washington, D.C., USA. 140 pp

BITTENCOURT, J. V. M. Variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus illicifolia* por meio de marcadores RAPD. **Dissertação (Mestrado)/UFPR.** Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2000.

BOVI, M.L.; GODOY JUNIOR, G.; SAES, L.A. Correlações fenotípicas entre caracteres da palmeira *Euterpe edulis* Mart. e produção de palmito. **Revista Brasileira de Genética.** Ribeirão Preto, v.14, n.1, p.105-121, 1991.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Agenda 21 brasileira:** área temática - agricultura sustentável. São Paulo, Consórcio Museu Emílio Goeldi, 1999.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Primeiro relatório nacional para a convenção sobre diversidade biológica:** Brasil. Brasília, MMA, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 17. **Diário Oficial da União,** 24/02/2000.

BRASIL. Medida Provisória nº 2.166-67. **Diário oficial da união,** 25.08.2001

BRIZICKY, G.K. The genera of Celastrales in the southeastern United States. **Journal Arnold Arboretum Harvard University** 45. p. 206-234, 1964.

BROWN, A.H.D; MATHESON, A.C.; ELDRIGE, K.G. Estimation of the mating system of *Eucalyptus oblique* L'Herit by using allozyme polymorphism. **Australian Journal of Botany,** v. 23, p. 931-949, 1975.

CGIAR. CONSULTIVE GROUP ON INTERNATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH. **Sustainable agricultural production:** final report of CGIAR Committee. 1990.

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

CARRICONDE, C. Fitoterapia em saúde pública. In: I Congresso Sul Brasileiro de Plantas Medicinais. **Palestra.** Maringá, PR, 1999.

CARVALHO, H. M. A geração de tecnologia agrícola socialmente apropriada. **Textos para debate** nº 29. Rio de Janeiro, AS-PTA, 1990. 26p.

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

CENARGEN - CENTRO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS. **Biodiversidade brasileira.** Brasília, EMBRAPA, 1995.

CERCCOPA – CENTRAL REGIONAL DE COMERCIALIZAÇÃO DO CENTRO-OESTE DO PARANÁ. **Relatório de mercado - 2001.** Guarapuava, CERCCOPA, 2001.

CERVI, A. C.; PACIORNIK, E. F.; VIEIRA, R. F.; MARQUES, L. C. Espécies vegetais de um remanescente de floresta de araucária (Curitiba, Brasil): Estudo preliminar I. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v. 18, n. 1/4, p. 73-114, 1989.

CHAMBERS, R., RICHARDS, P., BOX, L. Agricultores experimentadores e pesquisa. **Série agricultores na pesquisa.** Rio de Janeiro, AS-PTA, nº 1, 1989. 45p.

CLAYTON, J.; TRETIAK, D. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **Journal of Fisheries Research Board of Canada.** 29, p. 1169-1172, 1972.

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, 23, p. 72-84, 1969.

COELHO, A.S.G. Abordagem bayesiana na análise genética de populações utilizando dados de marcadores moleculares. **Tese (Doutorado)/ESALQ/USP.** Piracicaba, ESALQ/USP, 2002.

CROW, J.F.; KIMURA, M.A. **An introduction to population genetics theory.** New York, Harper and Row, 1970. 591 p.

DAL AGNOL, L. A indústria brasileira de fitoterápicos: desafios e perspectivas. In: EMBRAPA/IBAMA. Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas. **Resultados da 1ª reunião técnica**. EMBRAPA/IBAMA, Brasília, 2002.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência - Um Guia de Estudo Interdisciplinar**. São Paulo, UNESP, 1996.

DI STASI, L. C. Manejo sustentável de plantas medicinais em florestas tropicais. In: I Congresso Sul Brasileiro de Plantas Medicinais. **Palestra**. Maringá, 1999.

DOS REIS, H. H. T. Fitoterapia em saúde pública. I Congresso Sul Brasileiro de Plantas Medicinais. **Palestra**. Maringá, 1999.

EMBRAPA/IBAMA. Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas. **Resultados da 1ª reunião técnica**. EMBRAPA/IBAMA, Brasília, 2002.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F. **Introduction to quantitative genetics**. London, Longman, 1996. 464 p.

FANTINI, A. C. *et al.* **Sustained yield management in tropical forest: a proposal based on the autoecology of the species**. *Sellowia.*, v.42/44, p. 25-32, 1992.

FANTINI, A.C.; NODARI, R.O.; REIS, M.S.; MANTOVANI, A.; ODORIZZI, J.; RIBEIRO, R.J. Estimativa da produção de palmito em plantas de palmitero (*Euterpe edulis* Martius) a partir de características fenotípicas. **Árvore**. Viçosa, v.21, n.1, p. 49-57, 1997.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Animal genetic resources information**. Roma, 1984. 56 p.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Conservation of genetic resources in tropical forest management: principles and concepts**. Roma, FAO, 1993. 105p.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Sustainable development and management of land and water resources. In: **Conference on Agriculture and the Environment**. Roma, FAO/Ministry of Agriculture, Natural Management and Fisheries of the Netherlands, 1991.

FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S., SOEJARTO, D.D.; GUO, Z. O lugar das plantas medicinais na terapêutica. **Boletim da Organização Mundial de Saúde**, v.64, n.2, p. 159-175, 1985.

FARNSWORTH, N. R. Screening plants for new medicines. In: WILSON, E.O. (Ed.) **Biodiversity**. Washington D.C., Nat. Acad. Press, 1988.

FLORIANO, E. P. et al. Manejo do palmito: uma proposta. In: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISADORES EM PALMITO, 1, 1987, Curitiba. **Anais**. Curitiba, p.189-192, 1987.

FOURNIER, L.A. El dendrofenograma, una representación gráfica del comportamiento fenológico de los árboles. *Turrialba* 26 (1), p. 96-97, 1976.

FRANÇA, S. de C.; PEREIRA, A. M. S.. Espinheira-santa: do estudo a viabilização de um fitoterápico brasileiro contra úlcera gástrica. **Racine**, São Paulo, set./out./nov; p. 67-69, 1997.

FRANKEL, O H.; SOULE, M. E.; **Conservation and evolution**. Cambridge: Cambridge University Press. 1981. 327 p.

FRANKEL, O.H.; BROWN, A.H.D.; BURDON, J.J. **THE CONSERVATION OF PLANT BIODIVERSITY**. CAMBRIDGE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 1995

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA/INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS/INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL. **Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados do domínio da Mata Atlântica no período 1990-1995**. São Paulo, 1998.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631 p.

GANDARA, F.B. Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos de uma população de *Cedrella fissilis* Vell. (Meliaceae). **Dissertação (Mestrado)**/UNICAMP. Campinas, UNICAMP, 1996. 69 p.

GEBUREK, T. Some results of inbreeding depression in serbian spruce (*Picea omorica* (Pank.) Purk.). **Silvae genetica**, v.35, n.4, p. 169-172, 1986.

GODOY, R.A.; BAWA, K.S. The economic value and sustainable harvest of plants and animals from the tropical Forest: assumptions, hypotheses, and methods. **Economic botany** 47(3), p. 215-219, 1993.

GOMEZ-POMPA, L. E.; BURLEY, F. W. The management of natural tropical forests. In: GOMEZ-POMPA, A.; WHITMORE, T. C.; HADLEY, M. **Rain forest regeneration and management**. Paris, UNESCO, 1991. p. 3-18

GONZALEZ, F.G.; PORTELA, J.Y.; STIPP, E.J.; DI STASI, L.C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., *Sorocea bomplandii* e *Zolernia ilicifolia*. **J. Ethnopharmacology**, 77(1), p. 41-47, sep. 2001.

HALL, P.; ORREL, L.C.; BAWA, K.J. Genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Am. J. Bot.**, 81, p. 1104-1111, 1994.

HARTLEY, C.W.S. **The oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. London, Longmans, Green and Co, 1967.

HAMRICK, J.L. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations. In: **Differentiation patterns in higher plants**. Academic Press., p. 53-67, 1987.

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

HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: **Frugivorous and Seed Dispersal**. Estrada, A. & Fleming, T.H. (eds), Junk Publishers, Berlin, 1986. 392 p.

HAMRICK, J. L. & GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: **Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources** (eds BROWN, A D. H.; CLEG, M. T.; KAHLER, A L. & WEIR, B. S.), p 43-63, Sinauer, Sunderland, 1990.

HOSOKAWA, R. T. Manejo sustentado de florestas naturais (situação e tendências futuras). In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6, 1990, Campos do Jordão. **Anais**. Campos do Jordão, p. 26-34, 1990.

HOWE, J.; SMALLWOOD, S. Ecology and seed dispersal. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.13, p. 201-228, 1982.

ICRAF. **Viewpoints and issues on agroforestry and sustainability**. Nairobi, ICRAF, 1989.

IICA. INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACIÓN PARA LA AGRICULTURA. **Sostenibilidad de la agricultura y los recursos naturales**: bases para establecer indicadores. Coronado, IICA/GTZ, 1993. 133p.

IUCN. THE WORLD CONSERVATION UNION; UNEP; WWF. **Caring for the world**: a strategy for sustainability. Gland, 1989.

ITCF. **Plano de Manejo**. Parque Estadual de Caxambu, Castro, PR. Curitiba, ITCF, 1985. 126 p.

KAGEYAMA, P.Y. Uso e conservação de florestas tropicais: qual paradigma? In: V Simpósio de Ecossistemas Brasileiros: Conservação. **Anais**. Vitória, CNPQ/FINEP/FAPESP/BIODIVERSITAS, 2000.

KAGEYAMA, P.Y. & GANDARA, F.B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. In: III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira. **Publicação ACIESP nº 87-II**. Serra Negra, ACIESP, 1994

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B.; SOUZA, L.M.I. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série técnica IPEF**. São Paulo, IPEF, 1998.

KAGEYAMA, P.Y.; LEPSCH-CUNHA, N.M. Singularidade da biodiversidade nos trópicos. In: GARAY, I; DIAS, B.F.S. **Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais**. Petrópolis, Vozes, 2001.

KEARNS, C. A.; INOUYE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. Colorado, University Press of Colorado, 1993.

KEPHART, S.R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analyses of techniques. **Amer. J. Bot.**, 77(5), p. 693-712, 1990.

KLEIN, R. M. Árvores nativas da Mata Pluvial da costa atlântica de Santa Catarina. **Congresso Florestal Brasileiro – contribuições e trabalhos apresentados e pareceres das comissões**. p. 65-103, 1968.

KOEPPEN, W. **Climatologia**. México, Fundo de Cultura Econômica, 1948. 207 p.

LEPSCH-CUNHA, N. Estrutura genética e fenologia de espécies raras de *Couratari spp.* (Lecythidaceae) na amazônia central. **Dissertação (Mestrado)/ESALQ/USP**. Piracicaba, ESALQ/USP, 1996.

LI, C.C.; HORWITZ, D.G. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. **Am. J. Human Genet.**, p.107-117, 1953.

MALTEZ, H.M. Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell.Arg. (Apocynaceae) em uma floresta estacional semidecidual no estado de São Paulo. **Dissertação (Mestrado)/UNICAMP**. Campinas, UNICAMP, 1996.

MARIOT, A. Distribuição da diversidade genética e aspectos da fenologia e dispersão de sementes de pariparoba (*Piper cernuum* Vell. – Piperaceae). **Dissertação (Mestrado)/UFSC**. Florianópolis, UFSC, 2000. 133 p.

MARIOT, A.; DI STASI, L.C.; REIS, M.S. Genetic diversity in natural populations of *Piper cernuum*. **The American Genetic Association**, 93(1-5), 2002.

MAZUCHOWSKI, J.Z. **Manual da erva-mate**. Curitiba, EMATER/PR, 2ª Ed, 1991.

METTLER, L.E.; GREGG, T.G. **Genética de populações e evolução**. São Paulo, Polígono/EDUSP, 1973. 262 p.

MONACHE, F.D. Maitenin: a new antitumoral substance from *Maytenus sp.* **Gazetta Chimica Italiana**, v. 102, p. 317-320, 1972.

MONTANARI Jr., I. Aspectos do cultivo comercial de espinheira-santa. **Agroecologia**, v.10, 1999.

MONTANARI Jr., I. Exploração econômica de plantas medicinais da mata atlântica. In: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. (org). **Sustentável mata atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo, Ed. SENAC São Paulo, p. 35-54, 2002.

MORAES, M.L.T. Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F.F e M.F Allemão Anacardiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Engler. **Tese (Doutorado/ESALQ/USP**. Piracicaba, ESALQ/USP, 1993.

MORAES, P.L.R. Estrutura genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). **Tese (Doutorado)/UNESP/Rio Claro**. Rio Claro, UNESP, 1997. 197 p.

McNELLY, J. A; MILLER, K. R.; REIDI, W.; MITTERMEYER, R. A; WERNER, T. B.. **Conserving the world's biological diversity**. Gland, Switzerland, IUCN/WRI/CI/WWF – US/WORLD BANK, 1990. 193 p.

MURAWSKI,D.A.; HAMRICK, J.M. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, 67, p. 167-174, 1991.

MURAWSKI,D.A.; BAWA, K.S. Genetic structure and mating system of *Stemonoporus oblonifolius* (Dipterocarpaceae) in Sri Lanka. **Am. J. Bot.**, 81, p. 155-160, 1994.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of Natural Academy of Science**, v. 70, n. 12, p. 3321-3323. 1973.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Ann. Human Genet.**, 41, p.225-233, 1977.

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

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York, Columbia University Press, 1987.

NIERVO, R.; MOSER, R.; BUSATO, A.C.B.; YUNES, R.A.; REIS, A.; CECHINEL FILHO, V. A comparative chemical study of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *Maytenus robusta* Reiss (Celastraceae). **Z. Naturforsch**, 56 c, p. 158-161, 2001.

O'MALLEY, D.M.; BAWA, K.S. Mating system of a tropical rain forest tree species. **Am. J. Bot.**, 74, p. 1143-1149, 1987.

O'MALLEY, D.M.; BUCKLEY, D.P.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.:Lecythidaceae) 2. Mating system. **Theor. Appl. Genet.**, 76. p. 929-932, 1988.

OYAMA, K. Conservation biology of tropical trees: demographic and genetic considerations. **Environment update** 1, p.17-32, 1993.

PAVAN-FRUEHAUF, S. **Plantas medicinais da mata atlântica: manejo sustentável e amostragem**. São Paulo, Annablume/FAPESP, 2000.

PERECIN, M. B. Diversidade genética em populações naturais de espécies de espinheira-santa, *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae). **Tese (Doutorado)/ESALQ/USP**. Piracicaba, ESALQ, 2001.

RADOMSKI, M. I. Caracterização ecológica e fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em populações nativas, no município da Lapa, Paraná. **Dissertação (Mestrado)/UFPR**. Curitiba, UFPR, 1998. 98 p.

RACHWAL, M.F.G; CURCIO, G.R.; MEDRADO, M.L.S. Desenvolvimento de espinheira-santa (*Mayenus ilicifolia*) em floresta ombrófila mista no estágio de capoeirão, em cambissolo húmico em Colombo, PR. **Relatório de pesquisa em andamento (não publicado)**. Colombo, EMBRAPA – Florestas, 2002.

REIS, M. S. **Manejo sustentado de plantas medicinais em ecossistemas tropicais**. In: STASI, L. C. Plantas Medicinais: Arte e Ciência - Um Guia de Estudo Interdisciplinar. São Paulo, UNESP, p. 198-215, 1996a.

REIS, M. S. Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais em plantas. **Revista Brasileira de Genética**, 19, 4, Supl., p.37-47, 1996b

REIS, M. S. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmiteiro (*Euterpe edulis* Martius). **Tese de Doutorado/ESALQ/USP**, Piracicaba, ESALQ, 1996 c.

REIS, M. S.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O; **Management of natural populations and maintenance of genetic diversity of *Euterpe edulis*; the heart-of-palm tree**. Internations Foundation for Science. Florianópolis, p. 145-156, set/1997.

REIS, M.S.; KAGEYAMA, P.Y.; GUIMARÃES, E.; NODARI, R.O.; FANTINI, A.C.; MANTOVANI, A.; VENKOVSKI, R. Variação genética em populações naturais de *Euterpe edulis* Martius na Floresta Ombrófila Densa. **Sellowia** (49-52), p.131-149, 2000.

REIS, M. S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais. In: 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, Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2ª Ed., p. 39-60, 2000.

RITLAND, K. **Multilocus mating system program: Version 1.1**. Toronto, University of Toronto, 1997

RITLAND, K. & JAIN, S. A model for estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Heredity** 47, p. 35-42, 1981.

ROSA, S. G. T. da. Caracterização das sementes de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, espinheira-santa e viabilidade de sua propagação sexuada. **Dissertação (Mestrado)/UFRGS**. Porto Alegre, UFRGS, 1994. 106 p.

RURECO – Fundação para o Desenvolvimento Econômico-Rural da Região Centro-Oeste do Paraná. **Projeto florestas medicinais – conservação e o uso sustentado de plantas medicinais em Turvo e Guarapuava, PR.** Guarapuava, RURECO, 1998.

SAS. Institute Inc. **SAS/STAT User`s Guide.** Release 6.03 Edition. Cary (NC), 1988. 1028 p.

SCHEFFER, M. C.; DONI FILHO, L.; KOEHLER, H. S. 1994. Influência do tipo de coleta, das condições e do tempo de armazenagem na viabilidade de sementes de *Maytenus ilicifolia*. **Resumo de temas livres.** XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Fortaleza, FINEP/CNPq, 1994.

SCHEFFER, M. C.; ARAUJO, J. A. de. Observações sobre a frutificação de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) na região sul do Brasil. **Livro de resumos (XV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, Águas de Lindóia, 13 a 17/10/1998).** São Paulo, UNIFESP, 1998.

SCHEFFER, M. C. Sistema de cruzamento e variação genética entre populações e progênes de espinheira-santa. **Tese (doutorado).** Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2001.

SEARS, C. The easy way do sell drugs. **New Scientist**, Nov. 1995.

SEBBEN, A.M. Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) a partir de isoenzimas. **Dissertação (Mestrado)/ESALQ/USP.** Piracicaba, ESALQ/USP, 1997. 107 p.

SEBBEN, A.M.; SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; VENKOVSKY, R. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). **Scientia forestalis** n. 58, p.127-143, dez 2000.

SEBBEN, A.M.; SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; LACERDA, C.M.B. Estrutura genética em populações de *Tabebuia cassinoides*: implicações para o manejo florestal e a conservação genética. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 13, n.2, p.99-113, dez 2001.

SEBSEBE, D. The genus *Maytenus* (Celastraceae) in NE tropical Agrica and tropical Arabia. **Symbolae Botanicae Upsaliensis** 25. p.1-101. 1985

SEMA/GTZ – SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE / DEUTSCHE GESSELLSCHAFT FÜR TECHNISCHE ZUSAMMERARBEIT. **Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no Estado do Paraná**. Curitiba, SEMA/GTZ, 1995. 139 p.

SIQUEIRA, M. Análise florística e ordenação de espécies arbóreas da mata atlântica através de dados binários. **Dissertação (Mestrado)**, Instituto de Biologia, UNICAMP. Campinas, 1994.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review in Ecology and Systematics**, 16, p. 393-430, 1985.

SOUZA-FORMIGONI, M.L.; OLIVEIRA, M.G.; MONTEIRO, M.G.; SILVEIRA FILHO, N.G.; BRAZ, S.; CARLINI, E.A. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J. Ethnopharmacology**, 34(1), p. 29-41, aug 1991.

SOLTIS, D.E; HAUFLE, C.H.; DARROW, D.C.; GASTONY, G.J. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**, v. 73, p. 9-27, 1983.

SOKAL, R. R; ROHLF, F. J. **Biometry – the principles and practice of statistics in biological research**. W. H. Freeman and Company, 3d ed. New York, 1997.

SOUZA, L.M.I. Estrutura genética de populações de *Chorisia speciosa* St. Hil. (Bombacaceae) em fragmentos florestais na região de Bauru (SP) – Brasil. **Dissertação (Mestrado)**/ESALQ/USP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

SPVS – SOCIEDADE DE PESQUISA EM VIDA SELVAGEM. **Nossas árvores – manual para recuperação da reserva florestal legal**. Curitiba, SPVS, 1996.

STEEL, R. G. D; TORRIE, J. H.. **Principles and procedures of statistics – a biometrical approach**. McGraw-Hill Book Company, 2d ed. New York, 1980.

STELLFELD, C. A espinheira-santa: contribuição ao estudo farmacognóstico. **Bol. Assoc. Bras. Pharm.**, v. 15, p. 551 – 571, 1934.

STEENBOCK, W. (org) **Buscando a nossa farmacopéia**. Guarapuava, Fundação RURECO, 1999.

STEENBOCK, W. Medicinal plants: popular knowledge survey, alternative therapeutics, option of income and environmental conservation in the centre of Paraná State, Brazil. **Revista da Sociedade de Olericultura do Brasil**, Vol 13, Suplemento, SOB/FCAV-UNESP, p.137-140, 2000.

SWOFFORD, D.L.; SELLANDER, R.B. **BIOSYS-2 - A computer program for the analysis of allelic variation in genetics**. June, 1997.

TERBORGH, J. Keystone plant in a tropical forest. In: **Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity** (ed M E Souké). Sinauer, Sunderland, 1986.

TABARELLI, M.; VILLANI, J. P.; MANTOVANI, W. 1993. Estrutura, composição florística e dinamismo de uma floresta secundária na encosta atlântica - SP. In: 1º Congresso florestal panamericano/7º Congresso Florestal Brasileiro. **Anais**. Curitiba, 1993.

WHATLEY, J. J.; WHATLEY, F. R. **A luz e a vida das plantas**. São Paulo, EPU, 1982. 101 p.

WORKMAN, P.L.; NISWANDER, J.D. Population studies on southwestern indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. **Am. J. Human Genet.**, 22, p. 24-49, 1970.

WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p.97-159, 1931.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics** 28, p. 114-138, 1943

WRIGHT, S. Isolation by distance under diverse systems of mating. **Genetics** 31. p.39-59, 1946

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Ann. Eugenics**, 15: p. 395-420, 1951

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution** 19, p. 395-420, 1965.

WRI. WORLD RESOURCES INSTITUTE; USAID. UNITED STATES AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT; LAC. **Environmental strategy options for Latin America and the Caribbean**. Washington D.C., 1991.

WRI. WORLD RESOURCES INSTITUTE; IUCN. THE WORLD CONSERVATION UNION;
PNUMA. UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAME. **A estratégia global da
biodiversidade**. Curitiba: Fundação O Boticário de **Proteção** à natureza, 1992. 232p.

ANEXOS

Anexo 01: Receitas dos tampões de eletrodo, de gel e de revelação dos sistemas enzimáticos utilizados para eletroforese de isoenzimas de *M. ilicifolia*. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

Tampão eletrodo (TC):

- Tris: 27,00 g (PM = 121,14)
- Ácido cítrico: 16,52 g (PM = 210,1)
- Água destilada: 1000 ml
- Ajuste para pH 7,5, utilizando solução de NaOH 5M

Tampão gel (TC):

- Tampão do eletrodo diluído a 3,5 %

PRX:

- O-dianisidina bi HCl: 0,016 g
- H₂O₂ (3%): 1 ml (1 minuto depois da coloração, sobre o gel)
- Acetato de sódio 0,1M pH 4,5: 50 ml

6PGDH:

- Ácido 6-fosfogluconico, Na₃: 0,02 g
- NADP⁺, Na₂: 0,01 g
- MTT: 0,01 g
- PMS: 0,001 g
- MgCl₂ (1%): 1 ml (0,01 g)
- Tris HCl 0,1M pH 8,0: 50 ml

NADHDH:

- NADH: 0,025 g
- MTT: 0,01 g
- Tris HCl 0,2M pH 8,0: 50 ml

LAP:

- Leucine: 0,025 g (em 2 ml de metanol a 10 %)
- Fast blue: 0,03 g
- Tris Malato 0,1M pH 5,4: 20 ml
- Água destilada: 50 ml

IDH:

- DL-Ácido isocítrico, Na₃: 0,1 g
- NADP+, Na₂: 0,01 g
- MTT: 0,01 g
- PMS: 0,001 g
- MgCl₂ (1%): 1 ml (0,01 g)
- Tris HCl 0,1M pH 8,0: 50 ml

PGI:

- Frutose 6 fosfato, Na₃: 0,0375 g
- NADP+, Na₂: 0,01 g
- MTT: 0,01 g
- PMS: 0,001 g
- MgCl₂ (1%): 0,01 g (1 ml)
- Tris HCl 0,1M pH 8,0: 50 ml
- Glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH): 10 unidades (último ingrediente antes da coloração)

MDH:

- Ácido Málico 0,5M pH 8,0: 2 ml
- NAD⁺: 0,01 g
- MTT: 0,01 g
- PMS: 0,001 g
- Tris HCl 0,1M pH 8,5: 50 ml

Anexo 02: Características fenotípicas avaliadas em populações naturais de *M. ilicifolia* na região de Guarapuava, PR. Florianópolis, RGV/UFSC, 2003

População 01: Fazenda da Costa (MANASA S.A.), população à pleno sol, caracterizando clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico hístico e afloramento de rocha

Coleta dos dados em 16 e 27/06/00

<i>Nº ind</i>	<i>Nº folhas</i>	<i>Nº ramos primários c/folhas</i>	<i>Nº ramos primários s/folhas</i>	<i>Altura planta (m)</i>	<i>Altura 1ª ramif (cm)</i>	<i>DAC (cm)</i>
4	743	116	85	2,20	78	3,2
1	354	55	20	1,52	30	1,7
27	1621	169	34	2,11	47	3,2
5	3440	332	18	1,92	32	3,3
3	307	44	54	1,60	37	2,4
2	614	102	20	1,80	102	3,0
25	3670	386	56	2,16	65	4,1
24	2995	365	97	2,10	15	2,5
46	1731	198	110	2,40	55	3,2
35	3239	391	107	2,00	75	3,2
34	1284	162	29	1,75	52	2,6
8	717	100	33	1,60	55	2,0
10	1895	233	135	2,20	60	4,0
11	630	102	13	1,00	1	3,0
39	2345	293	94	2,35	3	3,2
6	4341	491	161	3,10	85	3,9
37	4293	423	146	2,90	10	4,0
15	163	13	8	1,50	80	1,3
17	368	65	36	2,95	75	3,0
42	527	40	15	1,80	20	2,8
44	1235	101	47	2,20	10	4,3
45	92	8	9	1,30	45	1,5
26	695	75	32	2,10	100	2,2
50	621	76	31	2,25	80	2,4
7	3669	357	91	2,80	40	4,5
38	2722	313	11	1,70	10	2,9
32	2996	332	47	3,25	70	4,7
9	1390	131	28	2,60	95	3,2
16	7644	707	76	3,60	40	4,8
31	1431	219	53	1,85	15	3,6

População 02 - sede da Fundação RURECO, população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em solo do tipo cambissolo hálico tb distrófico

Coleta de dados em 28/06/00

Nº ind	Nº folhas	Nº ramos primários c/folhas	Nº ramos primários s/folhas	Altura planta (m)	Altura 1ª ramif (cm)	DAC (cm)
18 R	778	54	7	1,30	50	2,8
26 R	406	20	3	1,65	85	1,8
16 R	2805	163	30	2,15	5	3,1
30 R	2173	157	14	1,50	0	4,4
49 R	1066	119	67	1,30	25	3,6
45 R	686	58	19	2,10	5	4,0
44 R	944	111	27	2,05	20	2,6
64 R	675	63	6	1,50	5	2,5
62 R	1002	67	19	1,95	0	2,9
39 R	1369	120	61	2,40	10	4,1
70 R	1353	82	3	1,85	95	3,8
25 R	694	91	32	1,30	10	5,5
50 RR	362	37	7	1,20	40	2,5
11 R	628	49	15	1,80	50	2,0
22 R	2730	146	5	2,30	85	3,4
36 R	168	11	0	1,85	138	1,8
43 R	245	23	5	1,85	65	1,7
17 R	3425	201	21	2,15	35	5,6
2 R	1244	130	6	1,80	40	3,5
65 R	619	25	0	1,90	65	2,2
7 R	2506	189	9	2,10	25	7,0
23 R	1208	112	24	2,05	55	3,5
10 R	4339	240	7	2,58	80	4,7
35 R	2748	252	28	2,20	52	3,7
46 R	791	78	5	1,90	1	4,0
21 R	623	45	6	1,20	6	3,8
63 R	347	40	12	1,20	5	2,6
15 R	1125	78	3	1,70	1	5,5
14 R	943	60	5	1,70	15	3,5
74 R	1698	99	9	1,60	50	2,8

Anexo 03: Tratamentos de poda por unidade experimental

População 01: Fazenda da Costa (MANASA S.A.), população à pleno sol, caracterizando clímax edáfico sobre associação de neossolo litólico histórico e afloramento de rocha

Implantação dos tratamentos em 18/08/00

<i>Nº indivíduos</i>	<i>Nº folhas</i>	<i>Nº ramos primários c/folhas</i>	<i>Tratamentos</i>
4	743	116	Poda de 1/3
1	354	55	Poda Total
27	1621	169	Sem Poda
5	3440	332	Poda de 1/3
3	307	44	Poda de 1/3
2	614	102	Poda Total
25	3670	386	Poda Total
24	2995	365	Poda Total
46	1731	198	Poda Total
35	3239	391	Poda de 1/3
34	1284	162	Poda de 1/3
8	717	100	Poda de 1/3
10	1895	233	Sem Poda
11	630	102	Poda Total
39	2345	293	Sem Poda
6	4341	491	Poda Total
37	4293	423	Sem Poda
15	163	13	Poda Total
17	368	65	Poda de 1/3
42	527	40	Sem Poda
44	1235	101	Poda Total
45	92	8	Sem Poda
26	695	75	Sem Poda
50	621	76	Sem Poda
7	3669	357	Poda de 1/3
38	2722	313	Poda Total
32	2996	332	Poda de 1/3
9	1390	131	Sem Poda
16	7644	707	Sem Poda
31	1431	219	Poda de 1/3

População 02 - sede da Fundação RURECO, população em sub-bosque de formação secundária, ocorrendo em solo do tipo cambissolo hálico tb distrófico

Implantação dos tratamentos em 17/08/00

<i>Nº indivíduos</i>	<i>Nº folhas</i>	<i>Nº ramos primários c/folhas</i>	<i>Tratamento</i>
18 R	778	54	Poda de 1/3
26 R	406	20	Poda Total
16 R	2805	163	Poda de 1/3
30 R	2173	157	Poda Total
49 R	1066	119	Sem Poda
45 R	686	58	Poda Total
44 R	944	111	Poda de 1/3
64 R	675	63	Poda Total
62 R	1002	67	Poda Total
39 R	1369	120	Poda de 1/3
70 R	1353	82	Sem Poda
25 R	694	91	Poda de 1/3
50 RR	362	37	Sem Poda
11 R	628	49	Sem Poda
22 R	2730	146	Poda de 1/3
36 R	168	11	Poda de 1/3
43 R	245	23	Sem Poda
17 R	3425	201	Poda Total
2 R	1244	130	Poda de 1/3
65 R	619	25	Sem Poda
7 R	2506	189	Sem Poda
23 R	1208	112	Poda de 1/3
10 R	4339	240	Poda Total
35 R	2748	252	Poda de 1/3
46 R	791	78	Sem Poda
21 R	623	45	Sem Poda
63 R	347	40	Poda Total
15 R	1125	78	Poda Total
14 R	943	60	Sem Poda
70 RR	1698	99	Poda Total

Anexo 04: Taxas de incremento dos indivíduos em duas populações naturais de *M. ilicifolia* na região de Guarapuava (PR) sob diferentes sistemas de poda. Florianópolis, UFSC, 2003

**População 01 – Fazenda da Costa (MANASA S.A.)
Biomassa de Folhas**

TRAT 1 – SEM PODA

<i>Nº ind</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
27	251,3	252,9	1,01	339,8	1,35
10 *	293,8	54,6	0,19	---	---
39 *	363,6	67,1	0,18	---	---
37 *	665,6	227,8	0,34	---	---
42	81,7	89,6	1,10	58,2	0,71
45	14,3	36,4	2,54	12,7	0,89
26	107,7	55,6	0,52	85,5	0,79
50	96,3	265,3	2,75	115,4	1,20
9 *	---	---	---	---	---
16	1185,1	369,7	0,32	692,3	0,58

TRAT 2 – PODA DE 1/3 DOS RAMOS

<i>Nº ind</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
4	115,2	106,4	0,92	66,6	0,58
5	533,3	153,8	0,29	220,5	0,41
3	47,6	18,2	0,38	26,6	0,56
35	502,2	334,0	0,66	326,5	0,65
34	199,1	163,5	0,82	87,6	0,44
8 *	111,2	11,2	0,10	0	---
17	57,0	31,5	0,55	21,4	0,37
7	568,8	237,3	0,42	158,1	0,28
32	464,5	172,1	0,37	275,5	0,59
31	221,9	50,9	0,23	127,3	0,57

TRAT 3 – PODA TOTAL

<i>Nº ind</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Taxa total</i>
2	54,9	63,8	1,16	125,7	2,29
25 *	95,2	83,1	0,87	470,5	4,94
24	569,0	503,3	0,88	771,9	1,36
46 *	464,3	1006,0	2,17	289,6	0,62
11	268,4	47,3	0,17	86,1	0,32
1	97,7	40,7	0,41	75,4	0,77
6	673,0	350,5	0,52	385,6	0,57
15	25,3	9,6	0,38	8,96	0,35
44	191,5	117,8	0,61	179,3	0,93
38 *	422,0	117,7	0,29	---	---

* - indivíduos não considerados na análise de variância, por algum dos seguintes motivos: morte; poda realizada à revelia do experimento, por outros extratores que não os envolvidos no trabalho; placa de identificação não encontrada.

Número de Ramos Primários com Folhas

TRAT 1 - SEM PODA

<i>Nº ind.</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
27	169	281	1,66	288	1,70
10 *	233	63	0,27	77	---
39 *	293	305	1,04	109	---
37 *	423	84	0,20	223	---
42	40	54	1,35	60	1,50
45	8	14	1,75	14	1,75
26	75	91	1,21	99	1,32
50	76	94	1,24	95	1,25
9 *	131	---	---	---	---
16	707	442	0,62	1045	1,48

TRAT 2 – PODA DE 1/3 DOS RAMOS

<i>Nº Ind.</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
4	116	76	0,65	97	0,84
5	332	146	0,44	238	0,72
3	44	14	0,32	37	0,84
35	391	336	0,86	317	0,81
34	162	132	0,81	110	0,68
8 *	100	16	0,16	---	---
17	65	36	0,55	46	0,71
7	357	275	0,77	236	0,66
32	332	162	0,49	284	0,85
31	219	53	0,24	169	0,77

TRAT 3 – PODA TOTAL

<i>Nº ind.</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
2	102	56	0,55	63	0,62
25 *	386	163	0,43	211	0,55
24	365	288	0,92	310	0,85
46 *	198	33	0,17	99	0,50
11	102	55	0,54	59	0,58
1	55	22	0,40	36	0,65
6	491	185	0,38	230	0,47
15	13	8	0,61	8	0,61
44	101	99	0,98	71	0,70
38 *	313	53	0,17	---	---

* - indivíduos não considerados na análise de variância, por algum dos seguintes motivos: morte; poda realizada à revelia do experimento, por outros extratores que não os envolvidos no trabalho; placa de identificação não encontrada.

Altura

TRAT 01 – SEM PODA

<i>Nº ind</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
27	2,11	2,65	1,256	2,56	1,21
10 *	2,20	2,53	1,150	2,38	1,08
39 *	2,35	2,35	1,000	2,04	0,87
37 *	2,90	1,29	0,445	1,70	0,59
42	1,80	2,07	1,150	2,24	1,24
45	1,30	1,69	1,300	1,74	1,34
26	2,10	1,88	0,895	2,06	0,98
50	2,25	2,57	1,142	2,58	1,15
9 *	2,60	---	---	---	---
16	3,60	2,96	0,822	3,00	0,83

TRAT 02 – PODA DE 1/3 DOS RAMOS

<i>Nº ind</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
4	2,20	2,30	1,045	2,22	1,01
5	1,92	2,03	1,057	2,08	1,08
3	1,60	1,65	1,031	1,70	1,06
35	2,00	2,37	1,185	2,38	1,19
34	1,75	2,10	1,200	1,91	1,09
8 *	1,60	1,70	1,062	----	---
17	2,95	2,33	0,790	2,72	0,92
7	2,80	2,90	1,036	3,11	1,11
32	3,25	2,60	0,800	2,68	0,82
31	1,85	2,25	1,216	2,08	1,12

TRAT 03 – PODA TOTAL

<i>Nº ind</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
2	1,80	1,88	1,044	2,00	1,11
25 *	2,16	2,84	1,315	2,98	1,38
24	2,10	2,60	1,238	3,16	1,50
46 *	2,40	2,60	1,083	2,72	1,13
11	1,00	0,93	0,930	1,03	1,03
1	1,52	1,35	0,888	1,43	0,94
6	3,10	3,05	0,984	2,84	0,92
15	1,50	1,35	0,900	1,53	1,02
44	2,20	2,08	0,945	2,37	1,08
38 *	1,70	1,61	0,947	----	---

* - indivíduos não considerados na análise de variância, por algum dos seguintes motivos: morte; poda realizada à revelia do experimento, por outros extratores que não os envolvidos no trabalho; placa de identificação não encontrada.

DAC

TRAT 01 – SEM PODA

<i>Nº ind.</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
27	3,2	3,5	1,094	3,9	1,22
10 *	4,0	4,1	1,025	4,3	1,07
39 *	3,2	3,2	1,000	3,7	1,16
37 *	4,0	4,0	1,000	4,2	1,05
42	2,8	3,0	1,071	3,0	1,07
45	1,5	1,7	1,133	1,8	1,20
26	2,2	2,2	1,000	2,2	1,00
50	2,4	2,7	1,125	2,8	1,17
9 *	3,2	0,0	0,000	---	---
16	4,8	5,3	1,104	5,5	1,14

TRAT 02 – PODA DE 1/3 DOS RAMOS

<i>Nº ind.</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
4	3,2	3,2	1,000	3,4	1,06
5	3,3	3,6	1,091	3,8	1,15
3	2,4	2,9	1,208	2,9	1,21
35	3,2	3,4	1,062	3,4	1,06
34	2,6	2,7	1,038	2,9	1,11
8 *	2,0	2,1	1,050	---	---
17	3,0	3,0	1,000	3,1	1,03
7	4,5	4,5	1,000	4,5	1,00
32	4,7	4,7	1,000	5,0	1,06
31	3,6	3,6	1,000	3,8	1,06

TRAT 03 – PODA TOTAL

<i>Nº ind.</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
2	3,0	3,0	1,000	3,2	1,07
25 *	4,1	4,8	1,171	5,4	1,32
24	2,5	3,8	1,520	5,0	2,00
46 *	3,2	3,2	1,000	3,2	1,00
11	3,0	3,3	1,100	3,4	1,13
1	1,7	2,9	1,706	3,0	1,76
6	3,9	4,1	1,051	4,1	1,05
15	1,3	1,3	1,000	1,8	1,38
44	4,3	4,3	1,000	4,3	1,00
38 *	2,9	2,9	1,000	---	---

* - indivíduos não considerados na análise de variância, por algum dos seguintes motivos: morte; poda realizada à revelia do experimento, por outros extratores que não os envolvidos no trabalho; placa de identificação não encontrada.

População 02 – sede da Fundação RURECO

Biomassa de Folhas

TRAT 01 – SEM PODA

<i>Nº ind</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
49 *	117,3	---	---		
74 *	186,8	---	---		
50	79,0	27,1	0,34	149,4	1,89
11 *	69,1	---	---		
43	53,5	24,3	0,45	79,2	1,48
65	135,1	46,8	0,35	---	
7	546,9	422,5	0,77	540,4	0,99
46	172,6	165,0	0,96	155,9	0,90
21	136,0	122,4	0,90	91,2	0,67
14 *	103,7	---	---		

TRAT 02 – PODA DE 1/3 DOS RAMOS

<i>Nº ind</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
18	169,8	52,8	0,44	117,6	0,69
16	612,2	108,1	0,25	286,9	0,47
44	206,0	84,0	0,58	116,6	0,57
39	298,8	121,7	0,60	177,3	0,59
25	151,5	62,3	0,55	202,9	1,34
22	595,8	118,6	0,30	223,6	0,37
36 *	36,7	13,6	0,47	---	---
2	271,5	124,6	0,66	99,8	0,37
23	263,6	89,4	0,51	252,4	0,96
35	599,8	201,6	0,52	546,3	0,91

TRAT 03 – PODA TOTAL

<i>Nº ind</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
26	88,6	8,4	0,09	110,2	1,24
30	474,3	189,0	0,40	1200,6	2,53
45 *	149,7	10,8	0,07	---	---
64	147,3	27,5	0,19	185,4	1,26
62	218,7	33,6	0,15	411,4	1,88
17 *	376,7	---	---	---	
10	529,1	412,2	---	925,3	1,75
63 *	38,17	---	---	---	---
15	245,5	58,5	0,24	463,2	1,89
70	370,6	69,9	0,19	433,1	1,17

* - indivíduos não considerados na análise de variância, por algum dos seguintes motivos: morte; poda realizada à revelia do experimento, por outros extratores que não os envolvidos no trabalho; placa de identificação não encontrada.

Número de Ramos Primários com Folhas

TRAT 01 – SEM PODA

<i>Nº ind</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
49 *	119	---	---	---	
74 *	99	---	---	---	
50	37	28	0,758	90	2,43
11 *	49	---	---	---	---
43	23	28	1,217	44	1,91
65 *	25	26	1,040	---	---
7	189	112	0,593	275	1,45
46	78	81	1,038	99	1,27
21	45	65	1,444	76	1,69
14 *	60	---	---	---	

TRAT 02 – PODA DE 1/3 DOS RAMOS

<i>Nº ind</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
18	54	22	0,407	70	1,30
16	163	53	0,325	176	1,08
44	111	63	0,567	108	0,97
39	120	213	1,775	143	1,19
25	91	43	0,472	90	0,99
22	146	52	0,356	126	0,86
36 *	11	8	0,727	---	---
2	130	135	1,038	121	0,93
23	112	68	0,607	143	1,28
35	252	96	0,381	278	1,10

TRAT 03 – PODA TOTAL

<i>Nº ind</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
26	20	14	0,700	27	1,35
30	157	36	0,229	230	1,46
45 *	58	9	0,155	18	0,31
64	63	22	0,349	60	0,95
62	67	24	0,358	74	1,10
17 *	201	---	---	---	---
10	240	187	0,779	199	0,83
63 *	40	---	---	---	---
15	78	39	0,500	109	1,40
70	99	46	0,465	142	1,43

* - indivíduos não considerados na análise de variância, por algum dos seguintes motivos: morte; poda realizada à revelia do experimento, por outros extratores que não os envolvidos no trabalho; placa de identificação não encontrada.

Altura

TRAT 01 – SEM PODA

<i>Nº ind.</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
49 *	1,30	---	---	---	
74 *	1,60	---	---	---	
50	1,20	1,33	1,108	1,22	1,02
11 *	1,80	---	---	---	
43	1,85	1,77	0,957	1,79	0,97
65 *	1,90	2,14	1,126	---	---
7	2,10	2,30	1,095	2,28	1,08
46	1,90	2,24	1,179	2,25	1,18
21	1,20	1,35	1,125	1,36	1,13
14 *	1,70	---	---	---	

TRAT 02 – PODA DE 1/3 DOS RAMOS

<i>Nº ind.</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
18	1,30	1,35	1,038	1,35	1,04
16	2,15	2,16	1,005	2,28	1,06
44	2,05	2,21	1,078	2,36	1,15
39	2,40	2,40	1,000	2,23	0,93
25	1,30	1,50	1,154	1,50	1,15
22	2,30	2,34	1,017	1,94	0,84
36 *	1,85	2,05	1,108	---	---
2	1,80	1,58	0,878	1,72	0,95
23	2,05	2,30	1,122	2,20	1,07
35	2,20	2,34	1,064	2,60	1,18

TRAT 03 – PODA TOTAL

<i>Nº ind.</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
26	1,65	1,31	0,794	1,52	0,92
30	1,50	1,37	0,913	1,49	0,99
45 *	2,10	1,57	0,748	1,67	0,79
64	1,50	1,30	0,867	1,30	0,87
62	1,95	1,85	0,949	2,27	1,16
17 *	2,15	---	---	---	---
10	2,58	2,41	0,934	2,62	1,01
63 *	1,20	---	---	---	---
15	1,70	1,96	1,153	1,94	1,14
70	1,60	2,20	1,375	2,09	1,31

* - indivíduos não considerados na análise de variância, por algum dos seguintes motivos: morte; poda realizada à revelia do experimento, por outros extratores que não os envolvidos no trabalho; placa de identificação não encontrada.

DAC

TRAT 01 – SEM PODA

<i>Nº ind.</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
49 *	3,6	---	---	---	---
74 *	2,8	---	---	---	---
50	2,5	2,5	1,000	2,5	1,00
11	2,0	---	---	---	---
43	1,7	1,9	1,118	2,0	1,18
65 *	2,2	2,7	1,227	---	---
7	7,0	7,5	1,071	7,6	1,09
46	4,0	5,1	1,275	5,5	1,37
21	3,8	3,9	1,026	3,9	1,03
14 *	3,5	---	---	---	---

TRAT 02 – PODA DE 1/3 DOS RAMOS

<i>Nº ind.</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
18	2,8	3,6	1,286	3,9	1,39
16	3,1	3,5	1,129	3,6	1,16
44	2,6	3,1	1,192	3,6	1,38
39	4,1	4,8	1,171	4,9	1,19
25	5,5	5,7	1,036	5,7	1,04
22	3,4	4,5	1,323	4,6	1,35
36 *	1,8	1,9	1,056	---	---
2	3,5	3,5	1,000	4,0	1,14
23	3,5	4,0	1,143	4,0	1,14
35	3,7	3,9	1,054	4,4	1,19

TRAT 03 – PODA TOTAL

<i>Nº ind.</i>	<i>Antes poda</i>	<i>1 ano</i>	<i>Tx. Inc.</i>	<i>2 anos</i>	<i>Tx total</i>
26	1,8	2,4	1,333	2,4	1,33
30	4,4	4,6	1,045	5,4	1,23
45 *	4,0	4,0	1,000	4,0	1,00
64	2,5	2,6	1,040	2,8	1,12
62	2,9	3,6	1,241	3,6	1,24
17 *	5,6	---	---	---	---
10	4,7	5,2	1,106	5,4	1,14
63 *	2,6	---	---	---	---
15	5,5	5,8	1,054	6,2	1,13
70	2,8	3,6	1,286	4,6	1,64

* - indivíduos não considerados na análise de variância, por algum dos seguintes motivos: morte; poda realizada à revelia do experimento, por outros extratores que não os envolvidos no trabalho; placa de identificação não encontrada.

Anexo 05: Peso verde de folhas e ramos a partir da retirada de 10 % dos ramos em cada indivíduo de populações naturais de *M. ilicifolia* na região de Guarapuava (PR), sob diferentes sistemas de poda. Florianópolis, UFSC, 2003

População 01: Fazenda da Costa (MANASA S.A.)

TRAT 01 – SEM PODA

<i>Nº ind.</i>	<i>Peso folhas 1 ano</i>	<i>Peso Ramos 1 ano</i>	<i>Relação folhas/ ramos</i>	<i>Peso folhas 2 anos</i>	<i>Peso ramos 2 anos</i>	<i>Relação folhas/ ramos</i>
27	15,8	7,8	2,02	92,1	16,9	5,45
10	5,2	3,3	1,57	14,3	3,2	4,47
39	6,6	5,1	1,29	12,2	3,3	3,70
37	21,7	12,4	1,75	52,1	16,7	3,12
42	8,3	4,1	2,02	18,1	13,0	1,39
45	2,6	0,9	2,89	4,0	1,1	3,64
26	5,5	1,5	3,67	9,5	1,4	6,78
50	25,4	7,8	3,26	42,3	11,1	3,81
9	---	---	---	---	---	---
16	36,8	24,2	1,52	76,8	29,3	2,62

TRAT 02 – PODA DE 1/3 DOS RAMOS

<i>Nº ind.</i>	<i>Peso folhas 1 ano</i>	<i>Peso. Ramos 1 ano</i>	<i>Relação folhas/ ramos</i>	<i>Peso folhas 2 anos</i>	<i>Peso ramos 2 anos</i>	<i>Relação folhas/ ramos</i>
4	11,2	3,6	3,11	16,7	3,9	4,28
5	15,8	7,8	2,02	18,2	3,9	4,67
3	1,3	0,5	2,60	2,8	0,6	4,67
35	33,8	15,8	2,14	36,7	6,6	5,56
34	16,1	5,2	3,10	37,1	8,2	4,52
8	1,4	1,1	1,27	---	---	---
17	3,5	1,5	2,33	6,3	1,9	3,32
7	23,3	8,5	2,74	19,8	4,2	4,71
32	17,0	6,7	2,54	31,3	7,5	4,17
31	4,8	3,4	1,42	10,9	1,6	6,81

TRAT 03 – PODA TOTAL

<i>Nº ind.</i>	<i>Peso folhas 1 ano</i>	<i>Peso. Ramos 1 ano</i>	<i>Relação folhas/ ramos</i>	<i>Peso folhas 2 anos</i>	<i>Peso ramos 2 anos</i>	<i>Relação folhas/ ramos</i>
2	8,9	2,1	4,24	7,8	1,3	6,00
25	49,4	19,4	2,55	63,0	15,1	4,17
24	99,1	39,2	2,53	87,8	28,7	3,06
46	4,3	1,5	2,87	10,2	1,9	5,37
11	3,7	0,9	4,11	8,4	1,7	4,94
1	5,8	1,3	4,46	7,0	1,4	5,00
6	34,1	20,6	1,65	21,0	5,7	3,68
15	1,2	1,0	1,20	5,2	2,1	2,48
44	11,9	3,6	3,30	16,1	5,1	3,16
38	11,1	6,2	1,79	---	---	---

População 02 – sede da Fundação RURECO

TRAT 01 – SEM PODA

<i>Nº ind.</i>	<i>Peso folhas 1 ano</i>	<i>Peso. Ramos 1 ano</i>	<i>Relação folhas/ ramos</i>	<i>Peso folhas 2 anos</i>	<i>Peso ramos 2 anos</i>	<i>Relação folhas/ ramos</i>
49						
74						
50	2,9	0,9	3,22	13,1	3,1	4,22
11						
43	2,6	1,5	1,73	9,6	1,4	6,90
65	5,4	3,2	1,69	---	---	---
7	41,5	26,5	1,57	91,4	19,9	4,59
46	16,3	6,0	2,72	35,2	11,5	3,06
21	11,3	4,2	2,69	11,7	3,0	3,90
14						

TRAT 02 – PODA DE 1/3 DOS RAMOS

<i>Nº ind.</i>	<i>Peso folhas 1 ano</i>	<i>Peso. Ramos 1 ano</i>	<i>Relação folhas/ ramos</i>	<i>Peso folhas 2 anos</i>	<i>Peso ramos 2 anos</i>	<i>Relação folhas/ ramos</i>
18	4,8	2,1	2,29	16,3	4,4	3,70
16	10,2	4,2	2,43	35,3	9,7	3,64
44	8,0	3,9	2,05	21,4	6,6	3,24
39	12,0	3,4	3,53	30,6	6,9	4,43
25	5,8	3,1	1,87	20,4	5,0	4,08
22	11,4	4,1	2,78	53,5	23,1	2,32
36	1,7	0,8	2,12	---	---	---
2	12,0	5,0	2,40	16,2	3,7	4,39
23	9,2	4,2	2,19	24,6	8,0	3,07
35	21,0	6,2	3,39	63,0	21,5	2,93

TRAT 03 – PODA TOTAL

<i>Nº ind.</i>	<i>Peso folhas 1 ano</i>	<i>Peso. Ramos 1 ano</i>	<i>Relação folhas/ ramos</i>	<i>Peso folhas 2 anos</i>	<i>Peso ramos 2 anos</i>	<i>Relação folhas/ ramos</i>
26	0,6	0,8	0,75	9,6	3,2	3,00
30	21,0	17,2	1,22	48,3	21,6	2,24
45	1,2	0,5	2,40	4,5	0,9	5,00
64	2,5	0,9	2,78	3,2	0,6	5,33
62	2,8	1,8	1,56	21,1	5,6	3,78
17	---	---	---	---	---	---
10	46,3	19,0	2,44	117,3	57,9	2,02
63	---	---	---	---	---	---
15	6,0	3,5	1,71	17,2	4,9	3,51
70	7,6	4,1	1,85	24,6	9,4	2,62

Anexo 06: Genótipos de indivíduos adultos e de progênes maternas de populações naturais de *M. ilicifolia* na região de Guarapuava, PR. Florianópolis, UFSC, 2003

População 01: Fazenda da Costa (MANASA S.A.) – indivíduos adultos

LOCOS: PRX, PGI, MDH1, MDH2, NADHDH, IDH, LAP e 6PGDH

Ind/genótipos

01 11 11 11 11 11 11 11 11 11
02 11 11 11 11 11 11 11 11 11
03 11 11 11 11 11 11 11 11 11
04 11 11 11 11 11 11 11 11 11
05 12 12 11 11 11 11 12 11
06 12 12 11 11 11 11 12 11
07 12 12 11 11 11 11 12 11
08 12 12 11 11 11 11 12 11
09 13 12 12 12 11 12 12 11
10 13 12 12 22 11 12 12 11
11 13 12 12 22 11 12 12 11
12 13 12 12 12 11 22 11 11
13 11 22 12 11 11 11 11 11
14 11 22 12 11 11 12 11 11
15 11 12 12 12 11 22 11 11
16 12 11 12 11 11 12 11 11
17 11 11 11 11 11 11 11 11
18 11 12 12 12 11 22 11 11
19 12 11 12 12 11 22 11 11
20 11 11 12 12 11 11 12 11
21 11 12 22 11 11 11 11 11
22 11 12 22 11 11 11 11 11
23 11 12 22 11 11 11 11 11
24 11 11 12 11 11 22 11 11
25 11 11 11 11 11 12 11 11
26 11 11 11 11 11 12 11 11
27 13 11 11 11 11 22 11 11
28 11 11 11 11 11 11 11 11
29 11 11 11 11 11 11 11 11
30 11 11 11 11 11 11 11 11
31 11 11 11 11 11 11 11 11
32 11 22 12 22 11 11 11 11

População 02 (sede da Fundação RURECO) – indivíduos adultos

LOCOS: PRX, PGI, MDH1, MDH2, NADHDH, IDH, LAP e 6PGDH

Ind/genótipos

01 11 22 11 11 11 11 11 11
02 11 22 11 11 11 11 11 11
03 11 22 11 11 11 11 11 11
04 11 22 11 11 11 11 11 12
05 11 12 11 11 22 11 11 12
06 22 11 11 11 11 11 11 11
07 11 12 11 11 11 11 12 11
08 12 12 11 11 11 11 11 11
09 11 11 11 11 11 11 11 11
10 11 22 11 11 12 11 11 11
11 11 12 12 11 11 12 22 11
12 11 12 12 11 11 11 11 11
13 11 12 11 11 11 11 11 11
14 11 12 11 11 11 11 11 11
15 11 12 11 11 11 12 11 11
16 11 22 11 11 12 12 11 11
17 11 11 11 11 11 13 11 11
18 12 12 11 11 11 11 11 12
19 11 11 11 11 11 11 11 11
20 11 11 12 11 11 11 11 11
21 11 22 12 11 11 11 11 11
22 11 11 22 11 11 11 11 11
23 11 11 12 11 11 12 12 11
24 11 11 22 11 11 11 11 11
25 11 11 11 11 11 11 11 11
26 11 11 11 11 11 13 11 11
27 11 22 11 11 11 11 11 11
28 11 22 11 11 11 11 11 11
29 22 12 11 11 11 11 11 11
30 11 22 11 11 11 11 11 11

População 01: Fazenda da Costa (MANASA S.A.) – progênies maternas

LOCOS: PRX, PGI, MDH1,MDH2, IDH e 6PGDH

Ind/genótipos

01	11 12 11 11 12 11	50	11 11 11 11 11 11	99	11 12 11 11 11 11
02	22 12 11 11 12 11	51	11 11 11 11 11 11	100	11 11 11 11 12 11
03	11 12 12 12 11 11	52	11 11 11 11 11 11	101	11 11 11 11 11 11
04	11 12 11 11 11 11	53	11 11 11 11 12 11	102	11 11 11 11 11 11
05	11 12 11 12 11 11	54	11 11 11 11 11 11	103	11 11 12 11 13 11
06	11 11 12 22 11 11	55	11 12 11 11 11 11	104	12 12 11 11 11 11
07	11 12 11 22 11 11	56	11 11 11 11 12 11	105	11 11 11 11 11 11
08	11 12 11 11 11 11	57	11 11 11 11 11 11	106	11 11 12 11 11 13
09	22 12 11 11 11 11	58	11 11 11 11 11 11	107	12 11 12 11 11 11
10	11 11 12 11 11 11	59	11 11 11 11 11 11	108	11 11 11 11 11 11
11	11 12 11 11 11 11	60	11 11 11 11 12 11	109	11 11 11 11 11 11
12	12 12 11 12 11 11	61	11 11 11 11 11 11	110	11 12 11 11 11 11
13	11 12 11 11 11 11	62	11 11 11 11 11 11	111	12 13 12 11 11 11
14	11 12 11 11 11 11	63	12 11 12 11 11 11	112	12 11 12 11 11 11
15	11 22 12 11 11 11	64	11 11 11 11 12 11	113	11 11 11 11 12 13
16	11 22 11 11 11 11	65	11 11 11 11 12 11	114	11 12 12 11 11 11
17	11 12 11 11 11 11	66	11 11 12 11 11 11	115	11 12 12 11 11 11
18	11 11 12 11 11 11	67	11 11 11 11 11 11	116	11 11 11 11 11 11
19	11 12 11 11 13 11	68	11 11 11 11 11 11	117	11 11 11 11 11 11
20	12 22 11 11 11 11	69	11 11 11 11 11 11	118	11 11 12 11 11 11
21	11 22 11 11 11 11	70	11 11 11 11 12 11	119	11 11 11 11 11 11
22	11 12 11 11 11 11	71	12 11 11 11 11 11	120	11 11 11 11 11 11
23	11 12 11 11 13 11	72	11 11 11 11 12 11	121	11 11 11 11 11 11
24	11 12 12 11 11 11	73	11 12 11 11 11 11	122	11 22 11 11 11 11
25	11 12 11 11 13 11	74	11 11 11 11 12 11	123	11 11 11 11 11 11
26	11 12 12 11 11 11	75	11 22 11 11 11 11	124	11 22 12 11 11 11
27	11 12 12 11 11 11	76	11 22 11 11 11 11	125	11 22 11 11 11 11
28	11 11 11 11 11 11	77	11 22 11 11 12 11	126	11 22 12 11 11 11
29	11 11 11 11 11 11	78	11 22 11 11 11 11	127	11 11 11 11 11 11
30	11 11 11 11 11 11	79	11 22 11 11 12 11	128	11 11 11 11 11 11
31	11 11 11 11 11 11	80	11 22 11 11 11 11	129	11 11 11 11 11 11
32	11 11 11 11 11 11	81	11 22 11 11 11 11	130	11 11 11 11 11 11
33	11 11 11 11 11 11	82	11 22 11 11 11 11	131	11 11 11 11 11 11
34	11 12 11 11 11 11	83	12 22 11 11 11 11	132	11 11 11 11 11 11
35	11 11 11 11 11 11	84	12 11 12 11 11 11	133	11 11 11 11 11 11
36	11 11 11 11 11 11	85	11 11 11 11 11 11	134	11 11 11 11 13 11
37	11 11 11 11 11 11	87	11 11 11 11 12 11	135	11 11 11 11 13 11
38	11 11 11 11 11 11	88	11 12 11 11 11 13	136	11 11 11 11 11 11
39	11 11 11 11 11 11	89	11 11 11 11 12 13	137	11 11 11 11 11 11
40	11 11 11 11 11 11	90	11 11 11 11 11 11	138	11 11 11 11 11 11
41	11 11 11 11 11 11	91	11 12 11 11 13 11	139	11 11 11 11 11 11
42	11 11 11 11 11 11	92	11 11 11 11 11 13	140	11 11 11 11 11 11
43	11 11 11 11 12 11	92	11 11 12 11 11 11		
44	11 11 11 11 12 11	93	11 11 11 11 11 13		
45	11 11 11 11 12 11	94	11 11 11 11 13 11		
46	11 11 11 11 11 11	95	11 11 11 11 11 11		
47	11 11 11 11 11 11	96	11 12 11 11 12 13		
48	11 11 11 11 11 11	97	11 12 11 11 13 13		
49	11 11 11 11 11 11	98	11 11 11 11 12 11		

População 02 (sede da Fundação RURECO) – progênies maternas

LOCOS: PRX, PGI, MDH1,MDH2, IDH e 6PGDH

Ind/genótipos

01	11 11 11 11 11 11	50	12 12 12 11 13 11	99	11 11 11 11 11 11
02	11 11 11 11 11 11	51	11 12 11 11 11 11	100	11 22 11 11 11 11
03	11 11 11 11 11 11	52	11 22 11 11 11 11	101	11 11 11 11 11 11
04	11 11 11 11 11 11	53	22 22 11 11 11 11	102	11 22 11 11 11 13
05	11 12 11 11 11 11	54	22 22 11 11 13 11	103	11 11 11 11 11 11
06	11 12 11 11 11 11	55	11 12 11 11 11 11	104	11 11 11 11 11 11
07	11 12 12 11 11 11	56	11 22 11 11 11 11	105	11 11 11 11 11 11
08	11 12 12 11 11 11	57	11 22 11 11 11 11	106	11 11 11 11 11 12
09	11 11 12 11 11 11	58	11 11 12 11 11 11	107	11 11 12 11 11 11
10	11 11 11 11 11 11	59	11 11 11 11 11 11	108	11 11 11 11 11 11
11	11 11 11 11 11 11	60	11 11 11 11 11 11	109	11 11 11 11 11 11
12	11 12 11 11 11 11	61	11 11 12 11 11 11	110	11 11 11 11 12 11
13	11 12 12 11 11 11	62	11 12 11 11 11 11	111	11 11 11 11 11 11
14	11 11 11 11 11 11	63	11 12 11 11 11 11	112	11 11 11 11 11 11
15	11 12 12 11 13 11	64	11 22 11 11 11 11	113	11 11 11 11 11 11
16	11 11 11 11 12 11	65	11 11 11 11 11 11	114	11 11 11 11 12 11
17	11 11 11 11 11 11	66	11 12 12 11 13 11	115	11 11 11 11 11 11
18	11 11 11 11 11 11	67	11 22 11 11 11 11	116	11 11 11 11 11 11
19	11 11 11 11 11 11	68	11 12 11 11 13 11	117	11 11 11 11 11 11
20	11 11 11 11 11 11	69	11 11 11 11 13 11	118	11 11 11 11 11 11
21	12 11 11 11 11 11	70	11 12 11 11 11 11	119	11 11 12 11 11 11
22	11 12 12 11 11 11	71	11 22 11 11 11 11	120	11 12 12 11 12 11
23	11 11 11 11 11 11	72	11 11 11 11 11 11	121	12 11 11 11 11 11
24	11 11 11 11 11 11	73	11 11 12 11 11 11	122	11 11 11 11 11 11
25	11 11 11 11 11 11	74	12 11 12 11 11 11	123	11 11 11 11 11 11
26	11 12 11 11 11 11	75	11 11 12 11 11 11	124	11 11 11 11 11 11
27	11 11 11 11 11 11	76	11 12 11 11 13 11	125	11 11 11 11 11 11
28	11 11 11 11 11 11	77	22 11 11 11 11 11	126	12 11 11 11 11 11
29	11 11 11 11 11 11	78	12 11 12 11 11 11	127	11 11 11 11 11 11
30	11 12 11 11 11 11	79	11 11 11 11 11 11	128	11 11 12 11 11 11
31	11 12 11 11 11 11	80	11 11 11 11 11 11	129	11 11 11 11 11 11
32	11 12 11 11 11 11	81	12 11 11 11 11 11	130	11 11 11 11 11 11
33	11 11 11 11 11 11	82	22 22 11 11 11 11	131	11 11 11 11 11 11
34	11 11 12 11 11 11	83	11 11 11 11 11 11	132	11 11 11 11 11 11
35	11 11 12 22 11 11	84	11 11 11 11 11 11	133	11 11 11 11 11 11
36	11 11 11 11 11 11	85	11 11 11 11 11 11	134	11 11 11 11 11 11
37	11 11 11 11 11 11	86	11 11 12 11 13 11	135	11 11 11 11 22 11
38	11 11 11 22 11 11	87	11 22 12 11 11 11	136	11 11 11 11 12 11
39	11 12 11 11 11 11	88	12 12 11 11 11 11	137	11 11 11 11 11 11
40	11 12 11 22 11 11	89	11 12 11 11 11 11	138	11 11 11 11 22 11
41	11 12 12 12 11 11	90	11 11 11 11 11 11	139	11 11 11 11 11 11
42	11 12 11 11 11 11	91	11 22 11 11 11 11	140	11 11 11 11 12 11
43	11 12 12 11 11 11	92	11 22 11 11 11 11	141	11 11 11 11 22 11
44	11 22 11 11 11 11	93	12 12 11 11 13 11		
45	11 22 11 11 11 11	94	11 11 11 11 11 11		
46	12 22 11 11 11 11	95	11 12 11 11 11 11		
47	12 12 11 11 11 11	96	11 12 11 11 13 11		
48	11 22 12 11 11 11	97	11 22 11 11 13 11		
49	11 12 12 11 11 11	98	12 22 11 11 11 11		