

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

ESTUDOS CITOGENÉTICOS E CARACTERÍSTICAS DA SEMENTE
EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE ESPINHEIRA-SANTA,
Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss. (CELASTRACEAE)

Mirela Pereira Machado Lunardi
Bióloga/URCAMP

Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Horticultura

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2004

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

à minha orientadora Profa. Maria Teresa Schifino Wittmann pela orientação, incentivo, confiança, amizade, apoio e principalmente por ter me feito acreditar que o trabalho era possível ser realizado;

à minha co-orientadora Profa. Ingrid Bergman Inchausti de Barros pelo carinho, amizade, orientação, apoio e ensinamentos para toda a vida;

ao Dr. Altemir Mossi pelo auxílio na identificação das plantas;

à Dra. Rita Carvalho-Okano e Dra. Marianne Scheffer pelas referências bibliográficas enviadas;

ao Sr. Luis Osório por ter feito a coleção de plantas na estação da FEPAGRO em Viamão e a FEPAGRO por disponibilizá-las para a realização do trabalho;

à empresa Cibecol por conceder material para o trabalho;

aos colegas da Fisiologia Vegetal, onde tudo começou..., pelo companheirismo e amizade, Elisete, Michel, "Carioca", Joséli e Gustavo;

aos colegas que tive durante todo o mestrado pela amizade, carinho e auxílio nas horas de dificuldades, em especial aos colegas Denis Salvati Guerra (também pelas estatísticas), Fernanda Bortolini, Edgar Carniel, Adriana Corrent, Flávia Martins, Eduardo Seibert, Regina Oliveira, Gilmar Schäfer, Nestor Panzenhagen, Francisco Amaro, Tatiana Terra;

à minha super colega Elisete Barp Gauer pelos conselhos, amizade e por ter me ajudado tanto com relação a minha vida pós-mestrado;

às minhas colegas de laboratório que me ajudaram bastante em todos os momentos que precisei e pela amizade, especialmente Elaine Biondo, Carine Simioni e Marisa Pozzobon;

à Dra. Betina Blochtein pela ajuda em minha chegada em Porto Alegre;

à minha super amiga e colega durante todo o mestrado Ionara Conterato pelo apoio, amizade, força, idéias, conselhos...

ao meu super colega Michel Elias Casali por todo carinho, auxílio, amizade, dicas, estatísticas, companheirismo, força e por ter me ajudado a acreditar mais em mim;

às minhas amigas super amigas Letícia Lopes “Lê” e Sidia Witter pelo apoio em todos os momentos e amizade incondicional;

à minha mãe Rosa Alice e ao meu pai Mauri por terem acreditado em mim, pelo carinho, amor, apoio e incentivo;

ao meu irmão Giancarlo e cunhada Luciane pela amizade, torcida, ajuda e por terem sido meus companheiros de campo;

ao Ederson por todo apoio, carinho, amizade, “parceria” e força;

à tia Cleonice e tio Lunardi pelo apoio, incentivo, carinho e também por terem acreditado em mim;

aos meus outros companheiros nas “indiadas” de coleta, Rogério, Diovani, Edson, Sr. Antônio e, à amizade e torcida da Maristela;

ao acadêmico de agronomia e bolsista Rodrigo por todo auxílio prestado;

à minha amiga “Lidi” pela amizade e apoio nos últimos meses do mestrado;

às amigas Sandra e Raquel; e ao amigo Daniel pela ajuda na informática.

a todos os amigos e amigas que me ajudaram de uma maneira ou de outra para a realização deste trabalho;

a todos os outros familiares que sempre me apoiaram, especialmente à minha vó Marfiza que sempre foi muito presente, torceu e rezou por mim;

à todos meus professores durante o mestrado pelos excelentes ensinamentos;

aos funcionários do Depto. de Horticultura, Ernani Pezzi, Cleusa Comeli e Detamar da Rocha; Depto. de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, Rogério e do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRGS, especialmente à Marisa;

E, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realização deste curso e à CAPES pela bolsa de estudos.

ESTUDOS CITOGENÉTICOS E CARACTERÍSTICAS DA SEMENTE EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE ESPINHEIRA-SANTA, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (CELASTRACEAE)¹

Autora: Mirela Pereira Machado Lunardi

Orientadora: Maria Teresa Schifino Wittmann

Co-orientadora: Ingrid Bergman Inchausti de Barros

RESUMO

O gênero *Maytenus* está distribuído por todo o mundo, predominando na região neotropical, muitas delas utilizadas como medicinais. *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) ocorre de forma nativa no Rio Grande do Sul. Algumas de suas propriedades medicinais foram comprovadas cientificamente. O presente trabalho teve por objetivos determinar o número cromossômico, analisar o comportamento meiótico e fertilidade do pólen, assim como algumas características físicas das sementes em diferentes populações da espécie. Os resultados constituem-se nas primeiras informações citogenéticas para a espécie. Os cromossomos de *M. ilicifolia* são muito pequenos (menores que 0,5 μm), numerosos e de difícil análise. O número cromossômico foi de 2n cerca de (ca.) 64 em quatro populações, 2n ca. 70 e 2n ca. 80 em outras duas, evidenciando a existência de variabilidade intraespecífica quanto ao número de cromossomos. O comportamento meiótico foi regular, com formação exclusiva de bivalentes na metáfase I e disjunção normal nas anáfases. O índice meiótico e a viabilidade do pólen foram sempre acima de 95% e 80%, respectivamente, demonstrando serem as populações analisadas meioticamente estáveis e potencialmente macho-férteis. A produção de sementes por fruto variou de uma a quatro. Nas populações naturais de Bagé ocorreu maior incidência de duas sementes e na população antropogênica de Viamão de uma, sendo para esta também verificado que com o aumento do número de sementes por fruto, diminui o peso médio das mesmas. O peso médio das sementes por categoria de frutos e o peso médio das sementes, diferenciou-se entre as populações de Bagé e dentro da população de Viamão. O peso médio de mil sementes variou de 20,98 g a 26,13 g.

Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (88 p). Março de 2004.

CYTOGENETIC STUDIES AND SEED CHARACTERISTICS IN DIFFERENT POPULATIONS OF ESPINHEIRA-SANTA, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (CELASTRACEAE)¹

Author: Mirela Pereira Machado Lunardi
Adviser: Maria Teresa Schifino Wittmann
Co-adviser: Ingrid Bergman Inchausti de Barros

ABSTRACT

The genus *Maytenus* is widespread around the world, predominating in the neotropical region, many of which used for medicinal purposes. *Maytenus ilicifolia*, known as espinheira-santa, is native from South America, also occurring in Rio Grande do Sul. Some of its medicinal properties have been scientifically demonstrated. The present work aimed to determine chromosome number, analyze meiotic behavior and pollen fertility as well as some seed physical characteristics in different populations. The results presented are the first cytogenetic data for the species. *M. ilicifolia* chromosomes are very small (less than 1 μm), in high number and difficult to analyze. Chromosome numbers were determined in six populations, being 2n ca. 64 in four of them and 2n ca. 70 and 2n ca. 80 in the other two, showing the existence of intraspecific variability regarding the number of chromosomes. Meiotic behavior (four populations) was regular, with the exclusive formation of bivalents at metaphase I and normal disjunction at the anaphases. Meiotic indexes (five populations) and pollen viability values (six populations) were always higher than 95% and 80%, respectively, showing these populations to be meiotically stable and potentially male-fertile. Seed production per fruit ranged from one to four. Two seeds per fruit predominated in the natural populations from Bagé, and one in the anthropogenic population from Viamão. In this same population it was also verified that increase in the number of seed per fruit was accompanied by a decrease in seed mean weight. Seed mean weight per fruit class was different between the Bagé populations and within the Viamão population. Thousand-seed weight ranged from 20.98 g to 26.13 g.

¹ Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agromomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (88 p). March, 2004.

SUMÁRIO

	pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Importância das plantas medicinais em geral e de <i>Maytenus ilicifolia</i>	3
2.2. Gênero <i>Maytenus</i> : botânica e distribuição.....	12
2.3. <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss.....	14
2.4. Caracterização de germoplasma e estudos citogenéticos.....	17
2.4.1. Considerações gerais.....	17
2.4.2. Trabalhos realizados em <i>Maytenus</i>	21
2.5. Características e produção de sementes em <i>M. ilicifolia</i>	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Material.....	28
3.1.1. Descrição detalhada dos locais de coleta.....	28
3.2. Métodos.....	37
3.2.1. Coleta, fixação e estocagem do material.....	37
3.2.2. Preparo de lâminas de botões florais.....	38
3.2.3. Análise do comportamento meiótico.....	39
3.2.4. Estimativa do índice meiótico.....	39
3.2.5. Estimativa da viabilidade dos grãos de pólen.....	39
3.2.6. Análise da mitose.....	40
3.2.7. Análise das sementes.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1. Estudos citogenéticos.....	44
4.1.1. Comportamento meiótico.....	44

4.1.2. Estimativa do índice meiótico.....	50
4.1.3. Estimativa da viabilidade dos grãos de pólen.....	55
4.1.4. Análise dos cromossomos somáticos.....	59
4.1.5. Análise geral do número cromossômico em <i>M. ilicifolia</i>	72
4.2. Análise das sementes.....	74
5. CONCLUSÕES.....	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
VITA.....	88

RELAÇÃO DE TABELAS

pág.

1. Locais de coletas de flores e sementes de *Maytenus ilicifolia* (cidade e localidade) em 2002 e 2003, tipo de população, número dado a cada população, quantidade de plantas-mãe que foram coletadas flores, quantidade de plantas-mãe que foram coletadas sementes e total de plantas-mãe..... 29
2. Locais de coleta, número dado a cada população, número dado a cada planta-mãe, data de coleta, material coletado e número de registro no herbário (ICN)..... 33
3. Análise do comportamento meiótico em diferentes populações de *M. ilicifolia*..... 47
4. Estimativa do índice meiótico em plantas de diferentes populações de *M. ilicifolia*..... 54
5. Estimativa da viabilidade do pólen em plantas de diferentes populações de *M. ilicifolia*..... 57
6. Análise de cromossomos somáticos em plantas de diferentes populações de *M. ilicifolia*..... 62
7. Números cromossômicos de *Maytenus* na Etiópia. Adaptado de Sebsebe (1985)..... 71
8. Número cromossômico em diferentes populações de *M. ilicifolia*... 72
9. Peso médio de sementes de *M. ilicifolia* comparadas por categoria de frutos dentro de uma mesma população (colunas); peso médio das sementes por categorias de frutos entre três diferentes populações: P1- Corredor dos Colares, P2-Fundos Clube Caixeiral e P5-Margens Rio Negro (linhas)..... 76
10. Comparação interpopulações (P1, P2 e P5) do peso médio de sementes *M. ilicifolia*..... 76
11. Comparação do peso médio de sementes entre plantas da população antropogênica de Viamão..... 77

RELAÇÃO DE FIGURAS

	pág.
1. A – Ramo com flores; B – Ramo de <i>M. ilicifolia</i> com frutos ainda não maduros.....	15
2. Distribuição geográfica de <i>M. ilicifolia</i> no Rio Grande do Sul. Adaptado de Rosa (1994) (pontos indicativos).....	18
3. Locais de coleta de <i>M. ilicifolia</i>	32
4. A e B – Mudas provenientes de sementes coletadas de diferentes populações de <i>M. ilicifolia</i>	36
5. Comportamento meiótico na população 1 de <i>M. ilicifolia</i> . A e B - Diacineses com pareamento regular, em torno de 40 ou pouco mais de 40 bivalentes. C e D – Anáfases com disjunção normal.....	48
6. Comportamento meiótico na população 2 de <i>M. ilicifolia</i> . A – Diacinese; B e C – Metáfases; A, B e C – mostrando pareamento regular, com cerca de 32 bivalentes; D, E e F – Anáfases com disjunção normal.....	49
7. Comportamento meiótico na população 3 de <i>M. ilicifolia</i> . A e C – Metáfases com pareamento regular, com cerca de 32 bivalentes; B – Desenho esquemático da célula em metáfase (A); e D – Desenho esquemático da célula em metáfase (C).....	51
8. Comportamento meiótico na população 8 de <i>M. ilicifolia</i> . A, B, C, D – Metáfases; E – Diacinese; Todas células mostrando pareamento regular, com cerca de 35 bivalentes.....	52
9. Comportamento meiótico na população 8 de <i>M. ilicifolia</i> . A, B, C, D – Anáfases. Todas células mostrando disjunção normal.....	53
10. Quartetos jovens de pólen de <i>M. ilicifolia</i> . A e B – Tétrades normais; C – Díade; D – Tríade; E e F – Políades (5 micrósporos em E e 6 micrósporos em F – seta).....	56

11. Grãos de pólen de <i>M. ilicifolia</i> . A e E – Grãos de pólen viáveis; B, C, D e F – Grãos de pólen viáveis (completamente corados) e inviáveis (não corados). Grão de pólen considerado inviável (seta em C).....	58
12. A – Sementes de <i>M. ilicifolia</i> com ataque fúngico na placa de petri. B – Radícula com ponta “queimada” (seta).....	61
13. Cromossomos somáticos da população 2 planta 2 de <i>M. ilicifolia</i> . A e B – $2n=ca.$ 56; C – $2n=ca.$ 60; D – $2n=ca.$ 64.....	64
14. Cromossomos somáticos de <i>M. ilicifolia</i> . População 2 planta 9: A – $2n=ca.$ 64; B – $2n=ca.$ 62; C – $2n=ca.$ 66. População 5 planta 5: D e E – $2n=ca.$ 64.....	65
15. Cromossomos somáticos da população 6 de <i>M. ilicifolia</i> . A e B – Muda espontânea com $2n=ca.$ 68; C – Planta 4A1 com $2n=ca.$ 60.....	67
16. Cromossomos somáticos da planta 2A6 da população 6 de <i>M. ilicifolia</i> . A e B – $2n=ca.$ 66; C, D e E – $2n=ca.$ 64 e F – $2n=ca.$ 62.	68
17. Cromossomos somáticos na população 6 de <i>M. ilicifolia</i> . A, B, C e D: planta 4A5; A – $2n=ca.$ 62; B e C – $2n=ca.$ 64; D – $2n=ca.$ 72. E e F: planta 4A6; E – $2n=ca.$ 68; F – $2n=ca.$ mais de 60.....	69
18. Cromossomos somáticos na população 6 de <i>M. ilicifolia</i> . A e B: planta 5A2 – $2n=ca.$ 62. C e D: planta 5A4; C – $2n=ca.$ 70 e D – $2n=ca.$ mais de 62. E: planta 5A5 – $2n=ca.$ mais de 58.....	70
19. Peso médio de sementes por categorias de frutos entre as diferentes plantas da P6.....	78
20. A e B - Sementes de <i>M. ilicifolia</i>	79

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Maytenus* Molina (Celastraceae) compreende 225 espécies de plantas arbóreas, arbustivas e subarbustivas distribuídas por todo o mundo, porém é predominante na região neotropical.

Espécies pertencentes a este gênero são comumente utilizadas na medicina popular, principalmente nos países de terceiro mundo, pois o alto custo da medicina moderna é incompatível com a capacidade econômica da maioria da população.

Diferentes espécies, bem como diferentes partes delas, são utilizadas tradicionalmente em tratamentos de diversos tipos de doenças, tais como, leucemia, diarreia, anti-helmíntico, epilepsia, convulsões, entre outros.

Devido a este valor medicinal, algumas espécies do gênero tem sido analisadas quimicamente e submetidas a testes clínicos. Resultados de pesquisas mostram que algumas contém potenciais agentes anti-cancerígenos.

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss. conhecida como espinheira-santa, é uma espécie originária da América do Sul, de ocorrência muito comum nas matas do Estado do Rio Grande do Sul, e as suas folhas tem propriedades comprovadas no combate de úlceras gástricas, entre outras doenças. É consumida em larga escala tanto no mercado brasileiro como no exterior, tendo portanto um aspecto comercial importante.

Embora *Maytenus* seja um gênero de grande importância, pouquíssimos trabalhos foram realizados sobre caracterização citogenética, restringindo-se ao número cromossômico de seis espécies ocorrentes na Etiópia (Sebsebe, 1985) e uma no Peru, citada por Federov (1969) e Sebsebe (1985). Portanto existe uma grande lacuna a ser preenchida quanto a aspectos citogenéticos do gênero.

Estudos citogenéticos fornecem informações importantes para programas de melhoramento, podendo auxiliar ainda na compreensão de processos evolutivos, na taxonomia das espécies e conservação de germoplasma.

O conhecimento das características e produção de sementes nas plantas podem auxiliar no planejamento de estratégias de propagação, manutenção e preservação de espécies de interesse.

Os objetivos do presente trabalho foram: a) determinar o número cromossômico de diferentes populações de *M. ilicifolia* ocorrentes no Rio Grande do Sul; b) estimar viabilidade do pólen e o índice meiótico; c) estudar o comportamento meiótico; d) caracterizar sementes desta espécie quanto ao peso e analisar a produção de sementes por fruto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância das plantas medicinais em geral e de *Maytenus ilicifolia*.

O uso de recursos naturais como forma de tratamento e cura de doenças é tão antiga quanto a espécie humana. As informações sobre a utilização das plantas medicinais e suas virtudes terapêuticas foram sendo acumuladas durante séculos, e muito desse conhecimento empírico encontra-se disponível atualmente (Di Stasi, 1996). O processo de evolução da "arte da cura" se deu de forma empírica, em processo de descobertas por tentativas, através de erros e acertos. Uma experiência em "câmera lenta", mas com resultados seguros.

O mundo inteiro vem descobrindo, há bastante tempo, o poder das plantas medicinais e os exemplos mais conhecidos são os das plantas estimulantes. Na Ásia descobriu-se o chá (*Camelia sinensis*), na África o café (*Coffea arabica*) e na América o guaraná (*Paullinia cupana*) e a erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

Várias espécies nativas têm sido amplamente utilizadas pelas populações, algumas com estudos químicos e/ou farmacológicos que dão suporte a sua utilização, outras empregadas somente a partir do conhecimento empírico ou tradicional da população (Di Stasi, 1996). Segundo o mesmo autor,

várias empresas nacionais empregam matéria-prima vegetal diretamente na elaboração de seus medicamentos. No Brasil, 20% da população é responsável por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis. O restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos.

A Organização Mundial da Saúde, na Conferência Internacional de 1978, recomendou o início de programas relativos a identificação, avaliação, preparo, cultivo e conservação de plantas usadas na medicina popular (Akerle, 1988).

Nas duas últimas décadas houve uma acentuada revalorização mundial do uso de plantas medicinais, o que Montanari Jr. (2002) explica ocorrer principalmente por três fatores:

- a crescente aceitação do consumidor por medicamentos feitos a partir de plantas, por causa do sentimento, nem sempre justificado, de que tudo o que vem da natureza é mais seguro, saudável e ecologicamente correto do que os produtos sintéticos;
- pelo interesse renovado da indústria farmacêutica em busca de compostos naturais que possuam atividade farmacológica, devido à sua aceitação por parte dos usuários, e também dos menores custos envolvidos na pesquisa e no desenvolvimento de um novo produto obtido a partir de plantas;
- pelas pesquisas científicas estarem validando o uso de inúmeras plantas usadas popularmente e incorporadas às farmacopéias de cada país, criando condições legais para que possam ser oficialmente transformadas em medicamentos por farmacêuticos e prescritas por médicos.

Com o aumento do uso de plantas medicinais e com a destruição acelerada dos recursos naturais, torna-se evidente que a exploração de plantas medicinais precisa estar acompanhada de medidas conservacionistas, caso contrário, podem ser levadas à extinção (Hamann, 1991). O apelo econômico dessas plantas aumenta os riscos de destruição do nicho ecológico de várias espécies, podendo levar à erosão genética, colocando em perigo a sobrevivência de muitas plantas medicinais nativas, caso que vem acontecendo com *M. ilicifolia* na Mata Atlântica (Montanari Jr., 2002)

Gottlieb & Kaplan (1990), considerando o potencial taxonômico disponível e a enorme velocidade de extinção de espécies devido a destruição de seus ecossistemas, estimam que no máximo 5% destas serão conhecidas e pesquisadas antes de serem extintas. Em outra estimativa, Nodari & Guerra (1999) calculam que apenas 8% da flora brasileira foi estudada em busca de compostos bioativos.

M. ilicifolia é uma espécie medicinal, amplamente utilizada no Rio Grande do Sul pelas propriedades terapêuticas de suas folhas, que são usadas popularmente para tratamentos internos como antiasmáticas, anticonceptivas, em tumores estomacais e contra ressaca alcoólica. Externamente, como antissépticas em feridas e úlceras. As mulheres paraguaias a utilizam como antifertilizante (Simões et al., 1995).

No Brasil, *M. ilicifolia* é uma planta que há muito tempo vem sendo utilizada popularmente como agente antiúlcera. Antigos catálogos de preparados fitoterápicos exaltavam suas propriedades terapêuticas. Silva Araújo & Lucas (1930) citado por Carlini & Braz (1988) relataram uma

comunicação do Dr. Aloísio França à Sociedade de Medicina do Paraná, em 1922: “a espinheira-santa é analgésica, desinfetante, tonificante e cicatrizante. Nas gastralgias, acalma rapidamente a dor. Nas doenças lesionais do estômago – na gastrite crônica, na úlcera por exemplo – gasta o medicamento o maior prazo para as preparações, mas as melhoras se fazem sentir rapidamente. É tonificante, porque reintegra às suas funções o estômago dos dispépticos, os hipotônicos e o intestino dos atônicos e constipados. É porém cicatrizante, porque cicatriza as feridas. Desde a simples perturbação funcional às lesões da mucosa, o medicamento tem decidida ação curativa”.

Índios brasileiros a utilizavam como remédio anti-tumor. No Paraguai, a população utilizava como contraceptivo, e na Argentina, como antiasmático e anti-séptico (ONG Amazonlink. org, 2004).

M. ilicifolia apresenta diversos nomes populares, entre eles, espinheira-santa, cancerosa (Simões et al., 1995; Lorenzi, 1998), espinheira-divina (Lorenzi, 1998; Longhi, 1995), erva-cancrosa, erva-santa (Lorenzi, 1998), cancerosa (Lorenzi, 1998; Simões et al., 1995), sombra-de-touro (Simões et al., 1995; Longhi, 1995), congorça, salva-vidas, quebrachilho (Longhi, 1995). Segundo Lorenzi (1998), os nomes mais utilizados no Rio Grande do Sul são espinheira-santa e cancerosa.

Foi criado no Brasil um Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais, coordenado por técnicos da Central de Medicamentos (CEME) em 1983, que tinha como principais objetivos reforçar a cultura fitoterapêutica nacional, criar uma alternativa medicamentosa efetivamente testada e de baixo custo para a população e introduzir a fitoterapia de modo efetivo nos programas de atenção

à saúde, nos níveis primário e secundário. Além disso, também contribuir para a redução de doenças de gravidade leve ou moderada de grande importância e conferir maior efetividade ao programa de assistência farmacêutica como um todo (Ribeiro, 1988).

Neste programa foram pesquisadas sessenta e uma plantas eleitas para serem estudadas, sendo que nos primeiros cinco anos já haviam oito plantas com resultados positivos, comprovados cientificamente (Ribeiro, 1988). Uma das espécies, considerada das mais promissoras, foi *M. ilicifolia* (Carlini, 1988). A CEME hoje é um órgão extinto do Ministério da Saúde (Gama, 2003).

Diversos estudos compilados por Simões et al. (1995) sobre dados químicos e farmacológicos, foram relatados para esta espécie. Stellfeld (1934) descreveu a presença de iodo, enxofre, fósforo, sódio, cálcio, taninos, resina, cera, clorofila, corante e mucilagem, como também propriedades diuréticas e analgésicas. Pereira (1962) relatou a presença de maitenina, tanino, cálcio, magnésio, titânio e ácido clorogênico. Gonçalves de Lima (1969) demonstrou que extratos de raízes apresentaram promissoras atividades antimicrobianas e antitumorais, atribuídas aos compostos maitenina e pristimerina.

Em 1988, a CEME publicou os resultados da pesquisa que comprovavam a ação da Espinheira Santa nos tratamentos de gastrite e úlceras gástricas. Diversos estudos farmacológicos foram realizados.

Macaubas et al. (1988), testaram a eventual ação antiúlcera gástrica do bálsamo, couve e espinheira-santa. Das três espécies testadas em ratos, somente Espinheira Santa teve eficiência, revelando um marcante efeito

protetor, comparável ao da cimetidina (droga sintética usada no tratamento da úlcera péptica).

Carlini & Braz (1988), testaram o efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus* contra úlcera gástrica experimental em ratos, constatando que o efeito protetor é dose-dependente e persiste por no mínimo dezesseis meses após a coleta da planta, equiparando-se aos efeitos da cimetidina e ranitidina (outro tipo de droga sintética usada no tratamento da úlcera péptica), tendo o liofilizado aumentado grandemente o volume e o pH do suco gástrico, sendo semelhante ao efeito das drogas sintéticas, sugerindo-se este ser devido ao alto conteúdo de derivados tanínicos. Resultados semelhantes foram obtidos por Souza-Formigoni et al. (1991), confirmando o uso popular da planta.

Oliveira & Carlini (1988) estudaram os efeitos farmacológicos da administração aguda de espinheira-santa em camundongos e ratos, sob forma de abafados e liofilizados. Os resultados revelaram não possuir efeito tóxico em doses 1600 vezes superior a utilizada pelo homem, além de não modificarem atividades motoras.

Geocze et al. (1988) trataram pacientes portadores de dispepsia alta com preparações de espinheira-santa e verificaram uma melhora significativa na sintomatologia dispéptica global, particularmente nos sintomas de azia e dor, não tendo sido relatados queixas de efeitos colaterais.

Paralelamente a comprovação científica das propriedades terapêuticas de *M. ilicifolia* e sua ampla divulgação, foi gerado também uma problemática, onde a partir do uso aprovado e recomendado da espécie, levou-se a um

aumento na demanda da matéria prima, provocando um maior extrativismo, visto que a planta ainda não era cultivada e os poucos que foram surgindo, estavam em início de estabelecimento, colocando em risco assim todo o patrimônio genético, acarretando uma diminuição drástica das populações naturais, levando a espécie à risco de extinção (Gama, 2003).

M. ilicifolia foi incluída na Lista da Flora Ameaçada de Extinção no Brasil (BDT, 2004). Para a construção desta lista foram consultadas várias fontes de pesquisa, entre elas, a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas de Extinção no Estado do Paraná, na qual foi encontrada a espinheira-santa, sendo enquadrada na categoria de ameaça: espécie rara (SEMA & GTZ, 1995)

Segundo Reis & Mariot (1999), a exploração de plantas de uso medicinal da flora nativa através da extração direta nos ecossistemas tropicais (extrativismo) tem levado a reduções drásticas das populações naturais dessas espécies, seja pelo processo predatório de exploração, seja pelo desconhecimento dos mecanismos de perpetuação das mesmas. Assim, a domesticação e cultivo aparecem como opções para obtenção da matéria prima de interesse farmacêutico e redução do extrativismo nas formações florestais.

A maioria das espécies medicinais nativas, ou que já foram aclimatadas no Brasil, são colhidas por processos extrativos, sem que haja fiscalização eficiente por órgãos responsáveis. Com isso, várias espécies medicinais de nossa flora, de amplo uso e comercialização, estão em risco de extinção, assim como *M. ilicifolia*. Também verifica-se outro problema quando espécies são colhidas por processos extrativos, a quantidade de material necessário para

consumo é muitas vezes insuficiente, a concentração de substâncias desejadas, são extremamente variadas e muitas vezes de baixa qualidade (Furlan, 1996).

A qualidade da matéria-prima vegetal é a determinante inicial da qualidade de um fitoterápico (Farias, 1999) e também determina seu valor financeiro, podendo este variar bastante. Quanto melhor a qualidade, maior o seu valor (Montanari Jr., 2002).

Furlan (1996) comenta que algumas pesquisas indicam que fatores como variação genética, clima, solo, época e forma de plantio, adubação, uso de agrotóxicos, irrigação, tratos culturais e formas de colheita, afetam os teores dos princípios ativos.

Segundo Montanari Jr. (2002) o fator genético deve ter atenção especial porque a quase totalidade dos princípios ativos das plantas são produzidos pelo metabolismo secundário, que por sua vez é regido pelo seu código genético.

A exploração de populações selvagens, na maioria dos casos com ampla variabilidade genética, não resulta em matéria-prima padronizada. Indivíduos geneticamente diferentes produzirão, ainda que sob as mesmas condições ambientais, ontogênicas e de pós-colheita, diferentes teores de princípios ativos (Montanari Jr., 2002)

Para garantir o fornecimento de matéria-prima para a indústria farmacêutica, é necessário fazer manejo da planta em seu ambiente natural, cultivá-la ou ainda descobrir plantas com as mesmas propriedades terapêuticas (Gama, 2003). Pesquisas recentes vem demonstrando que outras espécies

conhecidas popularmente como espinheira-santa são utilizadas terapêuticamente, bem como outras espécies do gênero *Maytenus*, e apresentam ações farmacológicas semelhantes (Gonzalez et al., 2001).

Segundo Montanari Jr. (2002), o cultivo poderá responder ao aumento de demanda e garantir regularidade e padrão necessários para o processamento industrial e que, apenas o manejo, não garante quantidades e especificidades desejadas pelo fabricante de remédio, pois fatores genéticos, ontogênicos e ambientais dificultam a sua padronização.

Montanari Jr. (2002) considera o sistema de manejo também uma prática interessante por fornecer ganho extra às populações que habitam áreas onde a espécie ocorre espontaneamente, desde que seja realizado de forma adequada, por pessoas conscientes da questão ambiental e com fiscalização atuante de órgãos como o Ibama.

O desenvolvimento de técnica de manejo e cultivo, tendo em vista a utilização dessas espécies vegetais pelo homem aliada à manutenção do equilíbrio dos ecossistemas, é de suma importância, visto que além do valor das plantas medicinais como recurso terapêutico, também é fonte de recursos econômicos (Reis, 1996). O manejo sustentável de populações naturais de plantas medicinais nativas é uma alternativa que, além de gerar fonte de renda adicional para agricultores, assegurando também a conservação do ambiente natural, pode promover o resgate e difusão do conhecimento tradicional com relação à prática terapêutica através de recursos naturais.

2.2. Gênero *Maytenus*: botânica e distribuição

A família Celastraceae abrange entre 50 e 60 gêneros e 800 a 900 espécies, com distribuição tropical e apenas alguns gêneros alcançam regiões temperadas (Dyer, 1975; Cronquist, 1981; Barroso, 1991).

O gênero *Maytenus* foi originalmente proposto em 1782 por Molina (Carvalho-Okano, 1992) e compreende cerca de 225 espécies, de distribuição cosmopolita, principalmente nos trópicos (Dyer, 1975). Segundo Carvalho-Okano (1992), o gênero *Maytenus* é um dos maiores da família, com cerca de 25% das espécies de Celastraceae ocorrentes em todo o mundo. É um gênero predominantemente neotropical, com apenas um número reduzido de espécies ocorrendo nos subtropicais. O Brasil conta com 77 espécies, das quais 43 estão no Brasil extra-amazônico, sendo que apenas 6 espécies são exclusivas ou mais abundantes na região subtropical: *M. ilicifolia*, *M. cassineformis*, *M. boaria*, *M. dasyclada*, *M. glaucescens* e *M. patens*.

No Brasil extra-amazônico, os quatro maiores conjuntos de espécies do gênero ocorrem na região nordeste, especialmente na Bahia (14 espécies), região sudeste (29 espécies), região sul (12 espécies) e região centro-oeste (4 espécies), sendo estimados cerca de 15 espécies para a região amazônica, que certamente também representa um dos grandes centros de diversidade do gênero (Carvalho-Okano, 1992).

Para o Rio Grande do Sul Carvalho-Okano (1992) cita a ocorrência de seis espécies de *Maytenus*: *M. aquifolia*, *M. cassineformis*, *M. dasyclada*, *M. evonymoides*, *M. boaria* e *M. ilicifolia*.

Segundo dados levantados por Rosa (1998) através de consultas nos seguintes herbários: ICN-UFRGS; HAS-Fundação Zoobotânica-RS e PACA-UNISINOS-RS; no Rio Grande do Sul há ocorrência das seguintes espécies: *M. aquifolium*, *M. boaria*, *M. gonoclados*, *M. cassineformis*, *M. dasyclados* e *M. ilicifolia*. Conforme Mossi et al. (2002) além das seis espécies citadas por Carvalho-Okano (1992), também ocorrem *M. glaucescens*, *M. robusta* e *M. gonoclada*.

O gênero está reunido em duas seções: *Maytenus* e *Oxyphylla*. Esta última é exclusiva da América do Sul, mais precisamente extra-amazônica, concentrando no Brasil o maior número de espécies, sendo bem definida taxonomicamente e reconhecida pela presença de espinhos em número variável, no bordo foliar, assim como por apresentarem as flores reunidas em fascículos. A seção *Maytenus* reúne as demais espécies do gênero, distribuídas nos trópicos da América, África e Ásia. Certamente o continente americano abriga o maior número de espécies. No Brasil é encontrado em todo território nacional (Carvalho-Okano, 1992).

No Brasil o gênero *Maytenus* está representado geralmente por arbustos e árvores inermes, sendo reconhecido taxonomicamente pela presença de folhas alternas, às vezes imbricadas; inflorescências cimosas; flores alternas pentâmeras isostêmones, com gineceu bicarpelar; fruto cápsula, bivalvar; sementes variando de 1 a 4 por fruto, envoltas completamente por um arilo de coloração branca. Sendo a morfologia dos ramos, folhas e principalmente o tipo de inflorescência, fundamentais para a taxonomia do gênero (Carvalho-Okano, 1992). As flores podem ser hermafroditas ou unissexuadas por aborto, sendo

funcionalmente masculinas ou femininas, pequenas, solitárias ou reunidas em fascículos ou racimos (Milano, 1958; Dyer, 1975).

2.3. *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss. é um subarbusto ou árvore, ramificado desde a base, medindo cerca de cinco (Carvalho-Okano, 1992; Lorenzi, 1998) a oito metros de altura (Milano, 1958), até mesmo podendo atingir de 10-20 metros (Longhi, 1995). Possui ramos novos glabros angulosos, tetra ou multicarenados; folhas congestas, coriáceas, glabras; pecíolo com 0,2-0,5 cm de comprimento; estípulas inconspícuas; limbo com 2,2-8,9 cm de comprimento e 1,1-3,0 cm de largura; nervuras proeminentes na face abaxial; forma elíptica ou estreitamente elíptica; base aguda a obtusa; ápice agudo a obtuso, mucronado ou aristado; margem 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 semilimbos.

Apresenta inflorescências em fascículos multifloros; pedicelos florais com 0,2-0,5 cm de comprimento; sépalas semicirculares, ciliadas, com cerca de 0,1 cm de comprimento; pétalas ovais, inteiras, com cerca de 0,22 cm de comprimento e 0,2 cm de largura; estames com filetes achatados na base; estigma capitado, séssil ou com estilete distinto; ovário saliente ou totalmente imerso no disco carnosos. Longhi (1995) ainda ressalta que as flores são brancas ou pálidas (Figura 1 A).

Os frutos são do tipo cápsula bivalvar, orbicular; pericarpo maduro de coloração vermelho-alaranjada (Carvalho-Okano, 1992) (Figura 1B).



FIGURA 1. A – Ramo de *M. ilicifolia* com flores; B – Ramo com frutos ainda não maduros.

De todas as espécies do gênero *Maytenus* seção *Oxyphylla*, *M. ilicifolia* é a única que apresenta ramos angulosos, tetra ou multicarenados e frutos cujo pericarpo maduro tem coloração vermelho-alaranjada, sendo estas características, portanto, importantes para sua identificação (Carvalho-Okano, 1992).

M. ilicifolia apresenta flores monóclinas, no entanto, possivelmente estas apresentem comportamento funcional de flores díclinas (Carvalho-Okano, 1992; Scheffer, 2001). Ocorrem flores de estames praticamente sésseis, com coloração pardacenta, presos na parede do ovário, o qual pode ser súpero ou semi-ínfero, proeminente. 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. Outras flores se apresentam com estames maiores, de cor amarelo-forte, e com ovário ínfero. Provavelmente, estas atuam como doadoras de pólen e atrativas à polinização, uma vez que, na antese, o disco dessas flores secretam néctar (Carvalho-Okano, 1992).

Steenbock (2003) verificou que indivíduos de *M. ilicifolia* apresentam características distintas em ambientes que apresentam diferentes condições edafoclimáticas. No mesmo trabalho, analisando aspectos sobre a biologia floral em populações naturais, sugeriu que existem diferentes estratégias de adaptação relacionadas à estrutura floral e à frequência de tipos florais da espécie em distintas condições de solo e luminosidade. Esta frequência apresenta uma grande associação com a taxa de cruzamento em populações

naturais. Também concluiu que a espécie possui sistema de cruzamento misto, com tendência à alogamia.

Radomski (1998) observou que nas plantas que crescem em pleno sol, o teor de taninos, polifenóis totais e polifenóis não tanantes é maior do que naquelas que se desenvolvem em ambientes semi-sombreados, ocorrendo o inverso em relação a teores de nitrogênio, potássio, boro e silício.

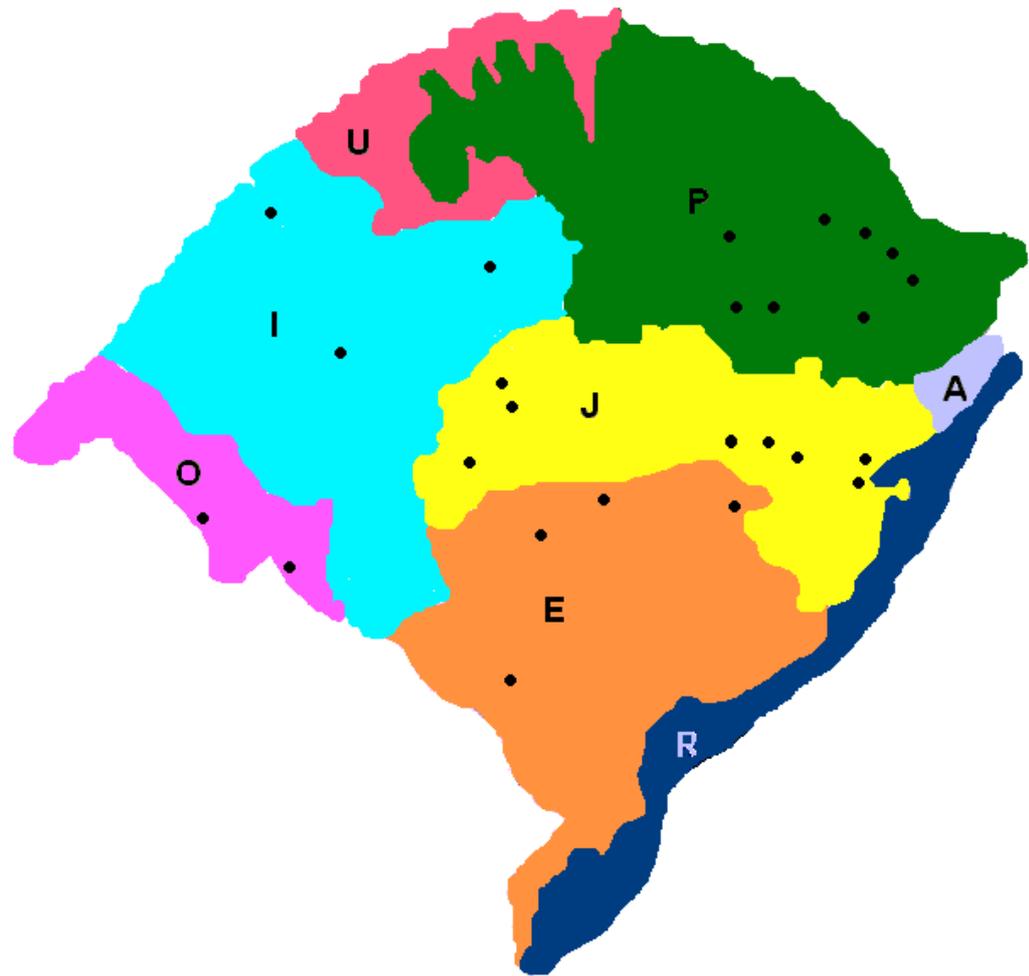
M. ilicifolia é encontrada predominantemente na região sul do Brasil, nos sub-bosques das florestas de Araucária ou às margens de rios. Ocorre também nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, porém em baixa frequência. *M. ilicifolia* também ocorre no Paraguai, Uruguai, Bolívia e leste da Argentina (Lorenzi, 1998; Carvalho-Okano, 1992).

Segundo Rosa (1994), conforme dados levantados nos herbários descritos anteriormente, *M. ilicifolia* apresenta uma expressiva dispersão em boa parte do Rio Grande do Sul: 48,5% na Área do Planalto em altitudes acima de 1000m (São Francisco de Paula, Bom Jesus, Vacaria); 21,2% na Depressão Central (São Leopoldo, Santa Cruz do Sul); 13,6% na bacia do rio Ibicuí e 10,6% no Escudo Riograndense. Ocorre também no Parque do Espinilho (6%). (Figura 2).

2.4. Caracterização de germoplasma e estudos citogenéticos

2.4.1. Considerações gerais

Germoplasma é todo conjunto genético de uma espécie, que, em uma coleção (banco de germoplasma), pode servir como fonte de variabilidade genética a ser utilizada por melhoristas (Miglani, 1998).



REGIÕES FITOGEOGRÁFICAS

- A – Floresta Pluvial de Encosta Atlântica
- E – Área do Sudeste ou Escudo Riograndense
- I – Bacia do Rio Ibicuí
- O – Área do Sudoeste ou Parque do Espinilho
- U – Bacia do Rio Uruguai
- J – Bacia do Rio Jacuí ou Depressão Central
- P – Área do Planalto ou Floresta com Araucária
- R – Restinga Litorânea

FIGURA 2. Distribuição geográfica de *M. ilicifolia* no Rio Grande do Sul. Adaptado de Rosa (1994). (pontos indicativos).

A caracterização de germoplasma, que pode ser feita através de abordagens citogenéticas, morfológicas, reprodutivas, fenológicas, agronômicas, entre outras, é essencial para programas de melhoramento genético, estudos taxonômicos, genéticos e para conservação deste germoplasma.

A citogenética compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação quanto a sua variação e evolução (Guerra, 1988).

Diferentes tipos de dados cromossômicos tem sido usados taxonomicamente, incluindo número, tamanho e forma, comportamento na meiose, e conteúdo de DNA. Devido aos cromossomos serem visíveis com microscópio óptico durante a divisão dos núcleos, as fontes de dados cromossômicos em plantas de valor para o taxonomista são geralmente de mitose e meiose, porém devem ser usados juntamente com outros caracteres para melhor confiabilidade dos dados (Stuessy, 1990).

O número cromossômico é o dado citogenético que tem sido usado mais freqüentemente em trabalhos de taxonomia devido à facilidade de observação (Stuessy, 1990). No entanto, determinar o número cromossômico para espécies ainda não estudadas não é um trabalho trivial e rápido segundo Hanson et al. (2003). Talvez por isso, apenas 25% das angiospermas tiveram seus números cromossômicos determinados (Bennet, 1998), e muitas dessas espécies tem apenas uma ou poucas contagens, estas freqüentemente antigas e por vezes duvidosas (Stace, 2000).

Estudos sobre o comportamento meiótico são importantes pois geram conhecimento sobre a fertilidade dos indivíduos, permitindo ainda entender as relações de homologia em espécies híbridas e poliplóides. Cromossomos meióticos são também proveitosos para dados taxonômicos (Stuessy, 1990), e segundo Guerra (1988), estão ligados a compreensão de alguns pontos mais críticos da evolução, além de constituir-se na base citológica dos mecanismos de transmissão dos caracteres hereditários.

A análise citotaxonômica tem trazido uma grande contribuição ao estudo da evolução, principalmente pelo fato de que os cromossomos constituem o próprio material genético e, portanto, alterações destes parâmetros quase sempre são significativas para o rumo evolutivo das espécies. Os dados citogenéticos mais comumente utilizados na citotaxonomia são o número e a morfologia cromossômica, padrão de bandas, quantidade de DNA, comportamento meiótico e vários outros (Guerra, 1988).

Estudos genéticos e citogenéticos são muito atrativos para taxonomistas de plantas pois refletem a evolução e portanto oferece a possibilidade da mais refinada referência para classificação (Stuessy, 1990).

De acordo com Sybenga (1998), a citogenética possui duas funções importantes para o melhoramento de plantas: gerar informações e fornecer métodos para a manipulação genética. As técnicas de manipulação que não envolvem transgenia (transferência gênica biotecnológica), como a transferência intra e interespecífica de genes e alterações na dosagem gênica (haploidia, alopoliploidia, autopoliploidia) envolvem diretamente a citogenética.

2.4.2. Trabalhos realizados em *Maytenus*

Em decorrência dos problemas de devastação das populações naturais de *M. ilicifolia*, que resultou na perda do complexo genético, foram realizados alguns estudos, apresentados abaixo, com intuito de fornecer subsídios para a elaboração de estratégias de conservação genética deste importante germoplasma.

Bittencourt (2000) analisou a variabilidade genética em populações naturais de *M. ilicifolia*, por meio de marcadores RAPD e identificou que, entre populações que estão inseridas em locais com características geológicas e classe de solos semelhantes, existem menores distâncias genéticas, mesmo que geograficamente distantes, se comparado a populações geograficamente mais próximas, porém em locais com características distintas.

Pinto et al. (2002) encontraram variabilidade genética intraespecífica em *M. ilicifolia* através de RAPD, o que já era esperado, devido a grande variabilidade morfológica demonstrada, e pelo fato desta espécie ser alógama.

Analisando o sistema de cruzamento e a diversidade genética em populações de progênies de espinheira-santa através de eletroforese de isoenzimas, Scheffer (2001) estimou a taxa de fecundação cruzada, como sendo de 99,6%, comprovando a expressiva alogamia da espécie. Os resultados da análise de diversidade genética entre populações indicaram que a maior parte da variação genética concentra-se dentro das populações e que a identidade genética entre elas diminui a medida em que aumentam suas distâncias geográficas.

Steenbock (2003) analisou a diversidade genética entre duas populações naturais de *M. ilicifolia* e a taxa de cruzamento da espécie utilizando a técnica de eletroforese de isoenzimas e verificou que estas apresentaram maior número médio de alelos por loco, maior heterozigosidade esperada e maior percentagem de locos polimórficos do que a média de populações naturais de espécies arbóreas perenes de clima tropical estudadas. Também verificou que a maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro das populações, e que a espécie apresenta sistema de cruzamento misto, sendo preferencialmente alógama, concordando com Scheffer (2001).

Segundo levantamentos feito por Sebsebe (1985), na família Celastraceae estudos citológicos concentram-se principalmente em espécies de *Celastrus* e *Euonymus*. Em *Celastrus* todas espécies estudadas tem $2n=46$, enquanto em *Euonymus* $2n=16, 32, 48$ e 64 (Federov, 1969; Moore, 1977). Também foi estudada a espécie *Lophopetalum fimbriatum* que apresenta $2n=40$ (Mehra et al. 1969).

O número cromossômico determinado por Sebsebe (1985) para seis espécies de *Maytenus* ocorrentes na Etiópia são citados a seguir: *M. addat* Sebsebe, $2n=4x$ =cerca de (ca.) 36; *M. arbutifolia* R. Wilczek, $2n=2x=20$; *M. gracilipes* subsp. *arguta* Sebsebe, $2n=2x$ =ca. 24; *M. obscura* (A. Rich) Cufod., $2n=4x$ =ca. 36; *M. senegalensis* (Lam.) Exell, $2n=6x=54$; *M. serrata* Wilczek, $2n=2x$ =ca. 20. O autor ressaltou que os dados evidenciaram que o número básico mais comum para o gênero é $x=9$. Entre as espécies da Etiópia, *M. addat* e *M. obscura* são tetraplóides e *M. senegalensis* um hexaplóide, todas com $x=9$. Em *M. arbutifolia* e *M. serrata* (ambas $2n=20$), e *M. gracilipes* subsp.

arguta e *M. rothiana* (ambas $2n=24$) provavelmente representem indivíduos em condição diplóide com número básico secundário $x=10$ e $x=12$ respectivamente.

Federov (1969) cita o número cromossômico de uma espécie do Peru, *M. vitis-idaea*, com $2n=80$.

Sebsebe (1985) ao investigar estudos citológicos prévios realizados com o gênero *Maytenus*, deixa explícita a idéia que considera este gênero como sendo igual ao *Gymnosporia*. Assim sendo, cita os trabalhos que determinaram o número cromossômico de algumas espécies desses dois gêneros: Mehra et al. (1969) de *Gymnosporia acuminata* Hook f. e *Maytenus rufa* (como *G. rufa*), ambas com $2n=36$ e originárias da Índia; Adatia et al. (1962) de *M. rothiana* (Laws.) Lobreau-Callen (como *G. rothiana*) com $2n=24$ e *M. senegalensis* (Lam.) Exell (como *G. spinosa* (Forssk.) Fiori) com $2n=54$, ambas também originárias da Índia e Covas & Schnack (1947), também citado por Federov (1969), a espécie *M. vitis-idaea* Griseb. com $2n=80$, originária do Peru.

Sebsebe (1985) trata sob o gênero *Maytenus*, 17 espécies africanas estudadas em seu trabalho, antes incluídas nos gêneros *Gymnosporia* e *Maytenus*, afirmando que estes dois gêneros não sejam suficientemente distintos para serem tratados como gêneros separados, porém Carvalho-Okano (1992) julga conveniente a separação de *Maytenus* e *Gymnosporia* como entidades distintas, sendo o primeiro predominantemente americano e o segundo na África e Ásia, alegando que o conjunto de caracteres diferenciais entre os dois gêneros é bastante forte sob o ponto de vista taxonômico.

Carvalho-Okano (1992) questiona a classificação de Sebsebe (1985), dizendo ser possível que a maioria das espécies tratadas por este autor, sejam representantes do gênero *Gymnosporia* e não *Maytenus*. Também nos trabalhos de Simmons & Hedin (1999) e Simmons et al. (2001), com base na análise de dados filogenéticos em Celastraceae, inferidos a partir da análise de DNA nuclear ribossomal 26S, das seqüências dos genes *phyB*, *rbcl*, *atpB* e morfologia, consideraram que *Gymnosporia* é distantemente aparentado de *Maytenus*.

Apesar da grande importância do gênero *Maytenus*, não existem, na literatura disponível outros trabalhos de citogenética, além dos citados anteriormente. As principais razões provavelmente residem no fato de *Maytenus* ser pouco favorável para observações citológicas, como já evidenciado por Sebsebe (1985), considerando o elevado número de cromossomos e o seu pequeno tamanho, dificultando desta forma a obtenção do número exato de cromossomos.

Certamente por estes motivos, não existem informações citogenéticas publicadas, tanto sobre outras espécies do gênero, como para *M. ilicifolia*.

2.5. Características e produção de sementes em *M. ilicifolia*

As sementes de *M. ilicifolia* tem geralmente 5 mm de comprimento por 4 mm de largura e 2 mm de espessura. Possuem cor marrom-escura, com tegumento membranáceo, sendo colhidas juntamente com o fruto maduro, isto é, quando apresentar coloração vermelha. Sua dispersão é feita por animais ou por gravidade (Longhi, 1995).

Conforme Rosa (1998), as sementes de *M. ilicifolia* se caracterizam como oleaginosas, com 54% de lipídios.

Carvalho-Okano (1992) descreve que sementes do gênero *Maytenus* tem a testa rija, lisa e brilhante, de coloração escura. Internamente o endosperma é abundante. O embrião é axial, com cotilédones planos, membranáceos e eixo hipocótilo-radícula reto e curto. São envoltas inteiramente pelo arilo suculento, de coloração branca. Segundo Sebsebe (1985) arilos são atrativos para pássaros e estão relacionados à dispersão das sementes.

Com relação ao número de sementes por fruto Carvalho-Okano (1992) observou a ocorrência de uma a quatro por fruto, tendo maior incidência de duas e três. Rosa (1994) encontrou também produção de uma a quatro sementes por fruto, com maior incidência de uma, seguida de duas, três e muito raramente quatro.

Segundo Longhi (1995) para exercer-se o plantio, as sementes devem ser liberadas manualmente, e a semeadura deve ser feita em sementeiras com cobertura de 0,5 cm de terra. O autor também diz que 1 Kg de frutos tem cerca de 820 g de sementes e 1 Kg de sementes tem aproximadamente 19500 unidades.

Rosa (1994) encontrou em seu trabalho que o peso da semente de *M. ilicifolia* é inversamente proporcional a quantidade destas por fruto, isto é, aumentando o número de sementes por fruto diminuiu o peso proporcionalmente. O peso de mil sementes foi de 99,1 g e em 62,3% das

sementes o peso médio foi de 0,10 g, as quais eram provenientes de frutos contendo uma semente.

Conforme Popinigis (1977) a qualidade da semente é um somatório de todos os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários que afetam a capacidade de originar plantas de alta produtividade. Sendo que a constituição genética da semente, por consequência a física, pode influenciar suas características de qualidade fisiológica, apresentando maior ou menor vigor e longevidade. O crescimento inicial da plântula está diretamente relacionado com as reservas de nutrientes presentes nas sementes (Rosa, 1998).

Com relação a germinação Scheffer et al. (1994) verificaram que as sementes de espinheira-santa perdem sua viabilidade rapidamente após a coleta, observando que as médias das taxas de germinação foram 59% para sementes recém coletadas e 34% para sementes com 180 dias de armazenamento (em geladeira e câmara seca). No trabalho de Rosa (1998) foi verificado que a capacidade germinativa das amostras, mostrou uma tendência decrescente, na medida que se prolongou os períodos de armazenamento nas condições de câmara fria, câmara seca e ambiente, sendo que a melhor condição de armazenamento foi a câmara fria a 5°C.

Sementes de *M. ilicifolia* podem ser classificadas como ortodoxas e conservadas em câmaras de germoplasma, suportando em grau de umidade de 6%, armazenamento a 5°C e a - 20°C, garantindo a manutenção da variabilidade genética (Eira et al., 1995).

Segundo Magalhães et al. (1998) *M. ilicifolia* é uma espécie que apresenta difícil propagação. Tem sido utilizadas sementes e estacas de

raízes, além da cultura de tecidos. Uma das vantagens de se propagar espinheira-santa por sementes é que além de permitir a produção de mudas em larga escala, possibilita a formação de raiz pivotante, proporcionando uma melhor fixação, o que não ocorre nos sistemas por estacas ou por cultura de tecidos.

Reis & Mariot (1999) afirmam que a domesticação e o cultivo de plantas medicinais nativas são as opções para obtenção de matéria prima de interesse farmacêutico e redução do extrativismo nas formações florestais.

O estudo sobre sementes de espécies nativas, principalmente aquelas com potencial medicinal é de suma importância para regulamentar aspectos tais como, armazenamento e conservação de sementes, bem como padronização do cultivo e produção de mudas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Todo material analisado de *Maytenus ilicifolia*, foi coletado em populações naturais e antropogênicas, através de saídas a campo, durante os anos de 2002 e 2003. Sete populações foram coletadas no Estado do Rio Grande do Sul e uma na República Oriental do Uruguai.

A Tabela 1 indica os locais de coleta do material analisado e o tipo de material coletado de cada população.

Os estudos citogenéticos foram realizados no Laboratório de Citogenética e Eletroforese do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da UFRGS. O processo de registro da produção de sementes por fruto e caracterização física destas, foi desenvolvido nos laboratórios do Departamento de Horticultura e Silvicultura da UFRGS.

3.1.1. Descrição detalhada dos locais de coleta

População 1 – População natural, localizada no município de Bagé-RS, na localidade das Palmas, às margens do Corredor dos Colares, estrada vicinal

TABELA 1. Locais de coletas de flores e sementes de *Maytenus ilicifolia* (cidade e localidade) em 2002 e 2003, tipo de população, número dado a cada população, quantidade de plantas-mãe que foram coletadas flores, quantidade de plantas-mãe que foram coletadas sementes e total de plantas-mãe. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

Origem	Localidade	Tipo da população	Número da população	Quantidade plantas/flores	Quantidade plantas/sementes	Total plantas-mãe	
Engenho Velho – RS	Bagé – RS	Corredor dos Colares	Natural	1			
				3			
				4			
				6			
	Linha Felipe	Bagé – RS	Fundos Clube Caixeiral	Natural	2		
					6		
					12		
					12		

a

3

2

0

2

Rivera – Uruguai

Parque Grã-Bretanha
Natural

4

4

2

5

Bagé – RS
Margens Rio Negro
Natural

5

4

3

7

Viamão – RS
Fepagro
Antropogênica^b

6

22

25

31

Porto Alegre – RS
 Lomba do Pinheiro
 Antropogênica ^c
 7
 0
 Não separada por indivíduo
 -

Gravataí – RS
 Barro Vermelho
 Natural
 8
 1
 0
 1

TOTAL

42

46

64

^a Duas plantas isoladas cultivadas

^b Plantas coletadas em diferentes lugares no RS mantidas em coleção

^c Cultivo de plantas

da BR 153 Km 540. Situa-se em um capão de mato, sendo de distribuição espalhada entre as outras espécies vegetais.

População 2 – População natural, localizada no município de Bagé-RS, nos fundos do Clube Caixeiral. Situa-se em uma mata ciliar, sendo de distribuição muito freqüente. Foi considerada a maior população natural encontrada.

População 3 – Duas plantas isoladas, cultivadas, localizadas no município de Engenho Velho-RS, em uma propriedade particular do Sr. Sérgio Riva na localidade da Linha Felipe.

População 4 – População natural, localizada no município de Rivera na República Oriental do Uruguai, no Parque Municipal Grã-Bretanha. É uma população grande, porém o número de indivíduos que estavam em estágio de florescimento ou frutificação, nos momentos de coleta, era pequeno.

População 5 – População natural, localizada no município de Bagé-RS, na Fazenda São Jorge, BR 153 Km 610, às margens do Rio Negro. Situa-se em uma mata ciliar que acompanha um bosque de eucalipto. População grande, porém também a quantidade de indivíduos em estágio de florescimento ou frutificação era pequena, nos momentos de coleta.

População 6 – População antropogênica, sendo uma coleção de plantas de genótipos originários de diversas regiões do Rio Grande do Sul de várias populações naturais, plantadas na Estação Experimental Fitotécnica de Viamão, pertencente a FEPAGRO. Está localizada no município de Viamão-RS.

População 7 – População antropogênica de cultivo, localizada no município de Porto Alegre-RS, Lomba do Pinheiro, pertencente a empresa farmacêutica Cibecol.

População 8 – População natural, situada em um capão de mato localizada no município de Gravataí-RS, localidade de Barro Vermelho, na propriedade do Prof. Lair Ferreira (UFRGS). Foi coletada somente em uma planta.

A Figura 3 apresenta um mapa indicando as diferentes localizações das oito populações de coleta de *M. ilicifolia*.

De todas as plantas-mãe que foram coletadas flores e/ou sementes, foram também coletados materiais para herborização. Cada exsicata foi identificada pelo Dr. Altemir Mossi, professor da URI – Campus Erechim-RS, e colocadas no herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UFRGS (Herbário ICN), recebendo um número de ordem/identificação (Tabela 2). Todos os exemplares estão mantidos na coleção, como testemunha do trabalho.

De todas exsicatas identificadas, somente três plantas-mãe não foram classificadas como *M. ilicifolia*. Os números do ICN destas plantas são: 129894 e 129920 para *M. dasyclada*, 129895 para *M. aquifolia* e 129896 para *M. glaucescens*. Todas foram coletadas na população antropogênica (coleção) da Estação Experimental Fitotécnica de Viamão.

Na tentativa de fazer uma nova coleção de *Maytenus*, foram produzidas mudas através de sementes coletadas de todas as plantas-mãe. De quase



POPULAÇÕES

1. Bagé – RS, Corredor dos Colares
2. Bagé – RS, Fundos do Clube Caixeiral
3. Engenho Velho – RS, Linha Felipe
4. Rivera – Uruguai, Parque Grã-Bretanha
5. Bagé – RS, Margens do Rio Negro
6. Viamão – RS, Fepagro
7. Porto Alegre – RS, Lomba do Pinheiro
8. Gravataí – RS, Barro Vermelho

FIGURA 3. Locais de coleta de *M. ilicifolia*.

TABELA 2. Locais de coleta, número dado a cada população, número dado a cada planta-mãe, data de coleta, material coletado e número de registro no herbário (ICN). Porto Alegre, UFRGS, 2002/2003.

Origem	Número da população	Número da planta-mãe	Data de coleta	Material coletado	ICN
Bagé	1	1	03/08/02	Flores	Sem exsicata
		2	03/08/02	Flores	Sem exsicata
		3	03/08/02 – 30/12/02	Flores – Sementes	- 129864
		4	30/12/03	Sementes	129865
		5	30/12/03	Sementes	129866
		6	30/12/03	Sementes	129867
Bagé	2	1	05/08/02 – 20/12/02	Flores – Sementes	- 129868
		2	05/08/02 – 20/12/02	Ramos – Sementes	- 129869
		3	21/09/02 – 20/12/02	Flores – Sementes	129870 -
		4	21/09/02 – 20/12/02	Flores – Sementes	129871 -
		5	21/09/02 – 20/12/02	Flores – Sementes	129872 -
		6	21/09/02 – 20/12/02	Flores – Sementes	- 129873
		7	21/09/02 – 20/12/02	Flores – Sementes	- 129874
		8	20/12/02	Sementes	129875
		9	20/12/02	Sementes	129876
		10	20/12/02	Sementes	129877
		11	20/12/02	Sementes	129878
		12	20/12/02	Sementes	129879
Engenho Velho	3	1	14/08/02	Flores	129880
		2	14/08/02	Flores	Sem exsicata
Rivera	4	1	20/09/02	Flores	129881
		2	20/09/02 – 14/12/02	Flores – Sementes	129882 -
		3	20/09/02	Flores	129883
		4	20/09/02	Flores	129884
		5	14/12/02	Sementes	129885

TABELA 2. Continuação. Locais de coleta, número dado a cada população, número dado a cada planta-mãe, data de coleta, material coletado e número de registro no herbário (ICN). Porto Alegre, UFRGS, 2002/2003.

Origem	Número da população	Número da planta-mãe	Data de coleta	Material coletado	ICN
Bagé	5	1	22/09/02	Flores	129886
		2	22/09/02	Flores	129887
		3	22/09/02	Flores	129888
		4	22/09/02	Flores	129889
		5	19/12/02	Sementes	129890
		6	19/12/02	Sementes	129891
		7	19/12/02	Sementes	129892
Viamão	6	1A1	11/12/02 – 26/08/03	Sementes – Flores	129893 – 129919
		1A3	11/12/02 – 26/08/03	Sementes – Flores	129894 ^a – 129920 ^a
		1A5	11/12/02	Ramos	129895 ^b
		1A6	11/12/02	Sementes	129896 ^c
		1A7	11/12/02 – 26/08/03	Sementes – Flores	129897 – 129921
		2A2	11/12/02	Sementes	129898
		2A5	11/12/02 – 26/08/03	Sementes – Flores	129899 – 129922
		2A6	11/12/02 – 26/08/03	Sementes – Flores	129900 – 129923
		4A1	11/12/02 – 26/08/03	Sementes – Flores	129901 – 129924
		4A2	11/12/02 – 26/08/03	Sementes – Flores	129902 – 129925
		4A5	11/12/02 – 26/08/03	Sementes – Flores	129903 – 129926
		4A6	11/12/02 – 26/08/03	Sementes – Flores	129904 – 129927
		5A1	26/08/03	Flores	129928
		5A2	11/12/02	Sementes	129905
		5A3	26/08/03	Flores	129929
		5A4	11/12/02	Sementes	129906
		5A5	11/12/02 – 26/08/03	Sementes – Flores	129907 – 129930
6A4	11/12/02	Sementes	129908		

TABELA 2. Continuação. Locais de coleta, número dado a cada população, número dado a cada planta-mãe, data de coleta, material coletado e número de registro no herbário (ICN). Porto Alegre, UFRGS, 2002/2003.

Origem	Número da população	Número da planta-mãe	Data de coleta	Material coletado	ICN
Viamão	6	6A5	26/08/03	Flores	129931
		6A6	26/08/03	Flores	129932
		6A7	11/12/02	Sementes	129909
		6A8	11/12/02	Sementes	129910
		7A1	11/12/02 – 26/08/03	Sementes – Flores	129911 – 129933
		7A2	11/12/02 – 26/08/03	Sementes – Flores	129912 – 129934
		7A3	11/12/02 – 02/10/03	Sementes – Flores	129913 – 129935
		7A4	02/10/03	Flores	129936
		8A1	02/10/03	Flores	129937
		8A2	11/12/02 – 02/10/03	Sementes – Flores	129914 – 129938
		8A3	11/12/02 – 02/10/03	Sementes – Flores	129915 – 129939
		8A4	11/12/02	Sementes	129916
		9A1	11/12/02	Sementes	129917
		9A2	11/12/02 – 02/10/03	Sementes – Flores	129918 – 129940
Porto Alegre	7	Várias plantas	10/01/03	Sementes	Sem exsicata
Gravataí	8	1	16/08/02	Flores	Sem exsicata

^a *M. dasyclada*

^b *M. aquifolia*

^c *M. glaucescens*

todas conseguiu-se sucesso e hoje estão sendo mantidas em casa de vegetação até o momento de serem transplantadas a campo (Figura 4).



FIGURA 4. A e B – Mudas provenientes de sementes coletadas de diferentes populações de *M. ilicifolia*.

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta, fixação e estocagem do material

Para análise da meiose, fertilidade do pólen e índice meiótico, foram coletados botões florais em vários estádios de desenvolvimento, dando preferência a dias ensolarados, nas sete populações de *M. ilicifolia*, num total de 42 plantas-mãe (Tabela 1). Os botões florais foram coletados individualmente de cada planta-mãe. Imediatamente após a coleta foram fixados com fixador constituído por nove partes de álcool, três de clorofórmio e uma de ácido acético, sendo o volume do fixador aproximadamente 10 vezes maior do que o material que estava sendo fixado. Botões florais foram mantidos no fixador por mais ou menos 48 horas em temperatura ambiente e após transferidos para álcool 70% e então conservados em freezer até a preparação das lâminas.

Frutos maduros foram coletados a campo em seis populações (Tabela 1), num total de 46 plantas-mãe separadas em cinco populações e uma população com frutos não separados por indivíduo. Os frutos foram secos a temperatura ambiente, os arilos retirados manualmente, separando-se as sementes. Neste processo registrou-se o número médio de sementes por fruto e após, o peso médio de sementes por categoria de frutos (com 1, 2, 3 e 4 sementes), bem como o peso de mil sementes para algumas populações.

Após as sementes serem retiradas dos frutos foram armazenadas em sacos de papel em geladeira a uma temperatura média de 4°C até o momento de serem colocadas para germinar gradualmente para análise de células em

mitose. As germinações ocorreram no período de cerca de um até 11 meses após a coleta das sementes.

3.2.2. Preparo de lâminas de botões florais

Para preparação das lâminas era colocado um botão floral sobre uma lâmina e separadas as anteras. A técnica utilizada foi de coloração seguida de esmagamento, sendo utilizado o corante carmim propiônico e as anteras esmagadas com bastão de vidro. Após eram retirados os fragmentos destas, mantendo-se apenas o corante com os meiócitos, tétrades ou pólen, conforme o estágio de desenvolvimento do botão floral. Uma lamínula era colocada em cima do material e pressionada contra a lâmina utilizando-se de papel filtro para a retirada do excesso de corante. Em seguida eram efetuadas “batidas” com auxílio de um palito de fósforo para permitir um melhor espalhamento das células e, no caso de haver a presença de meiócitos em estágio adequado, era também realizado um esmagamento para espalhar melhor os cromossomos, utilizando-se papel filtro dobrado, pressionando firme e cuidadosamente para não permitir nenhum deslizamento da lamínula sobre a lâmina, conforme técnicas descritas por Guerra & Souza (2002). O último passo para confecção da lâmina era vedar a lamínula com luto (uma mistura de breu com cera de abelha, na proporção 1:1), identificar e guardar na geladeira em caixas especiais para posterior observação em microscópio óptico. Após as análises as lâminas também ficaram guardadas em geladeira.

3.2.3. Análise do comportamento meiótico

Foram realizados estudos sobre o comportamento meiótico em células mãe de pólen em todas as fases de divisão meiótica encontradas. Foi analisado o maior número possível de células para cada indivíduo, dando especial atenção para células em diacinese, metáfase I e separação nas anáfases.

As análises foram realizadas em microscópio óptico, sendo documentadas as fases da divisão através de fotomicrografia, sistema de captura digital de imagens (programa SDI – Sistema Digital de Imagens) e desenhos esquemáticos.

3.2.4. Estimativa do índice meiótico

O índice meiótico, proposto por Love (1949), é uma complementação à análise meiótica e representa a porcentagem de quartetos de micrósporos normais, sendo indicativo da regularidade meiótica.

O índice meiótico foi calculado dividindo-se o número de tétrades normais, isto é, com quatro micrósporos, de igual tamanho, pelo número total de tétrades observadas, multiplicado por 100. Para cada indivíduo foram analisadas no mínimo duas flores (duas lâminas), contando-se 250 tétrades para cada, totalizando contagem no mínimo de 500 tétrades por indivíduo.

3.2.5. Estimativa da viabilidade dos grãos de pólen

A técnica utilizada para se fazer uma estimativa da viabilidade do pólen foi a de coloração com corante carmim propiônico. Foram considerados viáveis

os grãos que se apresentavam corados e íntegros, os que não estavam íntegros não foram contados e os que não adquiriam coloração eram considerados inviáveis. Somente eram analisadas lâminas com grãos de pólen maduros, isto é, com exina bem diferenciada, mostrando uma coloração característica específica.

Para cada indivíduo foram analisadas no mínimo duas flores (duas lâminas), contando-se 250 grãos de pólen para cada, totalizando contagem de no mínimo 500 grãos por planta.

Foi estimada a viabilidade dos grãos de pólen dividindo-se o número de grãos corados pelo total de grãos observados e multiplicando-se por 100, obtendo-se assim o percentual de grãos de pólen viáveis.

3.2.6. Análise da mitose

Para análise da mitose, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri sobre papel filtro, umedecido com água destilada em temperatura ambiente quando esta era alta, ou em BOD com temperaturas que variavam entre 20-25°C. Assim que as sementes germinavam eram coletados e testados vários tamanhos de raízes "ideais". Os melhores resultados obtidos foram com raízes de 1,5 cm de comprimento com a ponta afinada, sendo o padrão utilizado para o restante do trabalho.

As raízes coletadas foram pré-tratadas com o anti-mitótico paradiclorobenzeno (PDB), durante 18-20 horas a 4°C e após fixadas em fixador constituído por três partes de álcool e uma de ácido acético, durante 12-

24 horas, sendo estocadas posteriormente em álcool 70% no freezer até a confecção das lâminas.

Para a tratamento das raízes, foi testado primeiramente hidrolisá-las em solução de HCl 1N em 60°C durante diferentes tempos (5, 10, 15 e 20 minutos). Observou-se que as células apresentavam-se “cozidas” mas com membranas intactas, o que é ruim para a análise, pois não permite um bom espalhamento dos cromossomos. Então foi testado a hidrólise com HCl 5N em temperatura ambiente, com diferentes tempos (5, 10, 15 e 20 minutos) e hidrólise com solução de enzimas pectinase 2 e 5% e celulase 2 e 5%, em diferentes tempos, sem resultados satisfatórios. Finalmente testou-se hidrólise com solução HCl 1N em temperatura mais baixa, 50°C, em diferentes tempos (5, 10, 15 e 20 minutos). Os melhores resultados obtidos foram através desta técnica, utilizando o tempo de 5 minutos. Esta foi considerada como sendo a técnica “ideal” para hidrólise das raízes nesta espécie.

Para coloração primeiramente foi testado a técnica de coloração de Feulgen. Os resultados obtidos não foram satisfatórios, pois apesar da ponta da raiz mostrar-se mais intensamente corada após cerca de 2 horas, as células não apresentavam-se coradas depois do preparo da lâmina, a não ser quando eram esmagadas em carmim propiônico. Então começou-se utilizar somente o corante carmim propiônico na hora da montagem da lâmina.

Na montagem das lâminas, a ponta da raiz era retirada e esmagada juntamente com uma gota de carmim propiônico, com auxílio de um bastão de vidro. Uma lamínula era colocada em cima do material e pressionada contra a lâmina utilizando-se de papel filtro para a retirada do excesso de corante. Todo

o resto da técnica, esmagamento e espalhamento dos cromossomos, foi igual à descrita para a confecção de lâminas de meiose, assim como a vedação das lamínulas sobre as lâminas, que após eram guardadas em geladeira em caixas especiais.

As observações eram feitas em microscópio óptico, analisando-se o maior número possível de células em metáfase por planta, considerando que a dificuldade de encontrar células em divisão mitótica, bem como de encontrá-las com bom espalhamento dos cromossomos, era grande.

Com base nestas análises foi determinado o número cromossômico aproximado e o tamanho destes. Os resultados foram registrados através de fotomicrografia, captação digital de imagens e desenhos esquemáticos.

3.2.7. Análise das sementes

As características físicas das sementes foram analisadas em quatro populações, sendo três populações naturais de Bagé (P1, P2 e P5) e uma antropogênica de Viamão (P6) (Tabela 1).

No processo da retirada das sementes dos frutos, foi registrado o número médio de sementes produzidas por fruto, anotando-se a cada retirada de sementes, a quantidade que cada fruto produzia em cada planta. Também registrou-se o peso médio de sementes por categoria de frutos (com 1, 2, 3 e 4 sementes) em cada planta, bem como o peso de mil sementes para algumas populações.

Para as três populações de Bagé (P1, P2 e P5) foram estudados um total de 1239 frutos. Foram analisadas as seguintes variáveis: peso médio das

sementes por categoria de frutos dentro da mesma população; peso médio das sementes por categorias entre as diferentes populações; peso médio das sementes de uma população relacionado com as demais.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System).

O peso de mil sementes (PMS) para população 1 e 2, foi determinado segundo a metodologia descrita pelas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 1993). Para população 5 foi utilizada uma metodologia adaptada devido à menor quantidade de material: pesou-se 8 subamostras de 10 sementes, calculou-se o coeficiente de variação e multiplicou-se por 10 o peso médio obtido das subamostras; este valor ainda foi multiplicado por 10, obtendo-se o PMS.

Para a população antropogênica de Viamão (P6) foram estudados um total de 4266 frutos de 23 plantas, sendo analisadas as seguintes variáveis: peso médio de sementes por categorias de frutos entre as diferentes árvores e peso médio de sementes entre as diferentes árvores.

Os dados também foram submetidos à análise de variância, as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, e feita análise de regressão, utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudos citogenéticos

Estes são os primeiros estudos citogenéticos realizados em *Maytenus ilicifolia*. Para o comportamento meiótico além de serem as primeiras observações para a espécie, também são as primeiras para todo o gênero.

4.1.1. Comportamento meiótico

O estudo do comportamento meiótico em *M. ilicifolia* foi dificultado pelo pequeno tamanho e grande quantidade de cromossomos, além de sempre apresentarem-se com algumas sobreposições. Verificava-se muitas vezes a presença de impurezas no citoplasma, o que confundia e prejudicava muito a visualização dos cromossomos.

Sebsebe (1985) relatou em seu trabalho sobre estudos citológicos de seis espécies do gênero *Maytenus* nativas da Etiópia, que a contagem do número cromossômico foi dificultada pela ocorrência de cromossomos pequenos, aderentes e pegajosos. Estas características foram semelhantes as encontradas neste trabalho em *M. ilicifolia*, sugerindo-se ser um padrão comum do gênero.

Possivelmente, a grande lacuna existente sobre dados citogenéticos deste gênero, restringidos apenas a contagens cromossômicas de poucas

espécies, é devido ao quadro de dificuldades listados anteriormente, tornando estes estudos um pouco desencorajadores.

Outro fato que dificultou muito o desenvolvimento de análises do comportamento meiótico, foi a extrema dificuldade de encontrar meiócitos, devido a variação existente, no que se refere ao tamanho ideal de botão floral, prejudicando a continuidade do trabalho ou pelos botões florais coletados já apresentarem, na maioria das vezes, fases mais adiantadas da meiose.

Um outro problema que dificultou a obtenção de dados, foi a alta frequência de indivíduos que não apresentavam flores funcionalmente masculinas, conforme já descrito para a espécie.

Das 42 plantas que foram coletados botões florais, 17 delas não apresentavam botões florais com anteras funcionais, impossibilitando a realização das análises, visto que o objetivo do trabalho foi analisar o comportamento meiótico masculino. Em vista disso, diminuiu, já num primeiro momento, 40% de plantas potencialmente analisáveis. Sugere-se que para futuros trabalhos seja dada mais atenção durante a coleta, com relação a este aspecto, tentando identificar já a campo plantas que realmente apresentem flores funcionalmente masculinas, com anteras amarelas, ou, ainda, coletar flores de maior número de plantas, sempre que possível, para tentar minimizar este problema.

Das 25 plantas coletadas que apresentavam botões florais com anteras funcionais, originárias de sete populações diferentes, foram utilizados botões de 16 plantas de seis populações, com a finalidade de analisar o comportamento meiótico.

Das 16 plantas analisadas, conseguiu-se obtenção de meiócitos em nove plantas, de quatro populações (populações 1, 2, 3 e 8), sendo que para apenas seis plantas encontrou-se células passíveis de serem analisadas, com boa precisão, para observar o comportamento meiótico, bem como contar o número cromossômico. Cabe salientar ainda que foram encontradas poucas células em fases e com espalhamento adequado para a realização das análises.

A Tabela 3 mostra dados sobre o comportamento meiótico.

Todas as fases de meiose encontradas foram registradas como forma de melhor documentar toda a divisão meiótica.

Para população 1 foram analisados meiócitos originados de três plantas-mãe. A partir destes conseguiu-se observar em alguns que o comportamento meiótico é aparentemente regular, com formação de bivalentes, e disjunção normal nas anáfases. A quantidade de cromossomos, foi difícil de ser estabelecida com certeza, parecendo haver em torno de 40 ou um pouco mais de 40 bivalentes, ou seja em torno de 80 cromossomos (Figura 5).

Nas análises realizadas para a população 2, em apenas uma planta-mãe conseguiu-se meiócitos analisáveis, mostrando um comportamento meiótico regular, formando exclusivamente bivalentes, cerca de 32, sendo portanto possível também determinar o número cromossômico, cerca de 64. A disjunção nas anáfases mostrou ser normal (Figura 6).

Embora apenas 11 meiócitos analisáveis tenham sido encontrados na população 3, a meiose mostrou-se regular, com aparente formação exclusiva de bivalentes. Assim como na população 2, o número provável de bivalentes

TABELA 3. Análise do comportamento meiótico em diferentes populações de *Maytenus ilicifolia*. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

Origem	Bagé/Corredor dos Colares	Bagé/Clube Caixeiral	Engenho Velho	Gravataí
N° da população	1	2	3	8
N° de plantas-mãe	3	6	2	1
N° de plantas-mãe s/ anteras funcionais	0	2	0	0
N° de plantas-mãe c/ meiócitos	3	3	2	1
N° de plantas-mãe c/ meiócitos analisáveis	3	1	1	1
<hr/>				
N° total de células examinadas	27	41	15	88
N° total de células analisadas	14	33	11	72
Meiose				
Associações ¹	ca. 40 ou mais II (11)	32 II (12)	32 II (11)	35 II (47)
Diacinese e Metáfase I				
Disjunção ²	(3) N	(4) N	-	(20) N
Anáfases				
Outras	-	(17)	-	(5)
Número de cromossomos	ca. 80 ou mais	ca. 64	ca. 64	ca. 70

¹ Associação cromossômica em diacinese e metáfase I: bivalentes II

² N = aparente disjunção normal

() número de células; ca. = cerca de

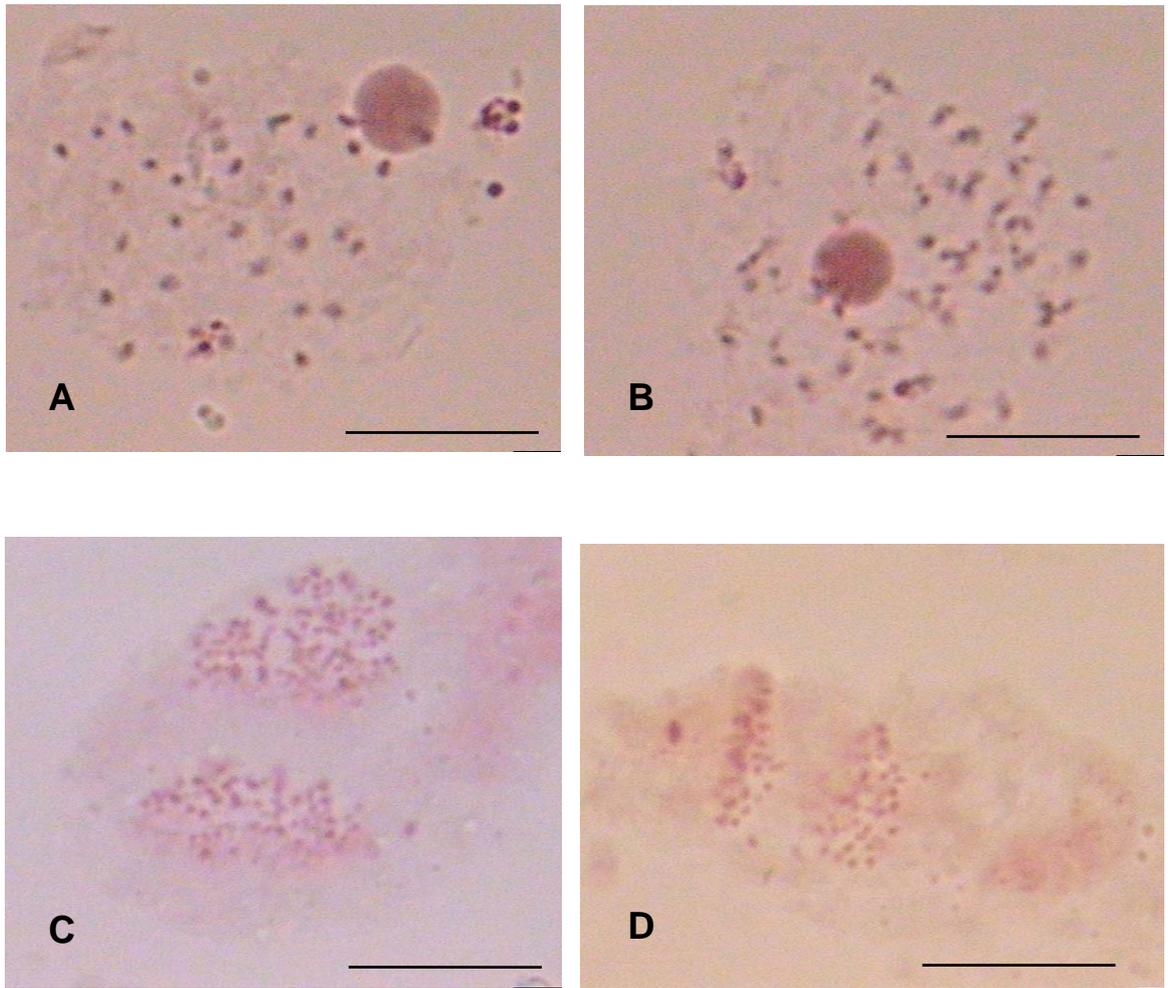


FIGURA 5. Comportamento meiótico na população 1 de *M. ilicifolia*. A e B – Diacineses com pareamento regular, em torno de 40 ou pouco mais de 40 bivalentes. C e D – Anáfases aparentemente com disjunção normal. Escala 10 μ m.

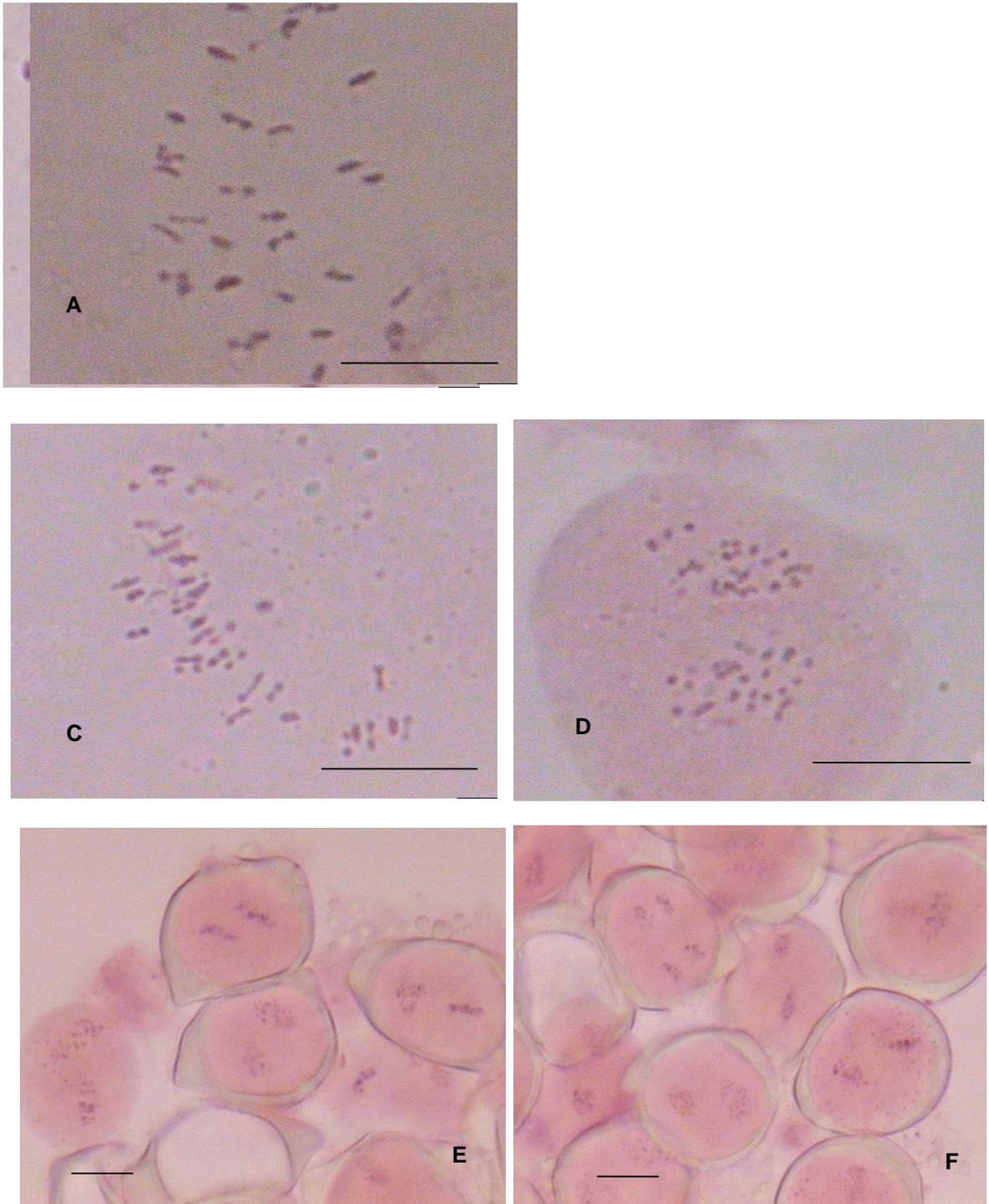


FIGURA 6. Comportamento meiótico na população 2 de *M. ilicifolia*. A – Metáfase com vista polar; B e C – Metáfases; A, B e C – mostrando pareamento regular, com cerca de 32 bivalentes; D, E e F – Anáfases aparentemente com disjunção normal. Escala 10 μ m.

era 32, e, conseqüentemente, número cromossômico de 64 (Figura 7).

A população na qual encontrou-se o maior número de meiócitos analisáveis foi a 8, sendo observado um comportamento meiótico altamente regular com formação exclusiva de cerca de 35 bivalentes e a disjunção regular nas anáfases. Portanto, o número cromossômico desta população é de cerca de 70 cromossomos (Figuras 8 e 9).

Ressalvando-se o exposto anteriormente, quanto à observação do comportamento meiótico, em todas populações analisadas o comportamento meiótico aparentemente mostrou-se regular, com formação essencialmente de bivalentes e disjunção normal nas anáfases.

4.1.2. Estimativa do índice meiótico

Para a estimativa do índice meiótico foram examinados botões florais de 42 plantas, de sete populações. Conforme já descrito anteriormente, 17 delas não apresentavam botões florais com anteras funcionais, impossibilitando as análises.

Para 25 plantas com botões florais com anteras funcionais, em 17 conseguiu-se determinar o índice meiótico, pois nas demais plantas só haviam flores em estágio de desenvolvimento mais adiantado.

Na tabela 4 são apresentados os resultados obtidos para o estudo das tétrades.

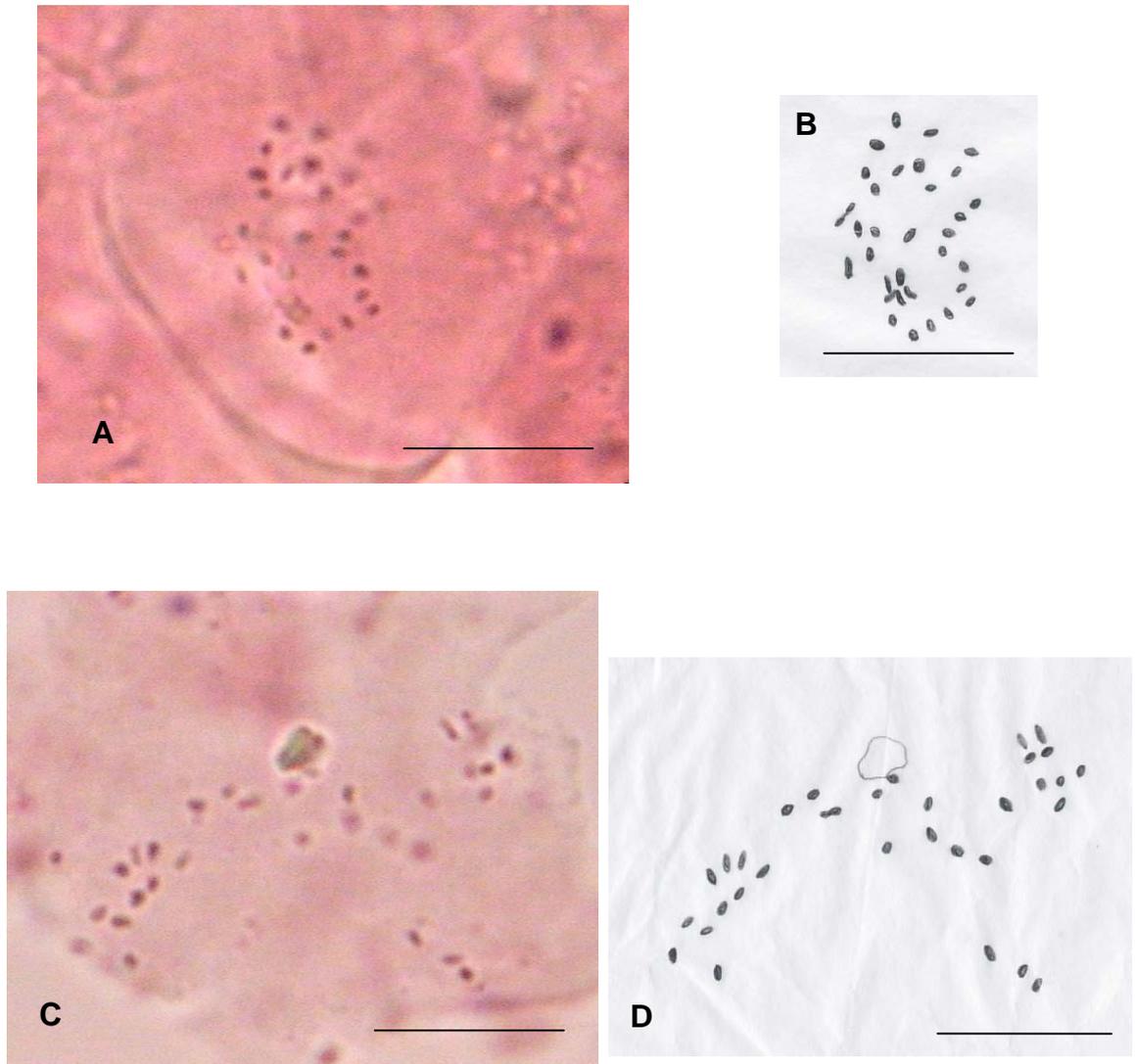


FIGURA 7. Comportamento meiótico na população 3 de *M. ilicifolia*. A e C – Metáfases com pareamento regular, com cerca de 32 bivalentes; B – Desenho esquemático da célula em metáfase (A); e D – Desenho esquemático da célula em metáfase (C). Escala 10 μ m.

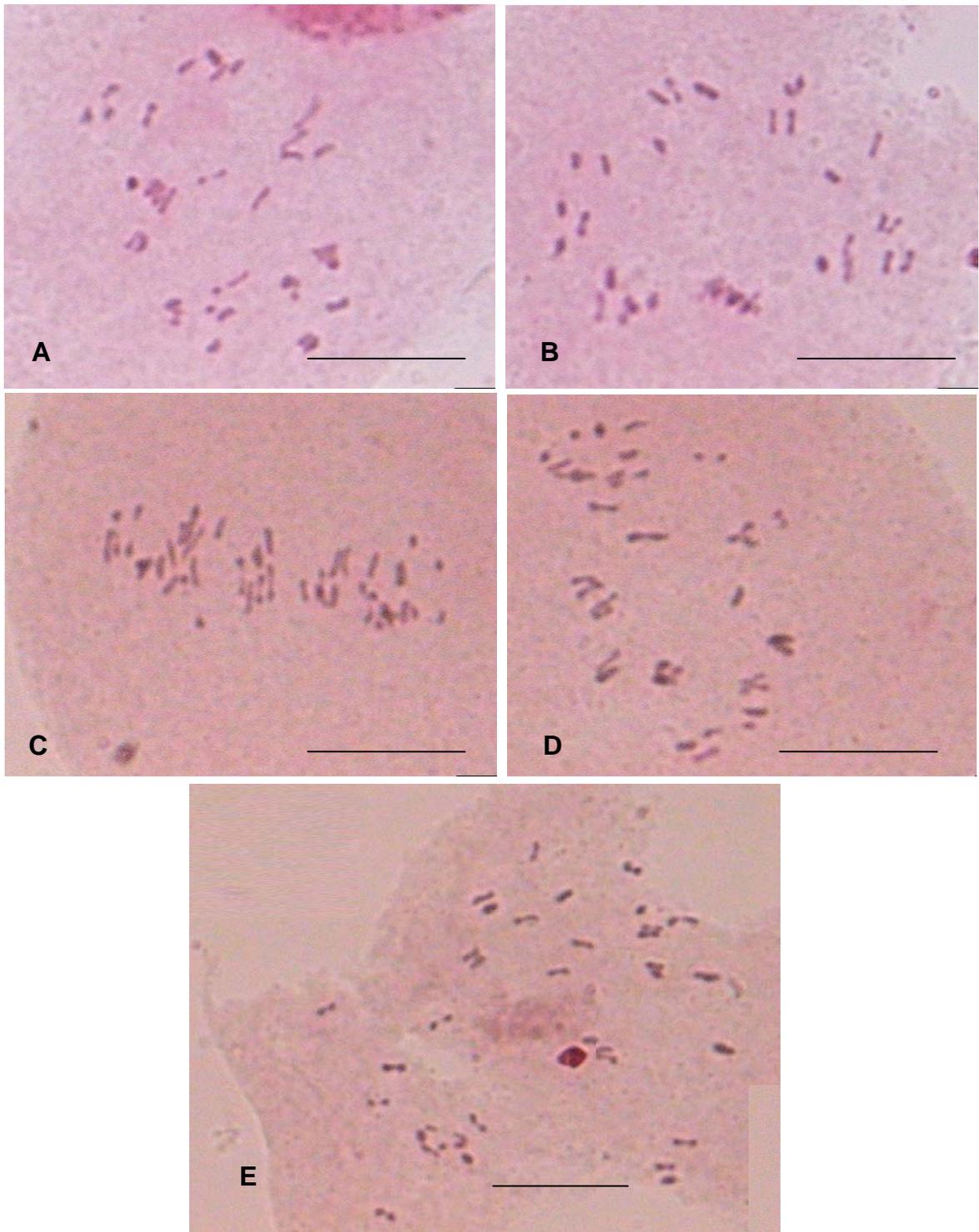


FIGURA 8. Comportamento meiótico na população 8 de *M. ilicifolia*. A, B, C, D – Metáfases; E – Diacinese; Todas células mostrando pareamento regular, com cerca de 35 bivalentes. Escala 10µm.

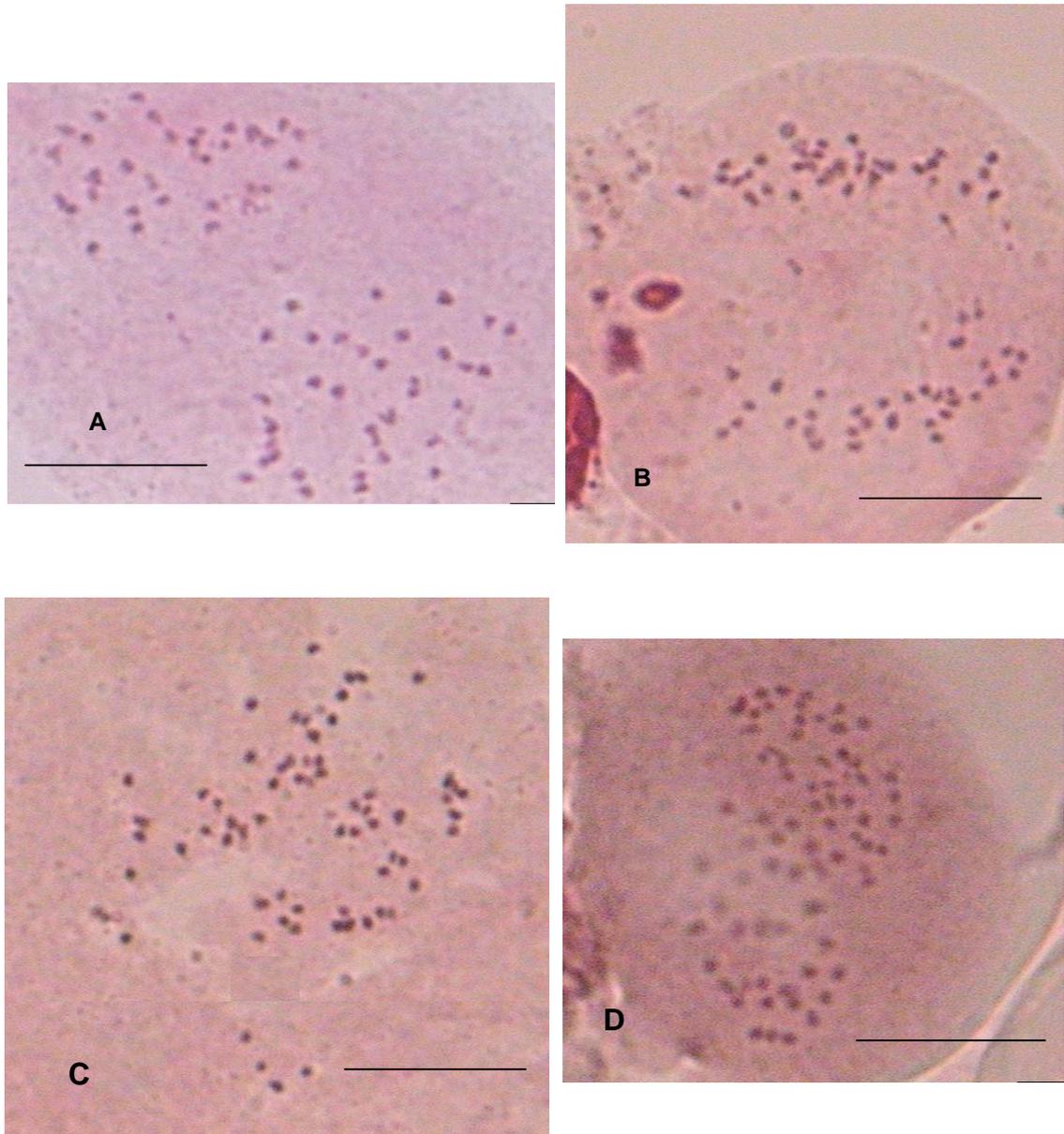


FIGURA 9. Comportamento meiótico na população 8 de *M. ilicifolia*. A, B, C, D – Anáfases. Todas células mostrando aparentemente disjunção normal. Escala 10 μ m.

TABELA 4. Estimativa do índice meiótico em plantas de diferentes populações de *Maytenus ilicifolia*. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

População	Planta	Percentual díades (%)	Percentual tríades (%)	Percentual políades (%)	Percentual tétrades normais (%) Índice Meiótico
1	2	0,19	1,16	-	98,65
	3	0,17	4,05	-	95,78
2	1	-	1,46	0,49	98,05
	3	-	0,90	-	99,10
	4	-	-	-	100
	6	-	-	-	100
5	1	-	-	-	100
	3	-	0,17	-	99,83
	4	-	0,75	-	99,25
6	2A5	-	1,84	0,13	98,03
	5A1	-	1,63	0,18	98,19
	6A5	-	0,95	0,57	98,48
	6A6	-	1,21	0,17	98,62
	7A1	-	1,02	-	98,98
	7A2	0,13	2,97	0,13	96,77
	8A1	-	2,79	0,56	96,65
8	1	0,38	0,95	0,74	97,93

A análise de tétrades, ou quartetos jovens de pólen, é uma técnica citológica rápida que permite registrar o número de quartetos normais e dos que apresentam micronúcleos. Os micronúcleos geralmente são formados pelos cromossomos que não se conjugaram durante a primeira divisão meiótica. Essa percentagem de quartetos normais é denominada índice meiótico, visto que é considerado um reflexo da normalidade de comportamento cromossômico durante a meiose (Love, 1949).

Nas análises realizadas no presente trabalho foram considerados anormais a formação de díades, tríades ou políades, ao invés de tétrades. Micronúcleos, comuns em muitas plantas, não foram observados.

Todas as plantas estudadas apresentaram índice meiótico acima de 95%, entre 95,78 a 100%, contendo tétrades com quatro micrósporos normais (Figura 10). Em algumas plantas foram observadas a presença de díades e políades em frequências muito baixas, variando entre 0,13 e 0,38% e 0,13 e 0,74%, respectivamente. Na maioria das plantas foi verificada ocorrência de tríades, também em frequências baixas, entre 0,17 a 4,05% (Figura 10).

Love (1949) afirma que plantas com índice meiótico acima de 90% podem ser consideradas citologicamente estáveis, sendo portanto passíveis de fazerem parte de um possível programa de melhoramento.

Os resultados de índice meiótico confirmam a regularidade do comportamento meiótico observado, como relatado em 4.1.1.

4.1.3. Estimativa da viabilidade dos grãos de pólen

Estudos sobre a viabilidade do pólen são realizados na maioria dos trabalhos envolvendo comportamento meiótico, por constituir-se um indicativo da fertilidade masculina do indivíduo e das populações, e por ser uma análise rápida de ser executada.

Existem várias técnicas que podem ser utilizadas para a realização de estudos sobre a viabilidade do pólen, tais como, coloração utilizando diversos tipos de corantes, inclusive fluorescentes, análise de germinação do grão de pólen em meio de cultura ou no estilete, e produção de sementes, após polinizações controladas. A técnica de coloração com carmim é uma das mais comumente utilizadas por ser rápida, eficiente, de baixo custo e de boa precisão relativa (Heslop-Harrison, 1992).

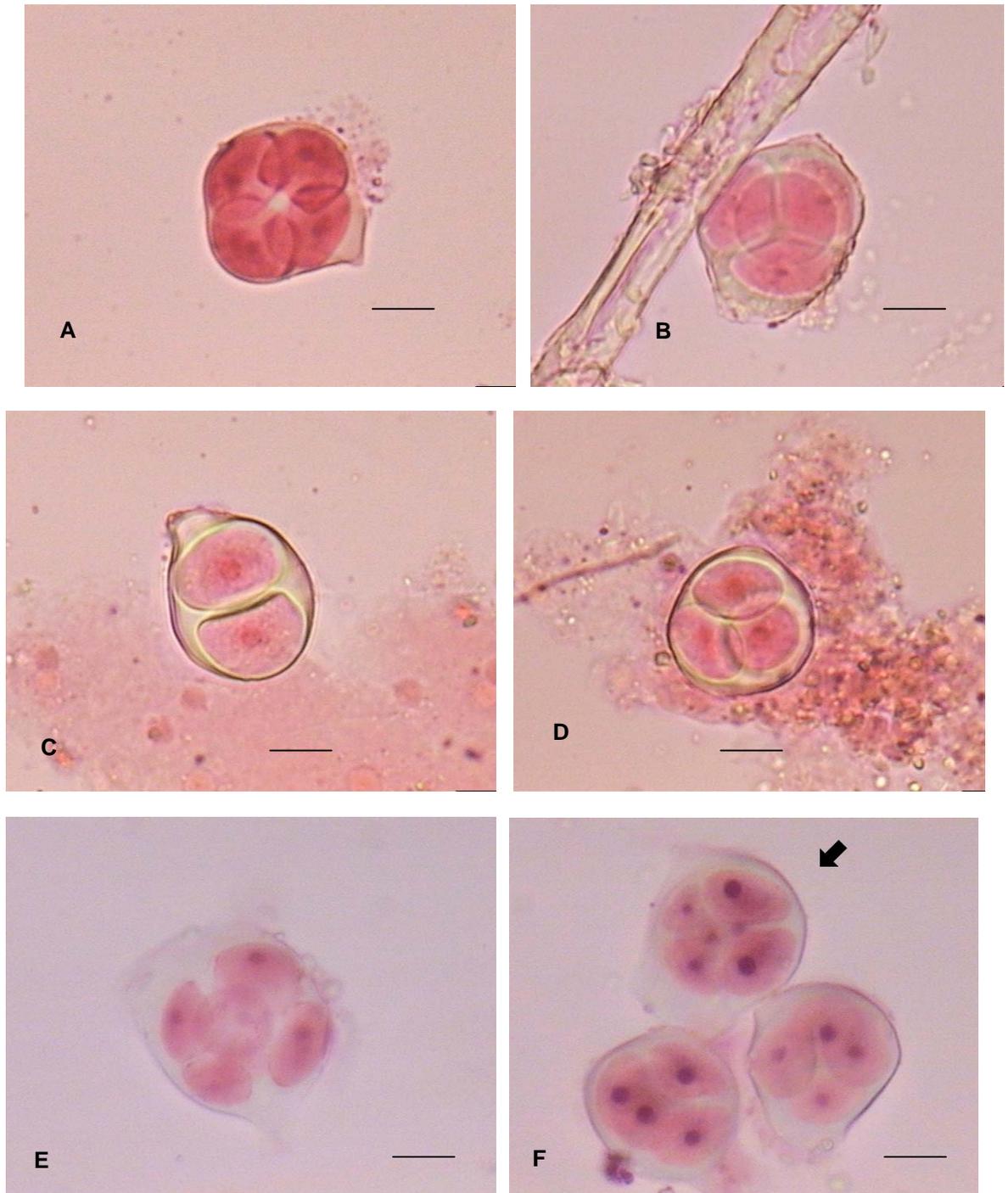


FIGURA 10. Quartetos jovens de pólen de *M. ilicifolia*. A e B – Tétrades normais; C – Díade; D – Tríade; E e F – Políades (5 micrósporos em E e 6 micrósporos em F – seta). Escala 10 μ m.

Para examinar a viabilidade do pólen foram analisadas botões florais de 25 plantas. Destas, somente em 20 foram encontrados grãos de pólen, já que nas outras as flores estavam em estádios mais jovens de desenvolvimento.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados obtidos para a estimativa da viabilidade do pólen.

TABELA 5. Estimativa da viabilidade do pólen em plantas de diferentes populações de *Maytenus ilicifolia*. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

População	Planta	Grãos de pólen viáveis %	Grãos de pólen inviáveis %
1	2	94,07	5,93
	3	97,15	2,85
2	3	90,09	9,01
	6	95,63	4,37
4	1	91,47	8,83
	2	95,95	4,05
5	1	93,09	6,91
	2	99,42	0,58
	3	97,53	2,47
	4	80,91	19,09
6	2 ^A 5	94,13	5,87
	5 ^A 1	82,62	17,38
	6 ^A 5	98,74	1,26
	6 ^A 6	98,40	1,60
	7 ^A 1	98,93	1,07
	7 ^A 2	97,33	2,67
	7 ^A 4	95,98	4,02
	8 ^A 1	98,38	1,62
	9 ^A 2	94,89	5,11
8	1	81,09	18,91

Os resultados da estimativa da viabilidade do pólen foram obtidos da seguinte forma: os grãos foram classificados como viáveis quando estavam corados completamente e quando não coravam, isto é encontravam-se vazios, eram considerados inviáveis (Figura 11).

Para 17 das 20 plantas analisadas, a viabilidade do pólen foi alta, acima de 90%, variando entre 90,09 a 99,42%. Na planta 4 da população 5, na planta

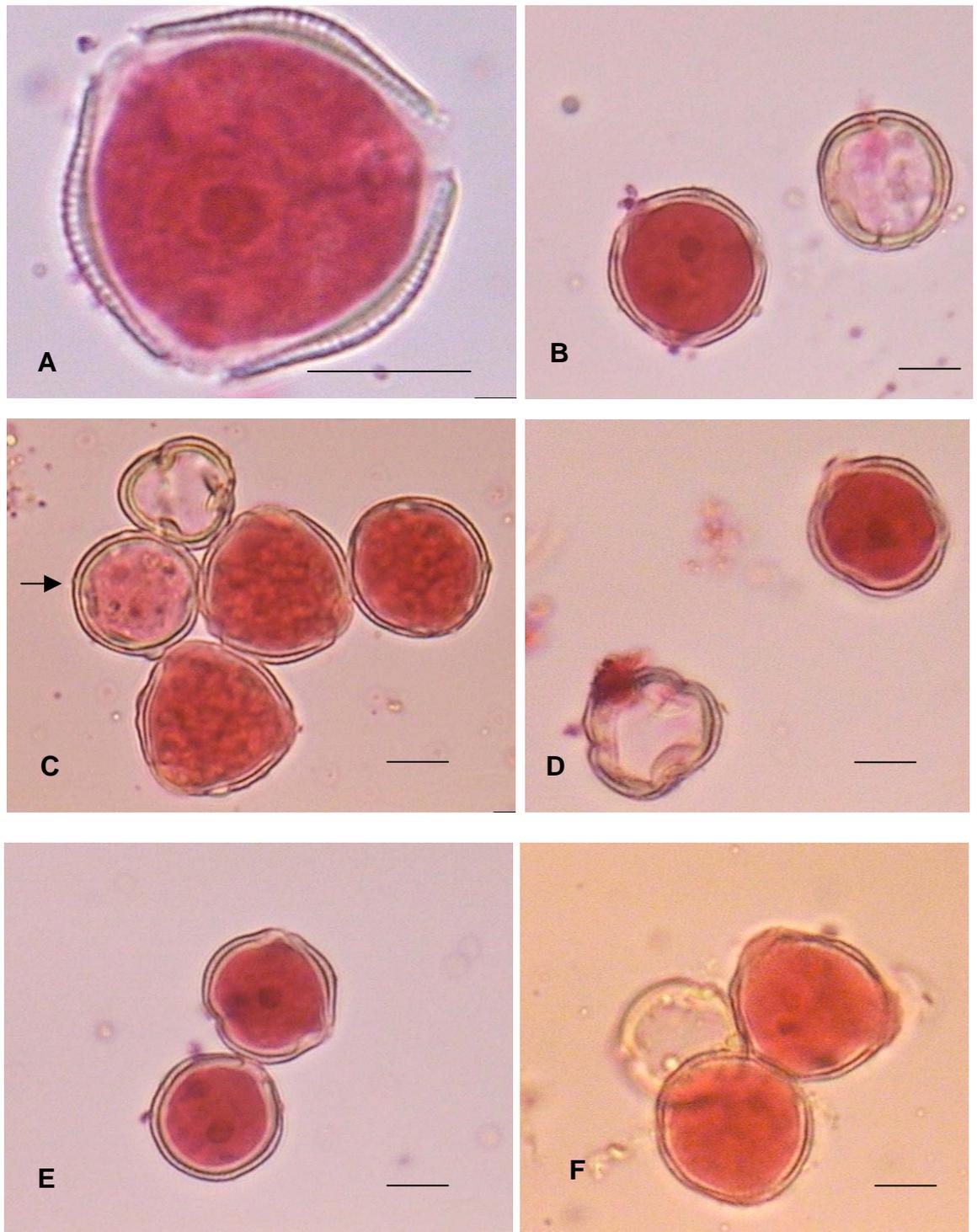


FIGURA 11. Grãos de pólen de *M. ilicifolia*. A e E – Grãos de pólen viáveis; B, C, D e F – Grãos de pólen viáveis (completamente corados) e inviáveis (não corados). Grão de pólen parcialmente corado também considerado inviável (seta em C). Escala 10 μ m.

5A1 da população 6 e na planta 1 da população 8, o percentual da viabilidade do pólen foi um pouco mais baixo, mas ainda relativamente elevado, sendo de 80,91, 82,62 e 81,09%, respectivamente.

Com relação às estimativas do índice meiótico, nestas mesmas plantas, não verificou-se nenhuma diferença das demais, apresentando-se estes superiores a 95% (Tabela 4), portanto os fatores responsáveis por essa menor viabilidade são provavelmente outros que não aqueles diretamente ligados com a regularidade meiótica.

Estes são os primeiros dados gerados sobre estimativa da viabilidade do pólen, bem como índice meiótico de plantas de diferentes populações de *M. ilicifolia*.

4.1.4. Análise de cromossomos somáticos.

A análise dos números de cromossomos somáticos em células de ponta de raiz em *Maytenus ilicifolia*, foi, assim como relatado para análise da meiose, bastante difícil.

Além do pequeno tamanho, alto número de cromossomos e dificuldade de bom espalhamento, outros fatores dificultaram os estudos em células em mitose, como descritos a seguir:

As sementes de *Maytenus ilicifolia*, que, após germinadas, dariam origem ao material a ser analisado, perdiam rapidamente sua viabilidade e poder germinativo, mesmo mantendo-as em condições refrigeradas, concordando com estudos realizados sobre a viabilidade das sementes desta espécie (Sheffer et al., 1994; Rosa, 1998 e Rosa & Barros, 1999).

Ao entrarem em contato com a umidade, quando colocadas sobre papel filtro umedecido, mesmo que antecipadamente passassem por um processo de desinfestação através banhos em hipoclorito de sódio, as sementes sofriam fortes ataques de fungos, o que segundo Guerra & Souza (2002) pode levar a diminuição da taxa mitótica, ou muitas vezes a semente apodrecia antes mesmo de germinar (Figura 12 A). Quando as sementes germinavam, além do crescimento ser lento, a ponta da raiz, ao encostar no papel filtro, ficava “queimada” (Figura 12 B), tornando-se imprópria para análise citogenética. Um método que mais tarde foi testado e utilizado com mais sucesso, foi de transferir as sementes com radículas recém emergidas, para uma placa de petri com terra fofa, o que melhor preservava as pontas das raízes.

Outra dificuldade, como relatado em material e métodos, foi o ajuste da técnica citológica. O melhor horário para coleta da raiz, precisou ser descoberto, já que, algumas plantas apresentam ritmos bem controlados, inclusive para picos de taxa mitótica. Por exemplo, Sampaio (1979) estudando o gênero *Briza* verificou três picos bem distintos na periodicidade das divisões no meristema do coleóptilo, às 12:30, 18:30 e 0:30 horas. Para as últimas análises, já sabia-se, que as coletas de raízes feitas por volta do meio dia, obtinham-se melhores resultados.

Todos estes aspectos contribuíram para diminuir a eficiência das análises.

A Tabela 6 mostra dados sobre cromossomos mitóticos de plantas de diferentes populações de *M. ilicifolia*.



FIGURA 12. A – Sementes de *M. ilicifolia* com ataque fúngico na placa de petri.
B – Radícula com ponta “queimada” (seta).

TABELA 6. Análise de cromossomos somáticos em plantas de diferentes populações de *M. ilicifolia*. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

Pop	Planta	N° de células examinadas	N° de células analisadas	N° de cromossomos	N° de cromossomos mais comum
1	5	4	-	-	-
2	2	20	2	ca. + de 50	ca. 56 e ≥ 60
			1	ca. 52	
			1	ca. 54	
			6	ca. 56	
			2	ca. 57	
			2	ca. 60	
			1	ca. 64	
2	5	9	-	-	-
2	9	24	1	ca. + de 60	ca. 64 e 66
			1	ca. 62	
			2	ca. 64	
5	5	15	2	ca. 56	ca. 64
			1	ca. + de 60	
			1	ca. 62	
6	Exp. Esp.	3	-	-	-
			-	-	
6	Mudas	8	1	ca. 65	ca. 68
			2	ca. 68	
6	1A1	5	-	-	-
6	1A3	1	-	-	-
6	2A2	5	-	-	-
6	2A5	6	-	-	-
6	2A6	14	1	ca. 60	ca. 64 e 66
			4	ca. + de 60	
			1	ca. 62	
			2	ca. 64	
			1	ca. 65	
6	4A1	1	2	ca. 66	-
			1	ca. 60	
6	4A5	20	1	ca. 60	ca. 64
			2	ca. 62	
			3	ca. 64	
			2	ca. 72	

TABELA 6. Continuação. Análise de cromossomos somáticos em plantas de diferentes populações de *M. ilicifolia*. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

6	4A6	9	1	ca. + de 60	ca. 68
			1	ca. 62	
			1	ca. 64	
			2	ca. 68	
6	5A2	13	2	ca. + de 51	ca. 62
			4	ca. 62	
6	5A4	27	1	ca. + de 56	> 60
			1	ca. 58	
			1	ca. + de 60	
			1	ca. + de 62	
			1	ca. + de 65	
6	5A5	8	1	ca. 70	ca. + de 58
			1	ca. 46	
			3	ca. 42	
6	8A2	1	-	-	-

Apesar do número de cromossomos mais comum encontrado para a planta 2 da população 2 seja aparentemente cerca de 56, duas células apresentavam um melhor espalhamento com cerca 60 e 64 cromossomos (Figura 13).

Já na planta 9 da população 2, a quantidade e a qualidade das células examinadas foi maior, apresentando a quantidade de cromossomos mais comum, mais homogênea, mostrando cerca de 64 e 66 cromossomos (Figura 14 – A, B e C).

Partindo do princípio que é mais provável que a variação encontrada não seja real devido a observação de grande variação aparente existente dentro de plantas da população 2, principalmente na planta 2, e considerando os resultados obtidos na mesma população na análise da meiose, presume-se que o número de cromossomos para a população 2 em geral seja entre cerca de 60 a 66, mais provavelmente 64.

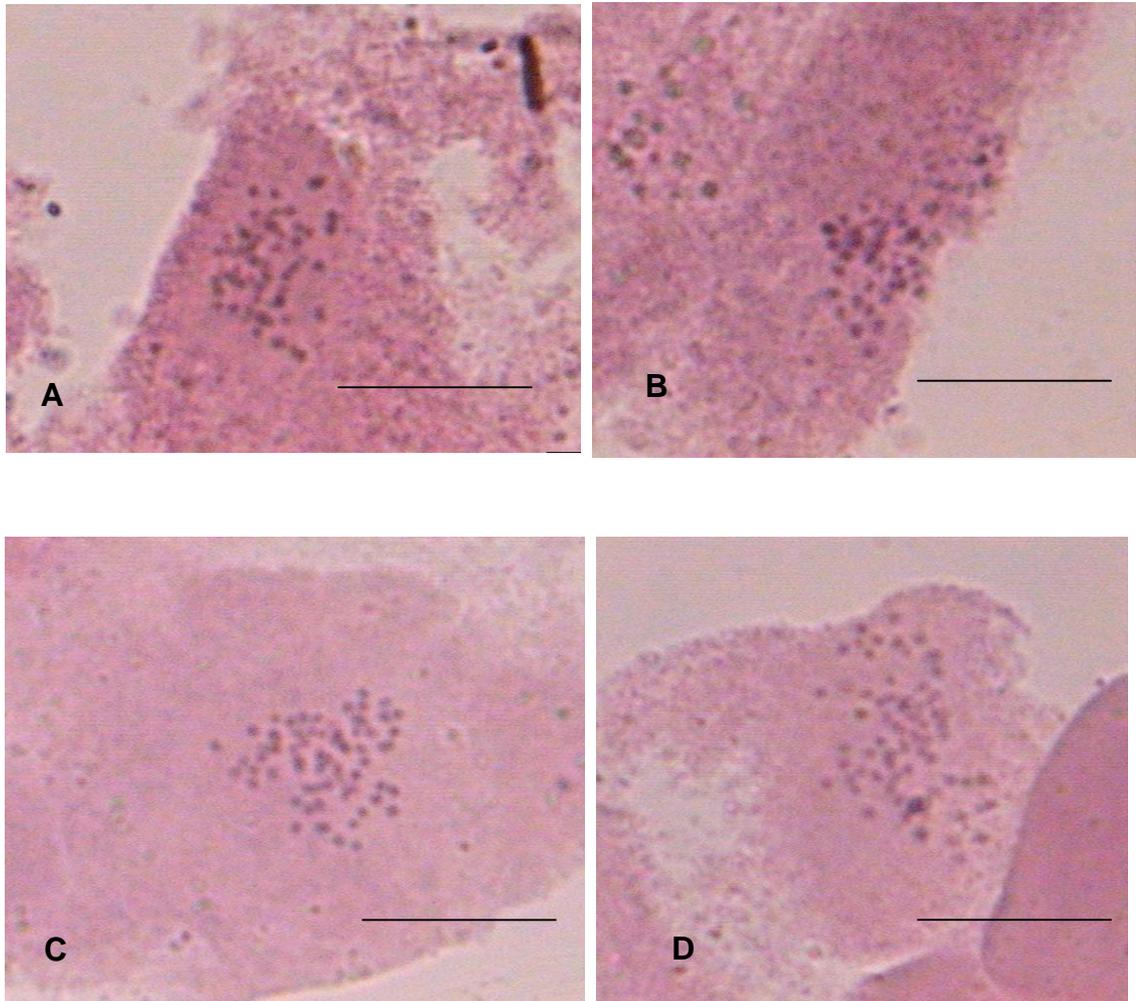


FIGURA 13. Cromossomos somáticos da população 2 planta 2 de *M. ilicifolia*.
A e B – $2n$ =ca. 56; C – $2n$ =ca. 60; D – $2n$ =ca. 64. Escala 10 μ m.

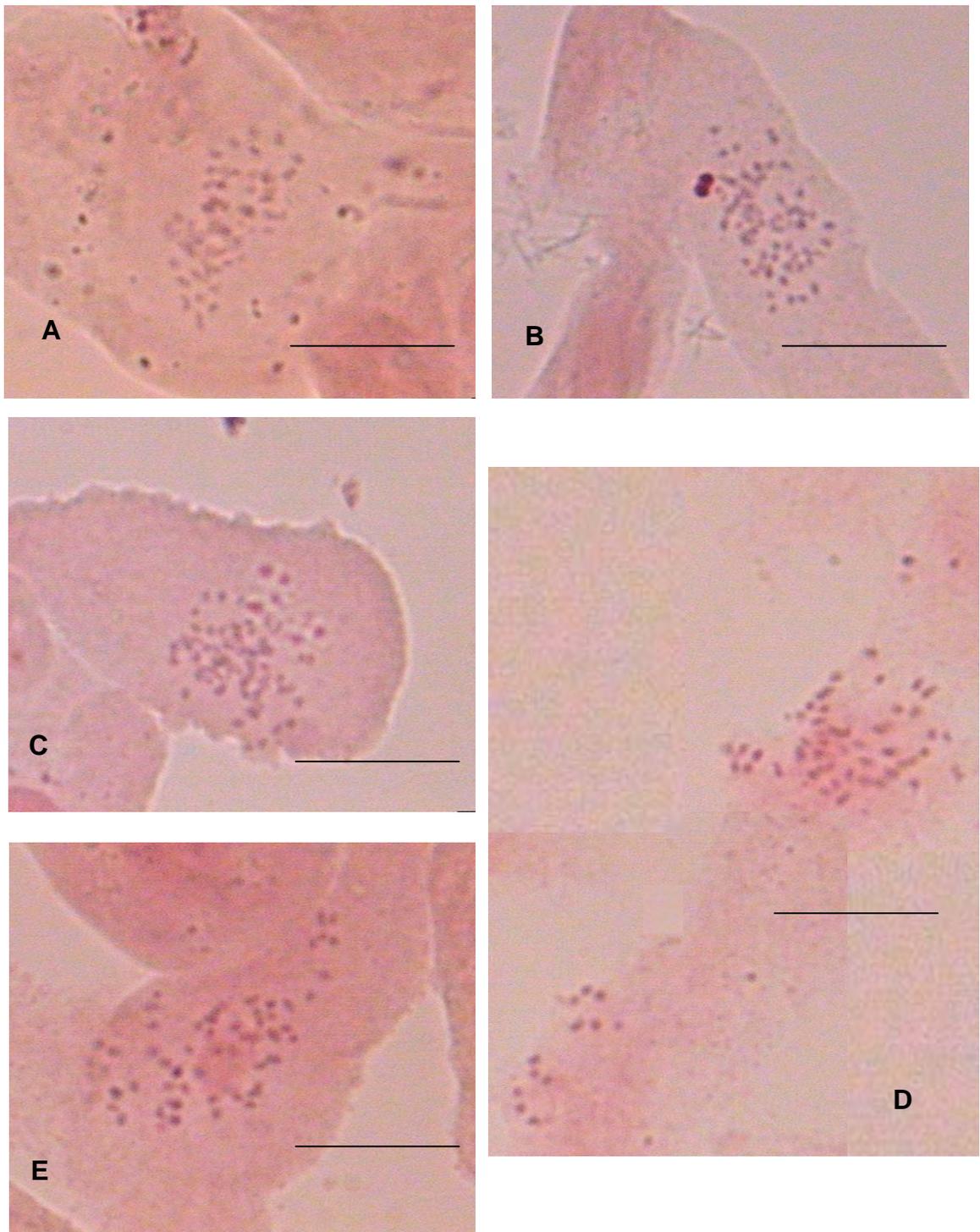


FIGURA 14. Cromossomos somáticos de *M. ilicifolia*. População 2 planta 9: A – $2n$ =ca. 64; B – $2n$ =ca. 62; C – $2n$ =ca. 66. População 5 planta 5: D e E – $2n$ =ca. 64. Escala 10 μ m.

Na população 5, analisou-se células de uma planta (planta 5), mostrando número cromossômico mais comum com cerca de 64 (Figura 14 – D e E).

Em células de ponta de raiz de uma muda espontânea encontrada na população 6, encontrou-se duas, das três células analisadas, com cerca de 68 cromossomos (Figura 15 – A e B).

Na planta 4A1 da população 6, o número encontrado para a única célula analisada foi de cerca de 60 cromossomos (Figura 15 – C). Para 2A6 o número de cromossomos mais comum foi cerca de 64 e 66, sendo que toda variação encontrada foi de cerca de 60 até cerca de 66 (Figura 16). Em 4A5 número mais comum foi de cerca de 64 cromossomos (Figura 17 – A, B, C e D). Para 4A6 cerca de 68 cromossomos foi o número mais freqüente (Figura 17 – E e F).

Na planta 5A2 cerca de 62 cromossomos foi o número encontrado com maior freqüência (Figura 18 – A e B). Em 5A4 não conseguiu-se estabelecer o número de cromossomos mais comum, já que, para cada célula analisada o número era aparentemente diferente, variando desde cerca de mais de 56 até cerca de 70, mas em geral acima de 60. Ressalva-se que a célula que apresentava cerca de 70 cromossomos, também apresentava um bom espalhamento, podendo indicar uma variação real (Figura 18 – C e D). O número mais comum para 5A5 foi de cerca de mais 58 cromossomos (Figura 18 - E).

Para todo o restante das plantas onde foram coletadas sementes não conseguiu-se nenhuma célula em mitose passível de ser analisada devido a série de motivos já mencionados anteriormente.

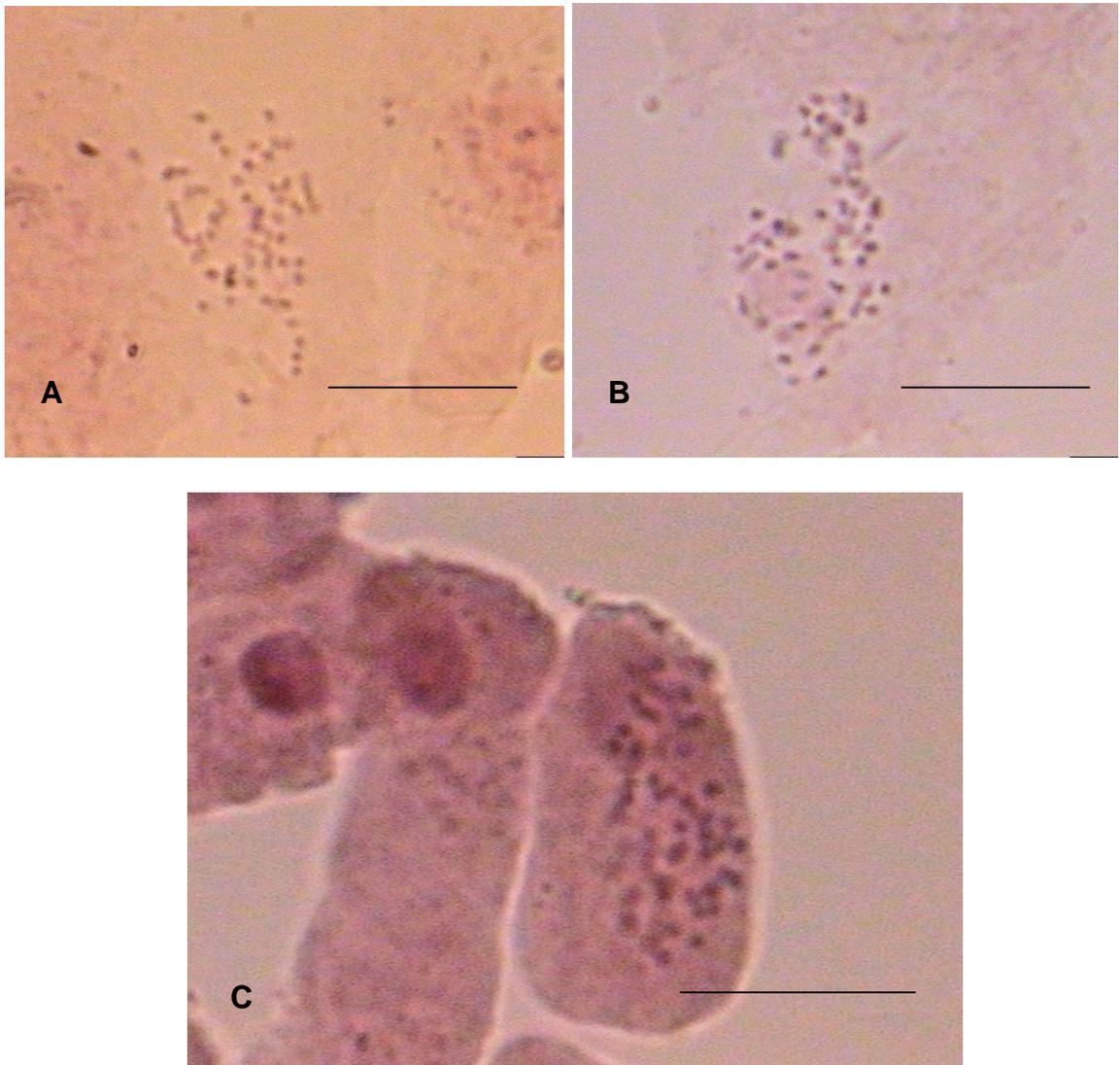


FIGURA 15. Cromossomos somáticos da população 6 de *M. ilicifolia*. A e B – Muda espontânea com $2n \approx 68$; C – Planta 4A1 com $2n \approx 60$. Escala 10 μm .

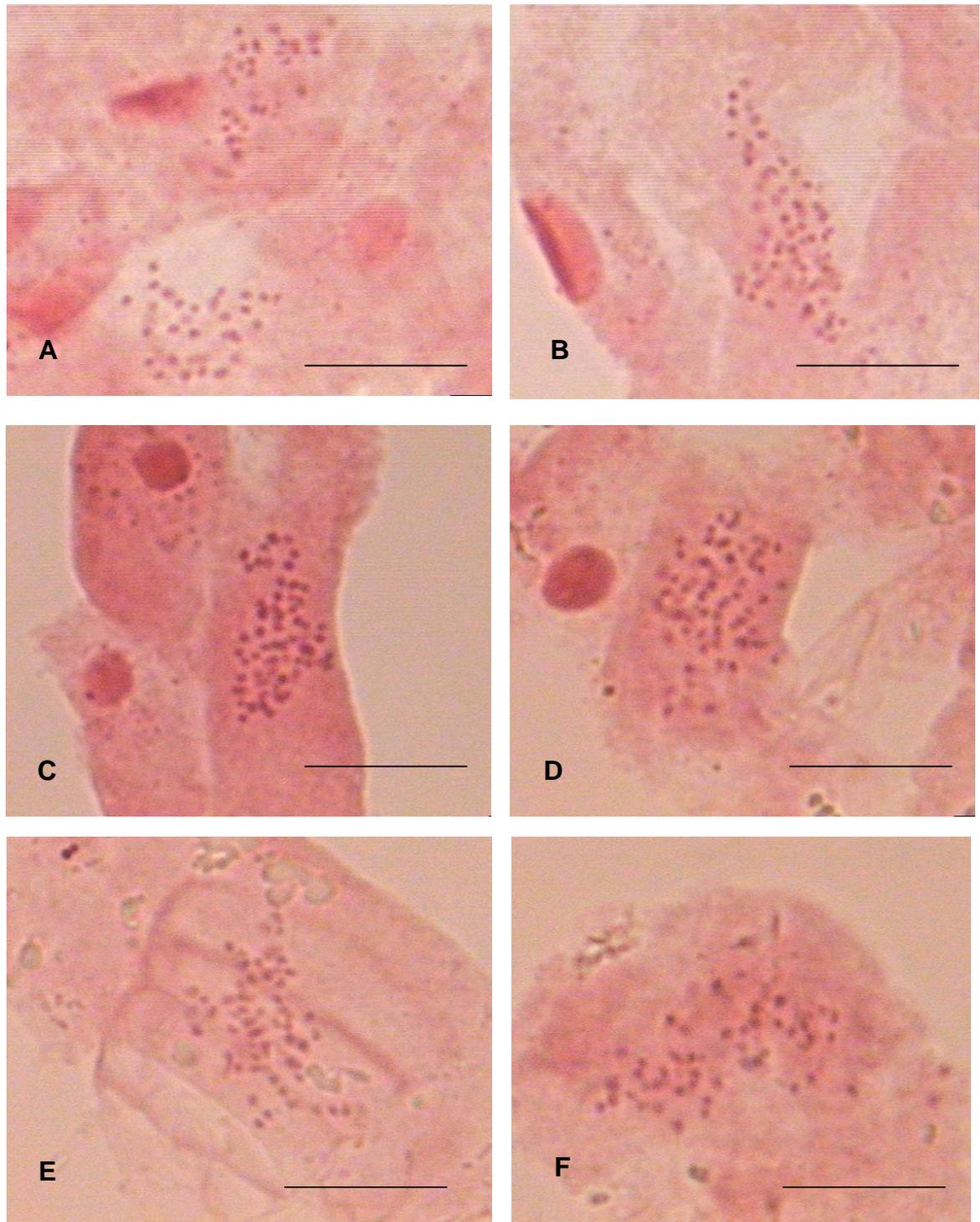


FIGURA 16. Cromossomos somáticos da planta 2A6 da população 6 de *M. ilicifolia*. A e B – $2n \approx 66$; C, D e E – $2n \approx 64$ e F – $2n \approx 62$. Escala 10 μm .

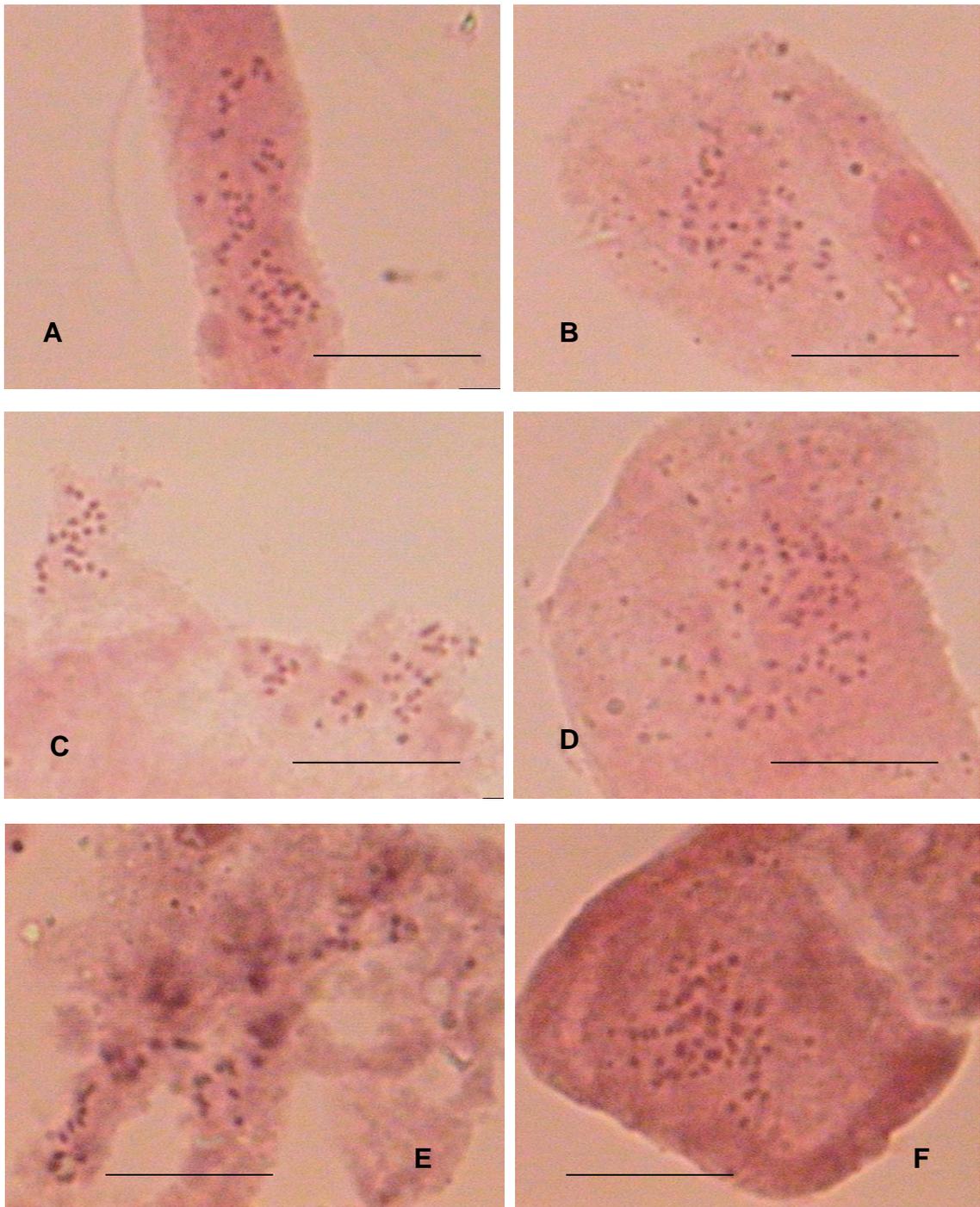


FIGURA 17. Cromossomos somáticos na população 6 de *M. ilicifolia*. A, B, C e D: planta 4A5; A – $2n \approx 62$; B e C – $2n \approx 64$; D – $2n \approx 72$. E e F: planta 4A6; E – $2n \approx 68$; F – $2n > 60$. Escala 10 μm .

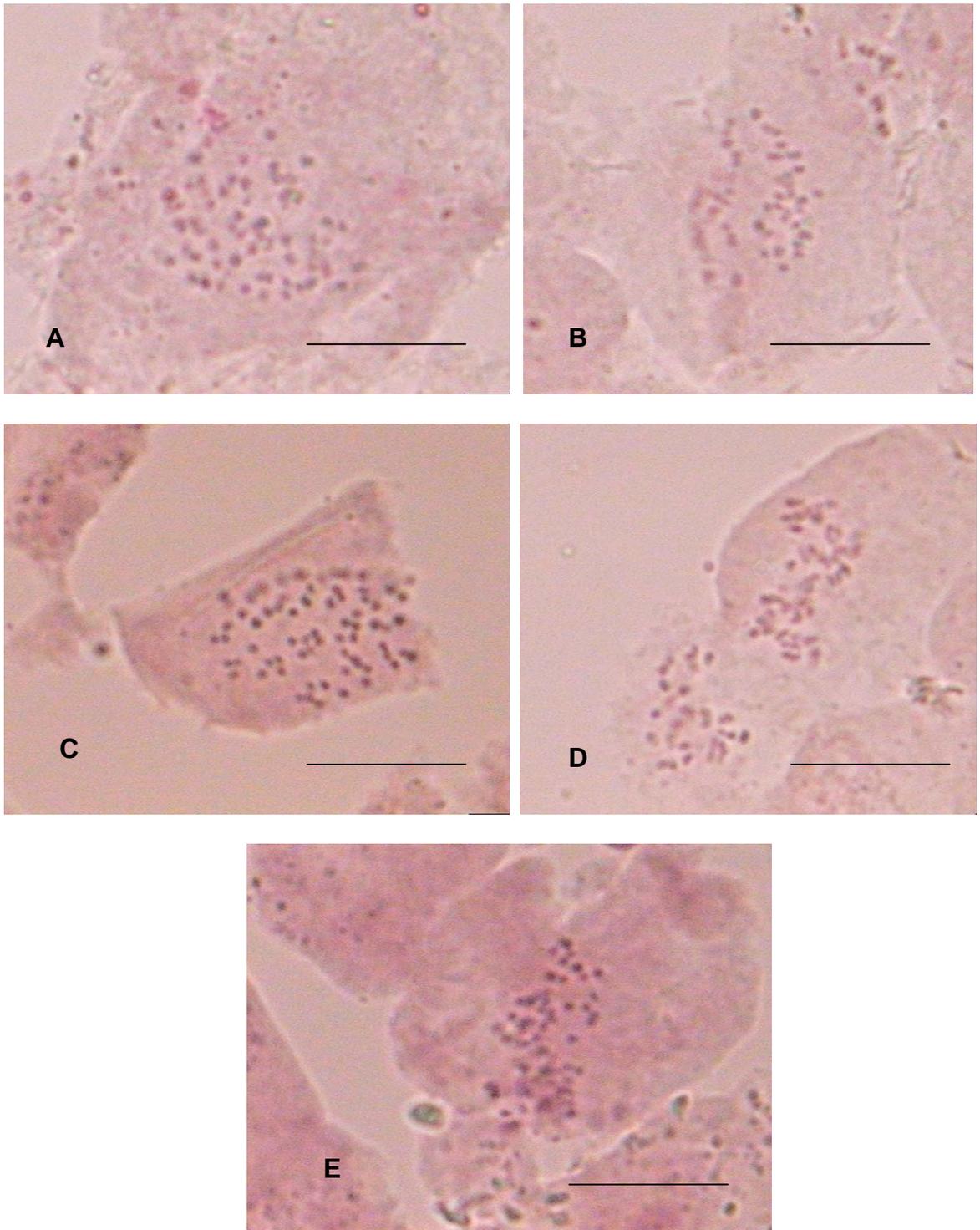


FIGURA 18. Cromossomos somáticos na população 6 de *M. ilicifolia*. A e B: planta 5A2 – $2n$ =ca. 62. C e D: planta 5A4; C – $2n$ =ca. 70 e D – $2n$ =ca. mais de 62. E: planta 5A5 – $2n$ =ca. mais de 58. Escala 10 μ m.

Os resultados mostram que *Maytenus ilicifolia* apresenta cromossomos somáticos muito pequenos, menos que 1µm, e numerosos.

Sebsebe (1985) também relatou as dificuldades em determinar com absoluta certeza o número de cromossomos nas espécies de *Maytenus* por ele estudadas.

Para cinco destas seis espécies (Tabela 7) o número cromossômico foi descrito pela primeira vez. Para *M. senegalensis* o número cromossômico foi apenas confirmado. Logo, somente para *M. arbutifolia* (2n=20) Sebsebe (1985) conseguiu contar com precisão o número de cromossomos. Como testemunha do seu resultado, o autor apresentou foi um desenho esquemático de apenas uma célula em metáfase somática, o que reforça ainda mais a dificuldade de obter-se células boas para observação dos cromossomos.

TABELA 7. Números cromossômicos de *Maytenus* na Etiópia *. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

Espécies	2n	Nível de ploidia	Nº básico
<i>M. addat</i>	ca. 36	4x	x=9
<i>M. arbutifolia</i>	20	2x	x=10
<i>M. gracilipes</i> subsp. <i>arguta</i>	ca. 24	2x	x=12
<i>M. obscura</i>	ca. 36	4x	x=9
<i>M. senegalensis</i>	54	6x	x=9
<i>M. serrata</i>	ca.20	2x	x=10

* adaptado de Sebsebe (1985).

Os resultados aqui apresentados são as primeiras determinações de número cromossômico somático para *Maytenus ilicifolia*, como também para outras espécies do gênero além das citadas por Sebsebe (1985) e Federov (1969).

4.1.5. Análise geral do número cromossômico em *M. ilicifolia*

Reunindo-se as informações quanto ao número cromossômico obtidas pela análise da meiose e de células somáticas (Tabela 8), verifica-se que existe uma variação intraespecífica quanto ao número de cromossomos entre diferentes populações de *M. ilicifolia*, sendo $2n=ca. 64$ o número mais comum, encontrado em quatro das seis populações analisadas.

TABELA 8. Número cromossômico em diferentes populações de *M. ilicifolia*. Porto Alegre, UFRGS, 2004.

População	Número cromossômico (2n)
1	ca. 80
2	ca. 64
3	ca. 64
5	ca. 64
6	ca. 64
8	ca. 70

Variação intraespecífica no número de cromossomos, mesmo aquela não diretamente relacionada com séries poliplóides, não é um fato raro em plantas, como já relatado em, por exemplo, *Mikania cordifolia*, variando o número cromossômico de $2n=34$ a $2n=38$ (Gaiser, 1954; Powell & King, 1969; Ruas & Ruas, 1987 e Robinson et al., 1989), *Mikania pachyphylla* $2n=34$, 36 e 38 (Nevling, 1969) e *Mikania pyramidata* $2n=36$ e 40 (Robinson et al., 1989) citados por Maffei et al. (1999). Schifino-Wittmann et al. (1994) encontraram variação em *Vicia angustifolia*, com o número cromossômico de $2n=10$, 12 e 14. Em várias espécies do gênero *Digitaria*, por exemplo, *D. adscendens*, encontrou-se $2n=54$, 70 e 72 e *D. sanguinalis* com $2n=36$ e 54 (IPCN, 2004). Variação no número cromossômico também foi relatado para *Leucaena shannonii* com $2n= 52$ e 56 (Boff & Schifino-Wittmann, 2003).

É interessante ressaltar que em duas populações (1 e 8), o número de cromossomos é múltiplo de dez ($2n=70$ e 80), assim como os $2n=80$ relatado para *M. vitis-idaea* por Covas e Schnack, citado por Federov (1969). Como para apenas estas duas espécies sul-americanas existem informações sobre o número de cromossomos, é prematuro, apesar de atraente, sugerir-se um número básico de cromossomos para as espécies da América do Sul, mas é possível que este seja $x=8$ ou $x=10$.

Comparando-se os resultados de Sebsebe (1985) (Tabela 7) com os do presente trabalho (Tabela 8), e a contagem para *M. vitis-idaea*, verifica-se que as espécies africanas possuem números cromossômicos mais baixos do que as duas representantes de *Maytenus* da América do Sul. Para que estes dados sejam realmente comparáveis, deveria-se considerar que todos os taxons analisados pertençam ao mesmo gênero. Para isto é necessário que as relações taxonômicas entre as espécies africanas, as sul-americanas e as demais espécies de *Maytenus* sejam definitivamente esclarecidas. Considerando-se espécies de um mesmo gênero, poderíamos sugerir que $2n=20$ (de *M. arbutifolia* e *M. serrata*) seria o número diplóide do gênero e que as demais espécies seriam hiperdiplóides (*M. gracilipes* $2n=24$), ou poliplóides múltiplos exatos de 10, como algumas populações de *M. ilicifolia* e *M. vitis-idaea* ($x=10$ seria então considerado o número básico do gênero) ou poliplóides que passaram por um processo de disploidia (*M. addat* e *M. obscura* com $2n=36$, *M. senegalensis* com $2n=54$, e as populações de *M. ilicifolia* com $2n=64$). Seguindo a mesma linha de raciocínio, as espécies americanas

analisadas seriam resultado de mais de um ciclo de poliploidia, seguido, ou não por disploidia.

Entretanto, para que as sugestões quanto ao número básico das espécies sul-americanas e sua possível relação com outras do gênero, possam ser consideradas fundamentadas, há necessidade de determinações do número cromossômico em muito mais espécies, e preferencialmente em mais de uma população por espécie. Considerando as dificuldades para análise citogenética aqui relatadas, parece pouco provável ser este um objetivo atraente para os citogeneticistas.

4.2. Análise das sementes

Para 1239 frutos analisados das três populações naturais do município de Bagé, população 1 (P1) – Corredor dos Colares; população 2 (P2) – Fundos do Clube Caixeiral; população 5 (P5) – Margens do Rio Negro, constatou-se que o número de sementes por fruto varia de uma a quatro e que a maior incidência são de frutos contendo duas sementes (39,52%), seguida de frutos contendo uma (25,15%), três (23,71%) e quatro sementes (11,62%).

Já para a população antropogênica de Viamão, população 6 (P6), foram analisados um total de 4266 frutos de 23 plantas, onde observou-se que o número médio de sementes por fruto variou também de um a quatro e a maior incidência foi de frutos contendo uma semente (46%), seguida de frutos com duas sementes (31%), três (16%) e quatro (7%).

Estes resultados concordam com Carvalho-Okano (1992) quanto a variação da quantidade, porém a maior incidência encontrada pela autora, foi

de duas e três sementes por fruto (valores provenientes de observações e não de contagens com número significativo de frutos), diferenciando-se deste estudo.

Rosa (1998) avaliou 608 frutos e encontrou de uma a quatro sementes por fruto, com maior incidência de uma (78,5%), seguida duas (17,4%), três (3,9%) e muito raramente quatro (0,2%), o que concorda com os resultados do presente trabalho para a P6 quanto às categorias, mas os valores percentuais por categoria diferiram.

A grande variabilidade encontrada entre diferentes populações e entre diferentes estudos devem refletir características genéticas das populações e também influências ambientais.

Em comparações realizadas entre as três populações naturais de Bagé, o peso médio de sementes por categoria de frutos (Tabela 9), não diferiu significativamente dentro de cada população, porém, entre as diferentes populações, houve diferenças significativas para as de frutos com dois e quatro sementes. Para as categorias de frutos com dois e quatro sementes, P2 apresentou peso médio de sementes significativamente maior que P5. Considerando o peso médio das sementes entre as populações, P2 apresentou valores significativamente maiores que P1 e P5 (Tabela 10).

TABELA 9. Peso médio de sementes de *M. ilicifolia* comparadas por categoria de frutos dentro de uma mesma população (colunas); peso médio das sementes por categorias de frutos entre três diferentes populações: P1- Corredor dos Colares, P2-Fundos Clube Caixaeral e P5-Margens Rio Negro (linhas). Porto Alegre, UFRGS, 2003.

Categorias de frutos	Peso médio de semente (g)		
	P1	P2	P5
com 1 semente	0,023 a A	0,028 a A	0,021 a A
com 2 sementes	0,020 a AB	0,030 a A	0,019 a B
com 3 sementes	0,024 a A	0,028 a A	0,019 a A
com 4 sementes	0,025 a AB	0,029 a A	0,020 a B

Médias seguidas da mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

TABELA 10. Comparação interpopulações (P1, P2 e P5) do peso médio de sementes *M. ilicifolia*. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

	P 1	P2	P5
Peso médio de sementes (g)	0,023 B	0,029 A	0,020 B

As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Rosa (1998), verificou que o peso das sementes de *M. ilicifolia* era inversamente proporcional à quantidade destas por fruto, o que não foi observado no presente trabalho.

Com relação ao peso de mil sementes para as populações de Bagé, os resultados obtidos foram: P1 – 20,98 g; P2 – 26,13 g e P5 – 22,40 g. Nos dados de Rosa (1998) o peso de mil sementes encontrado foi 99,1g, onde 62,3% das sementes apresentaram peso médio de 0,10g, o que demonstra uma grande variação entre as populações naturais.

Na P6, em relação à comparação do peso médio das sementes entre plantas, houve diferença significativa, tendo a árvore 1A1 o maior peso médio (Tabela 11). Como este estudo foi realizado com plantas coletadas de diferentes locais, portanto representando uma grande variabilidade, já era

esperado que ocorressem estas diferenças, provavelmente por não ser esta uma população natural, mas sim um conjunto de diferentes origens.

TABELA 11. Comparação do peso médio de sementes entre plantas da população antropogênica de Viamão. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

Árvore	Peso médio (g)		Árvore	Peso Médio (g)	
1/A1	0,0347	a	1/A7	0,0247	fg
6/A8	0,0315	b	8/A3	0,0225	gh
6/A7	0,0307	bc	5/A5	0,0222	h
2/A2	0,0297	bcd	4/A6	0,0217	h
7/A3	0,0295	bcd	9/A2	0,0210	hi
7/A1	0,0287	cde	8/A4	0,0207	hi
2/A6	0,0287	cde	8/A2	0,0192	ij
2/A5	0,0285	cde	7/A2	0,0187	ljk
4/A1	0,0280	de	4/A2	0,0187	ljk
4/A5	0,0262	ef	6/A4	0,0172	jk
9/A1	0,0252	f	5/A2	0,0165	k
5/A4	0,0250	f			

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro. Coeficiente de variação: 6,2%. Peso médio geral: 0,02423 g.

Quanto à variação do peso médio das sementes por categorias de frutos entre as diferentes plantas da P6, foi realizada análise de regressão dos dados, observando-se um comportamento linear: com o aumento do número de sementes por fruto, ocorre uma diminuição do seu peso médio (Figura 19)

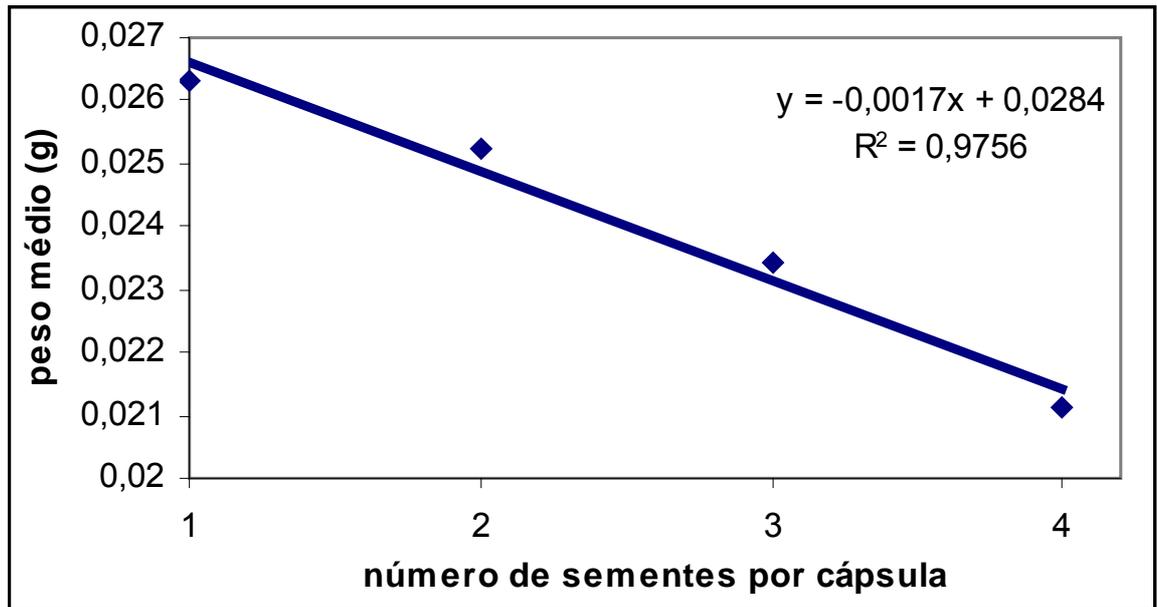


FIGURA 19. Peso médio de sementes por categorias de frutos entre as diferentes plantas da P6.

Vários atributos, como os genéticos e físicos determinam a qualidade das sementes, afetando sua capacidade de originar plantas de alta produtividade. As diferenças no vigor e no crescimento inicial da plântula estão relacionadas com a quantidade de reservas da semente. Segundo Dan et al. (1987), isto ocorre em função das sementes apresentarem maior capacidade de transformação e de suprimento de reservas dos tecidos de armazenamento e da maior incorporação destes pelo eixo embrionário. Sugerindo-se que, ao selecionar genótipos com sementes maiores, mudas mais vigorosas, de crescimento inicial mais rápido e uniformes poderão ser obtidas. Estes itens são extremamente desejáveis no que se refere a produção de mudas em larga escala para o estabelecimento de cultivos, visando a propagação, manutenção e preservação de *M. ilicifolia*.

A Figura 20 mostra fotos de sementes de *M. ilicifolia*.

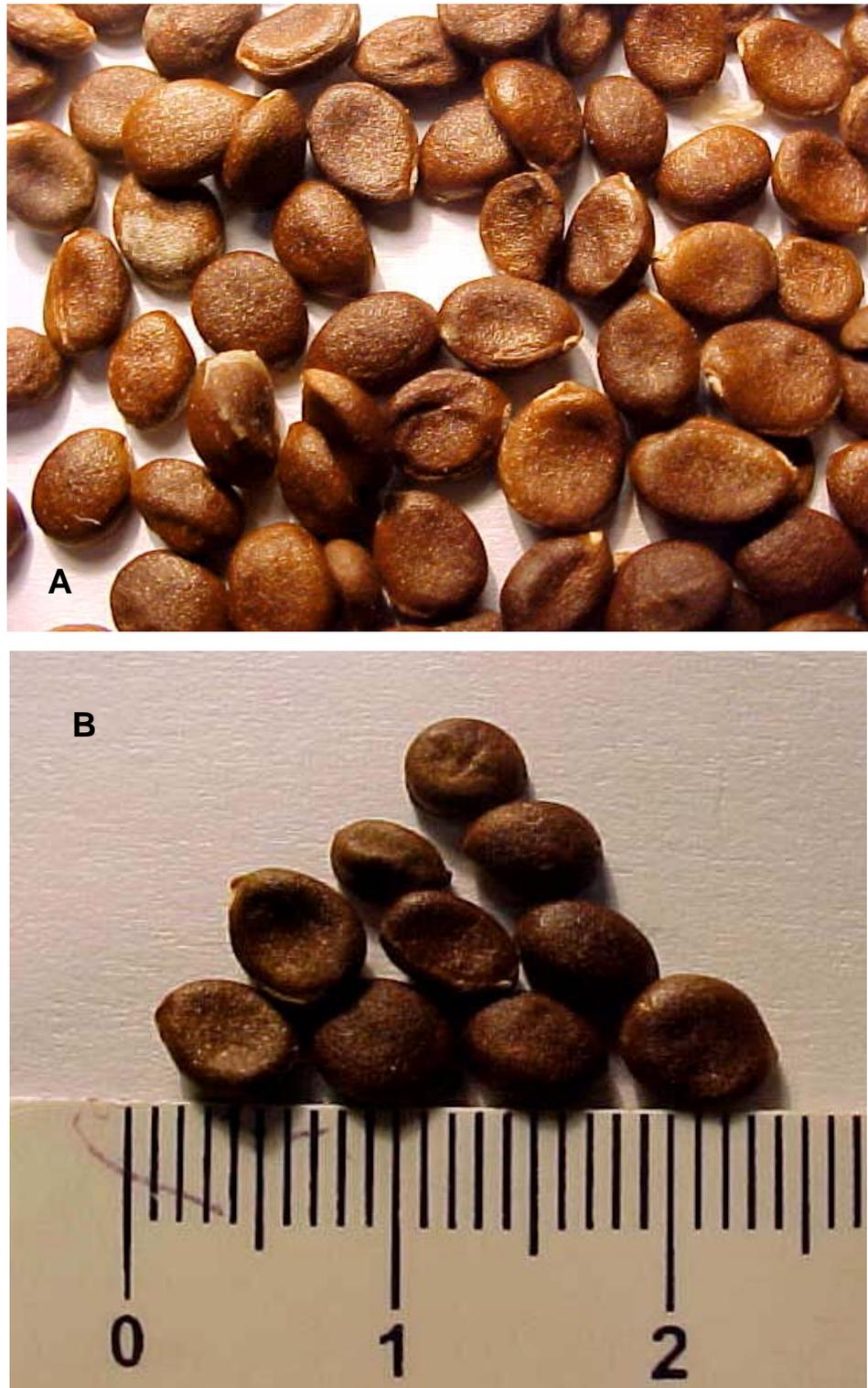


FIGURA 20. A e B - Sementes de *M. ilicifolia*. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

5. CONCLUSÕES

- *Maytenus ilicifolia* é uma espécie difícil para realizar estudos citogenéticos, pois apresenta cromossomos muito pequenos, com menos de 1µm, muito numerosos e extremamente aderentes;

- As quatro populações estudadas quanto ao comportamento meiótico, apresentaram meiose regular, aparentemente com formação exclusiva de bivalentes, índice meiótico acima de 95% e viabilidade do pólen acima de 80%. Os números cromossômicos contados em meiócitos, foram cerca de 80 ou pouco mais de 80 na população 1, cerca de 64 nas populações 2 e 3, e cerca de 70 na população 8;

- Análises do número cromossômico somático são mais difíceis do que na meiose, mas apesar das contagens não serem totalmente precisas, o número cromossômico provável é cerca de 64 nas populações 2, 5 e 6.

- As informações obtidas indicam haver variação intraespecífica no número cromossômico de *M. ilicifolia*.

- A produção de sementes por fruto nas populações estudadas de *Maytenus ilicifolia* variou de uma a quatro, com maior incidência de duas sementes por fruto em três populações naturais de Bagé e uma semente por fruto na população antropogênica de Viamão, sendo para esta última verificado que com o aumento do número de sementes por fruto, diminui o seu peso médio;

- O peso médio das sementes por categoria de frutos, bem como o peso médio das sementes, diferenciou-se somente entre as diferentes populações de Bagé, porém, dentro da população de Viamão, o peso médio das sementes variou entre indivíduos. O peso de mil sementes variou de 20,98 g a 26,13 g.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERELE, O. Medicinal plants and primary health care: na agend for action. **Fitoterapia**, Budapest, v.5, p.355-363, 1988.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991. 377p.

BDT – Base de Dados Tropical. **Lista da Flora Ameaçada de Extinção no Brasil**. Disponível em: <[http:// www.bdt.fat.org.br/redflora](http://www.bdt.fat.org.br/redflora) >. Acesso em: 09 fev. 2004.

BENNETT, M. D. Plant genome values: How much do we know? **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v.95, p.2011-2016, 1998.

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

BOFF, T.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Segmental allopolyploidy and paleopolyploidy in species of *Leucaena* Benth: evidence from meiotic behaviour analysis. **Hereditas**, Lund, v.138, p.27-35, 2003.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1993. 365p.

CARLINI, E. A.; BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus sp* (Espinheira-Santa) contra a úlcera gástrica experimental em ratos. In: CARLINI, E. L. A. (org.). **Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-Santa) e outras**. Brasília: CEME/AFIP, 1988. p. 21-35.

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

CARVALHO-OKANO, R. M. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. Emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil extra-amazônico.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1992. 253 f. Tese (Doutorado em Ciências- Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

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

DAN, E. L. et al. Transferência de matéria seca como método de avaliação do vigor de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 9, n. 3, p. 45-55, 1987.

DI STASI, L. C. Arte, Ciência e Magia. In: DI STASI, L. C. (org.). **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência – Um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo: UNESP, 1996. p. 15-21.

DYER, R. A. **The genera of southern african flowering plants: dicotyledons.** Petroria: Botanical Research Institute, 1975. p. 331-333.

EIRA, M. T. S.; DIAS, T. A. B.; MELLO, C. M. C. Comportamento Fisiológico de sementes de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) no armazenamento. **Horticultura Brasileira**, Botucatu, v.13, n.1, p.32-34, 1995.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: Ed. da UFRGS ; Florianópolis: Ed. da UFSC, 1999. p. 197-220.

FEDEROV, NA. A. **Chromosome numbers of flowering plants** . Leningrad: Academy of Sciences of the USSR, 1969. 926p.

FURLAN, M. R. Aspectos agronômicos em plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. (org.). **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência: Um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo: UNESP, 1996. p.157-167.

GAMA, L. Reservas Naturais: Uso medicinal popular da espinheira-santa estimula extrativismo e coloca a planta em risco de extinção. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.55, n.3, p.6-7, 2003.

GEOCZE, S. et al. Tratamento de pacientes portadores de dispepsia alta ou de úlcera péptica com preparações de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E. L. A. (org.). **Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-Santa) e outras.** Brasília: CEME/AFIP, 1988. p. 75-86.

GONZALEZ, F. G. et al. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v.77, n.1, p.41-47, 2001.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C. Amazônia: Tesouro químico a preservar. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.11, n. 61, p.17-20, 1990.

GUERRA, M. S. **Introdução à Citogenética Geral**. Pernambuco: Guanabara Koogan, 1988. 142p.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 131p.

HANSON, L. et al. First nuclear DNA C-values for 28 Angiosperm genera. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, p. 31-38, 2003.

HAMANN, O. The joint IUCN-WWF plants conservation programme and its interest in medicinal plants. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. (ed.). **The Conservation of Medicinal Plants**. Cambridge: University Press, 1991. 362p.

HESLOP-HARRISON, J. S. Cytological techniques to assess pollen quality. In: CRESTI, M.; TIEZZI, A. (orgs). **Sexual plant reproduction**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p. 41-57.

IPCN. Index Plant Chromosome Number. **Contém listagem atualizada dos números cromossômicos citados na literatura**. Disponível em: <<http://mobot.bot.org/w3t/search/ipcn.html>>. Acesso em: 12 fev. 2004.

LONGUI, R. A. **Livro das árvores**: árvores e arvoretas do sul. Porto Alegre: L & PM, 1995. 176p.

LORENZI, H. **Arvores brasileiras**: manual de identificação de cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998. 368p.

LOVE, R. M. **Estudos citológicos preliminares de trigos rio-grandenses**. Porto Alegre: Secretaria do Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio, 1949. 23p. (Circular, 74).

MACAUBAS, C. I. P. et al. Estudo da eventual ação antiúlcera gástrica do bálsamo (*Sedum sp*) folha-da-fortuna (*Bryophyllum calycinum*), couve (*Brassica oleraceae*) e da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) em ratos. In: CARLINI, E. L. A. (org.). **Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: Maytenus ilicifolia** (Espinheira-Santa) e outras. Brasília: CEME/AFIP, 1988. p. 5-20.

MAFFEI, E. M. D. et al. Numerical chromosome polymorphism in *Mikania cordifolia* Willd. (Asteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.22, n.4, p.609-612, 1999.

MAGALHÃES, P. M. Agroecologia para o cultivo da Espinheira Santa. In: MONOGRAFIAS de cultivo em plantas medicinais. CPQBA-UNICAMP/CYTED. 1998. Disponível em: <http://www.cpqba.unicamp.br/DivisoesPessoal/Pessoal_Pesq/pedro_melillo.htm>. Acesso em: 11 jul. 2002.

MIGLANI, G.S. **Dictionary of plant genetics and molecular biology**. New York: The Food Products Press, 1998. 348p.

MILANO, V.A. **Las plantas cultivadas en la Republica Argentina: Celastraceas**. Buenos Aires: Instituto de Botânica Agrícola, 1958. vol. 7, 22p. Fasc. 112.

MONTANARI JÚNIOR, I. Exploração econômica de plantas medicinais da Mata Atlântica. In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (orgs.). **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: SENAC São Paulo, 2002. p. 35-54.

MOSSI, A. J. ; ZANATTA, R. S.; GERALD, L. T. S. On the distribution of *Maytenus* species in Rio Grande do Sul. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.569, p.29-32, 2002.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS ; Florianópolis: Ed. da UFSC, 1999. p. 11-24.

OLIVEIRA, M. G. M.; CARLINI, E. A. Efeitos farmacológicos da administração aguda da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E. L. A. (org.). **Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-Santa) e outras**. Brasília: CEME/AFIP, 1988. p. 37-48.

ONG Amazonlink. org. Disponível em : <http://www.universiabrasil.net/pesquisa_bibliotecas/matéria.jsp?id=2250>. Acesso em: 16 fev. 2004.

PINTO, M. F. et al. Avaliação da variabilidade genética intraespecífica em *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reiss, através de RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 48., 2002, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: SBG, 2002. CD-ROM.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: Agiplan, 1977. 289p.

RADOMSKI, M. I. **Caracterização ecológica e fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em populações nativas, no município da Lapa – Paraná**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1998. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

REIS, M. S. ; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, M. O. et al. (orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS ; Florianópolis: Ed. da UFSC, 1999. p. 39-60.

REIS, M. S. Manejo sustentado de plantas medicinais em ecossistemas tropicais. In: DI STASI, L. C. (org.). **Plantas Medicinais: Arte e Ciência – Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. p. 199-215.

RIBEIRO, R. E. Nota de apresentação. In: CARLINI, E. L. A. (org.). **Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-Santa) e outras**. Brasília: CEME/AFIP, 1988. p. 1-2.

ROSA, S. G. T. **Caracterização da sementes de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, espinheira santa, e viabilidade de sua propagação sexuada**. 1994. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.

ROSA, S. G. T. Caracterização das Sementes de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, espinheira santa e viabilidade de sua propagação sexuada. **Plantas medicinais, Aromáticas e Condimentares: avanços na pesquisa agronômica**, Botucatu, v. 2, p. 33-51, 1998.

ROSA, S. G. T.; BARROS, I. B. I. Behaviour of *Maytenus ilicifolia* seeds in different periods and storage conditions. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.502, p.249-254, 1999.

SAMPAIO, M. T. S. **Citotaxonomia do complexo *Briza* (Gramineae): número cromossômico, cariótipo, quantidade de DNA nuclear, comportamento meiótico**. 1979. 145 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Porto Alegre, 1979.

SAS Institute. **System for information**. Versão 8.2. Cary, 2001.

SCHEFFER, M. C. **Sistema de cruzamento e variação genética entre populações de progênies de espinheira-santa**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2001. 104 f. Tese (Doutorado - Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

SCHEFFER, M. C.; DONI FILHO, L.; KOEHLER, H. S. Influência do tipo de coleta, da condições do tempo e do tempo de armazenagem na viabilidade de sementes de *Maytenus ilicifolia*. **Horticultura Brasileira**, Botucatu, v.12, n.1, p.100, 1994.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; LAU, A. H.; SIMIONI, C. The genera *Vicia* and *Lathyrus* (Leguminosae) in Rio Grande do Sul (Southern Brazil): cytogenetics of native, naturalized and exotic species. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.17, n.3, p.313-319, 1994.

SEBSEBE, D. The genus *Maytenus* (Celastraceae) in the NE tropical Africa and tropical Arabia. **Symbolae Botanicae Upsalensis**, Uppsala, v.25, n.2, p.1-102, 1985.

SEMA – Secretaria do Estado do Meio Ambiente & GTZ. **Lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção no estado do Paraná**. Contém a Lista da Flora Ameaçada de Extinção no Brasil. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/redflora>>. Acesso em: 09 fev. 2004.

SIMMONS, M. P. et al. Phylogeny of the Celastraceae inferred from 26S nuclear ribosomal DNA, phytochrome B, *rbcl*, *atpB*, and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.19, n.3, p.353-366, 2001.

SIMMONS, M. P.; HEDIN, J. P. Relationships and morphological character change among genera of Celastraceae sensu lato (including hippocrateaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v.86, p.723-757, 1999.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 4. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1995. 173p.

SOUZA-FORMIGONI, M. L. et al. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnofarmacology**, Shannon, v.34, n.1, p.21-27, 1991.

STACE, C. A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21th centuries. **Taxon**, Utrecht, v.49, p.451-477, 2000.

STEENBOCK, W. **Fundamentos para manejo de populações naturais de espinheira-santa, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae)**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. 145 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

STUESSY, T. F. **Plant taxonomy: the systematic evaluation of comparative data**. New York: Columbia University Press, 1990. 510p.

SYBENGA, J. Forty years of cytogenetics in plant breeding: a personal view. In: LELLEY, T. (Ed.). **CURRENT topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Tullen: [s. n.], 1998. p. 22-32.

VITA

Mirela Pereira Machado Lunardi, filha de Mauri Sidnei Machado e Rosa Alice Pereira Machado, nasceu em 26 de janeiro de 1979, em Bagé, Rio Grande do Sul.

Cursou ensino fundamental no Colégio Espírito Santo e o ensino médio na Escola Estadual Dr. Carlos Kluwe (Bagé – RS). Em 1996 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade da Região da Campanha (URCAMP – Bagé), onde licenciou-se em Ciências Biológicas em julho de 2001. Foi estagiária do Laboratório de Biologia da URCAMP desde 1999. Em março de 2002 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.