

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

Aline Karina Fodra Mello

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Brosimum*
***gaudichaudii* Trécul**

Ribeirão Preto
Fevereiro/2016

Aline Karina Fodra Mello

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Brosimum*
gaudichaudii Trécul**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientação Prof.^a Dr.^a Bianca Waléria Bertoni.

Coorientação Prof.^a Dr.^a Ana Maria Soares Pereira

Ribeirão Preto
Fevereiro/2016

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

M527a Mello, Aline Karina Fodra, 1974-
Avaliação da diversidade genética de *Brosimum gaudichaudii*
Trécul / Aline Karina Fodra Mello. - - Ribeirão Preto, 2016.
45 f.: il. color.

Orientadora: Profª. Drª. Bianca Waleria Bertoni.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2016.

1. Cerrado. 2. Conservação. 3. Planta medicinal. I. Título.

CDD 660

ALINE KARINA FODRA MELLO

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII*
TRÉCUL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 02 de dezembro de 2015

Resultado: Aprovada

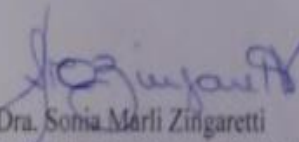
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Bianca Valéria Bertoni
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Profa. Dra. Luciana Rossini Pinto
Instituto Agrônômico - IAC



Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

Ao meu esposo Alexandre, que nunca hesitou em estar ao meu lado, meus filhos Pietra e Hugo, amores da minha vida, que entenderam minha ausência e minha mãe Maria Inês, exemplo de força e coragem. Sem o apoio deles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades.

À minha orientadora Dra. Bianca Waléria Bertoni, pesquisadora exemplar, pelos ensinamentos, compreensão e confiança de que o objetivo seria atingido.

Às Professoras Dras. Ana Maria Soares Pereira, Sonia Zingaretti, Silvia Helena Taleb, Ana Lucia Fachin, Mirian Lourenço por contribuir para o meu crescimento profissional.

Aos queridos amigos Lucas Junqueira, Isabela Gomes e Camila Carla Guimaraes, pelo incentivo, carinho e contribuição na realização deste trabalho.

Aos Colegas do Laboratório da Unidade de Biotecnologia da UNAERP: Simone Torres, Bruno Iglesias, Milene Camargos Almeida, Ana Paula de Oliveira, Juliana da Silva Coppede, Tamires Bitencourt, Marielle Cascaes Inácio, pelo aprendizado de diversas técnicas de laboratório e pela agradável e diferenciada convivência no ambiente de trabalho.

À minha irmã de alma Flávia Milene que está sempre com o coração aberto e muita paciência.

Às minhas irmãs Dafne e Daniela por torcerem por mim sempre.

À CAPES; FAPESP e CNPq pelo incentivo à pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| AFLP | <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> |
| AMOVA | <i>Analysis of Molecular Variance</i> |
| DNA | <i>Desoxyribosenucleic Acid</i> |
| FST | Índice de fixação |
| ISSR | <i>Inter-simple Sequence Repeat</i> |
| Nm | Fluxo gênico |
| PCoA | <i>Principal Coordinate Analysis</i> |
| PCR | <i>Polimerase Chain Reaction</i> |
| RAPD | <i>Random-amplified Polymorphic DNA</i> |
| SRAP | <i>Sequence-related polymorphic DNA</i> |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - <i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul..... | 17 |
| Figura 2 - Estruturas da substância psoralêno (A) e bergapteno (B) | 18 |
| Figura 3 - Estruturas de furocumarinas isoladas das raízes de <i>B. gaudichaudii</i> | 19 |
| Figura 4 - Populações de <i>Brosimum gaudichaudii</i> coletadas nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás | 25 |
| Figura 5 - Extração de DNA analisada por meio de gel agarose 1%. | 26 |
| Figura 6 - Análise de coordenadas principais (PCoA)..... | 32 |
| Figura 7 - Dendograma demonstrando as populações e o agrupamento | 33 |
| Figura 8 - Magnitude de Δk em função do K. | 33 |
| Figura 9 - Agrupamentos de grupos gênicos das populações da espécie <i>B. gaudichaudii</i> | 34 |
| Figura 10 - Proporção do grupo gênico das populações de <i>B. gaudichaudii</i> | 35 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Sequências das combinações dos primers SRAP | 22 |
| Tabela 2- Dados de coordenadas geográfica dos indivíduos de <i>Brosimum gaudichaudi</i> | 26 |
| Tabela 3 - Combinações de primers usados para obtenção de marcadores SRAP. | 27 |
| Tabela 4 - Estatística descritiva básica das populações de <i>B. gaudichaudii</i> por marcadores SRAP | 28 |
| Tabela 5 - Distância geográfica e genética | 29 |
| Tabela 6 - Resumo da AMOVA: porcentagem da variação total observada entre e dentro de populações de <i>Brosimum gaudichaudii</i> | 29 |

RESUMO

A espécie *Brosimum gaudichaudii* é considerada prioritária para a conservação e manejo de recursos genéticos vegetais. É uma planta medicinal, sua raiz é utilizada para obtenção de psoraleno e bergapteno, furocumarinas de propriedades fotossensibilizantes, utilizadas na produção de medicamentos como Viticromin®. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade genética em populações naturais de *Brosimum gaudichaudii* por marcador molecular SRAP, visando propor estratégias de conservação da espécie. Foram coletados acessos localizados em populações naturais nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás. Nas populações analisadas a variabilidade dentro das populações foi maior do que entre as populações. O valor do F_{ST} encontrado foi significativamente maior do que zero ($F_{ST} 0,15$). Os acessos coletados nos municípios de São Francisco Sales, Jataí e Inocência apresentaram maior variabilidade (84,26%), enquanto a população de Pedregulho apresentou um menor número de indivíduos polimórficos (71,91%). A análise por SRAP demonstrou ser uma técnica eficiente para determinar a diversidade genética entre populações de *B. gaudichaudii*, identificando dois grupos gênicos distintos apresentando uma estrutura em modelo de ilhas. As análises estatísticas desenvolvidas indicam a necessidade de se iniciar programas para a conservação da espécie, sugerindo a coleta de um maior número de indivíduos dentro das populações que obtivemos a maior diversidade genética.

Palavras-chaves: Cerrado, conservação, fluxo gênico, planta medicinal, SRAP.

ABSTRACT

The *Brosimum gaudichaudii* species is a priority for the conservation and management of plant genetic resources. It is a medicinal plant, its root is used to obtain psoralen and bergapten, furocoumarines photosensitizing properties, used in the production of drugs Viticromin®. This study to evaluate the genetic diversity in natural populations of *Brosimum gaudichaudii* by molecular marker SRAP, to propose the species conservation strategies. Were collected accesses located in natural populations in the states of Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul and Goiás. In the populations analyzed the variability within populations was greater than between populations. The value F_{ST} was statistically greater than zero (F_{ST} 0.15). The accessions collected in the municipalities of San Francisco Sales, Jataí and Innocence showed greater variability (84.26%), while the population of Gravel had fewer polymorphic individuals (71.91%). Analysis by SRAP shown to be an efficient technique for determining the genetic diversity among populations of *B. gaudichaudii*, identifying two distinct gene groups having a structure model islands. Statistical analyzes developed indicate the need to initiate programs for the conservation of the species, suggesting the collection of a greater number of individuals within populations that have obtained the greatest genetic diversity.

Keywords: Cerrado, conservation, gene flow, medicinal plant, SRAP.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 8 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 9 |
| 2.1 Diversidade genética em planta medicinal | 9 |
| 2.2 Conservação | 11 |
| 2.3 Polimorfismo Amplificado de Sequência relacionada (SRAP) | 12 |
| 2.4 Espécie alvo do estudo | 12 |
| 2.4.1 Família Moraceae | 12 |
| 2.4.2 <i>Brosimum gaudichaudii</i> | 15 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 19 |
| 4 HIPÓTESE | 19 |
| 5 OBJETIVOS | 20 |
| 5.1 Objetivo Geral | 20 |
| 5.2 Objetivos específicos | 20 |
| 6 MATERIAIS E MÉTODOS | 20 |
| 6.1 Coleta | 20 |
| 6.2 Análise da variabilidade genética | 21 |
| 6.2.1 Extração do DNA | 21 |
| 6.2.2 Análise SRAP | 22 |
| 6.2.3 Análise Estatística | 21 |
| 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 25 |
| 7.1 Coleta | 25 |
| 7.2 Extração do DNA | 27 |
| 7.3 Análise SRAP | 27 |
| 8 CONCLUSÃO | 35 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 36 |

1 INTRODUÇÃO

Existe aproximadamente 300.000 espécies de vegetais superiores na Terra, essa biodiversidade é fundamental para o desenvolvimento de pesquisas que buscam o melhor entendimento dos componentes desses mananciais, incluindo fármacos, pigmentos e substâncias químicas. As plantas produzem mais de 30.000 substâncias e as espécies estão dispostas de maneira dispersa no planeta, no entanto, notamos que as que tem potencial medicinal se encontram em maior concentração nas regiões tropicais.

O Brasil é o país que abriga a maior diversidade de espécies, em decorrência da sua grande extensão territorial e por dispor de condições favoráveis para a fixação desses vegetais, sendo um país com uma diversidade cultural proveniente do processo de composição da sociedade brasileira, tem oportunidade de fixar um modelo próprio, que sirva como referencial no que se trata da utilização da biodiversidade das plantas medicinais e seus compostos ativos a favor da saúde, priorizando a preservação e conservação dos recursos.

A utilização de plantas medicinais na forma em que são colhidas, e utilizadas através de processos caseiros, representam uma cultura realizada por vários povos do mundo. Porém entre a comunidade médica também é evidente a utilização de plantas medicinais, pois cerca de 25% das prescrições médicas são formulados a base de plantas ou derivados de plantas e análogos sintéticos. E 80% da população mundial depende de medicamentos derivados de plantas para a sua saúde e fica evidenciado que essa dependência é maior em países em desenvolvimento.

O desenvolvimento de novos fármacos é oneroso, estima-se que em média para obter uma droga é de mais de um bilhão de dólares, sem levar em conta os gastos com aprovações em órgãos competentes.

Torna-se assim de grande importância estudos que priorizem informações precisas acerca das espécies de plantas utilizadas na medicina, de modo a permitir sua correta identificação e conservação, uma vez que, estas informações podem auxiliar na elaboração de medicamentos e terapias com qualidade e segurança.

Neste sentido este trabalho propõe um estudo sobre a diversidade genética da espécie *Brosimum gaudichaudii* Trécul, planta amplamente utilizada na cultura

popular para doenças que acometem a pele com micoses, manchas, psoríase e principalmente vitiligo. Espera-se com a realização deste trabalho obter informações que possam ser úteis em elaborações de estratégias de conservação e maior conhecimento acerca da espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conservação

O Cerrado é o bioma que possui a segunda maior biodiversidade da América do Sul, superada somente pela Amazônia, ocupa 24% do território nacional com cerca 204 milhões de hectares, abrangendo os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Piauí, Distrito Federal, Tocantins e parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, São Paulo, Paraná e Rondônia (RIBEIRO, 2006).

Em razão da riqueza da biodiversidade, o Ministério do Meio Ambiente (MMA) definiu que 431 áreas no Cerrado têm prioridade para conservação. Inclusive no estado de São Paulo.

Segundo Bessa et al. (2013), o levantamento e identificação das plantas medicinais nativas do Cerrado permitem a reunião de informações sobre o conjunto de plantas de grande potencial medicinal e conseqüentemente econômico. Conservar um bioma é garantir a manutenção das espécies que nele se estabeleceram e, em conseqüência, a sua existência para as gerações atuais e futuras. Como relata Ribeiro (2006) há cerca de 6.500 espécies de plantas no Cerrado, das quais mais de 200 já têm algum uso econômico preconizado, seja uso forrageiro, madeireiro, medicinal e/ou ornamental. Além disso, o Cerrado é responsável pela produção de alimentos, fibras e outros produtos, em quantidade e qualidade adequadas às necessidades e exigências do mercado, promovendo também o desenvolvimento integrado e sustentável da região em que está inserido.

Portanto a definição de estratégias de conservação e uso sustentado dos recursos genéticos de uma espécie depende da compreensão dos padrões de distribuição da diversidade genética e o nível de diferenciação intraespecífico que se

encontra (GRIBEL, 2001). A variação genética presente em uma espécie é essencial para a sobrevivência e adaptação a possíveis mudanças do ambiente, é a base para programas de conservação.

2.2 Diversidade genética em planta medicinal

A busca por critérios de qualidade que garantam a eficácia e segurança de fitoterápicos mostra que a produção de compostos bioativos está relacionada a fatores como sazonalidade, radiação UV, índice pluviométrico, entre outros fatores ambientais, entretanto fatores intrínsecos ao material vegetal são igualmente importantes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Neste contexto, a avaliação da diversidade genética de plantas medicinais é vital uma vez que é necessário relacionar variações genotípicas e fenotípicas com a variabilidade morfológica e química das espécies a serem utilizadas como fitomedicamentos (FALK et al., 2001).

Esta abordagem no estudo de plantas não domesticadas com potencial uso terapêutico é necessária para assegurar sua conservação, evitando o extrativismo e protegendo do alto grau de pressão antrópica e da seleção de cultivares mais promissores geneticamente (VALLE et al., 2013)

A análise da diversidade genética demonstrou que, devido a distância geográfica, a espécie ornamental de cactus *Cereus peruvianus*, está sofrendo um processo de especiação, fenômeno este que leva a constituição de duas espécies diferentes (TAVARES, 2011).

Panax ginseng, coletado em diferentes regiões da China e Singapura, revelou que a diversidade genética na espécie está relacionada com o teor da saponina, ativo terapêutico, auxiliando na obtenção de cultivares mais interessantes economicamente (HONG et al., 2005).

Estudos realizados em *Pothomorphe umbellata* mostraram que, em populações das espécies coletadas em 4 localidades do estado de São Paulo e uma no Paraná, existe uma grande variabilidade genética dentro das populações (65,33%) e entre as populações (34,67%), possuindo um elevado grau de variabilidade genética, a qual pode ser fortemente impactada pelo extrativismo, quando partes

essenciais para a sua reprodução são retiradas, ou até mesmo a planta inteira (VALLE et al., 2013).

2.3 Polimorfismo Amplificado de Sequência relacionada (SRAP)

Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. São comumente utilizados para a construção de mapas genéticos, mapeamentos genéticos e clonagem, avaliação da diversidade genética e seleção assistida por marcadores no melhoramento de plantas. A classificação se dá pelo tipo de procedimento de detecção que pode ser baseado em hibridação ou em PCR.

Li e Quiros (2001) descreveram o desenvolvimento de uma técnica de marcadores chamada polimorfismo amplificado de sequência relacionada (SRAP) destinado para amplificação de fases de leitura aberta. Após os experimentos os autores concluíram que o marcador é bastante simples e eficiente e que pode ser utilizado para diferentes fins, inclusive para análise da diversidade genética em uma grande quantidade de organismos vivos, já que para sua detecção não é necessário informações da sequência do genoma (LI, MCVETTY, QUIROS, 2013).

Robarts e Wolfe (2014) em uma revisão sugerem que a técnica Polimorfismo amplificado de sequência relacionada (SRAP) pode ser aplicada na abordagem de hipóteses em estudos de sistemática vegetal, biogeografia, conservação, ecologia, além de outros. Neste trabalho os autores apontam as vantagens desta nova técnica e fazem comparações com outras técnicas já amplamente utilizadas como o PCR baseado em sistemas de marcadores dominantes, o polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD), inter-repetições de sequência simples (ISSR), e polimorfismo de fragmentos amplificados (AFLP). Embora bastante utilizados para estimativa da variação genética em plantas os autores relatam limitações destas técnicas tais como inconsistências na replicação de dados (RAPD), menor produção em termos de polimorfismos detectados por algumas combinações de iniciadores (ISSR) e a necessidade de maior tempo (AFLP).

A fim de pontuar as aplicações do SRAP os autores desta revisão relataram alguns estudos de casos que investigaram áreas específicas da biologia vegetal tais como nível de população sistemática (intraespecífica), hibridação, ordem superior sistemática (interespecífica ou superior), biogeografia, genética da conservação e ecologia (ROBARTS e WOLFE, 2014).

Como outros marcadores dominantes, o SRAP têm demonstrado a capacidade de elucidar a variação genética em uma variedade de níveis taxonômicos, com as vantagens de ser simples, barato e eficaz para a produção de fragmentos do genoma com alta reprodutibilidade e versatilidade. Como conclusão Robarts e Wolfe (2014) descrevem o uso dos marcadores SRAP tem crescido ao longo dos anos e que esta ferramenta tem ampla aplicação para estudos ecológicos e sistemáticos.

Desde que a técnica SRAP foi descrita em 2001 constatou-se um aumento do número de publicações utilizando este marcador, sendo eficiente em estudos de diversidade genérica de *Pinus Konaiensis* (FENG et al., 2009), *Vicia faba* (ALGHAMDI et al., 2012), *Saccharum spontaneum* (CHANG et al., 2012), *Allium sativum* (CHEN et al., 2013), *Erianthus aundinaceus* (ZHANG et al., 2013), nove espécies de *Salvia* (SAEBNAZAR; RAHMANI, 2013), catorze espécies do gênero *Alcea* (BADRKHANI et al., 2014), *Brassica napus* (AHMAD et al., 2014), *Lolium multilorum* (HUANG et al., 2014), *Crocus sativus* (BABAEI et., 2014), *Tetrastigma hemsleyanum* (Peng et al., 2015) e *Vitis ficifolia* (FAN et al., 2015).

2.4 Espécie alvo do estudo

2.4.1 Família Moraceae

A Família Moraceae compreende árvores, arbustos, ervas ou lianas monóicas ou dióicas, com canais laticíferos de látex leitoso distribuídos em todos os tecidos parenquimatosos. Pertencem a esta família a amora, o figo, a jaca e a fruta-pão (CASTRO, 2006, DIXON, 2011).

As plantas taxonomicamente incluídas neste grupo exibem folhas simples e alternadas, dificilmente lobadas. As estípulas que nem sempre são visíveis, normalmente são caducas com cicatrizes circular no ramo (SANTOS, 2012). As

estípulas podem estar associadas à proteção das gemas vegetativas, ocorrendo principalmente em plantas caducifólias como mencionado em alguns estudos. Em localidades onde as caducifólias não são comuns, as estípulas permanecem retidas, representando uma plesiomorfia na família (CASTRO, 2006).

As inflorescências axilares são racemosas: espigas, racemos ou capítulos (achatados, cenanto em *Dorstenia*; globosos em *Brosimum*; ou fechados em uma urna, como o sicônio, em *Ficus*). Apresenta hábito arbóreo, arbustivo, herbáceo, hemiepífita ou trepadeira. No que diz respeito as flores são unissexuadas, geralmente radiais, inconspícuas. Apresentam óvulos anátropos e drupas ou aquênios agregados (DAWTYLER, WEIBLEN, 2004; CASTRO, 2006; JACOMASSI et al., 2010 CASTAÑEDA, MANRÍQUEZ, 2012).

A família Moraceae é constituída de 37 gêneros e cerca de 1100 espécies presentes principalmente nas regiões tropicais e secundariamente em regiões subtropicais e temperadas (ROHWER, 1993; CASTAÑEDA, MANRÍQUEZ, 2012).

Ainda hoje se discute a relação desta família com outras filogeneticamente similares. Em termos moleculares a família Moraceae é considerada monofilética e como características diagnósticas estão exsudados leitosos, ovário com placentação apical e óvulos anátropos (CASTAÑEDA, MANRÍQUEZ, 2012).

Estudos de filogenia realizados em 1999 e 2009 revelaram que a família Moraceae se relacionava com a ordem Rosales e foi reunido a elas. Entretanto, Moraceae difere das demais famílias da ordem Rosales principalmente pela presença abundante de látex distribuídos em todas as regiões das plantas. No estudo de Judd et al. (2009) também é enfatizado que a presença abundante de laticíferos aproximam as Moraceae das Urticaceae como grupos irmãos dentro da ordem Rosales (DAWTYLER, WEIBLEN, 2004; SANTOS, 2012).

Segundo Forzza (2010) na elaboração dos catálogos de plantas e fungos do Brasil, foram encontradas 198 espécies nativas da família Moraceae e vários gêneros que ocorrem no país.

Rohwer classifica a família em cinco tribos. Segundo o autor a tribo Moreae apresenta oito gêneros: *Bleekrodea* (3 spp.), *Broussonetia* (8 spp.), *Fatoua* (3 spp.), *Milicia* (2 spp.), *Morus* (~12 spp.), *Streblus* (~25 spp.), *Trophis* (9 spp.) e *Maclura* (11 spp.), a qual ocorre no Brasil. Dos 11 gêneros conhecidos da tribo Artocarpeae estão

presentes no Brasil *Batocarpus* (4 spp.), *Bagassa* (1 sp.), *Sorocea* (20 spp.) e *Clarisia* (3 spp.). Os demais gêneros são *Antiaropsis* (1 sp.), *Artocarpus* (50 spp.), *Hullettia* (2 spp.), *Poulsenia* (1 sp.), *Prainea* (4 spp.), *Sparattosyce* (1 sp.) e *Treculia* (3 spp.). A tribo Dorsteneieae possui no total oito gêneros: *Bosqueiopsis* (1 sp.), *Scyphosyce* (2 spp.), *Trilepisium* (1 sp.), *Utsetela* (1 sp.). Os demais que ocorrem no Brasil são *Helianthostylis* (2 spp.), *Trymatococcus* (3 spp.), *Brosimum* (15 spp.) e *Dorstenia* (105 spp., 45 neotropicais e 60 africanas).

A tribo Castilleae também possui oito espécies que têm representantes no Brasil, dentre elas estão *Perebea* (10 spp.), *Maquira* (5 spp.), *Castilla* (3 spp.), *Helicostylis* (7 spp.), *Pseudolmedia* (9 spp.) e *Naucleopsis* (25 spp.). As demais são *Antiaris* (1 sp.) e *Mesogyne* (1 sp.). A última tribo Ficeae apresenta um único gênero, *Ficus* (~750 spp.), que é encontrado em todos os continentes, exceto nos pólos. Cerca de 150 espécies de *Ficus* são encontradas nos neotrópicos (DAWTYLER, WEIBLEN, 2004; SANTOS, 2012).

Várias espécies desta família são empregadas na medicina popular e na fitoterapia. A alguns gêneros da *Dorstenia* são conferidas propriedades expectorantes e bronco dilatadores e no conhecimento popular algumas destas plantas são utilizadas para efeitos curativo da doença de Chagas. Efeitos anti-helmínticos são encontrados em espécies de figueiras e neste sentido destaca-se a o gênero *Sorocea* representada pela falsa-espina-santa, planta bastante utilizada na medicina popular (CASTRO, 2006).

As plantas pertencentes a esta família apresentam hábito arbóreo, arbustivo, herbáceo, hemiepífito ou trepadeira. Em espécies heliófilas como *Maclura tinctoria* e *Brosimum gaudichaudii* ocorre a passagem de arbustos a árvores durante o seu desenvolvimento.

A família Moraceae tem espécies importantes para a economia, como as frutas comestíveis figo (*Ficus carica*), fruta-pão (*Artocarpus altilis*), jaca (*A. heterophyllus*) e a amora (*Morus nigra*) (CASTRO, 2006).

A casca de *Broussonetia papyrifera*, *Ficus*, *F. cotinifolia* e *F. petiolaris* são matérias prima para a fabricação do papel amate, e há muito tempo *Castilla elastica* e *Perebea mollis* eram utilizadas para obter borracha natural. Algumas espécies de *Ficus* são utilizadas no México para fornecer sombra e para construir cercas, já as

folhas e os frutos são utilizados como forragem para o gado. *Brosimum alicastrum*, assim como *F. insípida* tem ampla aplicação local como espécies comestíveis, madeiras e para fins medicinais (CASTAÑEDA, MANRÍQUEZ, 2012). Também são utilizadas para o fornecimento de madeira *Maclura* e *Brosimum* para a fabricação de cabos de ferramentas. E ainda neste contexto a espécie *Clarisia racemosa* está na lista das 100 espécies mais comercializadas no Brasil em 2008 e 2009.

Por estar presente em florestas úmidas ou em suas proximidades a família Moraceae pode estar ameaçada de extinção já que estas localidades estão hoje sendo habitadas devido as necessidades agrícolas e urbanas, e claro devido ao uso indiscriminado em alguns locais das plantas medicinais (CLEMENT; WEIBLEN, 2009; CASTAÑEDA; MANRÍQUEZ, 2012).

2.4.2 *Brosimum gaudichaudii*

Brosimum sp. é um gênero que pertence à família Moraceae bastante utilizado na Amazônia pelas indústrias madeiras. Suas espécies *B. utile*, *B. potabile*, *B. parinarioides*, *B. rubescens*, *B. acutifolium*, *B. gaudichaudii* possuem diferentes nomes dependendo da região onde são encontradas (LIMA et al., 2013). Macedo e Ferreira (2004) em um estudo botânico descrevem que *B. gaudichaudii* é, do gênero *Brosimum*, a espécie mais empregada para fins medicinais.

B. gaudichaudii é popularmente conhecida como mama-cadela, mamica de cadela, algodão, algodãozinho, entre outros.

Trata-se de uma espécie arbórea com altura que pode variar de 4 a 10 m (BALERONI, 2002), pouco ramificada, glabra, exceto quando trata-se de ramos jovens, com dimorfismo acentuado. As folhas são simples, hirtas na página inferior e verde-escuras na face superior, apresentam-se alternadas, com pecíolo curto. É monóica, floresce entre os meses de junho e outubro. As flores verde-amareladas são pequenas e ficam agrupadas na extremidade dos pendúnculos pendentes nas axilas das folhas (POZETTI, 2005; SANTANA; DE PAULA E ROSA, 2012)

Os frutos carnosos são comestíveis (SILVA et al., 2011), também amarelos-alaranjados, com cerca de 2 ou 3 cm de diâmetro, são mastigados como se fossem

goma de mascar devido ao seu sabor e a presença de látex (LEÃO et al., 2005; POZETTI, 2005). Apresenta frutos maduros nos meses de setembro e novembro (SANTANA, DE PAULA E ROSA, 2012).

Esta espécie é típica do cerrado, mas também é encontrada no Amazonas, Pará, Maranhão, Ceará, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerias, Paraná, Piauí, São Paulo, Tocantins e Distrito Federal; (BALERONI, 2002; POZETTI, 2005; SANTANA PALHARES E SILVEIRA, 2007; SILVA et al., 2011 DE PAULA E ROSA, 2012).

Palhares et al. (2006) assim como Jacomassi (2007) apontam em seus estudos que esta espécie apresenta características morfoanatômicas que a favorecem no que diz respeito a sua sobrevivência e perpetuação mesmo que em ambientes adversos. A espécie apresenta rápido crescimento radicular, capacidade de rebrotamento do xilopódio (estrutura que armazena água), a germinação é criptohipogea; as raízes são gemíferas; e existe a presença de fibras gelatinosas em todos os órgãos, assim como os laticíferos e os idioblastos fenólicos, ambos com papéis importantes na defesa do vegetal, em especial os laticíferos nos processos de cicatrização (SILVA et al., 2011)

Um estudo no Distrito Federal realizado por Corrêa et al. (2007) apontou que a espécie *Brosimum gaudichaudii* foi a quarta espécie de maior dominância dentre as 98 espécies lenhosas encontradas nas áreas mineradas (SILVA et al., 2011).

Devido as características da madeira desta espécie, a mesma tem aplicações na marcenaria, sendo recomendável o uso de indivíduos jovens na confecção de papel. Além disso, as folhas e os frutos estão presentes na dieta de bovinos, e tem um potencial forrageiro (SANTANA, DE PAULA E ROSA, 2012). Outra utilidade desta espécie é como aromatizante utilizando para este fim o pó obtido por raspagem das raízes (LEÃO et al., 2005).

Na medicina popular todas as partes da *B. gaudichaudii* são utilizadas para diferentes fins medicinais, seja como um tônico digestivo, para sinusite, gases intestinais, para o tratamento de hepatite, dermatite, desintoxicação do sangue, gripes, bronquites, lesões na coluna, para ação diurética e para manchas na pele. Sem dúvida a propriedade de maior destaque desta espécie é o seu já comprovado efeito no tratamento do vitiligo, uma alteração cutânea adquirida, de etiologia

desconhecida, caracterizada pela ausência de pigmentação da pele (hipomelanose) circundada por área de pigmentação normal (JACOMASSI, 2007; ZANDONÁ, 2009; SILVA et al., 2011). Entretanto o córtex da raiz, como já preconizado pela sabedoria popular, é a parte do vegetal que apresenta maior concentração de metabólitos de importância farmacológica e terapêutica (POZETTI, 2005; JACOMASSI, 2007; SANTANA, DE PAULA E ROSA, 2012) (Figura1).

Figura 1 - *Brosimum gaudichaudii* Trécul



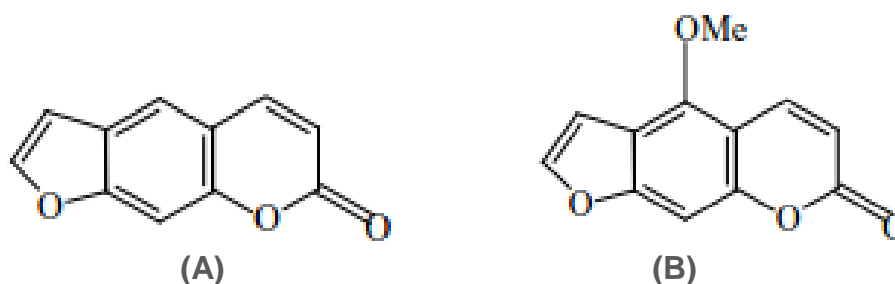
a) Árvore *Brosimum gaudichaudii*, b) fruto. Fonte: Arquivo pessoal

Além do uso popularmente difundido da mama cadela para o tratamento de vitiligo, seus derivados psoralênicos são encontrados no medicamento Viticromin®, o qual é feito a partir de cascas da porção inferior do caule e das raízes de *Brosimum gaudichaudii*. O processo de produção inicia-se com a colheita das partes de interesse do vegetal, posteriormente estas são dessecadas, descascadas, trituradas e manipuladas em fórmulas farmacêuticas para uso interno e externo (ANATEL et al., 2005; LEÃO, 2005, CUNHA et al., 2008; SILVA et al., 2011,).

De fato vários estudos demonstraram a presença de psoralêno e bergapteno (Figura 2) nas raízes de *B. gaudichaudii*, substâncias estas produzidas pelo metabolismo secundário de algumas plantas, amplamente utilizadas no tratamento de

despigmentação da pele algumas vezes em combinação com as vitaminas A, B1 e B6 (SANTANA, DE PAULA E ROSA, 2012).

Figura 2 - Estruturas da substância psoralêno (A) e bergapteno (B)



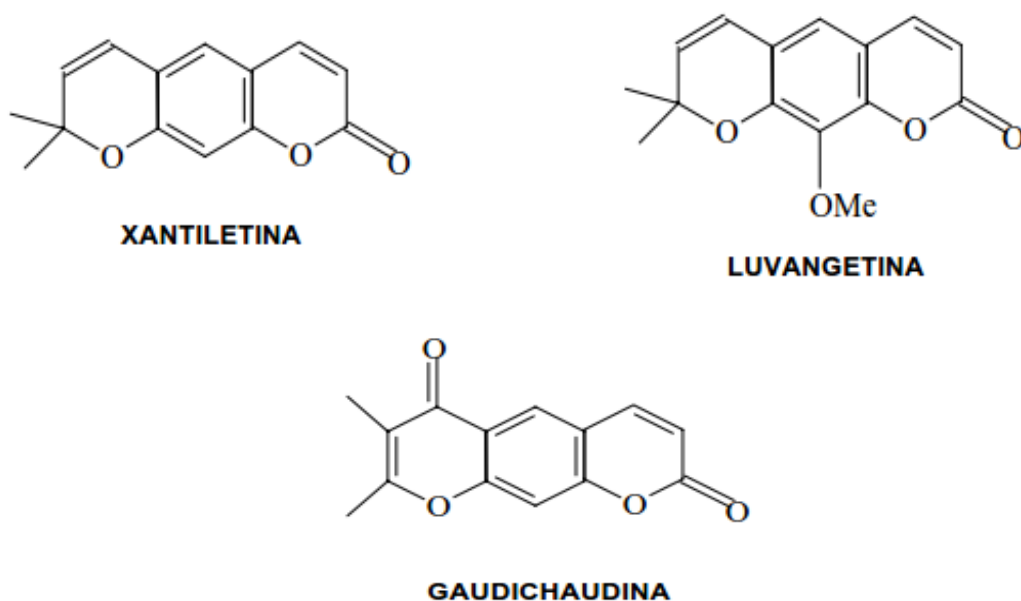
Fonte: Cunha et. al (2008)

Os dois princípios ativos furocumarinos psoralêno e bergapteno importantes para o tratamento do vitiligo podem ser obtidos através de síntese química, entretanto, o processo é bastante oneroso e como estas substâncias podem ser facilmente extraídas das raízes de *B. gaudichaudii*, esta espécie tem sido utilizada em escala industrial (PALHARES, SILVEIRA, 2007, JACOMASSI, 2007).

Brosimum gaudichaudii foi bastante estudada em relação a sua composição química e os efeitos medicinais dos seus metabólitos secundários, o que possibilitou a comprovação da sua atividade fotossensibilizante (POZETTI, 2005).

Além destas duas furocumarinas ainda foram isoladas das raízes de *B. gaudichaudii* xantiletina, luvangetina e gaudichaudina (Figura 3).

Figura 3 - Estruturas de furocumarinas isoladas das raízes de *B. gaudichaudii*



Fonte: Cunha et. al (2008).

3 JUSTIFICATIVA

A seleção de *Brosimum gaudichaudii* foi realizada em função da espécie ser amplamente utilizada para a produção de um medicamento denominado Viticromin®, indicado para vitiligo, cuja comercialização é realizada não apenas no Brasil, mas em toda a América Latina. Até o presente não há estudo da diversidade desta espécie que possa propor estratégia de conservação da mesma e com isso evitar a erosão genética causada pela fragmentação do bioma cerrado e coleta extrativista.

4 HIPÓTESE

O marcador molecular SRAP é eficiente para detectar a diversidade genética de populações naturais de *Brosimum gaudichaudii*.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

- Avaliar a diversidade genética em populações naturais de *Brosimum gaudichaudii* por marcador molecular SRAP.

5.2 Objetivos específicos

- Coletar amostras das espécies nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Goiás;
- Identificar combinações polimórficas para o estudo da variabilidade genética;
- Estimar as frequências alélicas e parâmetros genéticos básicos;
- Avaliar a estrutura genética populacional;
- Determinar a divergência genética e padrões espaciais;

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Coleta

As coletas foram realizadas em populações naturais dos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás. A amostragem no campo foi realizada considerando-se o tamanho, a densidade e a extensão da área. As informações sobre a topografia, características do habitat, data de coleta, frequência dos indivíduos, características morfológicas das plantas e outras considerações relevantes foram anotadas em cadernetas de campo. Foram tomados dados de localização geográfica (altitude, latitude e longitude) por meio do Sistema de Posicionamento Global (GPS) para indicação exata da localidade.

Para os experimentos da análise da diversidade genética, foram coletados folhas de cada acesso, que foram acondicionadas separadamente em tubos de fundo

cônico, devidamente identificados contendo sílica gel e posteriormente estocadas no freezer a -20°C até o momento da extração.

Os indivíduos férteis foram coletados para a confecção das exsiccatas que foram depositadas no Herbário de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (HMP – UNAERP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil).

6.2 Análise da variabilidade genética

6.2.1 Extração do DNA

Foram selecionadas folhas para a extração do DNA genômico pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE 1987) com algumas modificações. O tampão de extração ($1000\mu\text{L}$) foi adicionado sobre 100 mg de folha, macerados em nitrogênio líquido, homogeneizado a 4°C e, em seguida, foi incubado em banho-maria a 65°C por 30 min. Posteriormente, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente e, se adicionou a ela $200\mu\text{L}$ de clorofil (clorofórmio + álcool isoamilico 24:1). Após agitação, o material foi centrifugado a $12000\text{ g}/2\text{min}$. A fase aquosa foi removida para outro tubo, à qual foram adicionados $600\mu\text{L}$ de isopropanol, misturando-se bem. Após centrifugação a $12000\text{ g}/5\text{min}$, foi adicionado ao sedimento 1 mL de tampão de lavagem (etanol 70% v/v e acetato de amônio 10mM), que permaneceu à temperatura ambiente por 20 min. A centrifugação foi repetida a $12000\text{ g}/5\text{min}$, o sobrenadante foi descartado e o sedimento (DNA) foi lavado duas vezes em etanol 70%, seguido de centrifugação a 12000 g por 5 min. Após uma hora de secagem, à temperatura ambiente, o “pellet” foi ressuscitado em $50\mu\text{L}$ de água deionizada. O DNA foi tratado com a enzima RNase para a retirada de RNA, que poderiam interferir nas análises posteriores. A quantidade e qualidade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% com tampão de corrida TEB 1X e a quantidade avaliada através do espectrofotômetro *NanoDrop* 1000 (Thermo Scientific).

6.2.2 Análise SRAP

A análise SRAP foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Li e Quiros (2001). Foram utilizados oito combinações de primers (Tabela 1) e as reações de PCR foram efetuadas contendo 1 µL de 10X tampão de reação, 0,8 µL de MgCl₂ (25mM), 1 µL de mix de dNTP (2,5mM), 0,4 µL primer Forward (Me) (5µM) e 0,4 µL primer Reverse (Em) (5µM), 0,2 µL *Taq* DNA polimerase (5U/ µL Fermentas), 1 µL de DNA (5ng/µL) e água deionizada para completar o volume de 10,0 µL. Esta reação foi submetida a cinco ciclos de amplificação a 94°C, 1 min, 35°C, 1 min, e 72°C, 1 min. Em seguida, a temperatura de hibridação foi aumentada para 50°C durante outros 35 ciclos.

Os produtos SRAP foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6% com tampão TBE 1X. A eletroforese foi realizada com tensão constante de 80V e temperatura máxima de 50°C por três horas e trinta minutos. O gel foi corado com solução de nitrato de prata e revelado em carbonato de sódio seguindo o protocolo descrito por Creste et al. (2001).

Tabela 1- Sequências das combinações dos primers SRAP

| Forward primers | Sequencias | Reverse primers | Sequencias |
|-----------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| Me1 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA TA-3' | Em2 | 5'-GCA TGC GTA CGA ATT TCG-3' |
| Me1 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA TA-3' | Em6 | 5'-GCA TGC GTA CGA ATT GCA-3' |
| Me2 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA GC-3' | Em2 | 5'-GCA TGC GTA CGA ATT TGC-3' |
| Me2 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA GC-3' | Em1 | 5'-GCA TGC GTA CGA ATT AAT-3' |
| Me3 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA AAT-3' | Em6 | 5'-GCA TGC GTA CGA ATT GCA-3' |
| Me3 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA AAT-3 | Em5 | 5'-GCA TGC GTA CGA ATT AAC-3' |
| Me4 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA CC-3' | Em4 | 5'-GCA TGC GTA CGA ATT TGA-3' |
| Me5 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA AG-3' | Em2 | 5'-GCA TGC GTA CGA ATT TCG-3' |

6.2.3 Análises Estatísticas

A partir da matriz binária (ausência ou presença de bandas) foram calculadas a distância genética, de acordo com Nei (1978), que conjuntamente com a distância

geográfica calculada com o software TrackMaker v.13.8 possibilitou que fosse realizada a correlação entre distância genética e geográfica pelo teste de Mantel (DINIZ-FILHO, 2000) utilizando os softwares Popgene32 e Genes v. 2009.7.0 com 1000 simulações, por meio da seguinte equação:

$$r = \frac{2}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \frac{(x_{ij} - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y})}{S_x S_y}$$

Onde:

X e Y = localização geográfica e distância genética nas localizações i e j

N = número de entrada de dados nas matrizes de distância

S_x e S_y = Desvios padrão para as variáveis x e y.

O fluxo gênico foi efetuado de acordo com o modelo proposto por Wright (1951) que através do valor do FST. (Índice de fixação) determina o número de migrantes por geração de acordo com a equação abaixo:

$$Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{st}} - 1 \right)$$

Em que:

m = taxa de migração;

N = tamanho populacional;

Nm = número de migrantes/geração.

Nei (1973, 1978) determinou que a probabilidade de identidade e não identidade gênica de dois genes escolhidos ao acaso é dado por: $J_i = \sum_k p_{ijk}^2$ e $H_i = 1 - J_i$, respectivamente, sendo esta a identidade genética dentro da subpopulação. A probabilidade de não identidade, H , portanto, é igual ao complemento aritmético da identidade gênica, o que é usualmente denominado de Heterozigiosidade.

O Índice de Shannon foi utilizado para medir o grau de certeza em se prever a proximidade genética entre as populações:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

Em que:

n = número de indivíduos de cada espécie;

S = número de espécies;

N = número total de todos os indivíduos

$$- \sum_{i=1}^S$$

Pi = abundância relativa de cada espécie, calculada pela proporção de indivíduos: n_i/N

O agrupamento baseou-se no modelo UPGMA e a consistência dos ramos foi obtida com bootstrap de 1000 réplicas.

A estrutura genética das populações foi analisada através da Análise em Coordenadas Principais (PCoA), pelo programa GenAlEx v.6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2006), e o programa STRUCTURE v.2.2.4 (PRITCHARD et al. 2000) através de agrupamento baseado no modelo Bayesiano e modelo de mistura (*Admixture model*) usando *burn-in* 200.000 seguido de uma extensão (*run length*) de 500.000, com cinco interações independentes e valores de K variando de 1 a 10. Para determinar o número de grupos genéticos utilizou-se o critério proposto por Evanno et al. (2005).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Coleta

As coletas foram realizadas em um total de 150 indivíduos, em populações naturais (Figura 4) nos municípios de Água Comprida, São Francisco Sales e Sacramento (MG), Pedregulho, (SP), Água Clara e Inocência (MS), Jataí e Marilândia (GO), com a autorização de acesso de componente do patrimônio genético n.0108443/2014-0. As coordenadas geográficas das populações de *B. gaudichaudii* apresentam-se na Tabela 2.

Figura 4 – Locais de coleta das populações de *Brosimun gaudichaudii* nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás



Tabela 2. Municípios, códigos e coordenadas geográficas dos acessos de *B. gaudichaudii*.

| População/ Município | Código | N | Latitude | Longitude | Altitude (m) |
|--------------------------|--------|----|--------------|-------------|--------------|
| São Francisco Sales (MG) | SF | 20 | 19°51'46,5 " | 49°44'41,7" | 458 |
| Água Comprida (MG) | AG | 20 | 19°53'44,8 " | 48°06'45,8" | 643 |
| Jataí (GO) | JT | 20 | 17°52'51,4" | 51°52'08,1" | 841 |
| Maurilândia (GO) | MA | 20 | 18°00'42,0 " | 50°21'19,4" | 506 |
| Inocência (MS) | IN | 20 | 19°42'55,7 " | 51°40'47,2" | 555 |
| Água Clara (MS) | AC | 20 | 20°26'06,1 " | 53°15'22,8" | 502 |
| Pedregulho (SP) | PE | 18 | 20°24'07,7 " | 47°25'33,3" | 975 |
| Sacramento (MG) | SA | 12 | 20°04'13,3 " | 47°24'04,7" | 605 |

N=número de indivíduos coletados

7.2 Extração do DNA

O procedimento utilizado para extração do DNA mostrou-se eficiente para a maioria dos indivíduos, como observado na Figura 5.

Figura 5 - Perfil de gel de agarose 1%, mostrando a integridade do DNA



7.3 Análise SRAP

As oito combinações de primers testadas para *B. gaudichaudii* amplificaram bandas. As combinações Me2/Em1, Me3/Em6 e Me1/Em2 foram escolhidas por apresentarem polimorfismos e nitidez nos fragmentos.

A análise dos géis resultou em 235 locus (Tabela 3), sendo constatado na segunda combinação de primers Me3/Em6, um número maior de bandas polimórficas (98%) e com a terceira combinação Me1/Em2, o menor número de bandas polimórficas (80%), com um total de 92% de polimorfismo nos indivíduos da espécie.

Tabela 3. Número e porcentagem de bandas polimórficas e combinação de primers SRAP na análise molecular de populações naturais de *B. gaudichaudii*.

| Combinações | N | Bandas Polimórficas | Bandas Monomórficas | Bandas Polimórficas % |
|-------------|-----|---------------------|---------------------|-----------------------|
| Me2 / Em1 | 80 | 77 | 3 | 96 |
| Me3 / Em6 | 80 | 78 | 2 | 98 |
| Me1 / Em2 | 75 | 60 | 15 | 80 |
| Total | 235 | 215 | 20 | 92 |

As populações de São Francisco Sales, Jataí e Inocência apresentaram maior variabilidade (84,26%), e maiores índices nos parâmetros genéticos avaliados (n_a , n_e , h e I), enquanto a população de Pedregulho apresentou um menor número de indivíduos polimórficos (71,91%) e conseqüentemente menores índices (Tabela 4). Isso pode ser explicado pelo fato de os indivíduos de Pedregulho estarem localizados em um ambiente mais influenciado pelo homem, onde havia um município, com isso as plantas estavam em uma área mais susceptível às interferências como, desmatamento para plantio de plantas cultivadas.

A correlação apresentada entre o índice de Nei (h) e o índice de Shannon (I) foi de $r = 0,98$, a correlação apresentada entre o índice de Nei (h) e a % de locus polimórficos foi de $r = 0,83$ e a correlação apresentada entre o índice de Shannon (I) e a % de locos polimórficos foi de $r = 0,88$, confirmando a alta correlação entre todos os índices utilizados (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros genéticos e estatística descritiva básica das oito populações de *B. gaudichaudii* por marcadores SRAP. **n**: número de indivíduos coletados; **na**: número de alelos observados; **ne**: número de alelos efetivos; **h**: índice de Nei; **I**: índice de Shanon; **% locus** polimórficos.

| População | n | na | ne | H | I | % locus polimórficos |
|---------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------|
| São Francisco Sales | 20 | 1,84 | 1,68 | 0,37 | 0,53 | 84,26 |
| Água Clara | 20 | 1,75 | 1,54 | 0,31 | 0,44 | 74,89 |
| Jataí | 20 | 1,84 | 1,65 | 0,36 | 0,51 | 84,26 |
| Maurilândia | 20 | 1,78 | 1,53 | 0,30 | 0,44 | 78,30 |
| Inocência | 20 | 1,84 | 1,66 | 0,36 | 0,52 | 84,26 |
| Água Comprida | 20 | 1,75 | 1,56 | 0,31 | 0,46 | 75,32 |
| Pedregulho | 18 | 1,72 | 1,59 | 0,32 | 0,45 | 71,91 |
| Sacramento | 12 | 1,76 | 1,59 | 0,33 | 0,47 | 76,17 |
| Total | 150 | 1,91 | 1,72 | 0,39 | 0,56 | 91,49 |

Um elevado polimorfismo também foi encontrado em diversos estudos utilizando vários marcadores moleculares. Em *Malpighia emarginata* (SALLA et al., 2002); *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (GANGA et al., 2004); *Euterpe edulis* Mart. (CARDOSO et al., 2000) e *Butia capitata* (BUTTOW et al., 2010).

Através do Teste de Mantel as populações amostradas tiveram suas distâncias genéticas e geográficas calculadas (Tabela 5) indicando a ausência de correlação, sugerindo, portanto que as populações naturais de *B. gaudichaudii* estão estruturadas em modelo de ilhas, definido por FUTUYMA (1997), como sendo um modelo de fluxo gênico que a migração ocorre ao acaso entre um grupo de pequenas populações. Nessas populações já pode ser constatado o início de fixação dos alelos. Resultados similares foram encontrados em trabalhos realizados com *Myrcia splendens* (BRANDÃO, 2008) e *Erythrina mulungu* (BENINCASA, 2015), sendo necessário nestes casos o estabelecimento de estratégias de conservação para essas espécies.

Tabela 5. Distância geográfica e genética. Acima da diagonal estão representadas as distâncias geográficas e abaixo da diagonal as distâncias genéticas. SF: São Francisco Sales; AG: Água Clara; JT: Jataí; MA: Maurilândia; IN: Inocência; AC: Água Comprida; PE: Pedregulho; SA: Sacramento.

| | SF | AG | JT | MA | IN | AC | PE | SA |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| SF | * | 178,5 | 90,2 | 274,3 | 362,7 | 134,2 | 251,4 | 270,2 |
| AG | 0,1030 | * | 141,3 | 247,9 | 292,4 | 117,1 | 73,4 | 99,2 |
| JT | 0,0891 | 0,0735 | * | 186,4 | 274,4 | 165,1 | 212,6 | 240,4 |
| MA | 0,0854 | 0,1322 | 0,0833 | * | 105,1 | 331,9 | 286,4 | 320,2 |
| IN | 0,0999 | 0,0960 | 0,0640 | 0,0998 | * | 328,1 | 213,1 | 338,1 |
| AC | 0,1516 | 0,1017 | 0,1005 | 0,1837 | 0,0818 | * | 165,2 | 170,3 |
| PE | 0,1163 | 0,1199 | 0,1013 | 0,1688 | 0,0974 | 0,9668 | * | 10,1 |
| SA | 0,1236 | 0,1336 | 0,0810 | 0,1433 | 0,0930 | 0,1154 | 0,1064 | * |

Em *B.gaudichaudii* foi constatada maior variabilidade genética dentro (85%) do que entre (15%) as populações (Tabela 6), o que mostra que a conservação será mais eficiente, se feita ao coletar um maior número de indivíduo dentro das populações.

Tabela 6. Resumo da AMOVA (Análise Molecular de Variância): porcentagem da variação total observada entre e dentro de populações de *Brosimum gaudichaudii*.

GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrados médios.

| Fonte | GL | SQ | QM | Componente de variância | % |
|-------------|-----|----------|---------|-------------------------|-----|
| Entre Pops | 7 | 992,054 | 141,722 | 5,817 | 15 |
| Dentro Pops | 142 | 4679,572 | 32,955 | 32,955 | 85 |
| Total | 149 | 5671,627 | | 38,772 | 100 |

A variabilidade encontrada dentro das populações avaliadas nesse trabalho está de acordo com a afirmação de Loveless e Hamrick (1984), de que a existência de maior variabilidade dentro das populações do que entre elas é típico de espécies que apresentam mecanismos eficientes de dispersão de pólen e sementes. Portanto as habilidades dos indivíduos em trocar genes, associadas ao fluxo gênico entre

populações, reduzem as diferenças entre populações por deriva genética e seleção, reduzindo a diversidade genética entre as populações (KAGEYAMA et al., 2003). Exemplos de resultados similares foram obtidos com: *Vellozia epidendroides*, *Eugenia dysenterica*, *Caryocar brasiliense*, *Gochnatia pulchra*, *Bulbophyllum ipanemense*, *Dimorphandra mollis*, *Tibouchina papyrus*, *Dipteryx alata* e *Solanum lycocarpum* (CAVALCANTI, 2010).

Os valores estatísticos obtidos a partir de probabilidades de identidade por descendência tais como F_{st} , são estimados e comparados às expectativas sob a estrutura de populações. Ele demonstra que a relação entre F_{st} e o número de migrantes por geração (Nm) é frequentemente empregado para quantificar o fluxo gênico. Esta relação tem sido demonstrada aproximar-se da relação entre F_{st} e o número de migrantes em modelo de ilhas em um espaço bidimensional, e é utilizado na obtenção de estimativas indiretas do número de migrantes, a partir de dados genéticos (ROUSSET, 1997).

Esse é um modelo convencional de genética de populações de troca de genes entre populações. Assume equilíbrio entre migração e deriva genética entre todas as populações. Há igual troca de genes entre populações, e parte da premissa de que todas as populações são iguais fontes de migrantes e produz estimativas que não refletem a variação da troca de genes entre populações ou mudanças atuais no processo dispersivo (ZUCCHI, 2002).

As populações amostradas de *Brosimum gaudichaudii* apresentaram fluxo gênico acima de um migrante por geração ($Nm = 2,74$), esse valor ainda é considerado baixo para uma população natural. Smouse et al. (2001) afirmam que quanto maior a estruturação das populações, menor será a dispersão de pólen e conseqüentemente, menor o fluxo gênico. O fluxo gênico, dessa forma, atua como um fator evolutivo responsável pela homogeneização das populações, restringindo os efeitos da deriva genética e seleção (SEOANE et al., 2000).

Oliveira (2015) encontrou fluxo gênico de 1,18 em *Croton antisiphiliticus*, sugerindo a dificuldade de dispersão da espécie. Em estudo com *Erythrina mulungu*, Benincasa (2015) verificou fluxo gênico de 1,66, também considerado baixo.

Em contrapartida, em relação ao Índice de Fixação de alelos, o valor encontrado para *B. gaudichaudii* ($F_{st} = 0,15$) é considerado moderado, próximo ao

limite proposto por WRIGHT (1978) que é de 0,25, e mostra que há uma grande estruturação populacional. Quanto maior o valor de F_{st} menor é a capacidade de dispersão da espécie, ou seja, há dificuldade de troca de alelos entre elas, o que aumenta a probabilidade de estas populações tornarem-se endogâmicas

Os valores de fluxo gênico e índice de fixação de alelos encontrados na espécie refletem a situação nos locais coletados, que sofreram fortemente a ação do homem, resultando assim em populações estruturadas em modelo de ilha como foi constatado no Teste de Mantel o que está condizente com outros trabalhos encontrados na literatura para as espécies características do Cerrado: *Eugenia uniflora* L. (FRAZON et al., 2010) e *Stryphnodendron adstringens* (GLASENAPP et al., 2013).

A análise de Coordenadas Principais (Figura 6) revelou a tendência das populações de Maurilândia (MA) e São Francisco Sales (SF) serem as mais distantes geneticamente das demais populações analisadas, tendendo a formação de dois grupos gênicos entre as populações. O grupo 1 foi formado pelas populações de MA: Maurilândia e SF: São Francisco Sales; e o grupo 2 formado pelas populações de AG: Água Clara; JT: Jataí; IN: Inocência; AC: Água Comprida; PE: Pedregulho; SA: Sacramento, o que foi corroborado pelo dendograma (Figura 7).

Figura 6. Gráfico de dispersão em coordenadas principais (PCoA) obtido a partir da matriz de similaridade de Jaccard, estimada com marcadores moleculares SRAP entre indivíduos de oito populações naturais de *Brosimum gaudichaudii*. SF: São Francisco Sales; AG: Água Clara; JT: Jataí; MA: Maurilândia; IN: Inocência; AC: Água Comprida; PE: Pedregulho; SA: Sacramento.

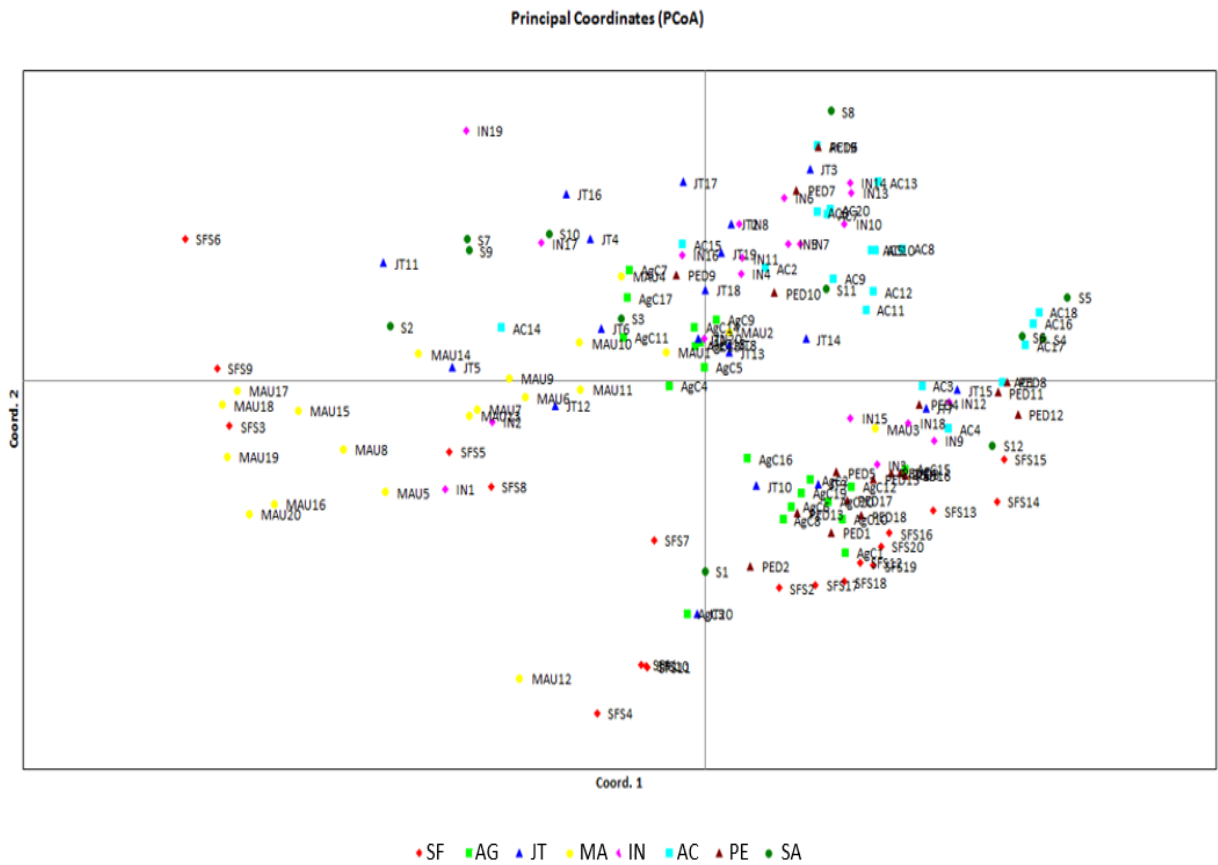
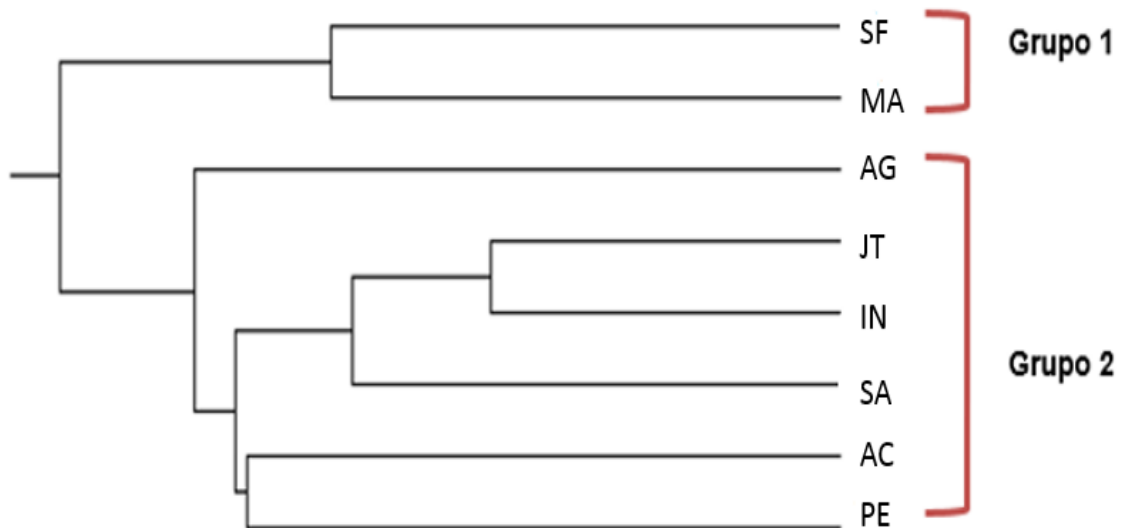
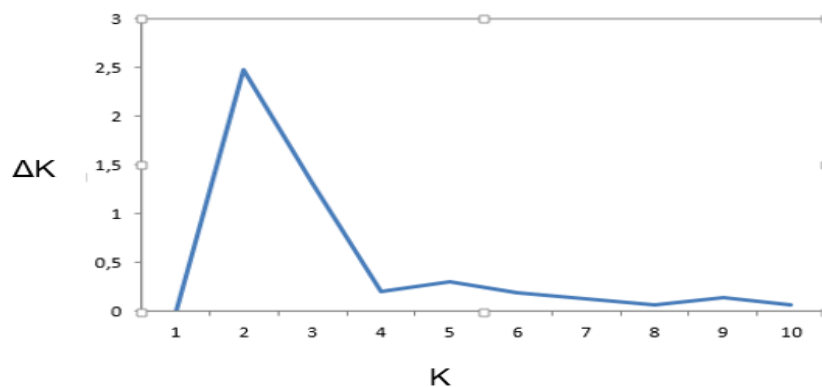


Figura 7. Dendograma de similaridade genética entre as populações naturais de *Brosimum gaudichaudii* obtido pela análise de agrupamento UPGMA, com base nos dados da análise molecular pela técnica SRAP. SF: São Francisco Sales; AG: Água Clara; JT: Jataí; MA: Maurilândia; IN: Inocência; AC: Água Comprida; PE: Pedregulho; SA: Sacramento.



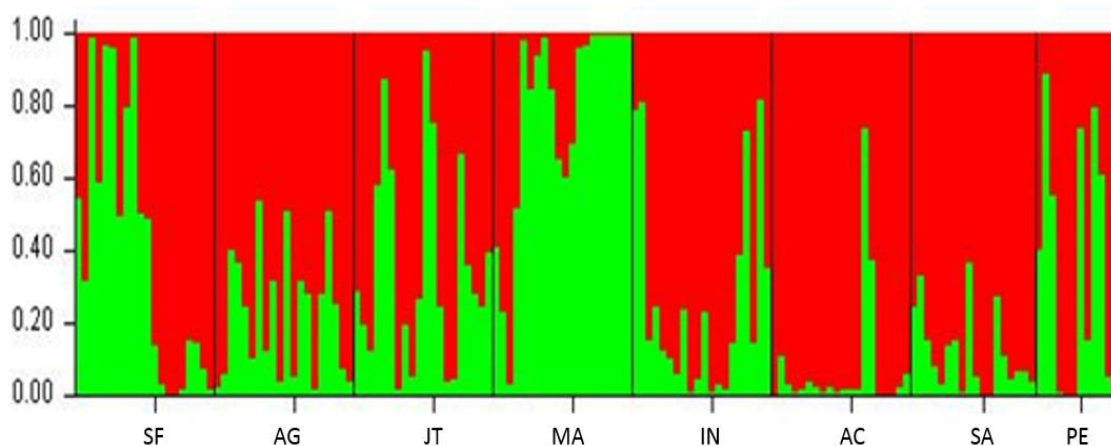
A partir dos resultados gerados pelo programa Structure, utilizando uma abordagem bayesiana, as oito populações naturais de *B. gaudichaudii* estão estruturados em dois grupos gênicos, sendo o melhor $K = 2$, de acordo com a Figura 8, segundo Evanno (2005). Outros trabalhos encontrados na literatura para o melhor valor de $K=2$: *Phaseolus vulgaris* (FARIA et. al., 2012) e *Erythrina mulungu* (BENINCASA, 2015).

Figura 8. Magnitude de ΔK em função do K.



É possível identificar os grupos gênicos, na Figura 9, representados em verde e vermelho. Cada uma das cores indica um grupo baseado em semelhanças genotípicas. Portanto este resultado confirma que as populações naturais de São Francisco Sales e Maurilândia, são divergentes das demais populações. Do ponto de vista genético, a fragmentação pode alterar o fluxo gênico entre as populações, de maneira que elas se tornem mais susceptíveis aos processos de endogamia e deriva genética, o que significa ocorrer um afastamento das frequências de seus alelos comparados aos da população original (KAGEYAMA et al., 1998).

Figura 9. Agrupamentos de grupos gênicos das populações da espécie *B. gaudichaudii*. SF: São Francisco Sales; Ag: Água Clara; JT: Jataí; MA: Maurilândia; IN: Inocência; AC: Água Comprida; PE: Pedregulho; SA: Sacramento



O gráfico apresentado na Figura 10 foi gerado com dados através do programa STRUCTURE demonstrando a proporção dos grupos gênicos para cada população. Para cada população a proporção de um grupo é variável, e destacam-se as populações de SF e MA com as maiores proporções do grupo gênico de coloração verde (0,412% e 0,782%). Com isso, podemos inferir que são duas populações naturais de *B. gaudichaudii* com características bem semelhantes entre si, apesar da distância geográfica que as separam.

Figura 10. Proporção dos grupos gênicos de cada população.



Segundo Melo (2012), as análises de agrupamento são baseadas na similaridade ou dissimilaridade (distância) entre grupos, sendo que a similaridade entre estes consiste dependência entre eles. O conhecimento e o entendimento do padrão de distribuição dos genótipos no espaço geográfico são extremamente importantes para a conservação dos recursos naturais, pois auxiliam a definição de estratégias de conservação para espécies ameaçadas.

Para a espécie *B. gaudichaudii* o marcador molecular SRAP apresentou simplicidade, reprodutibilidade e forneceu informações de grande importância para analisar a relação genética entre as populações. Isso pôde ser observado em várias espécies utilizando o mesmo marcador molecular, como *Prunus pérsica* (AHMAD et al., 2004), *Diospyros* L. (JING et al., 2013), *Phaseolus vulgaris* (CEYLAN et al., 2014), *Salvia miltiorrhiza* (PENG et al., 2014), *Pleurotus pulmonarius*, (YIN et al., 2014), *Zanthoxylum* (FENG et al., 2015).

8. CONCLUSÃO

O marcador molecular SRAP foi eficiente para caracterizar a variabilidade genética em populações naturais de *Brosimum gaudichaudii*, identificando dois grupos distintos, podemos concluir que a variabilidade genética é maior dentro das

populações do que entre elas, apresentando estruturadas em modelo de ilhas com um índice de fixação de alelos moderado.

As estimativas estatísticas ressaltam a relevância deste trabalho e indicam a necessidade de se iniciar programas para a conservação da espécie, sugerindo a coleta de um maior número de indivíduos dentro das populações que obtivemos a maior diversidade genética.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, R.; FARHATULLAH; QUIROS, C. F.; RAHMAN, H.; SWATI, Z. A. Genetic diversity analyses of *Brassica napus* accessions using SRAP molecular markers. **Plant Genetic Resources**, v.12, n.1, p.14-21, 2014.

ALGHAMDI, S.S.; AL-FAIFI, S. A.; MIGDADI, H.M.; KHA, M. A.; EL-HARTY, E. H.; AMMAR, M. H. Molecular Diversity Assessment Using Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) markers in *Vicia faba* L. **International Journal Molecular Sciences**, v.13, p.16457-16471, 2012.

ALICE, C.B. et al., Plantas medicinais de uso popular: **Atlas farmacológico**. 208p. 1995.

ANATEL, R.L. et al., Avaliação clínica toxicológica preliminar do Viticromin® em pacientes com vitiligo. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.1, p.15-23, 2005.

BABAEI, S.; TALEBI, M; BAHARA, M.; ZEINALI, H. Analysis of genetic diversity among saffron (*Crocus sativus*) accessions from different regions of Iran as revealed by SRAP markers. **Scientia Horticulturae**, v.171, p.27-31, 2014.

BADRKHANI, N.; RAHMAN, F.; LARTI, M. Evaluation of genetic diversity in *Alcea* (Malvaceae) using Srap markers. **Botanical Sciences**, v.92, n.3, p. 433-439, 2014.

BALERONI, C. R. S., MORAES, M. L. T., MORAES, S. M. B., SOUZA, C. S. S., SÁ, M. E.; Composição química de sementes das espécies florestais mamica-de-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trec), marolo arbóreo (*Annona crassiflora* Mart.), marolo rasteiro (*Annona dióica* St. Hil.), chichá-docerrado (*Sterculia a* St. Hil. Ex Turpin) e imbuia (*Ocotea porosa* (Nees) L. Barroso), **Ciências. Agr. Saúde**. FEA, Andradina, v. 2, n. 1, jan-jun, 2002, p 28 – 32.

BENINCASA, B. I. Estudo da diversidade química e genética em populações naturais de *Erythrina mulungu* Mart. Ex. Benth. 56f. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP. 2015.

BESSA, N.G.F.de; BORGES, J.C.M.; BESERRA, F.P.; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.U; QUIRINO, M.S; CALIXTO, J.B. Efficacy, Safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, n.2, p.179-189, 2000.

BRANDÃO, Murilo Malveira. DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Myrcia splendens* (SW.) DC. (MYRTACEAE) POR MARCADORES ISSR EM SISTEMA CORREDOR-FRAGMENTO SEMIDECIDUAIS NO SUL DE MINAS GERAIS. 2008. 80 f. **Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Florestal**, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BUTTOW, M.V. et al. Caracterização molecular de populações de *Butia capitata* (Arecaceae) do Sul do Brasil através de marcadores AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 1, p.230-239, 2010.

CASTRO, R. M. Flora da Bahia – Moraceae. Universidade Estadual de Feira de Santana Departamento de Ciências Biológicas **Programa de Pós-Graduação em Botânica. Dissertação** , 2006, 156 p.

CAVALCANTI, F.A.G.S.. MODELAGEM DE NICHOS EM ESPÉCIES DE PLANTAS DO CERRADO E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA VARIABILIDADE GENÉTICA. 2010. 95 f. **Tese (Doutorado) - Curso de Ecologia e Evolução, Universidade Federal de Goiás**, Goiânia, 2010.

CEYLAN, A. et al. Genetic diversity among the Turkish common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) as assessed by SRAP, POGP and cpSSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 54, p. 219-229, 2014.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**. Campinas, v.15, n.4, supl.I, p.692-707, 2013.

CHANG, D.; YANG, F.Y.; YAN, J.J.; WU, Y.Q.; BAI, S.Q.; LIANG, X.Z.; ZHANG, Y.W.; GAN, M. SRAP analysis of genetic diversity of nine native populations of wild sugarcane, *Saccharum spontaneum*, from Sichuan, China. **Genetic and Molecular Research**, v.11, n.2, p.1245-1253, 2012.

CHEN, S.; ZHOU, J.; CHEN, Q.; CHANG, Y.; DU, J.; MENG, H. Analysis of the genetic diversity of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm by SRAP. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.50, p.139-146, 2013.

CHRISTIANINI, A.V., ANTONELLI, A., RODRIGUES, G.B. & VIANI, R.A.G. 2004. Síndromes de dispersão e distribuição espacial de indivíduos de sete espécies lenhosas do cerrado. In: Relatórios da disciplina NE211 – PPGEcologia. (F.A.M. Santos, F.R. Martins, J.Y. Tamashiro, coords.). **Universidade Estadual de Campinas**, Campinas

CHUKR N.S., CAPELLARI JR L (2003) Iridaceae. In: WANDERLEY MGL, SHEPHERD GJ, GIULIETTI AM AND MELHEM TS (eds) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. RiMa, São Paulo, pp 127-147.

CORRÊA, R.S.; MELO FILHO, B.; BAPTISTA, G.M.M. Avaliação fitossociológica da sucessão autogênica em áreas Mineradas no distrito federal. **Revista Cerne**, v.13, n.4, p.406-15, 2007.

CRESTE. S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306. 2001.

CUNHA, L.C; PAULA, J.R; SÁ, V.A; AMORIM, M.E.P; BARROS, I.C.M; BRITO, L.A.B; SILVEIRA, N. Acute toxicity of *Brosimum gaudichaudii* Trécul. root extract in mice: determination of both approximate and median lethal doses. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 532-538, 2008.

DATWYLER, S. L, WEIBLEN, G. D. On the origin of the fig: phylogenetic Relationships of moraceae from Ndhf sequences. **American Journal of Botany**, v. 91, n.5, p. 767–777., 2004.

DINIZ-FILHO JAF (2000) Métodos Filogenéticos Comparativos. **Holos, Ribeirão Preto**, 162 pp.

DIXON, D.J. Moraceae. In Short, P.S. & Cowie, I.D. (eds), Flora of the Darwin Region. **Northern Territory Herbarium, Department of Natural Resources**, Environment, the Arts and Sport, v. 1, p. 1–26, 2011.

DUKE, J.A. *Promising phytomedicinals*. In: JANICK, J. & SIMON, J.E. Advances in new crops. **Timber Press**, p. 491-498, Portland, 1990.

DURIGAN, G. et. al.; **Manual para recuperação da vegetação de cerrado**. 3.ed.rev. e atual. São Paulo : SMA, 2011.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620. 2005.

EXCOFFIER L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variante inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics, Austin, Tex., US**, v. 131, p. 479-491, 1992.

FALK, D.A., An introduction to restoration genetics, **Knapp, E.E., Guerrant, E.O.; Society of Ecological Restauration**, 2002.

FAN, X.; JIANG, J.; ZHANG, Y.; SUN, H.; JIAO, J.; LIU, C. Genetic diversity assessment of *Vitis ficifolia* Bge. Populations from Henan province of China by SRAP markers. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.29, n.1, p.15-20, 2015.

FARIA, R. A. P. G., ALBUQUERQUE, M. C. F., COELHO, M. F. B., Tamanho da semente e sombreamento no desenvolvimento inicial de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. **Revista Caatinga, Mossoró**, v. 26, n. 1, p. 09-15, jan.-mar., 2013.

FARIA, R.A.P.G.; COELHO, M.F.B., MARTINEZ, M.E.; AZEVEDO, R.A.B.; uso de um modelo matemático no estudo do desenvolvimento de mudas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. **Revista Verde** (Mossoró – RN – Brasil) v.6, n.5, p. 54 - 60 dezembro de 2011 (EDICAO ESPECIAL), <http://revista.gvaa.com.br>.

FENG, F.; CHEN, M.; ZHANG, D.; SUI, X.; HAN, S. Application of SRAP in the genetic diversity of *Pinus koraiensis* of different provenances. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n.6, p. 1000-1008, 2009.

FIRMO, W.C.A.; MENEZES, V.J.M.; PASSOS, C.E.C.; DIAS, C.N.; ALVES, L.P.L.; NETO, M.S.; OLEA, R.S.G.; Contexto Histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais, **Cad. Pesquisa. São Luis**, v.18, n.especial, dez. 2011.

FORZZA, R. C., org., et al. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson. Estúdio: **Instituto de pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 2, p. 828, 2010.

FRANZON, Rodrigo Cezar; CASTRO, Caroline Marques; RASEIRA, Maria Do Carmo Bassols. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p.240-250, mar. 2010.

FUTUYMA D.J., Biologia Evolutiva, 2ed. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, 1997, 144p.

GLASENAPP, Jaqueline Siqueira et al. DESCRIÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE BARBATIMÃO *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DE MINAS GERAIS. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 1, p.103-112, 2014

GOBBO-NETO, L., LOPES, N.; Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007

GOIS, Itamara Bomfim. **VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Zizyphus joazeiro* MART. E *Cassia grandis* L.f., POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES ITAMARA BOMFIM**. 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ecologia e Conservação, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2010.

GRIBEL, R. Biologia reprodutiva de plantas amazônicas: importância para o uso, manejo e conservação dos recursos naturais. **Humanidades**, Brasília, DF, n.48, p.110-114, 2001.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspect of Medicine**, n. 27, p. 1-93, 2006.

HERMUCHE,P.M; GUIMARÃES, G.M.A; CASTRO, S.S., Análise dos comportamentos morfopedológicos como subsídio ao planejamento do uso do solo em Jataí – GO. **GEOUSP - Espaço e Tempo, São Paulo**, Nº 26, pp. 113 - 131, 2009

HOLSINGER K.E., P.O. LEWIS & D.K. DEY. A Bayesian method for analysis of genetic population structure with dominant marker data. **Molecular Ecology**, v.11, p.1157–1164. 2002.

HOLSINGER, K.E.; LEWIS, P.O. Department of Ecology & Evolutionary Biology. **The University of Connecticut**. 2003. HICKORY v. 1.0. (Disponível em: www/eeb.uconn.edu/).

HUANG, L.K.; JIANG, X.Y.; HUANG, Q.T.; XIAO, Y.F.; CHEN, Z.H.; ZHANG, X.Q.; MIAO, J.M.; YAN, H.D. Genetic diversity and relationships in cultivars of *Lolium multitorum* Lam. using sequence-related amplified polymorphism markers. **Genetic and Molecular Research**, v.13, n.4, p.10142-10149, 2014.

JACOMASSI, E., MOSCHETA, I. S., MACHADO, S. R.; Morfoanatomia e histoquímica de órgãos reprodutivos de *Brosimum gaudichaudii* (Moraceae). **Revista Brasil Botânica**, V.33, n.1, p.115-129, jan.-mar 2010.

JING, Z. B. et al. Genetic diversity and relationships between and within persimmon (*Diospyros* L.) wild species and cultivated varieties by SRAP markers. **Plant and Systematics Evolution**, v.299, p.1485-1492, 2013.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**. v.12, p.65-70, 1998.

KLEIN, Aldo Luiz (Org.). Eugen Warming e o cerrado brasileiro: Um século depois. [S. L.]: **Unesp**, 2002. 156 p.

LEÃO, A.R.; CUNHA, L.C.; PARENTE, L.M.L.; CASTRO, L.C.M.; CHAUL, A.; CARVALHO, H.E.; RODRIGUES,V.B.; BASTOS, M.A. Avaliação clínica toxicológica preliminar do Viticromin® em pacientes com vitiligo. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n. 1, p. 15-23, 2005.

LEGATES, D R; McCABE JR, G J. Evaluating the use of “goodness-of-fit” measures in hydrologic and hydroclimatic model validation. **Water Resources Research**, v. 35, n. 1, p. 233–241, 1999.

LI, G., e QUIROS C. F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theoretical and Applied Genetics** 103 : 455 – 461, 2001.

LI G., MACVETTY, P. B. E., QUIROS, C. F. SRAP Molecular Marker Technology in Plant Science. **Plant Breeding from Laboratories to Fields**. Chapter 2, P. 23-43, 2013.

LOVELLES, M. D.; HAMDRICK, J. L. Ecological Determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**. Palo Alto, v.15, p.65-95, 1984.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v.3, p.91-99. 1994

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 40-44, 2004.

MARACAHIPES, L., LENZA, E., MARIMON, B.S., OLIVEIRA, E.A., PINTO, J.R.R. & MARIMON JR., B.H. Structure and floristic composition of woody vegetation in cerrado rupestre in the Cerrado-Amazonian Forest transition zone, Mato Grosso, Brazil. **Biota Neotrop.** 11(1): <http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1/en/abstract?article+bn02111012011>

MELO, A. T. O. Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica. 2012. 87 f. **Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)** – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012

MMA, MINISTÉRIO MEIO AMBIENTE. Cerrado e pantanal: áreas e ações prioritárias para conservação da biodiversidade (Série Biodiversidade 17). **Ministério do Meio Ambiente**. – Brasília: MMA, 2007.

MS - Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos - Departamento de Assistência Farmacêutica**. p.60. Distrito Federal, 2006.

MS - Ministério da Saúde. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos - Departamento de Assistência Farmacêutica**. p.47. Distrito Federal, 2009.

MUNOS B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. **Nature Review Drugs Discovery**. v.8, p. 959–968, 2009.

NEWMAN D.J.; CRAGG G.M. Natural products as sources of new drugs over 30 years from 1981 to 2010. **Journal Nature Products**. v.75, p. 311–335, 2012.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v.70, p. 3321-3323, 1973.

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

NERI, A.V., NETO J.A.A., SILVA, A.F., MARTINS, S.V., SAPORETTI, A.W.J. Composição florística de uma área de cerrado sensu stricto no município de Senador Modestino Gonçalves, Vale do Jequitinhonha (MG) e análise de similaridade florística de algumas áreas de cerrado em Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.31, n.6, p.1109-1119, 2007

PALHARES, D.; PAULA, J.E.; SILVEIRA, C.E.S. Morphology of stem and subterranean system of *Brosimum gaudichaudii* Trécul.. (Moraceae). **Acta Botânica Hungarica**, v.48, n.1-2, 2006

PALHARES, D; SILVEIRA, C.E.S. Aspectos morfológicos de plantas jovens de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae) produzidas em condições alternativas de cultivo. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, v.9, n.1, p.93-96, 2007.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. Genealex 6.5: genetic analysis in Exel population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288 295, 2006.

PENG, X.; JI, Q.; FAN, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, J. Genetic diversity in populations of the endangered medicinal plant *Tetrastigma hemsleyanum* revealed by ISSR and SRAP markers: implications for conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Published online, 2015.

POZETTI, G.L. *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae): da planta ao medicamento. **Revista de Ciên. Farm. Básica Aplicada**, v. 26, n.3, p. 159-166, 2005.

RIBEIRO, R. A., RODRIGUES, F. M.; Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista Ciências médicas e biológicas.**, Salvador, v. 5, n. 3, p. 253-260, set./dez. 2006.

ROBARTS D. W. H., e WOLFE A. D., REVIEW ARTICLE sequence-related amplified polymorphism (srp) markers: a potential resource for studies in plant molecular biology. **Applications in Plant Sciences** 2014.

ROMERO R., e NAKAJIMA J.,N., Espécies endêmicas do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, V.22, n.2(suplemento), p.259-265, out. 1999.

ROUSSET, F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. **Genetics**, v. 145, p. 1219-1228, 1997.

SAEBNAZAR, A.; RAHMANI, F. Genetic Variation Among *Salvia* Species Based on Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP). **Journal of Plant Physiology and Breeding**, v.3, n.1, p.71-78, 2013.

SALLA, M.F.S. et al. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D. C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n. 1, p. 15-22, 2002.

SANTANA, M L; DE PAULA, E R; ROSA F M. estudo cienciométrico e etnobotânico sobre uma planta medicinal do cerrado mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul). **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 7, n. 2, 2012.

SANTOS, M. M.; NUNES, M. G. S.; MARTINS, R. D.; Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. vol.14 no.2 Botucatu 2012.

SANTOS, A. Moraceae Gaudich. (excl. Ficus) da Serra da Mantiqueira São Paulo. **Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Dissertação**, 2012, p. 127

SASAKI D., MELLO-SILVA R., Levantamento florístico no cerrado de Pedregulho, SP, Brasil. **Acta botânica brasileira**. 22(1): 187-202. 2008.

SOUZA-CHIES, T.T. et al. Studies on diversity and evolution of Iridaceae species in southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 35, 4 (suppl), 1027-1035 (2012)

SCHWIRKOWSKI, P. http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=7216

SILVA, D B; VIEIRA, R F; CORDEIRO, M C T; PEREIRA, E B C; PEREIRA, A. Propagação vegetativa de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (mama-cadela) por estacas de raízes. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.13, n.2, p.151-156, 2011.

SOUZA M., <http://www.discoverlife.org/mp/20qsearch=Sisyrinchium+vaginatum>

TAVARES, J.S.F. Marcadores moleculares para a caracterização genética de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **Universiadde Estadual de Maringá, PR, 2011**.

TORRES, K. R. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**, In: EnFarMed, 3., 2009.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T., SÁ F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M., ROMANO, E.; **Glossário de biotecnologia vegetal. Brasília: Embrapa Hortaliças**, 2000. 128 p.

VALLE, J.S.; FONSECA, B.K.D.; NAKAMURA, S.S.; LINDE, G.A.; MATTANA, R.S.; MING, L.C.; COLAUTO, N.B.; Diversidade genética de populações naturais de paripoba (*Pothomorphe umbellata*) Miq.. por RAPD. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. vol.15 n.1 p. 47-53 Botucatu 2013.

ZANDONÁ, G L. Avaliação de estudos de atividades químicas e biológicas em plantas medicinais da região de Dourados-MS. **Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul. Curso de Química**. Trabalho De Conclusão de Curso, 2009, 36 p.

ZHANG, J.; YAN, J.; ZHANG, Y.I; MA, X.; BAI, S.; WU, Y.; DAO, Z.; LI, D.; ZHANG, C.; ZHANG, Y.; YOU, M.; YANG, F.; ZHANG, J. Molecular Insights of Genetic Variation in *Erianthus arundinaceus* Populations Native to China. **Plos One**, v.8, n.11, 2013

ZHONG, J.J. Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology** 72: 2-26, 2001.

ZHUCCI, M. I. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. **Tese (Doutorado). Escola superior de Agroicultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo**. 148f. 2002.

YIN, Y. G. et al. Genetic diversity of *Pleurotus pulmonarius* revealed by RAPD, ISSR and SRAP fingerprinting. **Current Microbiology**, v. 68, p. 397-403, 2014.