



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Caracterização genética de populações naturais de *Palicourea coriacea*
(Cham) K. Schum utilizando marcadores moleculares**

TARYANA COELHO SALES BARBOSA

Orientador:

Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

AGOSTO - 2006

TARYANA COELHO SALES BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE
PALICOUREA CORIACEA (CHAM) K. SCHUM UTILIZANDO
MARCADORES MOLECULARES**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:

Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

Goiânia, GO – Brasil

2006

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Barbosa, Taryana Coelho Sales.

B238c Caracterização genética de populações naturais de *Palicourea coriacea* (Cham) K. Schum utilizando marcadores moleculares / Taryana Coelho Sales. – 2007. 91 f. : il., tabs., figs.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás. Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2007.

Bibliografia: f. 74-86.

Inclui listas de tabelas e de figuras.
Anexos.

1. *Palicourea coriacea* – Variabilidade genética 2. Plantas medicinais (douradinha) – Cerrados 3. Marcadores moleculares RAPD) I. Sibov, Sérgio Tadeu II. Universidade Federal de Goiás. **Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos III. Título.**

CDU: 633.88:582.972(251.3)

FICHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Altair e Dalila pelo amor, carinho que sempre tiveram comigo e por sempre me incentivarem nos estudos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, pois sem ele seria impossível a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Professor Dr. Sérgio Tadeu Sibov gostaria de agradecer de forma muito especial pela paciência e seriedade com que me orientou na realização deste trabalho, pois com você aprendi muito.

A professora Lourdes Cardoso Laureano com quem comecei a aprender estudar as plantas medicinais e me indicou a douradinha para que eu pudesse estudá-la.

Gostaria de agradecer imensamente também, à professora Dra. Mariana Pires de Campos Telles pela grande ajuda na análise dos dados, pelos grandes ensinamentos que tive e que continuarei tendo e também por ter aceitado ser membro da banca de defesa.

A professora Glyn Mara Figueira muito obrigada por ter aceitado ser membro da banca de defesa dessa dissertação, pois tenho certeza que trará uma contribuição muito grande neste trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Agronomia na pessoa da Professora Dra. Mara Rúbia da Rocha.

Ao funcionário Wellington Barbosa do programa de pós-graduação em Agronomia.

A toda a minha família, tios, tias e primos em especial aos meus avós que sempre me apoiaram e sempre estiveram ao meu lado, em todas as etapas da minha vida.

A todos os colegas de Pós-graduação Luíce, Aracelle, Márcia, Thannya, Keyla, Mara, Raphael, Luciana, Fábio Telles, André, Andréia Juliana, Mansuêmia e Rita, pois com vocês pude aprender muito.

Em especial gostaria de agradecer as minhas amigas Luíce, Aracelle, Márcia e Thannya pessoas estas que me ensinaram o valor de uma amizade sincera.

A Sivany e Fabiana gostaria de agradecer a paciência que tiveram em me ensinar as atividades de laboratório.

Ao professor e colega Edson Duarte por ter me emprestado alguns de seus livros de plantas medicinais os quais me ajudaram muito.

Os estagiários e colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Escola de Agronomia da UFG César, Geovane, Agenor, Gisele, Lorena, Rudy, Luciana e Fábio pela grande ajuda na realização da parte experimental desse trabalho. E em especial gostaria muito de agradecer a estagiária Fernanda Araújo que me acompanhou no

laboratório desde o início e que me ajudou muito na realização deste trabalho, apesar da correria de final de curso, não poupou esforços para me ajudar.

Os meus colegas do ITS, também sou eternamente grata, pois foi com eles que comecei a dar os primeiros passos na pesquisa.

Ao Professor Ms. Roberto Malheiros, meus sinceros agradecimentos por tudo que aprendi e tenho aprendido a cada dia com a convivência no trabalho e também pela sua grande amizade.

Ao Professor Dr. Antônio Teixeira Neto muito obrigado por ter me ajudado na elaboração do mapa dos locais de coleta.

As minhas amigas, Neide, Raquel e Lorena que estão sempre ao meu lado em todos os momentos e que me ajudaram muito nas coletas.

O meu sincero agradecimento também ao meu amigo Teo que com os seus conhecimentos com plantas nativas, esteve presente em praticamente todas as coletas, me ajudando e foi quem me ajudou a identificar a douradinha pela primeira vez em campo.

Os estagiários do laboratório de Genética e Melhoramento da UCG, Felipe Gouveia e Dayane Melo pela grande ajuda na árdua tarefa de codificar os géis.

Ao Sr. Carlos Moreira que me levou nos locais de coleta em Correntina.

A Sra. Marisa dos Santos Pereira Araújo prefeita de Uruaçu pelo apoio e pela ajuda na coleta efetuada nessa região.

Ao Sr. Reginaldo pela ajuda e por ter autorizado a efetuar as coletas nas suas fazendas em Caiapônia e Perolândia.

Ao Sr. Wagner Rosa por também ter me autorizado a coletar no seu sítio em Cristianópolis.

Ao Sr. Binômio meu grande professor que muito me ensina, me incentiva e me orienta nos caminhos da pesquisa.

A professora Lucília Kato pelos ensinamentos na parte de química das plantas medicinais.

A professora Monalisa com quem pude muitas vezes tirar dúvidas e aprender muito.

Ao professor Breno Vasconcellos pelos seus ensinamentos.

Aos professores Lázaro, João Batista, Alexandre Siqueira, Patrícia, Jaison, Américo, Fabrício, Ronaldo e Mara muito obrigada pelos ensinamentos e pelas maravilhosas aulas que tive com vocês.

Ao Jorge sou eternamente grata pelo seu companheirismo e carinho pois me apoiou em todos os momentos da realização deste trabalho.

E por último gostaria de agradecer ao meu pai que compartilhou comigo todos os momentos dessa pesquisa e da minha vida, me ajudando nas coletas, me ensinando e sempre me incentivando.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	09
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 O BIOMA CERRADO	16
2.2 PLANTAS MEDICINAIS	23
2.2.1 Histórico.....	23
2.2.2 Plantas Medicinais no Brasil.....	25
2.2.3 Plantas Medicinais no Cerrado	27
2.3 A ESPÉCIE <i>Palicourea coriacea</i>	30
2.3.1 Descrição Botânica	30
2.3.2 Etnobotânica.....	32
2.3.3 Características Ecológicas.....	34
2.4 MARCADORES MOLECULARES	34
2.4.1 Tipos de Marcadores Moleculares.....	34
2.4.2 Marcadores Moleculares e Biodiversidade	38
2.5 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES	40
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	44
3.2 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE <i>PRIMERS</i>	46
3.3 AMPLIFICAÇÃO DO DNA UTILIZANDO MARCADORES RAPD	46
3.4 ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL	47
3.4.1 Divergência genética e padrão espacial.....	50
3.4.2 Métodos de estimação de fluxo gênico	51

3.4.3 Tamanho Efetivo	53
4 RESULTADOS	55
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES E LOCAIS DE COLETA	55
4.2 SELEÇÃO DE <i>PRIMERS</i> RAPD E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA.	58
4.3 ESTRUTURA GENÉTICA	61
4.4 DIVERGÊNCIA GENÉTICA E PADRÃO ESPACIAL	63
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÃO	73
7 REFERÊNCIAS	74
ANEXOS.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização e caracterização de cada local de coleta e caracterização de cada população de <i>P. coriacea</i> e suas respectivas coordenadas geográficas.....	45
Tabela 2. Esperanças matemáticas dos quadrados médios [E(QM)] para populações (P), indivíduos dentro de populações (I/P), conforme Excoffier et al. (1992).....	47
Tabela 3. Caracterização, tipo fisionômico, altitude e caracterização do solo das populações de <i>P. coriacea</i>	57
Tabela 4. Quantidade de indivíduos que foram coletados e a quantidade após a retirada dos indivíduos com mais de 30 % de dados perdidos	58
Tabela 5. <i>Primers</i> RAPD selecionados para a espécie <i>P. coriacea</i> com suas seqüências de bases nitrogenadas, número de locos amplificados e polimórficos	59
Tabela 6. Relação da heterozigosidade de Nei (He), porcentagem de locos polimórficos (LP), e número de locos polimórficos por população de <i>P. coriacea</i>	60
Tabela 7. Resultado da Análise de Variância Molecular (AMOVA) e estimativa de fluxo gênico (<i>Nm</i>) calculado pelo método de Wright (1951) com base em 164 locos RAPD	61
Tabela 8. Resultado da análise Bayesiana entre nove populações de <i>P. coriacea</i> incluindo todos os modelos testados e o ajuste do modelo Dbar e DIC	61
Tabela 9. Resultado da análise Bayesiana entre as nove populações de <i>P. coriacea</i> , incluindo as medidas de informação I_e e a distância H-d entre a distribuição <i>a posteriori</i> e uma distribuição β , para os quatro modelos testados	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica do Bioma Cerrado no Brasil	16
Figura 2. Os Subistemas do Sistema Biogeográfico do Cerrado	21
Figura 3. Fotos das flores, frutos, folhas e de toda planta da espécie <i>P. coriacea</i>	32
Figura 4. Mapa dos locais de coleta das populações de <i>P. coriacea</i> nos Estados de Goiás e Bahia.....	45
Figura 5. Perfil de amplificação do <i>primer</i> OPH-11 na população de Guapó com 29 indivíduos	59
Figura 6. Matriz de distância genética baseada em valores de Φ_{ST} par a par entre as nove populações de <i>P. coriacea</i> , com base em locos RAPD	63
Figura 7. Dendrograma gerado apartir do critério UPGMA apresentando as distâncias genéticas Φ_{ST} par a par entre as nove populações de <i>P. coriacea</i> com base em 164 locos RAPD. Correlação cofenética igual a 0,826	63
Figura 8. Matriz de distância genética baseada em valores de θ^B par a par entre as nove populações de <i>P. coriacea</i> , com base em locos RAPD	64
Figura 9. Dendrograma gerado apartir do critério UPGMA apresentando as distâncias genéticas θ^B par a par entre as nove populações de <i>P. coriacea</i> com base em 164 locos RAPD. Correlação cofenética igual a 0,814	64
Figura 10. Relação entre as distâncias genéticas de Nei e as distâncias geográficas entre as nove populações de <i>P. coriacea</i> . A correlação matricial ($r = 0,155$)	65

RESUMO

BARBOSA, T. C. S. **Caracterização genética de populações naturais de *Palicourea coriacea* (Cham) K. Schum utilizando marcadores moleculares.** 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)–Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006¹.

A espécie *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum é uma espécie pouco conhecida cientificamente, pertencente à família Rubiaceae, popularmente conhecida como douradinha. É utilizada pela medicina popular na terapia de doenças renais. O nome popular douradinha está associado à cor das brácteas e do caule e a espécie ocorre no bioma Cerrado, porém em diferentes fitofisionomias. Estudos sobre a diversidade genética e sua distribuição em populações naturais de *P. coriacea* são de extrema importância para a definição de estratégias adequadas de manejo e cultivo, porém não existem, na literatura, estudos dessa natureza. Este trabalho teve como objetivo avaliar a estrutura genética de nove populações naturais de *P. coriacea*, coletadas nos Estados de Goiás e Bahia e avaliar a diversidade genética dessas populações utilizando marcadores RAPD. A espécie *P. coriacea* apresentou um alto nível de diversidade genética, ou heterozigosidade esperada de Nei (1972) que variou entre 0,259 e 0,338 nas populações, com um total geral igual a 0,296. A AMOVA revelou que 23 % da variabilidade total se encontram entre populações e 77 % se encontra dentro de populações. As estimativas de fluxo gênico aparente (Nm) foram inferiores a um, ou seja, igual a 0,83. As análises do índice de fixação (f) por abordagem bayesiana forneceram valores médio igual a 0,98 sugerindo a possibilidade dessa espécie se comportar como uma espécie autógama. As análises de divergência genética e padrão espacial das populações utilizando as matrizes de θ^B e Φ_{ST} par a par revelou que não existe uma correlação entre distância geográfica e distância genética todas as nove populações se agrupam aleatoriamente, não obedecendo a sua origem geográfica. Assim, a hipótese previamente formulada de que populações geograficamente próximas teriam que ser geneticamente próximas, foi descartada pelos resultados obtidos no teste de Mantel onde a correlação foi igual a 0,155. Assim essa diferenciação interpopulacional relativamente alta permite recomendar uma estratégia de amostragem para a conservação *ex situ* da variabilidade genética, utilizando o maior número de populações possível. No que diz respeito a conservação *in situ*, deve ser levado em conta características genéticas e demográficas dessa espécie, considerando que esse fato implica na possibilidade de uma evolução contínua e no desenvolvimento de novas estratégias adaptativas. É necessário ter conhecimento sobre a distribuição da diversidade genética destas áreas com o intuito de auxiliar nas políticas para preservação não somente de populações naturais encontradas em parques nacionais, mas também preservação das reservas legais e propriedades privadas.

Palavras-chave: douradinha, variabilidade genética, RAPD.

¹ Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

ABSTRACT

BARBOSA, T.C.S. **Genetic characterization of natural populations of *Palicourea coriacea* (Cham) K. Schum using molecules markers.** 2006. 75 f. Dissertation (Master in Agronomy: Genetic and Plant Breeding)–Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.¹

The Species *Palicourea coriacea* (Cham) K,Shum is a species little know, it is belonging to the Rubiaceae family, popularly known as *douradinha*. The popular use medicine in the therapy of kidneys illnesses. The popular name *douradinha* is associated with the color of the bracts and of the stem and the species occurs in Cerrado's Bioma, however in different environments. Studies about the genetic diversity and its distribution in natural populations of *P. coriacea* are of extreme importance for the definition of adequate strategies of handling and cultivation, however they do not exist in literature, studies of this nature. This work had as objective to evaluate the genetic structure from nine natural populations of *P. coriacea*, collected in States of Goiás and Bahia and to evaluate the genetic diversity of these populations through markers RAPD. The *P. coriacea* species presented one high level of genetic diversity, or heterozygosity waited by Nei (1972) that it varied between 0,259 and 0,338 in the populations, with equal on average value the 0,296. The AMOVA disclosed that 23% of the total variability is meeting each other between populations. Although the estimates of apparent gene flow (N_m) have disclosed values inferior to one, on the other hand, equal the 0,83. The analyses of Bayesian Statistics had disclosed to a value of f (F_{IS}) equal the 0,98 suggesting the possibility of this species has behavior like autogamous species. The analyses of grouping of the populations using Bayesian and AMOVA statistics disclosed that it does not exist a correlation between geographic distance and genetic distance all the nine populations they grouping, eventually, not obeying its geographic origin. Then, the hypothesis previously formulated of that geographically next populations would be genetic next, was discarded for the results gotten for the Mantel test where it got a correlation of 0,155. In addition, this relatively high inter populations differentiation allows to recommend to a strategy *ex situ* of the genetic variability using the biggest possible number of populations. In what, the conservation says respect *in situ* must be taken in account characteristic genetic and demographic of this species considering that this fact implies in the possibility of a continuous evolution and in the development of new adaptable strategies. It is necessary to have conscience on the distribution of the genetic diversity of these areas with intention to not only promote polities for preservation of found natural populations in national parks, but yes to private preservation of the legal reserves and properties.

Key words: douradinha, genetic variability, RAPD.

¹ Adviser: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

1 INTRODUÇÃO

As plantas são importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma imensa diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (Wall & Wani, 1996).

O emprego de plantas medicinais como opção terapêutica é conhecida desde os primórdios da civilização. Várias espécies de plantas medicinais nativas utilizadas pela população e freqüentemente comercializadas, nunca foram identificadas botanicamente, nem tiveram comprovada sua eficácia terapêutica, não foram estudadas com relação a sua variabilidade genética ou tiveram seus princípios ativos identificados para que possam ser usadas como fitoterápicos e/ou utilizadas como modelos na síntese de fármacos.

A espécie *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. é uma espécie pouco conhecida, pertencente à família Rubiaceae, popularmente conhecida como douradinha e é utilizada pela medicina popular na terapia de doenças renais. A planta é arbustiva em estado selvagem, com até 80 cm de altura e ocorre freqüentemente formando moitas. Possui folhas opostas, ovais, amareladas e coriáceas. A inflorescência é apical com flores brancas e brácteas amarelas. O fruto é carnoso com várias sementes e o nome popular douradinha está associado à cor das brácteas e do caule (Silva, 1998).

As folhas de *P. coriacea* são preparadas na forma de chás caseiros, que é prática consagrada, tanto por comunidades rurais como por populações urbanas oriundas principalmente de regiões de Cerrado. Esse chá caseiro é indicado principalmente para inflamações de uretra, rins e como diurético (Laureano, 2001).

Ecossistemas tropicais, como a Floresta Amazônica e o Cerrado, vêm sendo alterados em grande escala. Com as atuais taxas de destruição das comunidades naturais, a extinção em massa de espécies é uma consequência eminente. Especificamente, no Brasil, um dos ecossistemas que vêm sofrendo maior pressão antrópica é o Cerrado. Essa pressão

se traduz principalmente pela expansão da fronteira agrícola, pois em extensas áreas contínuas a vegetação natural vem sendo substituída por monoculturas agrícolas, reflorestamentos monoespecíficos e pastagens, sem deixar amostras das formações vegetais que possam funcionar como bancos genéticos e refúgios da fauna e da flora (Mittermeier et al., 1992).

A conservação de recursos genéticos dos biomas tropicais é um dos tópicos mais prementes nos dias de hoje. A conservação e o manejo da biodiversidade, mesmo em áreas protegidas nos trópicos, constituem-se em desafios complexos que requerem conhecimento básico sobre a distribuição e abundância de espécies, suas interações mutualísticas, sua biologia reprodutiva e a estrutura genética de suas populações (Mittermeier et al., 1992). Apesar de sua grande importância com comprovada ação terapêutica na medicina popular, poucas informações estão disponíveis sobre a espécie *P. coriacea*. A presença de uma espécie endêmica de um ecossistema altamente ameaçado como o Cerrado reforça a necessidade de estudos para a sua conservação, em particular, e do ecossistema como um todo.

Os recentes avanços na biologia molecular abriram novas perspectivas para a pesquisa em conservação de espécies e para os estudos de biologia populacional. Pela primeira vez a variação encontrada em plantas ou animais pôde ser analisada ao nível da molécula de DNA. Diferenças na seqüência de nucleotídeos podem ser diretamente observadas e descritas com um grau de precisão impraticável a pouco tempo atrás. Muitas dessas técnicas já são utilizadas no estudo da extensão e distribuição da variação entre espécies, como também para investigar questões taxonômicas e evolutivas (Haig, 1998).

Uma vez que as populações naturais referentes à espécie *P. coriacea* estão seriamente ameaçados pela progressiva destruição de seu habitat, é necessário encontrar um modo rápido e eficiente para obter informações sobre a quantidade e a distribuição da variação genética dentro e entre suas populações. Estudos similares estão sendo feitos e se fazem necessários para outras espécies nativas do Cerrado como pequi (*Caryocar brasiliense* Camb – Oliveira, 1998; Chaves, 2005), cagaita (*Eugenia dysenterica* D. C. – Telles et al, 2001; Zucchi et al, 2005), araticum (*Annona crassiflora* Mart. – Bandeira, 2002), mangaba (*Hancornia speciosa* Gomez. – Moura, 2003) e baru (*Dipteryx alata* – Soares, 2006). Nesse contexto, o uso de marcadores moleculares torna-se uma opção viável para atingir esses objetivos, além de gerar importantes informações para um eficiente plano de conservação e manejo dessas espécies.

Dentre os marcadores moleculares existentes, os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Williams et al., 1990) destacam-se pelas vantagens que apresentam em termos de facilidade de obtenção. Além disso, podem ser aplicados em um grande número de espécies permitindo a análise de um grande número de locos. Segundo Lynch & Milligan (1994), o uso desse tipo de marcador possibilita ainda, uma amostragem aleatória mais ampla do genoma do que aquelas proporcionadas por outras classes de marcadores.

Espécies nativas como *P. coriacea*, utilizadas indiscriminadamente pelas populações humanas residentes nas regiões de Cerrado, são cientificamente desconhecidas quanto à sua variabilidade genética como quanto à comprovação de suas propriedades terapêuticas. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização genética da espécie *P. coriacea* utilizando marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Williams et al., 1990), destacando-se a sua variabilidade genética, estrutura populacional e fluxo gênico, podendo gerar informações para subsidiar programas de manejo da espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O BIOMA CERRADO

O bioma Cerrado é o segundo maior, em área do país, ocupando 23 % do território nacional, aproximadamente dois milhões de quilômetros quadrados. Excetuando-se algumas pequenas áreas na Bolívia e no Paraguai, ele está totalmente inserido em território nacional, mais especificamente no Planalto Central. Os limites deste bioma não coincidem na totalidade, mas abrange grandes extensões dos Estados de Goiás, Distrito Federal, Tocantins, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, parte de Mato Grosso, Oeste da Bahia, Sul do Maranhão, Piauí e parte de São Paulo, com radiações para Rondônia e Paraná Fernandes & Bezerra (1990).

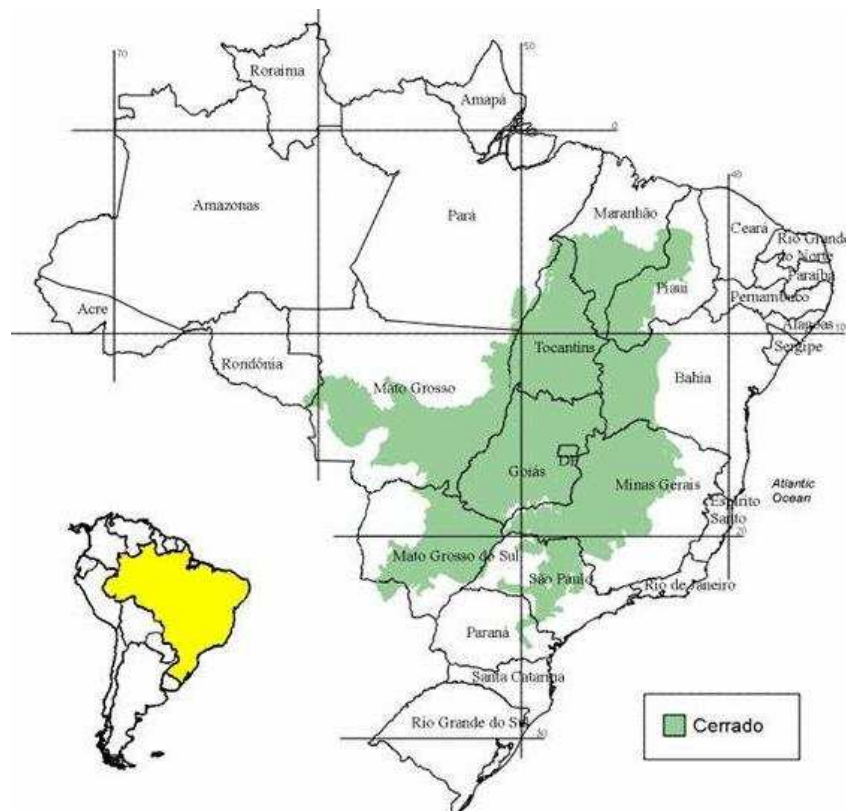


Figura 1. Distribuição geográfica do Bioma Cerrado no Brasil. Fonte: EMBRAPA (2005)

A área nuclear dos Cerrados se enquadra, em quase sua totalidade, dentro da Província Zoogeográfica Cariri-Bororo de Melo Leitão (1947) ou dentro do Distrito Zoogeográfico Tropical, definido por Cabrera e Yepes (1960). Fitogeograficamente porém, a área nuclear do Cerrado é tratada de forma particular, constituindo uma província própria: Província do Cerrado, definida por Cabrera e Willink (1980).

Da mesma forma, Rizzini (1963), em sua Divisão Fitogeográfica do Brasil, dispensa o mesmo tratamento particularizado, incluindo a área nuclear do Cerrado na subprovíncia do Planalto Central, embora seus limites não coincidam com os limites de Cabrera & Willink (1980).

Entretanto, a área nuclear do Cerrado não pode ser entendida como uma unidade zoogeográfica, tampouco pode ser considerada uma unidade fitogeográfica, porque não se trata de uma área uniforme em termos de paisagem vegetal. Porém, se aos fatores zoogeográficos e fitogeográficos forem agregados fatores morfológicos e climáticos, dentre outros, tem-se maiores elementos para sua compreensão e possivelmente, poderemos defini-la como um Sistema Biogeográfico (Barbosa, 2002).

Esse Bioma constitui um sistema complexo, que abrange áreas planálticas, como o Planalto Central Brasileiro, com altitudes médias de 650 m, clima tropical subúmido e com duas estações bem definidas, uma seca e outra chuvosa. Este sistema abriga uma fauna variada, que embora transite em outros sistemas como a Caatinga e os Cacaiais, ocorrem em sua maior concentração, neste sistema Biogeográfico em virtude das possibilidades alimentares que este Sistema biogeográfico oferece durante todo o ano (Barbosa, 2002).

Há um estrato gramíneo que sustenta uma fauna de herbívoros durante boa parte do ano enquanto não está seco. A estiagem acontece no exato momento em que aparecem as flores que, em grande parte, substituem como alimento as pastagens. O final das floradas coincide com o início da estação chuvosa, fazendo rebrotar os pastos secos e ainda brindando com a maturação de várias espécies de frutos. Acompanhando os herbívoros, animais de outros hábitos formam uma complexa cadeia. Em termos vegetais, esse sistema é complexo e nunca pode ser entendido como uma unidade, há o predomínio do Cerrado como paisagem vegetal, mas há também seus variados matizes, como campo, cerradão, além de formações florestais como matas, matas ciliares e, ainda, as veredas e ambientes alagadiços (Barbosa, 2002).

As áreas florestadas são constituídas pelas matas ciliares que ocorrem nas cabeceiras dos pequenos córregos e rios, margeando-os, como também se espalham em áreas mais extensas, acompanhando as manchas de solo de boa fertilidade natural, como, por exemplo, as matas do rio Claro e outras vertentes do Paranaíba e a chamada anteriormente microregião 'Mato Grosso de Goiás'. As veredas e ambientes alagadiços são mais abundantes a partir do centro da área nuclear, em direção ao norte e ao leste. Para o sul e oeste, à medida que se aproxima do Pantanal Matogrossense, essas veredas tendem a desaparecer, ficando apenas os ambientes alagadiços com contornos diferenciados. Esses ambientes aparecem como 'ilhas' em meio à paisagem geral dominante do Cerrado (Barbosa, 2002).

Os solos que ocorrem sob Cerrado apresentam grande variações em suas características morfológicas e físicas como elevada acidez, toxidez de alumínio e em certos casos níveis tóxicos de manganês e alta deficiência de nutrientes, especialmente N, P, K, Ca, Mg, B, S, Cu e Zn devido ao alto grau de intemperização, alta capacidade de fixação de fósforo e baixa capacidade de troca de cátions. A classe de solos mais extensiva na região é o Latossolo, que ocorre em aproximadamente 54% da área total e está associada à vegetação de Cerrado típico (*strictu senso*) (Naves, 1999).

Em termos de paisagem vegetal, a área nuclear do Cerrado no centro do Brasil pode ser caracterizada como um Sistema Biogeográfico, composto por subsistemas específicos e caracterizados pela fisionomia e composição vegetal e animal (Figura 2). Esses subsistemas segundo Barbosa (2002) são:

- **Subsistema de Campo:** ocupa as partes mais elevadas do sistema, áreas planas, denominadas regionalmente por chapadões ou campinas. Há forte ventilação durante quase todo o ano e a temperatura em geral é mais baixa que nos demais subsistemas. A rede de drenagem é insignificante. Às vezes aparecem pequenas lagoas, algumas perenes. A vegetação é arbustiva esparsa e de gramínea, intensamente distribuída pela área.
- **Subsistema de Cerrado:** constitui a paisagem dominante do sistema. Apresenta um estrato gramíneo e diferencia do campo pela ocorrência de árvores de pequeno porte e retorcidas. A rede de drenagem é boa, os solos são de baixa fertilidade natural e não são uniformes. Há formações de Cerrado que ocorrem em latossolos

avermelhados como também em solos arenosos, como, por exemplo, Sudoeste de Goiás e Oeste da Bahia, respectivamente. Entre o subsistema de campo e o de Cerrado, há uma forma de paisagem intermediária, designada popularmente por campo sujo, que não foi considerada como um subsistema à parte, porque sua abrangência geográfica é pequena e ecologicamente mostra as mesmas características desses dois subsistemas.

- ***Subsistema de Cerradão:*** fisionomicamente é mais vigoroso que o subsistema de Cerrado. As árvores atingem de 10 a 15 metros de altura e os solos demonstram maior fertilidade natural. Não há um estrato gramíneo forte como no subsistema de Cerrado e as árvores são mais espaçadas. A rede de drenagem é bastante significativa. Antigamente alguns botânicos o classificavam como floresta xeromorfa, hoje essa denominação foi abandonada.
- ***Subsistema de Matas:*** ocorre em manchas de solo de boa fertilidade natural. Às vezes adquire a configuração de ilhas em meio a uma paisagem dominante de Cerrado, conhecida pelo nome de capões e, às vezes, formam áreas extensas, compactas e homogêneas, como é o exemplo clássico do Mato Grosso de Goiás.
- ***Subsistema de Matas Ciliares:*** existe nas cabeceiras dos pequenos córregos e rios e acompanha-os pelas suas margens em estreitas faixas. Essas faixas, todavia, são muito variadas quanto à configuração. Há locais onde se alargam na forma de bosques e há outros locais onde praticamente desaparecem, como é o caso de algumas áreas do médio Tocantins.
- ***Subsistema de Veredas e Ambientes Alagadiços:*** as cabeceiras de alguns córregos e rios são, às vezes, caracterizadas por ambientes alagadiços, decorrentes do afloramento do lençol de água ou ainda em virtude de características impermeabilizantes do solo. Nestes locais são muito frequentes as veredas, paisagens nas quais predominam as plantas buriti e buritirana, os quais se distribuem acompanhando os cursos d'água, às vezes, até à altura dos cursos médios de alguns rios. Há um estrato inferior de gramíneas que se apresenta verde

durante todo ano. Em alguns locais, o afloramento do lençol chega a formar verdadeiras lagoas, rodeadas por buritis.

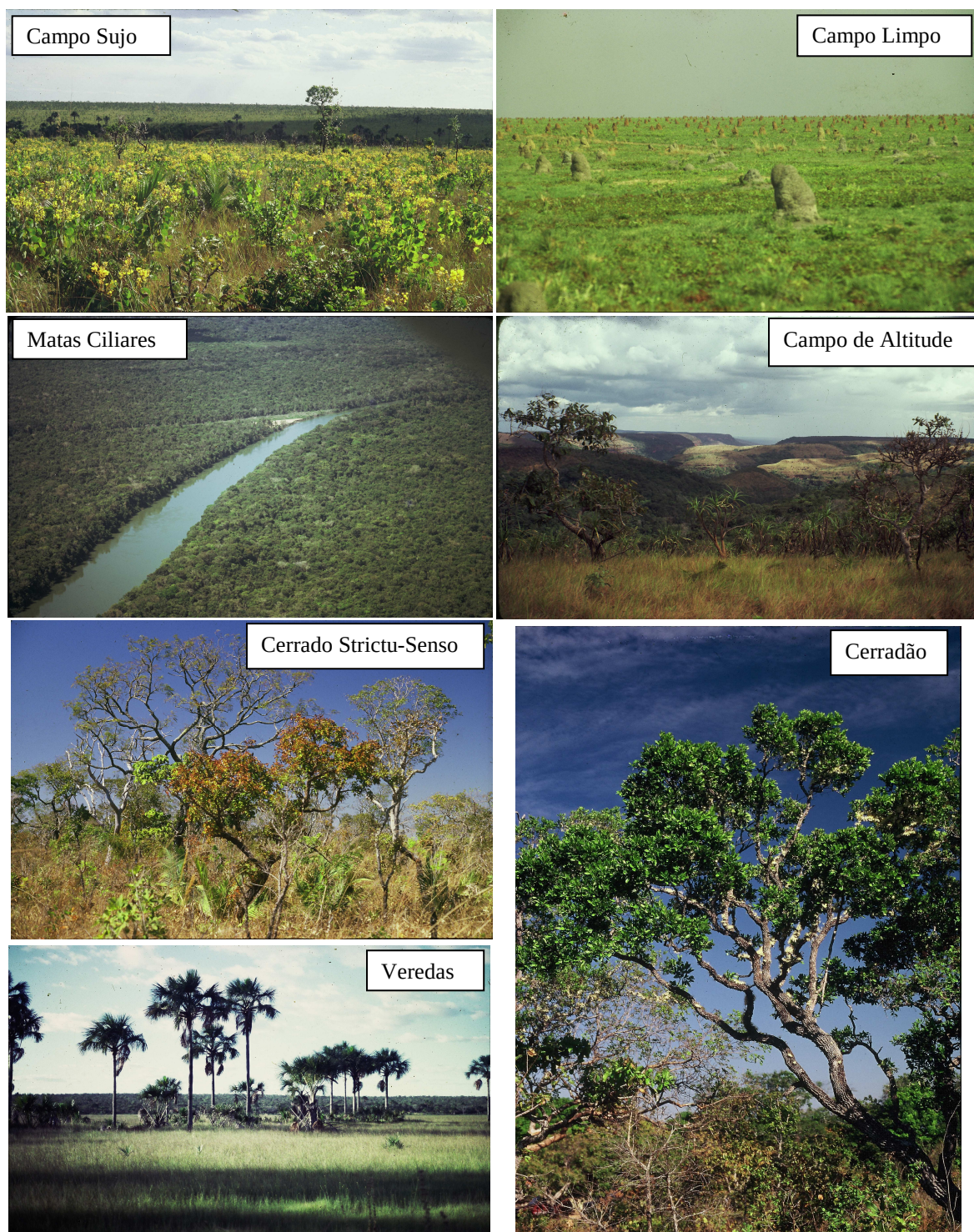


Figura 2. Subsistemas do Sistema Biogeográfico do Cerrado

O Sistema Biogeográfico dos Cerrados é limitado por uma série de complexas formas vegetacionais intermediárias que adquirem contornos específicos em direção à caatinga e outras configurações em direção à floresta amazônica. É importante mencionar também as savanas do norte e noroeste do continente, que no aspecto fisionômico e em muitos pontos da composição faunística e florística, como o da ocupação humana, muito se assemelham aos aspectos que caracterizam o sistema dos cerrados e, não fosse o caráter da descontinuidade, poderiam integrar perfeitamente este sistema biogeográfico.

Essa diversidade de ambientes é um fator positivo na diversificação faunística, permitindo a ocorrência de animais adaptados a ambientes secos, como também a ambientes úmidos. Da mesma forma, propicia tanto a ocorrência de formas adaptadas a áreas ensolaradas e abertas, como brinda a oportunidade de ocorrência de formas umbrófilas. Esses fatores atribuem a este Sistema Biogeográfico um caráter singular, caracterizando-o pela diversidade de formas vegetais e animais. A compreensão dessa diversidade, refletida na organização dos seus subsistemas, é de fundamental importância para compreender os principais processos associados à ocupação desta área por populações humanas, de economia e organização social simples (Barbosa, 2002).

O Cerrado é apontado como grande detentor de uma biodiversidade florística e faunística e isto se deve a diversidade de ambientes existentes (Malheiros, 2004) e toda essa riqueza está sendo constantemente ameaçada pela ação antrópica. Cerca de 40 % do bioma já tenha sido devastado e esta situação se agrava mais ainda devido ao fato de que apenas 1,5 % de sua extensão é protegida por lei. Cerca de 67 % das áreas de Cerrado são consideradas como "altamente modificadas" e apenas 20 % encontram-se em seu estado original (Silva & Bates, 2002).

Recentemente, o Cerrado foi considerado um dos *hotspots* mundiais de diversidade (Myers et al., 2000; Oliveira & Marquis, 2002) devido ao elevado número de espécies endêmicas de plantas que ocorrem nesse ambiente (1,5% das espécies da flora mundial). Sendo que este ainda abriga 13%, 35% e 23% da riqueza de espécies de borboletas, abelhas e cupins neotropicais respectivamente (Cavalcanti & Joly, 2002).

Nesse contexto de *hotspots*, é preciso considerar ainda que as áreas de proteção integral para conservação, sendo que destas restam somente 6% de acordo com WWF ou SEMARH representam apenas uma pequena parte do bioma, o que torna mais urgente a necessidade de entender os padrões de biodiversidade a fim de ampliar os processos de proteção desse ambiente (Telles et al., 2006).

Portanto, pelo seu potencial agrícola e por sua grande biodiversidade, os Cerrados têm sido alvo de um volume crescente de estudos objetivando o seu melhor conhecimento (Pinto, 1994; Ribeiro et al., 2001; Oliveira & Marquis, 2002). Ou seja, estudos que busquem a ampliação e intensificação de conhecimentos sobre as espécies e ecossistemas dos Cerrados, que exigem uma abordagem multidisciplinar, objetivando o conhecimento das espécies sob seus aspectos taxonômicos, genéticos, evolutivos, fisiológicos, ecológicos e sócio-econômicos (Telles et al., 2006).

Considerando a riqueza de espécies existentes no Cerrado e as suas finalidades, podemos dar ênfase àquelas espécies que são medicinais e que nos oferecem recursos terapêuticos. Segundo Yunes & Filho (2001), aproximadamente 25 % dos fármacos empregados nos países industrializados advém, direta ou indiretamente, de produtos naturais.

2.2 PLANTAS MEDICINAIS

2.2.1 Histórico

Desde os primórdios, os homens buscam na natureza recursos para melhorar suas condições de vida, aumentando suas chances de sobrevivência. O uso das plantas como alimento sempre existiu e a este foi incorporado à busca de matéria-prima para confecção de roupas e ferramentas, além de combustível para o fogo (Lorenzi & Matos, 2002). Os estudos e os tratamentos de determinadas doenças, através de plantas medicinais, são tão antigos quanto à própria humanidade e a história da medicina e da botânica encontra-se ligada às plantas medicinais (Campêlo, 1990). Muitos dos primeiros trabalhos que buscavam nomear e categorizar os vegetais tinham como primeiro propósito oferecer um catálogo de plantas com importância medicinal. Ao longo dos anos a busca por novas plantas medicinais acabou levando à descobertas botânicas e vice-versa. E dessa forma muitas plantas foram batizadas considerando seus usos medicinais (Lorenzi & Matos, 2002).

Na China, há registros de cultivo de plantas medicinais que datam de 3.000 a.C. Os egípcios, assim como assírios e hebreus, também as cultivavam desde 2.300 a.C. e

com elas, produziam vermífugos, purgantes, cosméticos, diuréticos, outros produtos líquidos e gomas que serviam para o embalsamento de múmias (Martins et al., 2000).

O valor terapêutico de algumas plantas era muito conhecido na Grécia Antiga. Hipócrates, considerado o “Pai da Medicina”, fez uma síntese dos conhecimentos médicos de seu tempo, indicando o remédio vegetal para cada enfermidade. Os romanos também usavam com frequência determinadas plantas venenosas para se livrarem dos inimigos (Campêlo, 1990).

Populações de norte a sul nas Américas incluíam o tabaco em seus rituais, por seus efeitos narcóticos. E, muitas vezes, os efeitos estupefacientes de determinadas plantas foram extrapolados para aliviar a dor em pacientes agonizantes. Ao longo dos anos, esses observadores perceberam que uma erva capaz de induzir sonolência seria capaz também de acalmar, se usada em dosagens menores (Lorenzi & Matos, 2002).

Sabe-se que muitas substâncias utilizadas na alopatia têm princípios ativos extraídos das plantas medicinais, encontradas em abundância na natureza. Como exemplos podem citar o *Salix alba* (salgueiro branco), de onde se extrai o ácido acetil salicílico para a produção da aspirina usada no tratamento de dores e reumatismo; *Hypericum perforatum* (erva de São João), de onde se extrai as substâncias hipericina e hiperforina, usadas na produção de antidepressivos; *Papaver sonniferum* L. (papoula), de onde se extrai a morfina para produção de sedativos; *Cinchona calisaya* Wedd. (quina), de onde se extrai o quinino das cascas, utilizado no tratamento da malária, etc. (Lorenzi & Matos, 2002).

Segundo Campêlo (1982), as plantas medicinais além de conter substâncias de alto valor terapêutico, podem possuir princípios tóxicos que causam distúrbios sérios nos organismos quando usadas de maneira errada. Assim Campêlo & Silva (1982) comentam que a simples observação das plantas nos campos, bosques e jardins para aprender a conhecer melhor a natureza, não bastam. As informações obtidas com curandeiros, raizeiros e usuários, têm um valor extraordinário para a identificação e a utilização correta e extensiva das plantas medicinais.

2.2.2 Plantas Medicinais no Brasil

O Brasil está entre os países que possuem a maior biodiversidade mundial em plantas superiores, cerca de 50 mil espécies, distribuídas em todos os seus biomas, Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Floresta Subtropical (Vieira et al., 2002). Porém apesar dessa enorme biodiversidade, esse potencial de recursos genéticos, está sendo ameaçado pela destruição em massa da vegetação natural. E, além disso, a maioria dessas espécies, especialmente as medicinais e aromáticas necessita de estudos científicos básicos para o estabelecimento de estratégias de conservação.

Estes recursos biológicos brasileiros, foco de interesse mundial devido a sua riqueza genética vem sendo alvo de biopirataria e de ações governamentais descoordenadas, dificultando o uso sustentável desses recursos.

Nos poucos bancos de germoplasma de plantas medicinais existentes no Brasil, foi constatado segundo Vieira (2002) que existe pouca variabilidade intra-específica disponível. Portanto, é preciso difundir melhor essa idéia de variabilidade genética para que se tenha um *pool* gênico suficiente para o desenvolvimento de trabalhos de domesticação e melhoramento dessas espécies, além do estabelecimento de estratégias de conservação, o que pode contribuir muito para diminuir o extrativismo predatório que essas espécies vêm sofrendo.

Porém, as preocupações com a biodiversidade e as idéias de desenvolvimento sustentável, trouxeram novos ares ao estudo de plantas medicinais. Novas linhas de pesquisa foram estabelecidas em universidades brasileiras e também centros de pesquisas como a embrapa recursos genéticos e biotecnologia e outros órgãos criados com o intuito de buscar bases mais sólidas para a validação científica do uso dessas plantas (Lorenzi & Matos, 2002).

No Brasil, a prática do uso das plantas na cura de enfermidades tem, basicamente, influência das culturas africanas, européias e indígenas. Esta última se manifesta em maior escala e está intimamente ligada ao desenvolvimento de uma série de populações indígenas, que apesar do processo de extinção que passaram, lograram transmitir muitas informações sobre o uso de espécies vegetais com fins terapêuticos, que se perpetuam através de gerações até seus remanescentes atuais (Lorenzi & Matos, 2002).

Também podemos evidenciar a utilização da medicina caseira pelos imigrantes africanos, uma vez que o movimento dos quilombos atingiu grande parte da Zona da Mata

dos estados do nordeste, durante cerca de 100 anos, e certamente esse movimento contribuiu para uma rica farmacopéia popular, que foi transmitida às populações descendentes e imigrantes europeus (Staviski, 1990).

Até a metade do século XX, o Brasil era um país essencialmente rural, com amplo uso da flora medicinal, tanto nativa quanto introduzida. Com o início da industrialização e urbanização, o conhecimento popular passou a ser posto em segundo plano e isso levou o uso das plantas medicinais a um período de decadência (Lorenzi & Matos, 2002).

Martins et al. (2000) apresentam dados preocupantes ao afirmarem que cerca de 80% da população brasileira não tem condições de usar os medicamentos chamados essenciais. Assim, as plantas medicinais pelo fato de serem matéria-prima de fácil acesso, baixo custo e fácil manipulação, têm contribuído muito para a saúde da população. E segundo Lapa (2001) o Brasil é considerado o 7º mercado consumidor de plantas medicinais devido a essa carência de recursos financeiros da população.

Segundo Agnol (2002), o mercado de fitoterápicos no Brasil vem crescendo muito, mas comparado com o mercado da Europa e Estado Unidos esse crescimento ainda é pequeno, pois, as grandes empresas nacionais não investem muito em medicamentos fitoterápicos. No Brasil, as vendas de fitoterápicos atingem US\$ 260 milhões, enquanto que na Europa o mercado atual é de US\$ 6 bilhões, sendo US\$ 2 bilhões apenas na Alemanha e nos Estados Unidos o mercado é de US\$ 5,1 bilhões (Agnol, 2002). Em países desenvolvidos, como Estados Unidos e grande parte da Europa, a maioria da população utiliza medicamentos fitoterápicos e a maioria dos médicos prescreve regularmente algum tipo de medicamento fitoterápico e estes também são encontrados a venda em farmácias.

No Brasil, além do pouco investimento das grandes empresas em produzir fitoterápicos, alguns problemas são encontrados dificultando assim a comercialização dessas plantas como as condições precárias de armazenamento, o não cumprimento dos prazos de validade, o extrativismo predatório e outros (Agnol, 2002).

O uso de plantas medicinais, quando feito com critério, só tem a contribuir para a saúde de quem o pratica. Tais critérios referem-se à identificação do quadro clínico apresentado (doença ou sintoma), escolha correta da planta a ser utilizada e adequada preparação (Martins et al., 2000).

As plantas medicinais devem ser adquiridas, preferencialmente por pessoas ou firmas idôneas que possam dar garantia da qualidade e da identificação correta. Não se

deve colher plantas próximo de estradas, pois podem estar contaminadas pela poeira e pelos gases que saem dos escapamentos dos automóveis. Também deve-se evitar a colheita próximo de lavouras onde se utilizam agrotóxicos e à beira de cursos d'água contaminados com produtos químicos (Martins et al., 2000).

As plantas frescas com aspecto ruim não devem ser utilizadas e, quando secas, podem apresentar sinais de deterioração, como mofo. Estes sintomas certamente refletem os maus cuidados na conservação e a possível presença de toxinas de fungos, como aflatoxina, estaquiobotriotoxina e fusariotoxina, comuns em mofos e que podem causar perturbações diversas no organismo (Martins et al., 2000).

No Brasil, na década de 1970, surgiu um boato da cura milagrosa do câncer através do ipê-roxo (*Tabebuia avellanae*). Isso detonou um processo desenfreado de se coletar a casca dessas árvores, pondo em risco a existência da própria espécie, uma vez que os coletores não seguiam critério algum para isso, derrubando e matando qualquer espécime vegetal (Corrêa Junior et al., 1994).

A maioria das plantas medicinais utilizadas pela população é nativa, crescendo espontaneamente nas mais diferentes formações vegetacionais do país. A coleta indiscriminada dessas plantas nativas pode levá-las a extinção. Essa atividade, feita normalmente por leigos, além da possibilidade de depredação do patrimônio genético vegetal, aumenta a possibilidade de engano do material coletado com espécies vegetais trocadas.

A fim de melhorar a qualidade da matéria-prima nacional, a saída mais segura portanto seria a criação de uma legislação ambiental específica (Agnol, 2002) e o cultivo das plantas medicinais em áreas específicas dentro de padrões agronômicos requeridos, buscando melhorar a produtividade e qualidade do material produzido, de forma a garantir a qualidade fitoquímica e farmacológica das matérias-primas para a produção de fitoterápicos eficazes (Corrêa Junior et al., 1994).

2.2.3 Plantas Medicinais no Cerrado

No Cerrado a utilização de plantas medicinais também é muito significativa pois nesse bioma encontram-se várias comunidades populares que utilizam dessas plantas intensamente.

Contendo uma riquíssima flora medicinal, o bioma cerrado engloba aproximadamente 7 mil espécies vegetais com potencial terapêutico. Dentre elas podemos citar alguns exemplos como: o Landim (*Calophyllum brasiliense*) que é uma planta com comprovada farmacologia e princípio ativo identificado, para uso popular e na veterinária. Para o uso popular, o chá da casca e das folhas, é muito empregado no tratamento da diabetes, o látex ou resina do tronco é vesicante e energizante, sendo também indicado para reumatismo, tumores e úlceras crônicas e também contra úlceras crônicas do gado e também apresenta usos anti-sépticos. Seu ambiente de ocorrência são as Matas de Galeria, é amplamente usada pela população e sua exploração atende ao mercado interno (Vieira et al., 2002).

Outra espécie também muito conhecida no bioma cerrado é a copaíba (*Copaifera langsdorffii*) que também possui uma farmacologia comprovada e princípio ativo em estudo, o óleo obtido do tronco é o produto principal, frequentemente pode ser encontrada em matas de galeria, sendo encontrada também nos ambiente de cerradão e cerrado *strictu - senso*. É amplamente usada pela população como antiinflamatório, cicatrizante e anti-séptico e seu comércio atende ao mercado interno e externo (Vieira et al., 2002).

O Barbatimão (*Stryphnodedron adstringens*) (Mart.) Cov – Leguminosae é utilizada como adstringente, cicatrizante na blenorragia, na diarreia, nas úlceras e uretrites. As partes usadas são a casca, raiz e folhas (Rodrigues & Carvalho, 2001).

Outra planta muito conhecida no Cerrado e bastante utilizada pela população é a Arnica do Cerrado (*Lychnophora ericoides*) pertencente à família Asteraceae, é usada como cicatrizante e sua parte usada é a folha (Silva, 1998).

O Pacari (*Lafoensia pacari*) possui farmacologia comprovada e princípio ativo identificado, a parte usada é a casca, e suas indicações terapêuticas são: úlcera gástrica, gastrite, ferimentos, inflamação do útero, transtornos da vesícula biliar, emagrecimento e urticária. Possui uma ampla distribuição geográfica porém é mais encontrada em ambientes de Cerradão e Cerrado *Strictu - Senso*. Uso popular regionalmente localizado e o comércio atende ao mercado interno (Vieira et al., 2002).

As plantas do Cerrado são ricas em metabólitos diversificados, vários deles com atividade biológica cientificamente comprovada (Goodland & Ferri, 1979). Esta diversidade de substâncias pode estar relacionada à tentativa de adaptação de plantas à aridez e acidez do solo, como também ao clima seco e quente da região. Muitas destas

plantas são utilizadas pela medicina popular como único recurso terapêutico por uma grande parte da população que as utiliza indiscriminadamente sem levar em conta os efeitos tóxicos das mesmas (Goodland & Ferri, 1979).

Tendo em vista esses aspectos, um melhor aproveitamento da flora da região poderia ser conseguido através do estudo fitoquímico/biológico, paralelo à investigação do potencial genético de espécies do Cerrado. Essa estratégia poderia auxiliar no uso adequado das plantas medicinais, permitindo a descoberta de princípios ativos com atividade biológica conhecida ou com novas atividades, servindo, também, como modelo para a síntese de novos fármacos. Esta é a linha de pesquisa que está sendo seguida por vários grupos de pesquisa, mas ainda de forma incipiente. Como exemplo, temos o trabalho desenvolvido pela UFG, Embrapa Cerrados e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Pesquisadores da Embrapa Cerrados e da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia já catalogaram 330 espécies de uso medicinal. Dentre elas, quatro foram escolhidas para estudos de sua distribuição geográfica e diversidade genética e química. A coordenadora do projeto, a pesquisadora Semíramis Pedrosa Almeida explica que estas espécies foram selecionadas principalmente por sua importância como plantas medicinais e pela urgência na conservação de seu germoplasma. As espécies selecionadas foram: mamacadela (*Brosimum gaudichaudii* Trec.), faveira (*Dimorphandra mollis* Benth), arnica (*Lychnophora ericoides* Less.) e ginseng brasileiro (*Pffafia glomerata*). Um dos principais tópicos do projeto é a criação de um banco de germoplasma onde as espécies ficarão armazenadas. Semíramis explica também que a idéia de se trabalhar com plantas medicinais, surgiu a partir da constatação de que era necessário preservar espécies com risco de extinção e também resgatar o conhecimento popular sobre o uso dessas espécies (Biotecnologia, 2004).

Após uma reunião ocorrida em Brasília em 2002, foi elaborado um documento onde consta uma lista de plantas medicinais da região do Cerrado e Pantanal. Dessa lista foram selecionadas as espécies prioritárias para estudo, segundo alguns critérios como: 1) plantas importantes para indústria; 2) plantas de importância social; e 3) plantas que não foram selecionadas nos itens 1 e 2 e que foram consideradas muito importantes.

Além de Universidades e da Embrapa, existe atualmente 90 organizações e 10 redes regionais em 15 regiões e cinco Estados que estão empenhadas também no estudo das plantas medicinais da região do Cerrado. Estes movimentos populares propõem o

envolvimento dos conhecedores tradicionais como raizeiros, benzedeiras e parteiras no processo de implantação de políticas de plantas medicinais.

A Articulação Pacari é uma delas e tem como objetivo valorizar, recuperar e disponibilizar conhecimentos tradicionais e populares sobre o uso e o manejo de plantas medicinais, visando qualificar o trabalho ambiental e de saúde realizado por grupos comunitários. Além disso, visa também promover a auto-regulamentação das chamadas farmácias populares, que atendem a população com base na medicina tradicional e que estão espalhadas por todo o Cerrado.

Em 2001, o IBAMA criou o NUPLAM (Núcleo de Plantas Medicinais e Aromáticas) que tem como objetivo conciliar a pesquisa e o conhecimento popular a fim de melhorar a qualidade de vida das populações extrativistas e a conservação dos ecossistemas naturais (NUPLAM, 2001).

2.3 A ESPÉCIE *Palicourea coriacea*

2.3.1 Descrição Botânica

O gênero *Palicourea*, pertence à tribo Psychotrieae da família Rubiácea. E esta família possui aproximadamente 200 espécies que ocorrem em forma de subherbáceas e são distribuídas somente nos trópicos do Novo Mundo (Taylor, 1997). As flores do gênero *Palicourea* se desenvolvem em forma de tubos e são tipicamente coloridas e cheirosas, o que permite a polinização ser feita por beija-flores e os seus frutos carnosos azuis brilhantes, serem dispersos por aves (Taylor, 1993).

Existem três centros de ocorrência de espécies desse gênero, sendo todos na América do Sul e um deles ocorrendo na região do Planalto Centro – Sul do Brasil, com cerca de 37 espécies. Sendo a maioria das espécies desse gênero distilica, uma condição considerada ancestral no gênero (Taylor, 1989, 1997).

De acordo com Richards (1986) e Hamilton (1990) citado por Coelho & Barbosa (2003), distilia é um dimorfismo floral controlado geneticamente, caracterizado pela separação espacial recíproca entre altura de filetes e estiletos de dois tipos de flores

produzidos por indivíduos diferentes. Flores com estiletes curtos e filetes longos são denominadas brevestilia, enquanto que o contrário é denominado longistilia.

A espécie *P. coriacea* é herbácea medindo até 80 cm de altura e ocorre frequentemente formando moitas (Figura 3A). É planta perene, decídua com biomassa aérea sazonal; de julho a outubro, não ocorre massa verde e nesse período observa-se apenas o caule de cor amarela. Estípulas inter-peciolares, características de Rubiaceae, também estão presentes nesta espécie, e são persistentes. O pecíolo é curto, piloso nas duas faces e sua forma é achatada. O brotamento ressurgue no período das águas, em novembro, com as primeiras folhas surgindo rentes ao solo, de forma cespitosa. A floração inicia-se no mês de novembro permanecendo florida até março. As inflorescências são terminais com flores de cor branca e com brácteas bem desenvolvidas, de cor amarela (Figura 3B). Os frutos, drupas, apresentam cor azul e são encontrados à partir do mês de abril (Figura 3C) (Laureano, 2001).

As folhas são simples, medindo de 6 a 10 cm de comprimento por 3 a 6 cm de largura, e curto-pecioladas. Possuem forma ovada ou, quando jovem, elíptica; ápice acuminado e base arredondada ou levemente cordiforme. As folhas jovens apresentam ápice obtuso. A superfície adaxial é lisa quanto ao tato e a abaxial é pubescente. Tem consistência coriácea e quando seca fragmenta-se facilmente (Figura 3D) (Laureano, 2001).

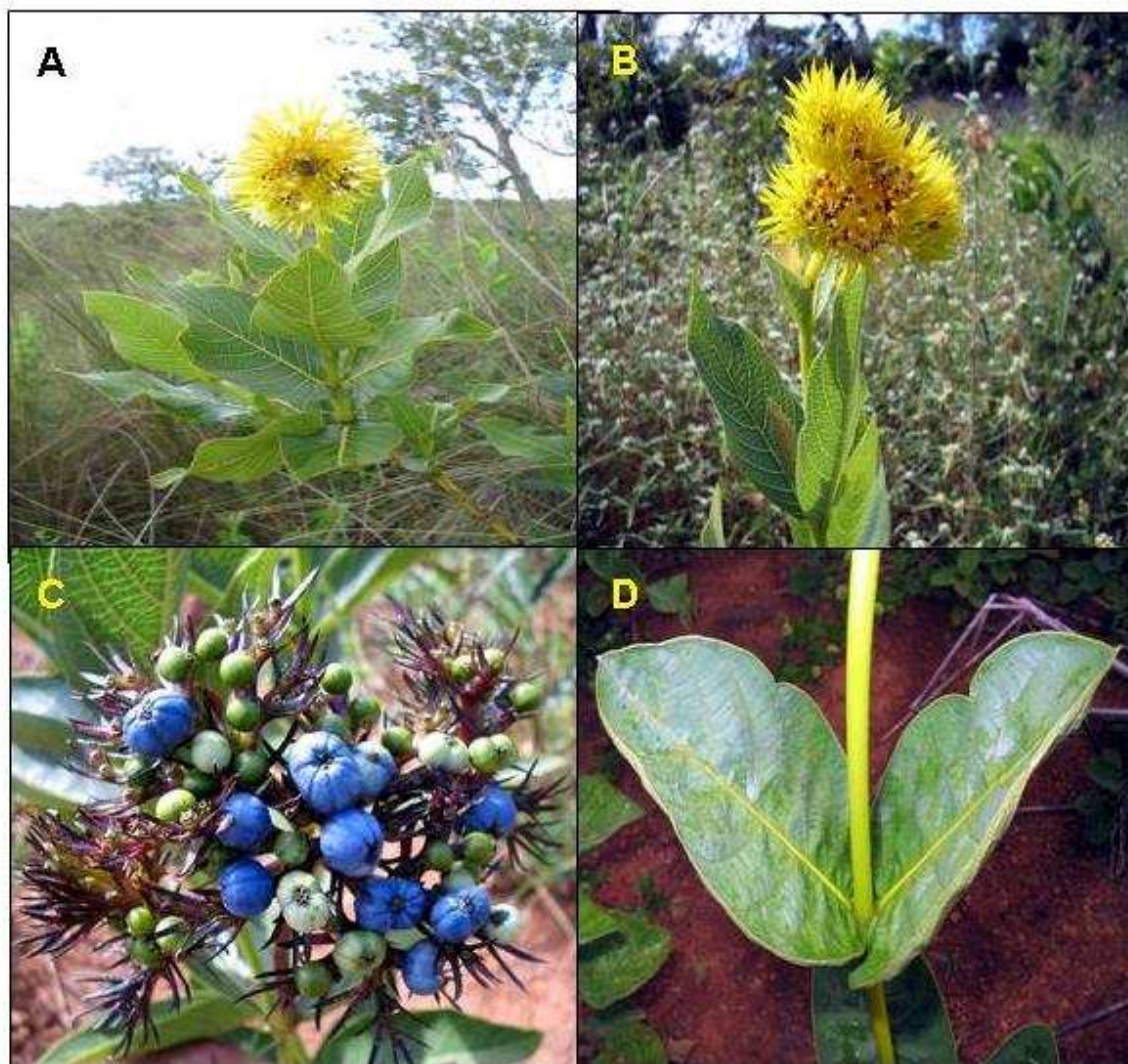


Figura 3. A) Foto da espécie *P. coriacea* popularmente conhecida como douradinha. B) Flores da espécie *P. coriacea*. C) Frutos azuis brilhantes da espécie *P. coriacea*. D) Folhas coriácea da espécie *P. coriacea*.

2.3.2 Etnobotânica

A etnobotânica consiste no estudo da relação Homem/Natureza, ou seja, os pesquisadores procuram estudar e resgatar todo o conhecimento e afinidade popular sobre o uso de determinada planta. Este trabalho é multidisciplinar, pois envolve pesquisadores de diversas áreas como: botânicos, antropólogos, engenheiros agrônomos, engenheiros florestais, biólogos, químicos, farmacêuticos e outros, com a finalidade de estabelecer

quais as espécies são prioritárias para pesquisa (Rodrigues & Carvalho, 2001). E este conhecimento popular tradicional é a fonte para indicação do caminho dos princípios ativos, substâncias estas responsáveis pela ação de cura e combate as doenças.

A espécie *P. coriacea*, é uma planta reconhecida popularmente por suas propriedades medicinais, cujas folhas são utilizadas como drogas vegetais. A utilização dessa espécie é prática consagrada tanto por comunidades rurais, como por populações urbanas, oriundas principalmente de regiões de Cerrado, com a seguinte indicação terapêutica: inflamação na uretra, nos rins e como diurético (Laureano, 2001).

Silva (1998) cita que o chá feito das folhas ou raíz da *P. coriacea* é utilizado para dores nos rins. E quando utilizada juntamente com o Mastruz (*Chenopodium ambrosioidium*), é empregada como calmante. Siqueira (1981) cita o uso das folhas de *P. coriacea*, no tratamento de reumatismo e com ação depurativa.

Em alguns trabalhos desenvolvidos por Brandão (1980) e Silva (1998) encontram-se registrado o uso popular da espécie *P. coriacea* como diurético, na forma de infusão das folhas. O uso dessa planta já se firmou como remédio no tratamento de litíase renal pelas comunidades do Cerrado e relatos sobre a sua eficácia são encontrados em livros e cartilhas.

O trabalho de coleta dessas plantas para a realização deste trabalho se deu através de entrevistas realizadas com raizeiros da região a fim de indicar locais onde supostamente poderia encontrar douradinha. Segundo eles: “quase não existe mais douradinha, locais onde havia matas de douradinha, não existe mais, a soja chegou e tomou conta de tudo, hoje em dia se a gente quiser um remédio de planta tem que andar muito”.

Goodland & Ferri (1979), referenciam a família Rubiaceae como essencialmente acumuladora de alumínio. O autor afirma que, apesar de pouca afinidade taxonômica entre as famílias acumuladoras de alumínio, existem algumas características vegetativas que poderiam ser correlacionadas entre elas: folhas coriáceas com nervuras proeminentes, tornando-se amarelo-esverdeadas quando secas e frutos azuis brilhantes, características estas notadas nas folhas e frutos de *P. coriacea*.

A folha seca, na forma que se apresenta como droga, é inodora e de sabor levemente adstringente (Laureano, 2001).

A sua distribuição ocorre nos Estados de Goiás, Distrito Federal, Bahia, Mato Grosso e Minas Gerais (Silva, 1998). E em diferentes subsistemas do cerrado como campo, cerradão, cerrado *strictu – senso* e covais.

2.3.3 Características Ecológicas

Nada se conhece a respeito da ecologia dessa espécie, como a polinização, forma de dispersão da semente, viabilidade do pólen, germinação, dormência, etc....

A espécie *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. também conhecida como *Psychotria Xanthophylla* Muell. Arg. de acordo com relatos do professor Dr. Piero Delprete, (comunicação pessoal) botânico, especialista na família Rubiácea e autor de vários trabalhos no assunto, sugerindo que o polinizador dessa espécie seja a borboleta, pois, segundo ele, as flores dessa espécie são heterostílica facilitando então a polinização ser feita por borboletas e não por beija-flores como citado anteriormente, talvez este seria apenas visitante e sugador de néctar.

Outro fato que foi observado durante a realização deste trabalho nas viagens de coleta foi que essa espécie não foi encontrada em áreas onde há a presença do capim brachiaria e nem em locais com a presença de ambientes alagadiços.

2.4 MARCADORES MOLECULARES

2.4.1 Tipos de Marcadores Moleculares

O sucesso de qualquer programa de melhoramento ou de conservação é dependente do conhecimento da quantidade de variação presente na espécie de interesse. Tradicionalmente, utiliza-se uma combinação de caracteres morfológicos e agronômicos para a medição da diversidade genética em determinada população de indivíduos. Porém, estes caracteres possuem uma grande dificuldade na identificação de grupos taxonômicos discretos, não permitindo identificar similaridades genéticas entre tais grupos. Esta dificuldade deve-se ao fato de que a grande maioria dos caracteres vegetais são influenciados por fatores ambientais, exibindo variação contínua e uma alto grau de plasticidade fenotípica. Para tentar solucionar estes problemas técnicas moleculares tem sido utilizada para monitorar a variabilidade genética (Parker et al., 1998).

As variações de forma e função dos organismos possuem, em maior ou menor escala, um componente genético. Portanto, a diversidade biológica pode ser traduzida, em última análise, por variações nas seqüências de DNA. São várias as técnicas disponíveis para analisar diferenças entre seqüências de DNA. Os locos analisados por estas técnicas constituem-se em marcas, pontos de referência no genoma e, por serem detectados por técnicas moleculares, são geralmente conhecidas como locos de marcadores moleculares. Os dados coletados através destes marcadores são utilizados para conhecer a natureza da variabilidade genética de indivíduos ou populações. Tais técnicas também são utilizadas para dar suporte ao uso eficiente desta variabilidade em programas de melhoramento. (Beckmann, 1991; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O conteúdo informativo de uma técnica é alto quando um maior número de alelos for distinguível naqueles locos, quando a técnica permitir a análise de vários locos ao mesmo tempo e quando em uma única reação a proporção de locos polimórficos for também alta. A técnica é considerada altamente acessível quando o custo, rapidez e trabalho envolvido na obtenção de cada dado é baixo. No contexto de diversidade genética, os dados obtidos são utilizados para estimar parâmetros genéticos. Em geral, as estimativas de diversidade genética em uma amostra populacional baseiam-se em dois níveis de variação: o número de formas alternativas (alelos) de uma seqüência e a freqüência destes alelos na população. Com base nestas estimativas, diferentes parâmetros podem ser calculados, possibilitando uma maior compreensão da diversidade de uma população ou de populações (Weising et al., 2005).

A introdução da técnica de eletroforese de isoenzimas no início da década de 60, além de iniciar a era dos marcadores moleculares, ampliou o número de marcadores que poderiam ser utilizados. A técnica baseia-se em mutações no código genético, as quais alteram a carga elétrica de algumas proteínas com função enzimática. Após eletroforese das amostras de proteína, o polimorfismo é detectado através da visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos. Os marcadores isoenzimáticos podem ser obtidos de uma maneira relativamente rápida, barata e são disponíveis para praticamente todas as espécies de plantas. A utilização de isoenzimas permitiu a detecção de polimorfismo entre plantas que não mostravam diferenças morfológicas. Assim foi possível uma melhor avaliação da variação genética (Torggler et al., 1995).

O poder de detecção da variabilidade existente diretamente ao nível do DNA, só foi alcançado com o desenvolvimento de técnicas em biologia molecular. A primeira

delas baseia-se na ação de enzimas de restrição, as quais reconhecem uma sequência de DNA, e clivam a molécula nestes sítios específicos. Os efeitos de mutações pontuais, inserções, deleções e rearranjos nos sítios de clivagem, são detectados através de “Southern blots” como polimorfismos no tamanho dos fragmentos de DNA após digestão com uma enzima de restrição. Esta variação encontrada entre indivíduos foi denominada RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - Botstein et al., 1980).

O surgimento da Reação de Polimerase em Cadeia (Polimerase Chain Reaction – PCR) (Mullis & Faloona, 1987) permitindo a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA provocou uma verdadeira revolução nas técnicas de biologia molecular, facilitando muito o trabalho de laboratório. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* - Williams et al., 1990), SSR (*Simple sequence Repeat* – Charlesworth, 1995) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - Vos et al., 1995), são exemplos das muitas técnicas baseadas em PCR que abriram novas e inúmeras possibilidades de utilização do polimorfismo encontrado na molécula de DNA.

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar *primers* mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio de sequência. Esta técnica foi desenvolvida por dois grupos independentes nos Estados Unidos. Williams et al., (1990) patentearam essa técnica com o nome de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ou seja, DNA polimórfico amplificado ao acaso (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Welsh & McClelland (1990), por sua vez propuseram a denominação mais apropriada para a técnica chamando-a de AP-PCR (*Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction*) uma vez que os *primers* possuem sequência arbitrária, mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso e sim em lugares específicos no genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Marcadores RAPD tem sido muito utilizados em estudos de populações naturais nos últimos anos como estudos de diversidade genética com populações de *Coscinium fenestratum* (Narasimhan et al., 2006), trabalhos realizados com a espécie *Amphicarpaea edgeworthii* (Zhang et al., 2005) e estudos de diversidade genética com variedades de *Mucuna pruriens* (Padmesh et al., 2005). Pois eles são tecnicamente mais simples que outros tipos de marcadores como RFLP ou SSR. Facilitando o estudo de um grande número de locos e uma amostragem aleatória maior do DNA (Zuchi, 2002).

Muitos trabalhos também têm demonstrado as diversas vantagens do uso destes marcadores tanto no mapeamento genético quanto na caracterização da variação genética em plantas cultivadas e coleções de germoplasma (Welsh & McClelland, 1990). Os marcadores RAPD também têm sido muito utilizados no estudo de filogenia, como por exemplo, em Lim et al. (1999) que avaliaram as distâncias genéticas entre três gêneros e entre espécies de cada gênero de orquídea.

Várias são as vantagens de se utilizar esse marcador e estas podem ser resumidas em dois atributos: simplicidade e rapidez. Ou seja, a obtenção de dados é pelo menos duas ordens de magnitude mais rápida do que em outros marcadores como RFLP.

Um conjunto único de *primers* arbitrários pode ser utilizado para qualquer organismo, não necessita a utilização de radioatividade, é utilizada uma quantidade mínima de DNA para cada indivíduo, não requer um conhecimento prévio da seqüência a ser amplificada, pode ser aplicada a qualquer espécie, além do custo dessa técnica ser mais baixo.

Como toda técnica, essa também tem as suas limitações quando comparadas com os marcadores codominantes. E a sua principal limitação é o baixo conteúdo de informação genética por loco (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A dominância limita as inferências feitas com RAPD, principalmente em estudos com organismos diplóides e podem fornecer algum viés em alguns parâmetros genéticos quando comparados com marcadores multialélicos e codominantes (Lynch & Milligan, 1994). Outra limitação constitui-se no fato dessa técnica ser muito sensível às condições de amplificação, ou seja, ao tipo de enzima DNA polymerase, usada, concentração de DNA, concentração de magnésio e temperatura de anelamento, além de apresentar problemas de baixa reprodutibilidade na amplificação de alguns fragmentos de DNA (Pérez et al., 1998).

Alguns autores comentam que é possível minimizar a limitação dos marcadores RAPD. Uma delas é assumindo que a população está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e estimar as frequências alélicas, considerando as bandas como homólogas ou seja bandas que estão no mesmo loco (Buso et.al., 1998, Fischer et.al., 2001, Lynch & Milligan, 1994). Outra técnica que permite minimizar as limitações desse marcador é fazer o estudo de duas ou mais gerações e através da progênie, conhecer o genótipo dos pais e estimar frequências alélicas. Esse estudo pode ser encontrado no trabalho de Wadt (2001).

2.4.2 Marcadores Moleculares e Biodiversidade

A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão, tamanha a sua complexidade. O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (Dias, 1996).

Segundo Ehlich & Wilson (1991), uma das razões fundamentais para estabelecer programas de conservação da diversidade biológica reside no fato de que a humanidade já obteve enormes benefícios econômicos diretos da biodiversidade na forma de alimentos, medicamentos e produtos industriais, podendo obter ainda mais benefícios no futuro.

A biodiversidade pode ser entendida como uma preciosa “biblioteca genética” mantida em seus ecossistemas naturais, na qual apenas uma pequena parte de seus componentes foi adequadamente estudada e cujos benefícios futuros não são ainda conhecidos. É importante mencionar também que ainda que a diversidade da flora brasileira revele ótimas oportunidades para o desenvolvimento de novos produtos industriais ou medicinais, grupos brasileiros nesta área ainda são poucos (Brito & Nunes, 1997).

As principais causas da perda da diversidade genética têm sido associada à destruição e à fragmentação dos ecossistemas e aos estresses ambientais como a poluição e as mudanças climáticas globais. A preocupante taxa de extinção de espécies vegetais leva à necessidade de se considerar urgente estabelecimento de políticas e ações de conservação e, ao mesmo tempo, de se obter grandes quantidades de matéria prima vegetal para a obtenção de substâncias dela derivadas (Borris, 1996). Esse fato nada otimista demonstra que é necessário estabelecer estratégias para caracterizar e conservar a diversidade genética vegetal *in situ*.

Se considerarmos um cromossomo como uma associação temporária de alelos específicos, no caso da conservação *ex situ*, a intensidade de conservação é parcial, uma vez que o processo evolutivo é interrompido e congelado em determinado momento. Já em condições naturais, a cada ciclo reprodutivo ocorrem recombinações, rearranjos e mutações em taxas maiores do que aquelas que ocorrem nas condições *ex situ*. Além disso, é importante considerar que, em muitos casos, quando se considera a complexidade de

ecossistemas tropicais, ocorrem nas condições *in situ* interações complexas entre os componentes desse ecossistema que não são passíveis de serem reconstituídas nas condições *ex situ* (Fischer & Araujo, 1995). Em outros casos, a interação genótipo-habitat é tão elevada que algumas espécies não sobrevivem em ambientes degradados ou com menor complexidade. Isso quer dizer que, em muitos casos, mais importante do que conservar um germoplasma específico, é necessário estabelecer estratégias para a conservação de todo o ecossistema (Matos et al., 1999).

Os avanços científicos na área da biologia após a metade do século XX proporcionaram o desenvolvimento de dezenas de técnicas biotecnológicas, que estão facilitando a realização de estudos de genética e de melhoramento de plantas. Nesse contexto, podem ser empregadas ferramentas biotecnológicas associadas ao uso de marcadores moleculares para caracterização e monitoramento da diversidade genética, visando a sua utilização e conservação.

Comumente, os marcadores morfológicos são utilizados para discriminar espécies quando a morfologia é altamente semelhante e corre-se o risco de equívocos na classificação. Como no caso da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek, Celastraceae) a identificação via marcadores morfológicos não é tão simples, uma vez que existem várias espécies do mesmo gênero *Maytenus* com morfologia semelhante. E quando isso ocorre, existem implicações tanto para o consumidor como para a indústria. No caso do consumidor, ele está sendo enganado e no caso da indústria farmacêutica, a qualidade do produto estará certamente comprometida. A preocupação dos fitoterapeutas com a botânica é justificável, já que uma caracterização empobrecida da planta usada pode levar a enganos letais (Simões et al., 1999).

Nos casos, em que a análise morfológica impossibilita a identificação das espécies, podem-se utilizar marcadores moleculares com o objetivo de identificar espécies ou variedades. Esse processo de identificação de bandas exclusivas para uma espécie ou variedade é denominado *fingerprinting* e equivale a impressão digital, que é específica para cada indivíduo (Shaw & But, 1995). Assim é possível distinguir as espécies e averiguar qual espécie é falsa e qual é verdadeira.

Essa caracterização via marcadores moleculares de espécies frutíferas e lenhosa é uma prática comum nos programas de melhoramento, pois a identificação correta das variedades auxilia os melhoristas a esclarecer dúvidas quanto à legitimidade e qualidade do material (Fachinello et al., 2000). Vários trabalhos dessa natureza estão sendo

desenvolvidos como, por exemplo, o trabalho realizado por Fachinello et al. (2000) que detectou o polimorfismo enzimático nos tecidos de pereira (*Pirus communis* L.) para utilização na identificação varietal dessa espécie.

Outro trabalho que também está sendo desenvolvido utilizando marcadores moleculares em espécies frutíferas, é o caso da classificação botânica da Acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) que apesar da adoção desse nome pelo Conselho Internacional de Recursos Genéticos Vegetais em 1986, ainda é pouco utilizada. E essa inexistência de variedades definidas de acerola no Brasil, está causando sérios problemas para os agricultores, pois, o plantio de mudas a partir de sementes, causa uma desuniformidade muito grande na produção anual de frutos por planta, levando a perdas na produtividade e na qualidade dos frutos (Salla et al., 2002).

2.5 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES

Uma espécie é constituída normalmente por um grupo de populações dispostas em uma área geográfica, cujos indivíduos compartilham de um mesmo *pool* gênico, que não é acessível aos indivíduos de uma outra espécie (Valva & Coelho, 1997).

A definição de população, portanto engloba dois componentes, o componente genético que são os indivíduos de uma mesma espécie e o componente espacial que são esses indivíduos convivendo em uma mesma área (Valva & Coelho, 1997).

A expressão “estrutura genética” de populações refere-se à heterogeneidade na distribuição dos genótipos e ao grau de endogamia/coancestria entre e dentro de populações. O surgimento e a manutenção dessa estrutura são devidos a interações entre todo um conjunto de fatores evolutivos, como a variação no conjunto gênico, organização dessas variações nos genótipos, distribuição espacial desses genótipos, o sistema reprodutivo que controla como os gametas se unem para formar a progênie, a dispersão dessa progênie, os eventos estocásticos, os processos de crescimento, mortalidade e substituição que dão origem às futuras gerações, além da interação entre genótipo e ambiente e a ação da seleção natural (Valva & Coelho, 1997).

Nas plantas, a estrutura espacial que descreve como estas estão distribuídas no espaço, está intimamente relacionada com a estrutura genética dessas populações, pois as

plantas são fixas em um determinado ambiente, ao contrário dos animais que podem migrar de um ambiente para outro. A estrutura espacial dessas plantas está relacionada com o transporte de pólen e com a dispersão de sementes, pois de acordo com Valva & Coelho (1997), o sistema reprodutivo organiza a variabilidade genética enquanto o fluxo gênico determina os padrões de estruturação dentro e entre populações.

As populações vegetais devem ser entendidas como populações ligadas entre si pelo fluxo gênico, pois mesmo quando as populações ocupam habitats homogêneos e realizam fecundação cruzada, pode causar um mosaicismo espacial devido ao padrão do fluxo gênico, através da formação de grupos de indivíduos geneticamente aparentados. Mas esses grupos de indivíduos aparentados, ou seja, essa estruturação familiar dentro da população pode ter efeitos drásticos sobre a variabilidade genética, pois o índice de endogamia seria elevado (Cartew, 1993).

O modelo de isolamento por distância é o principal modelo para explicar como ocorrem as subdivisões das populações grandes (Wright, 1951). Nesse modelo o fluxo gênico ocorre entre os vizinhos e o cruzamento depende da distância entre os indivíduos ou da forma como as sementes são dispersas. No modelo de ilhas, a migração ocorre ao acaso entre um grupo de pequenas populações e o fluxo gênico é quantificado de acordo com a relação entre a variação total interpopulacional (F_{ST}) e o número de migrantes por geração (Moraes et al., 1999). No modelo de alpondras (*Stepping-stone*), cada população recebe migrantes somente de populações vizinhas e o efeito desse modelo é de reduzir a variação genética intragrupos e aumentar a variabilidade intergrupos.

Existem vários métodos de análise genética de populações, que podem ser realizados através de alguns parâmetros como diversidade genética média da população, variação nos níveis de diversidade em diferentes populações, correlação genética e distância genética entre populações diferentes (Brown, 1978). Em genética de populações, geralmente se assume um modelo de classificação hierárquica envolvendo os genótipos provenientes de diferentes populações que por sua vez podem ser provenientes de diferentes regiões.

A variabilidade genética de uma população geralmente é medida pela heterozigosidade média por loco, enquanto que as diferenças gênicas entre duas populações devem ser medidas pelas distâncias genéticas Nei (1973). E as medidas de diversidade mais utilizadas são as porcentagens de locos polimórficos, o número médio de alelos por loco polimórfico e heterozigosidade (Alfenas et al., 1998).

As diferenças genéticas podem ser analisadas através das distâncias genéticas que são utilizadas nas análises de agrupamento. E os métodos de agrupamento mais utilizados são dendrogramas e análise de coordenadas principais.

A distância genética mais utilizada em estudos de genética de populações é a estatística D de Nei (1972, 1978) na qual populações de frequências alélicas semelhantes são mais similares. Esse índice mede a correlação entre as frequências alélicas em cada loco com duas populações e mede a diversidade entre e dentro das unidades experimentais, sendo que estas unidades podem ser populações, subpopulações, espécies ou demes.

A análise de variância de frequências alélicas desenvolvida por Cockerham (1969, 1973) consiste na medida de correlação entre genes, compatibilizadas como medidas de probabilidade de identidade por descendência (Alfenas et al., 1998).

Para melhor avaliar os dados provenientes de marcadores dominantes, Excoffier et al. (1992), através da introdução da estatística Φ , proporcionaram uma nova alternativa para esse tipo de marcador que foi utilizado pela primeira vez por Huff et al. (1993). Essa nova alternativa consiste em um método denominado AMOVA (*Analyses of Molecular Variance*) que produz estimativas dos componentes de variância das estatísticas F de Wright no qual reflete a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica. Esse método consiste em analisar diferentes tipos de matrizes de dados, provenientes de diferentes tipos de marcadores sem modificar a estrutura básica da análise. E, segundo os autores que desenvolveram esse método, este é facilmente aplicável em diferentes situações e constitui uma estrutura coerente e flexível para análise de dados moleculares.

Na AMOVA, as somas de quadrado convencionais (SQ) podem ser escritas na forma de somas de quadrado de diferenças entre pares de observações. Dessa forma foi construído uma análise de variância hierárquica, partindo da matriz das distâncias quadradas de todos os pares de haplótipos. E para testar a significância do componente de variância entre duas populações, os indivíduos serão permutados entre essas duas populações, e a significância será dada pela razão entre o número de vezes que um valor obtido de uma permuta foi igual ou superior ao valor observado e o número de permutação n . Esse modelo é semelhante a análise de variância convencional o qual descreve os mesmos pressupostos de regiões, populações e indivíduos (Bandeira, 2002).

Essas metodologias usadas para estimar variação genética, nem sempre são fáceis de serem aplicadas a dados com marcadores dominantes como RAPD e por isso

outras propostas surgiram, no intuito de minimizar esses efeitos de dominância, como foi o caso da proposta de Lynch & Milligan (1994) que resultou em valores de F_{ST} semelhantes aos estimados a partir de tecidos haplóides e marcadores enzimáticos (Sales et al., 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada neste trabalho consistiu na coleta de populações naturais de *P. coriacea* e análise da variabilidade genética encontrada nestas populações através de marcadores de DNA amplificados ao acaso (RAPD). A partir dos resultados obtidos com estes marcadores fizeram-se todas as inferências e estimativas. Todas as análises de laboratório foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP) do Setor de Melhoramento de Plantas da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da UFG, em Goiânia (GO).

3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O trabalho de coleta do material vegetal foi realizado entre os meses de novembro de 2004 e março de 2005. Esse período foi escolhido porque corresponde ao período de floração e frutificação da espécie, facilitando a identificação da mesma no campo.

Para a realização desse trabalho, foram coletadas nove populações da espécie *P. coriacea* localizadas nos estados de Goiás e Bahia (Figura 4). As regiões de coleta foram determinadas a partir de entrevistas com raizeiros da região e após viagens de prospecção. Cada população coletada teve as suas coordenadas geográficas e altitude determinadas com o auxílio de GPS (*Global Positioning System*) (Tabela 1).

O material de coleta constituiu-se de seis a oito folhas jovens e sadias de 20 a 30 indivíduos. Essas folhas coletadas foram acondicionadas em tubos plásticos de 50 mL mantidas em gelo e transportadas até o LBMP - UFG onde estas foram armazenadas em freezer com temperatura de -20°C até o momento da extração do DNA para análise.

Tabela 1. Localização e caracterização de cada local de coleta e caracterização de cada população de *P. coriacea* e suas respectivas coordenadas geográficas (S – sul; WG – oeste de Greenwich).

Populações	Código	Municípios	Latitude	Longitude
1	ABA	Abadia de Goiás	16° 41' 26" S	49° 15' WG
2	URU	Uruaçu	14° 31' 24" S	49° 09' WG
3	CRI	Cristianópolis	17° 12' 00" S	48° 42' WG
4	COR1	Correntina 1	13° 26' 00" S	45° 18' WG
5	COR2	Correntina 2	13° 33' 57" S	45° 29' WG
6	JAT	Jataí	17° 51' 50" S	52° 00' WG
7	GUA	Guapo	16° 50' 53" S	49° 33' WG
8	PER	Perolândia	17° 36' 43" S	52° 02' WG
9	CAI	Caiapônia	17° 19' 29" S	51° 47' WG

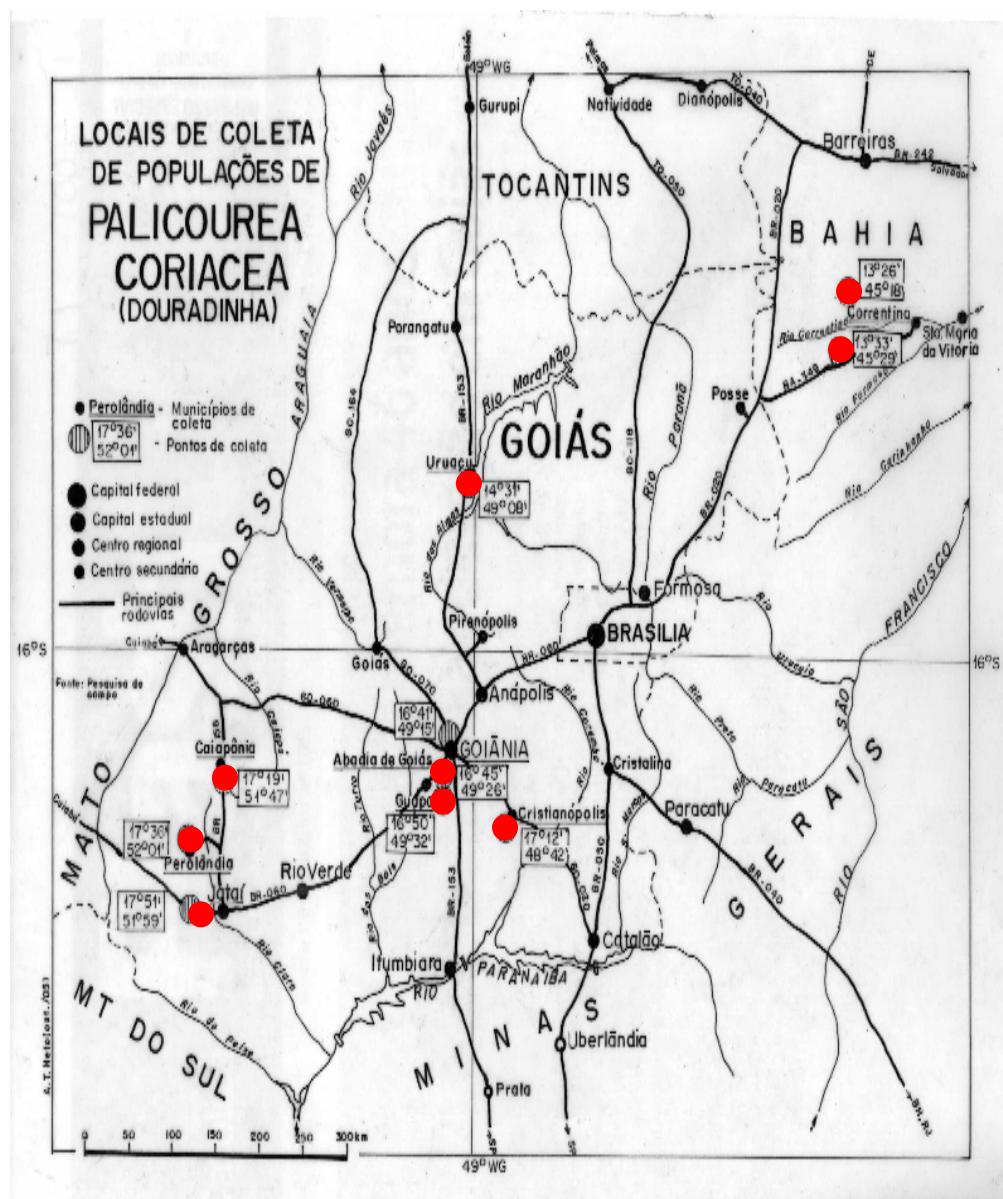


Figura 4. Mapa dos locais de coleta das populações de *P. coriacea*, nos Estados de Goiás e Bahia (desenhado por Antônio Teixeira Neto - 2005).

3.2 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE *PRIMERS*

A extração do DNA foi realizada com base no protocolo CTAB 2% descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998), com modificações (Anexo B). Uma vez isolado, o DNA foi seco e ressuspendido em 50 µl de tampão TE (10mM tris-HCl, pH 8,0; 0,1mM EDTA), sendo armazenado em freezer com temperatura de -20°C.

Após a extração, o DNA foi quantificado utilizando diferentes concentrações de DNA fago λ: 25 ng, 50 ng, 75 ng e 100 ng. A concentração das amostras obtidas foi estimada por comparação visual da intensidade de fluorescência das bandas do DNA do fago λ. Foram realizadas eletroforeses em cubas horizontais utilizando géis de agarose a 1 %, submetido a 100 V durante uma hora. Para a visualização dos resultados, os géis foram corados com brometo de etídio diluído em 2 L de água destilada (0,5µg/ml), submetidos à luz ultravioleta e fotografados com máquina digital Canon Power Shot A300. Após a quantificação, o DNA de cada planta foi diluído a concentração de 5 ng/µl e mantido no freezer à temperatura de -20°C, para posterior utilização em reações de amplificação.

Para a seleção dos melhores marcadores foram testados um total de 94 *primers* pertencentes às séries: A, AA, AC, AF, B, BA, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, R, T, U, V, X, Z e W (Operon Technologies - Alameda, CA). Para verificação do perfil de amplificação de cada *primer*, foram utilizados dez indivíduos da população de Cristianópolis (GO).

3.3 AMPLIFICAÇÃO DO DNA UTILIZANDO MARCADORES RAPD

As reações de amplificação seguiram as concentrações de reagentes otimizadas no LBMP/UFG, sendo estas 10 ng/µl de DNA genômico em um volume final de 15µL contendo: 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,8; 2,8 mM MgCl₂; 0,4 mM dNTPs; 2 µM de *primer* e 1 U de *Taq* DNA polimerase. Essas reações foram realizadas utilizando microplacas de 96 poços e o termociclador utilizado foi o modelo PTC – 100 (Mj Research, Watertown, MA), programado para um passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos e 49 ciclos repetidos de 92°C por 30 segundos, 37°C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Finalizando com um passo adicional de extensão a 72°C por 6 minutos.

Os produtos das reações de amplificação foram separados eletroforéticamente em gel de agarose horizontal, com concentração de 1,2 %, aplicando-se 90 V por quatro horas. Os géis foram corados com brometo de etídio e os produtos da amplificação foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

3.4 ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL

A análise da estrutura genética das nove populações de *P. coriacea*, foi realizada, utilizando duas metodologias: Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et.al., 1992) e análise de estruturação da variabilidade genética baseada na Estatística Bayesiana proposta por Holsinger et al. (2002).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) permite analisar a variabilidade entre e dentro de populações locais, partindo de uma matriz de distância euclidiana, calculada entre indivíduos, com base na presença e ausência das bandas RAPD. E a significância destas estimativas foi obtida pelo método de randomização utilizando 1000 *bootstraps*. Segundo essa metodologia, os indivíduos também podem ser agrupados, de acordo com critérios não genéticos, ou seja, critérios geográficos, ecológicos e ambientais. Essa análise de variância denominada AMOVA, produz estimativas do componente de variância que são análogas às estatísticas F que os autores chamam de estatísticas Φ no qual refletem a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis hierárquicos (Tabela 2).

Tabela 2. Esperanças matemáticas dos quadrados médios [E(QM)] para populações (P), indivíduos dentro de populações (I/P), conforme Excoffier et al. (1992).

Fonte de variação (FV)	Grau de liberdade	SQ	QM	E(QM)
Populações (P)	P-1	SQ_a	QM_a	$\sigma_b^2 + 2\sigma_a^2$
Indivíduo (I)/P	N-P	SQ_b	QM_b	σ_b^2
Total	N-1			

O componente de variância inter-populacional é estimado por equações das esperanças de quadrado médio (QM), o qual, segundo Cockerham (1969), temos:

$$\Phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma^2}$$

em que:

- Φ_{ST} : a proporção da variabilidade molecular de haplótipos entre populações.

Para a análise de variância de dados moleculares (AMOVA) foi utilizado o software Arlequin (Schneider et al., 2000).

A segunda metodologia utilizada nesse trabalho foi realizada para estimar a divergência entre as populações, baseada em estimadores que são utilizados na estatística Bayesiana que foi proposta por Holsinger et al. (2002) e implementada utilizando o programa HICKORY v. 1.0 (Holsinger & Lewis, 2003). A notação foi proposta por Holsinger (1999) e Holsinger et al., (2002), baseada em uma analogia com as fórmulas para estimativa das estatísticas- F propostas por Weir & Cockerham (1984).

Nesse modelo, o f equivale ao F_{IS} (índice que indica a probabilidade de dois alelos serem idênticos por descendência, com um intervalo de confiança de 95%) e o θ^B equivale ao F_{ST} . E para os marcadores dominantes a distribuição dos parâmetros é dada por:

$$P\left(f, p, \pi / N_{A1} N_{A2}\right) \alpha$$

$$\left[\prod_{i=1}^I \left(\prod_{K=1}^K \gamma_{A1,ik}^{N_{A1,ik}} P\left(\gamma_{ik} / \pi_i, \theta, f\right) \right) P(\pi_i) \right] P(\theta) P(f)$$

em que:

$P(f)$ e $P(\theta)$ referem-se ao número de fenótipos dominantes e recessivos no loco i da população k ;

$P(\pi_i)$ refere-se a distribuição *a priori* da média das frequências alélicas por loco;

$P(\gamma_k / \pi, \theta, f)$ é a frequência fenotípica inicial em cada população.

Para calcular $P(\gamma_{ik} / \pi_i, \theta, f)$ deve assumir que a distribuição *a priori* da frequência dos alelos no loco i na $k^{ésima}$ população, P_{ik} , é dada por uma distribuição- β com

parâmetros $\left[\left(1 - \frac{\theta}{\theta} \right) \right] \pi_i$ e $\left[\left(1 - \frac{\theta}{\theta} \right) \right] (1 - \pi_i)$. A frequência fenotípica corresponde deve ser calculada como:

$$\gamma_{A1,ik} = P_{ik}^2 (1 - f) + P_{ik} f + 2P_{ik} (1 - P_{ik}) (1 - f)$$

$$\gamma_{A2,ik} = (1 - P_{ik})^2 (1 - f) + (1 - P_{ik}) f$$

Note-se que o primeiro estágio da verossimilhança consiste de uma amostragem binomial dos fenótipos. Estas equações assumem que são feitas amostragens independentes tanto nos locos quanto nas populações. Amostragens independentes sobre os locos permitem ignorar qualquer dependência de distribuições estatísticas associadas com desequilíbrio gamético ou identidade, de modo que se espera que esses efeitos sejam pequenos. Amostragens independentes sobre as populações já são um pouco mais problemáticas, uma vez que as altas correlações entre as populações podem ocorrer em modelos genéticos realistas devido aos processos espacialmente estruturados de fluxo gênico, especialmente quando o número de populações e a taxa de mutação são pequenos. Como acontece frequentemente em modelos Bayesianos hierárquicos relativamente complexos, as expressões para as distribuições *a posteriori* do f e do θ^B não são disponíveis. Por isso utiliza-se o método da Cadeia Markoviana por método de Monte Carlo (MCMC) para aproximar a distribuição *a posteriori* do f e do θ^B para qualquer tipo de dado genético. De acordo com Holsinger et al. (2002) este valor de f é considerado em populações com mais de 10 indivíduos.

Os valores da distribuição *a posteriori* de f e do θ^B variam entre 0 e 1. E os caminhos para sumarizar a distribuição desses parâmetros seriam utilizar as informações das médias e os desvios padrões *a posteriori* ou usar diretamente os parâmetros α e β da distribuição β que fornece uma aproximação boa da distribuição *a posteriori*. Recomenda-se que para escolha do melhor modelo que se ajusta, deve-se analisar as duas formas.

A metodologia não pressupõe, *a priori*, a existência de endogamia e nem de equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações locais. A distribuição *a posteriori* do estimador θ^B se aproxima numericamente à simulação realizada pela MCMC, tendendo a convergir para a distribuição β , como já discutido anteriormente.

O software HICKORY v 1.0, permite estimar, portanto o valor de θ^B por meio de quatro modelos diferentes. Sendo que o primeiro modelo, o “*full model*”, permite a estimativa tanto do θ^B quanto do f . O segundo e o terceiro modelo assumem que o θ^B e o f são iguais a zero. E o terceiro modelo, denominado *Free f* permite com que o f fique livre

para variar. Nesse caso, o modelo escolhe valores de f aleatoriamente para a distribuição *a priori* enquanto estima os outros parâmetros durante a análise pela MCMC. Os resultados destes modelos são então comparados usando o “Deviant Information Criterion (DIC)” (Holsinger, 1999; Holsinger et al., 2002; Spiegelhalter et al., 2002; Holsinger & Wallace, 2004).

Para escolher o melhor modelo, vários parâmetros são utilizados como o I_e que é uma medida de informação fornecida para estimar o parâmetro do conjunto de dados, e se esses valores forem altos, significa que mais informação foi extraída dos dados. O $H-d$ que é um parâmetro importante, pois mede a “distância” entre as simulações das distribuições *a posteriori* e a sua aproximação da distribuição β , podendo ser interpretado como uma porcentagem da não-sobreposição entre essas distribuições. Se $H-d$ for igual a zero, significa que as distribuições são idênticas, e por outro lado se for igual a 1, as distribuições são completamente diferentes.

Outros parâmetros utilizados também na escolha do melhor modelo são DIC e Dbar, sendo que Dbar é uma medida de como o modelo se ajusta aos dados e quanto menor o valor melhor, e DIC leva em conta o número aproximado de parâmetros que foram estimados (pD) e quanto menor o seu valor, melhor.

3.4.1 Divergência Genética e Padrão Espacial

A divergência genética entre as populações foi avaliada com base na matriz de distância genética obtida pela AMOVA e essa matriz foi analisada a partir de uma análise de agrupamento tipo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method by Arithmetic Averages*) que produz um arranjo hierárquico das populações, representado por um dendrograma, sendo esta representatividade testada por meio da correlação entre as distâncias genéticas originais e as distâncias genéticas entre as populações no dendrograma (correlação cofenética) (Telles et al., 2006).

A fim de testar a significância da associação entre as matrizes de distância genética e distância geográfica, foi utilizada a estatística Z de Mantel com 9999 permutações, cujo valor é dado por:

$$Z = \sum_{i,j=1}^n X_{ij} Y_{ij}$$

onde X_{ij} e Y_{ij} são elementos das matrizes X e Y ou seja matriz de distância genética e geográfica. A significância do Z pode ser obtida comparando o valor observado com o valor de uma distribuição nula, aleatorizando esses valores diversas vezes (Manly, 1997).

O teste de Mantel e as correlações matriciais também foram utilizadas para determinar o padrão da estrutura espacial das populações de *P. coriacea*, calculando os coeficientes de correlação matricial entre distâncias genéticas, entre populações “ligadas” a uma distância geográfica de 200 km.

Neste trabalho foram estimadas, com base nas frequências alélicas populacionais obtidas pela metodologia de Lynch & Milligan (1994), as distâncias genéticas de Nei (1972), e a porcentagem de locos polimórficos entre os pares de populações.

As análises de divergência genética multivariadas e os testes de Mantel foram realizados utilizando o pacote NTSYS 1.5 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analyses System) (Rohlf, 1989). E a diversidade de Nei (1972) foi testada através do software POPGENE v.1.32 (Population Genetic analysis) (Yeh et al., 1999).

3.4.2 Métodos de estimação do Fluxo gênico

A variabilidade genética nas populações é resultado de vários fatores, dentre eles o fluxo gênico, que, quando restrito as populações, tendem a ter um menor tamanho efetivo e mais endogamia, resultando em uma maior divergência entre si. Por outro lado, quando este fluxo é alto a tendência é homogeneizar as diferenças genéticas entre as subpopulações, mesmo em presença de uma seleção intensa (Valva & Coelho, 1997). Portanto segundo Futuyma (1992), a taxa de fluxo gênico influencia o tamanho efetivo da população. Existem diversos modelos de fluxo gênico que correspondam a diferenças na estrutura genética da população (Futuyma, 1992), dentre eles destacam-se:

- Modelo Continente – ilha, no qual efetivamente existe um movimento unidirecional de uma população grande para uma menor e isolada.

- Modelo ilha, no qual a migração ocorre ao acaso entre um grupo de pequenas populações.
- Modelo de alpondras (stepping-stone), onde cada população recebe migrantes somente de populações vizinhas.
- Modelo de isolamento por distância, no qual o fluxo gênico ocorre localmente entre os vizinhos, em uma população de distribuição contínua.

Sendo assim, o fluxo gênico pode ser estimado através de medidas diretas e indiretas. As medidas diretas referem-se ao fluxo gênico contemporâneo e são medidos através da utilização de corantes, marcadores morfológicos e análise de paternidade, enquanto que as indiretas são baseadas em estruturas populacionais e referem-se ao fluxo gênico histórico e passado (Levin & Kerster, 1974).

Os métodos indiretos são via F_{ST} , alelos privados, auto-correlação espacial e baseados em inferências indiretas do fluxo gênico. O método do F_{ST} , é baseado na análise da estrutura genética de populações, sendo muito utilizado para estimar o número de migrantes por geração (Nm) para um conjunto de populações e sub-populações. O fluxo calculado através do parâmetro F_{ST} é chamado fluxo gênico aparente, pois este admite que a estrutura genética das populações está sob o modelo de ilhas de Wright (1951) e assume equilíbrio entre migração e deriva genética. Dessa forma tem-se:

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

em que:

- m : taxa de migração;
- N : tamanho populacional;
- Nm : número de migrantes/ geração;

Segundo Wright (1951), quando $Nm \geq 1,0$, ou seja, quando um ou mais indivíduos migram por geração, os efeitos da migração são suficientes para contrapor os

efeitos da deriva e, portanto, o número de migrantes por geração impede a divergência entre populações.

3.4.3 Tamanho efetivo

De acordo com a genética de populações, a erosão genética e as medidas para combater os seus efeitos, podem ser analisadas sob a ótica do tamanho efetivo populacional. Esse conceito foi introduzido por Sewal Wright há mais de 50 anos e está relacionado com a representatividade genética de amostras de plantas e sementes (Vencovsky, 1987).

A conservação eficiente da variabilidade genética de uma espécie depende basicamente da manutenção *in situ* ou *ex situ* de amostras com tamanho efetivo adequado. E quando ocorre alguma variação entre as subpopulações, é necessário amostrar um grande número de populações, para se ter um tamanho efetivo adequado (Chaves, 2001).

A equação que evidencia o tamanho efetivo, segundo Vencovsky & Crossa (1999), é a seguinte:

$$N_e = \frac{1}{2D_1}, \text{ em que:}$$

$$D_1 = F_{ST} \left[\frac{1+C^2}{S} \left(\frac{S^*}{S^*-1} \right) - \frac{1}{S^*-1} - \frac{1}{n} \right] + \frac{1+F_{IT}}{2n}$$

Sendo:

- C^2 : Diferença entre os coeficientes de variação das subpopulações;
- S^* : Número infinito de populações existentes na natureza;
- n : Número de indivíduos dentro das populações;

E admitindo que a endogamia na população seja desprezível, a equação pode ser escrita da seguinte maneira:

$$N_e \cong \frac{S}{2F_{ST}} \Leftrightarrow S \cong 2F_{ST}N_e$$

De acordo com essa equação, podemos então inferir sobre o número de populações adequadas para conservação de uma determinada espécie. Por exemplo: um conjunto de populações, com um valor de F_{ST} igual a 0,10 e com tamanho efetivo de 500 o que convencionalmente considera-se adequado para conservação de recursos genéticos, seriam necessários no mínimo 100 populações dessa população para ser conservada. Ou seja, sob o ponto de vista de conservação *in situ*, seria necessário então não somente a conservação de parques e reservas naturais, como também a conservação das propriedades particulares e das reservas legais (Chaves, 2001; Costa & Scariot, 2003).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES E LOCAIS DE COLETA

A espécie *P. coriacea*, tem sua ocorrência restrita ao Sistema Biogeográfico dos Cerrados. Dados preliminares e indicações de locais de coleta citados na dissertação de Laureano (2001) indicaram que a ocorrência dessa espécie estaria restrita ao Subsystema de Campo Sujo. Porém, de acordo com as informações obtidas durante a fase de prospecção e coleta do material vegetal, pôde-se perceber que a sua distribuição não é uniforme e não está associada a um ambiente específico conforme descrito anteriormente. A espécie ocorre tanto em áreas de Chapadões, Covais, áreas de Cerrado *Strictu - Senso* e até Cerradão.

Uma das regiões de coleta foi no município de Uruaçu, próximo ao vale do Rio Passa – Três. A vegetação típica desse local é uma mancha de Cerrado *Strictu - Senso* e o solo é resultante da decomposição de rochas intrusivas básicas, com presença de gabro, piroxenitos, anfibólitos e metabasitos de idade correspondente ao Pré-Cambriano Inferior (Anexo A). A área específica da coleta refere-se a uma zona com predominância de terrenos gnáissicos-migmatitos, de acordo com o Mapa Geológico de Goiás-Tocantins (1987).

No município de Perolândia, a coleta foi realizada em áreas de Cerradão, em terrenos que correspondem à Formação Serra Geral, de idade Cretácea e os solos são oriundos da decomposição de rochas basálticas.

A coleta efetuada no município de Guapó foi realizada em uma área totalmente degradada, que se enquadra na formação geológica do grupo Araxá, do Proterozóico Médio. O solo é resultante da decomposição de gnaisses, anfibólio, xisto, micaxistos com granada, cianita, calcita, quartzo com xisto, dentre outros.

Em Jataí, a coleta foi realizada no ambiente de Covais. Este ambiente é caracterizado por áreas encharcadas e por uma geomorfologia peculiar, onde sobressaem pequenas colinas ou morrotes separadas por filões de água. Nesses morrotes é encontrada a *P. coriacea* em abundância. Essa área se enquadra na Formação geológica Cachoeirinha,

de idade Terciária que se caracteriza por solos com concentrações argilo-arenosas, de natureza laterítica, de coloração avermelhada e a granulometria é fina e média.

Na região de Caiapônia a coleta foi efetuada nas bordas dos chapadões onde nascem os Rios Claro (Bacia do Paranaíba) e o Rio Caiapó (Bacia do Araguaia). A vegetação no local da coleta ainda estava intacta e corresponde ao Cerrado *Strictu - Senso*. A Formação geológica característica é Aquidauana, com idade que corresponde ao Carbonífero Superior. O solo é arenoso, de granulação variável, de cor vermelho arroxeadado, associada a siltito e argilito. O local específico da coleta, no aparado da Serra, parece refletir uma área de contato entre a formação Cachoeirinha de Idade Terciária e a formação Aquidauana, pois no local foram registrados, argila e laterita.

No Estado da Bahia foram realizadas duas coletas no município de Correntina, denominados de Correntina I e Correntina II. A coleta da população Correntina I foi efetuada próxima ao Rio Santo Antônio, no município de Correntina em ambiente de Cerradão e em terrenos que, de modo geral, se enquadram na Formação geológica Urucuia de idade Cretácea. Entretanto, o local específico de coleta demonstra contato geológico de formações variadas, embasamento cristalino (granito), formação Bambuí Calcário e formação Urucuia com predominância deste. Este contato promove no local o aparecimento de uma pequena mancha de solo diferenciado dos solos arenosos da formação Urucuia.

A vegetação do local de coleta da população de Correntina II é caracterizada por uma transição entre o Cerrado e Campo, chamado regionalmente por Campina. O solo é resultante do acúmulo de areia da Formação Urucuia de idade Cretácea. Entretanto há entre os grãos de areia, lentes de argila, constituindo-se em pequenas manchas de solo areno-argiloso.

A coleta efetuada no Distrito de Abadia de Goiás foi realizada em uma chácara urbana, com vegetação de Cerrado *Strictu - Senso*, parcialmente preservada. A formação geológica se enquadra dentro do grupo Araxá, sendo a pedologia idêntica à área de coleta do município de Guapó e Cristianópolis. Estas três áreas estão enquadradas, dentro de uma grande unidade fisionômica, denominada Mato Grosso Goiano, hoje totalmente desconfigurada.

A coleta da população denominada Cristianópolis, foi realizada no Sítio Araçá, município de Bela Vista (GO). Essa coleta foi efetuada próximo ao Ribeirão Passa-Quatro, com vegetação de Cerrado *Strictu - Senso* ainda intacta. Os terrenos se enquadram na

formação geológica do grupo Araxá, tendo as mesmas características pedológicas descritas para a região de Guapó, embora dista deste ponto mais de 90 Km.

Deste modo, pode-se constatar que a ocorrência de *P. coriacea* não está associada a um tipo específico de solo, nem às formações geológicas específicas. Pelo contrário, tanto ocorre em solos encharcados, como em solos bem drenados e secos superficialmente.

Evidenciamos também nos resultados obtidos que há uma semelhança entre os ambientes de coleta e a caracterização morfológica das populações coletadas. Ou seja, populações coletadas em ambientes degradados ou em regiões bem antropizadas e no ambiente de Cerrado *Strictu - Senso* possuem as mesmas características como folhas grandes e base arredondada. Um resumo das informações sobre os locais de coleta encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização, tipo fisionômico, altitude e caracterização do solo das populações de *P. coriacea*.

Pop.	Altitude (em m)	Tipo fisionômico	Conservação do ambiente	Caracterização do solo
Abadia de Goiás	898	Cerrado <i>Strictu Senso</i>	Antropizado	Gnaisses, anfibolito, micaxisto, xisto, cianita e calcita.
Uruaçu	520	Cerrado <i>Strictu-Senso</i>	Antropizado	Gabro, piroxenitos, anfibolitos, e metabásitos
Cristianópolis	802	Cerrado <i>Strictu-Senso</i>	Intacto	Gnaisses e anfibolito. Micaxisto, xisto, cianita e calcita.
Correntina 1	680	Cerradão	Intacto	Areno-argiloso
Correntina 2	680	Campina	Intacto	Areno-argiloso
Jataí	702	Covais	Intacto	Argilo-arenosas
Guapo	707	Cerrado <i>Strictu Senso</i>	Antropizado	Gnaisses, anfibolito, micaxisto, xisto, cianita e calcita.
Perolândia	889	Cerradão	Intacto	Rochas basálticas
Caiapônia	752	Cerrado <i>Strictu Senso</i>	Intacto	Siltito e argilito

4.2 SELEÇÃO DE *PRIMERS* RAPD E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA

Dos 94 *primers* RAPD testados da série Operon Technologies para a espécie *P. coriacea*, 30 foram monomórficos e 64 apresentaram locos polimórficos. Destes 64 *primers*, foram selecionados 10 (Tabela 5) que apresentaram os melhores perfis de amplificação e os maiores números de locos por *primer*, variando de 12 (OPAA-07) a 20 (OPH-11), totalizando 164 locos, porém com uma considerável variação na intensidade das bandas. O tamanho dos fragmentos amplificados variaram de 123 pb a 1722 pb. O número médio de locos foi 16,4 por *primer* e não foi detectada a presença de locos monomórficos considerando todas as populações. A Figura 5 ilustra o padrão de amplificação obtido pela análise RAPD.

Para uma análise mais concisa dos dados, foram retirados os indivíduos com mais de 30% de dados perdidos, totalizando 168 indivíduos, com uma média de 18,66 indivíduos por população (Tabela 4).

A partir da genotipagem dos géis, foi gerada uma matriz de dados binários presença (1) e ausência (2) de bandas RAPD. E com base nesta matriz foram realizados os cálculos para a Análise de Variância de Dados Moleculares (AMOVA), Análise de Diversidade genética através do método UPGMA e estimativas utilizando Estatística Bayesiana.

Tabela 4. Quantidade de indivíduos que foram coletados e a quantidade após a retirada dos indivíduos com mais de 30 % de dados perdidos.

Populações	Início	Final
Abadia de Goiás	30	28
Uruaçu	21	13
Cristianópolis	25	9
Correntina 1	28	26
Correntina 2	28	18
Jataí	30	21
Guapo	29	25
Perolândia	30	14
Caiapônia	30	14

A porcentagem de locos polimórficos observada em cada população, variou de 82,93% (Uruaçu) a 95,73% (Abadia de Goiás). A diversidade genética ou heterozigosidade esperada (H_e) de Nei (1972) foi alta e variou entre 0,259 a 0,338 nas populações, com um valor geral de 0,296 (Tabela 6).

Tabela 5. *Primers* RAPD selecionados para a espécie *P. coriacea* com suas seqüências de bases nitrogenadas, número de locos amplificados e polimórficos.

Primer	Seqüência 5'→3'	Nº de locos	Amplitude de variação dos locos
OPAA 07	CTA CGC TCA C	12	1599 a 246
OPB 08	GTC CAC ACG G	17	1599 a 246
OPB 11	GTA GAC CCG T	15	1476 a 246
OPB 12	CCT TGA CGC A	14	1353 a 123
OPB 13	TTC CCC CGC T	16	1722 a 246
OPF 06	GGG AAT TCG G	19	1722 a 123
OPG 17	ACG ACC GAC A	18	1599 a 123
OPH 03	AGA CGT CCA C	15	1476 a 123
OPH 11	CTT CCG CAG T	20	1722 a 246
OPAC 14	GTC GGT TGT C	18	1476 a 123
Total:		164	

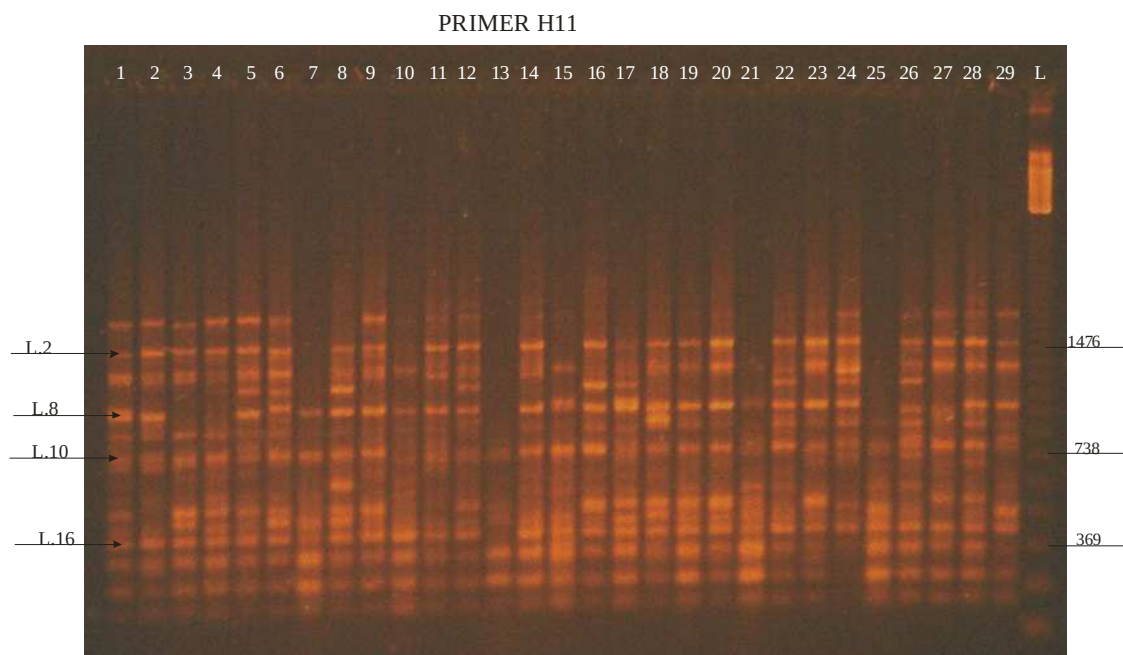


Figura 5. Perfil de amplificação do *primer* OPH-11 na população de Guapó com 29 indivíduos. As setas indicam quatro dos 20 locos polimórficos selecionados para análise (lado esquerdo) e os respectivos pesos moleculares (lado direito). A letra L indica o marcador de peso molecular (Ladder 123 bp, Invitrogen).

Tabela 6. Relação da heterozigosidade de Nei (He), porcentagem de locos polimórficos (LP), e número de locos polimórficos por população de *P. coriacea*.

Populações	He (Nei)	Nº de locos polimórficos	% de locos polimórficos
Abadia de Goiás	0,338	157	95,73
Uruaçu	0,259	136	82,93
Cristianópolis	0,304	149	90,85
Correntina 1	0,297	149	90,85
Correntina 2	0,259	144	87,80
Jataí	0,296	152	92,68
Guapo	0,312	151	92,07
Perolândia	0,319	149	90,85
Caiapônia	0,284	147	89,63
Geral	0,296	164	100,00

4.3 ESTRUTURA GENÉTICA

A análise de variância molecular (AMOVA) forneceu um valor de $\Phi_{ST} = 0,230$ utilizando 1000 permutações, indicando que 23% da variabilidade genética está entre populações e 77% da variabilidade genética está dentro das populações (Tabela 7). O valor de Φ_{ST} para os pares de populações, variou entre 0,109 e 0,235 (Figura 6).

Apesar da distância genética obtida pela AMOVA ser o método mais utilizado em trabalhos de caracterização genética, neste trabalho optou-se também por utilizar a Estatística Bayesiana (θ^B), sendo este um método desenvolvido recentemente para dados binários com marcadores dominantes. Os resultados obtidos nesta análise estão descritos na Tabela 8.

Dos quatro modelos testados, o *full model* foi o que apresentou menor DIC (*Deviant Information Criterion*) e menor Dbar sendo estes valores 6541,79 para o DIC e 5481,60 para Dbar, indicando ser este o melhor modelo para estimar a variabilidade genética das populações, revelando um valor de $\theta^B = 0,22$ (Tabelas 8 e 9), o que indica que 22 % da variabilidade genética se encontra dentro das populações, sendo este valor semelhante ao encontrado nos resultados da AMOVA.

Baseado no *full model*, modelo escolhido para representar a estimativa da estimação da variabilidade genética entre e dentro das populações de *P. coriacea*, o valor de $f = 0,98$, equivalente ao F_{IS} sugere-se que essa espécie se comporte como uma espécie preferencialmente autógama.

Tabela 7. Resultado da Análise de Variância Molecular (AMOVA) e estimativa de fluxo gênico (N_m) calculado pelo método de Wright (1951) com base em 164 locos RAPD.

Fonte de variação (FV)	GL	SQ	Porcentagem total da variação	E(QM)	Estatística Φ	N_m
Entre populações	8	1401,523	23,01	8,055 Va	0,230	0,835
Dentro de populações	159	4285,828	76,99	26,954 Vb	1- $\Phi = 0,77$	
Total	167	5687,351	35,010			

Tabela 8. Resultado da análise Bayesiana entre nove populações de *P. coriacea* incluindo todos os modelos testados e o ajuste do modelo Dbar e DIC.

Modelo	F	θ^B	Dbar	DIC
<i>Full</i>	0,98	0,22	5481,60	6541,79
$f = 0$	-	0,16	5488,90	6593,16
$\theta^B = 0$	0,96	-	11437,11	11598,45
free f	0,50	0,20	5582,98	6707,82

Tabela 9. Resultado da análise Bayesiana entre as nove populações de *P. coriacea*, incluindo as medidas de informação I_e e a distância H-d entre a distribuição *a posteriori* e uma distribuição β , para os quatro modelos testados.

Modelo	<i>full</i>		$f = 0$		$\theta^B = 0$		free f	
	I_e	H-d	I_e	H-d	I_e	H-d	I_e	H-d
F	3,038338	0,002412	-	-	2,138195	0,002967	0,000105	0,001967
θ^B	3,41877	0,000683	3,66588	0,000688	-	-	2,807556	0,009492

4.4 DIVERGÊNCIA GENÉTICA E PADRÃO ESPACIAL

Através do dendrograma construído pelo método UPGMA utilizando as matrizes de distância genética (Figura 7 e 9), pôde-se observar que não existe uma relação clara entre distância genética e geográfica. Populações geograficamente próximas como Abadia de Goiás (1) e Guapó (7), estão geneticamente distantes entre si. Os agrupamentos obtidos pelo método UPGMA utilizando as matrizes de distância Φ_{ST} e θ^B mostram que não houveram diferenças significativas entre os resultados obtidos com as duas estatísticas.

No sentido de investigar o padrão espacial da variabilidade genética presentes nestas populações, o teste de Mantel realizado apresentou uma baixa correlação matricial entre distância genética e distância geográfica, igual a 0,155 ($p = 0,239$ com 1000 permutações) não significativa. Estes resultados demonstram no gráfico de dispersão (Figura 10) que não existe um padrão espacial claro que possibilite a interpretação global da estruturação da variabilidade genética a partir das distâncias geográfica, ou seja, não se pode observar a formação de grupos entre as populações amostradas, próximas geograficamente sugerindo que estas estão evoluindo independentemente uma da outra. Estes resultados confirmam o que foi observado no UPGMA.

Também foi testada a correlação matricial entre distância geográfica e distância genética considerando populações “ligadas” a uma distância geográfica até 200 km o que também não indicou nenhuma correlação entre essas distâncias, descartando assim a possibilidade de um correlograma espacial multivariado (Sokal et al., 1986).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0,000								
2	0,179	0,000							
3	0,121	0,142	0,000						
4	0,190	0,193	0,169	0,000					
5	0,150	0,183	0,141	0,174	0,000				
6	0,174	0,188	0,158	0,187	0,165	0,000			
7	0,188	0,235	0,175	0,215	0,212	0,179	0,000		
8	0,160	0,186	0,141	0,179	0,165	0,143	0,176	0,000	
9	0,169	0,143	0,131	0,168	0,150	0,143	0,183	0,109	0,000

Figura 6. Matriz de distância genética baseada em valores de Φ_{ST} par a par entre as nove populações de *P. coriacea*, com base em locos RAPD.

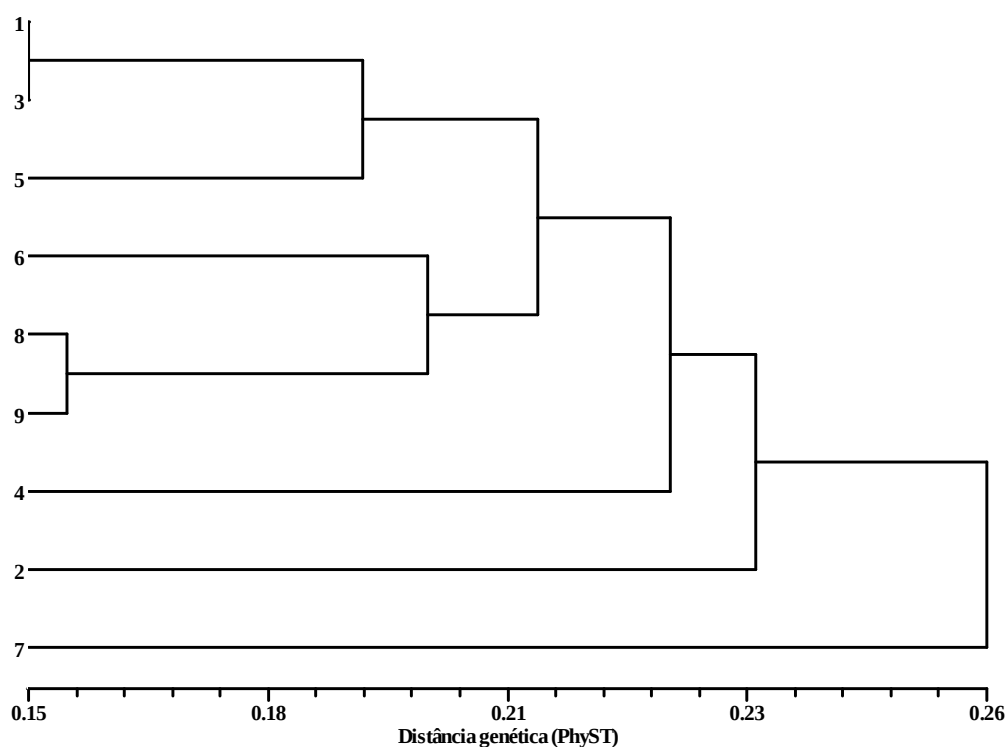


Figura 7. Dendrograma gerado a partir do critério UPGMA apresentando as distâncias genéticas Φ_{ST} par a par entre as nove populações de *P. coriacea* com base em 164 locos RAPD. Correlação cofenética igual a 0,826. Pop. 1: Abadia de Goiás, Pop. 2: Uruaçu, Pop 3: Cristianópolis, Pop 4: Correntina 1, Pop 5: Correntina 2, Pop 6: Jataí, Pop 7: Guapo, Pop 8: Perolândia, Pop 9: Caiapônia.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0,000								
2	0,179	0,000							
3	0,121	0,142	0,000						
4	0,190	0,193	0,169	0,000					
5	0,150	0,183	0,141	0,174	0,000				
6	0,174	0,188	0,158	0,187	0,165	0,000			
7	0,188	0,235	0,175	0,215	0,212	0,179	0,000		
8	0,160	0,186	0,141	0,179	0,165	0,143	0,176	0,000	
9	0,169	0,143	0,131	0,168	0,150	0,143	0,183	0,109	0,000

Figura 8. Matriz de distância genética baseada em valores de θ^B par a par entre as nove populações de *P. coriacea*, com base em locos RAPD.

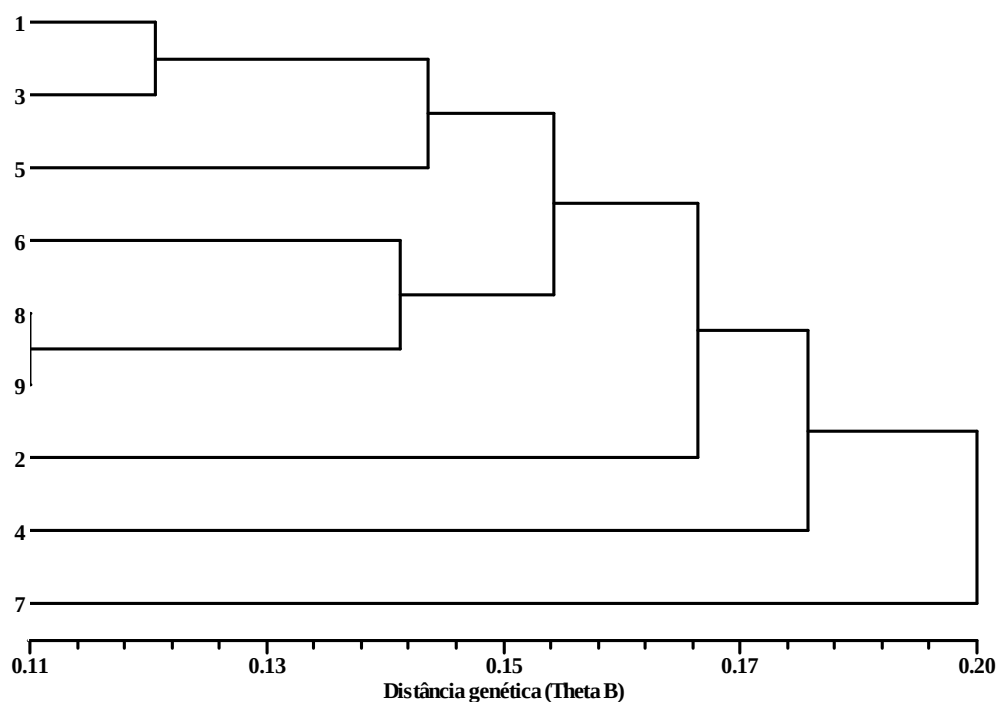


Figura 9. Dendrograma gerado a partir do critério UPGMA apresentando as distâncias genéticas θ^B par a par entre as nove populações de *P. coriacea* com base em 164 locos RAPD. Correlação cofenética igual a 0,814. Pop. 1: Abadia de Goiás, Pop. 2: Uruaçu, Pop 3: Cristianópolis, Pop 4: Correntina 1, Pop 5: Correntina 2, Pop 6: Jataí, Pop 7: Guapo, Pop 8: Perolândia, Pop 9: Caiapônia.

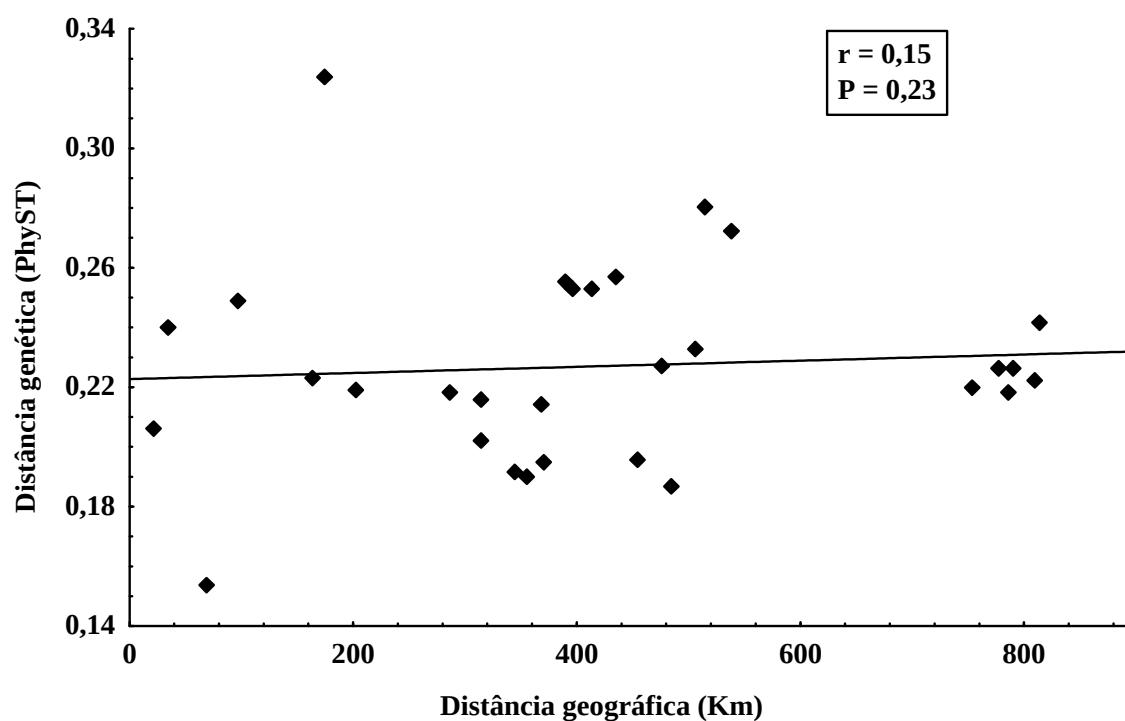


Figura 10. Relação entre as distâncias genéticas de Nei e as distâncias geográficas entre as nove populações de *P. coriacea*. A correlação matricial ($r = 0,155$) não foi significativa segundo o teste de Mantel utilizando 9999 permutações.

5 DISCUSSÃO

Apesar da importância e do interesse econômico por plantas medicinais do Cerrado, entre elas a *P. coriacea*, quase tudo ainda está para ser feito no que se refere aos estudos básicos com estas plantas. Alguns estudos para a caracterização botânica (Laureano, 2001) e química (Nascimento, 2005) de *P. coriacea* foram conduzidos, porém não há na literatura relatos sobre sua biologia floral e nem tampouco da maioria das espécies de plantas medicinais do Cerrado. Por isso, a dificuldade em discutir alguns resultados obtidos neste trabalho.

Este é o primeiro trabalho realizado para avaliar a diversidade genética e sua distribuição em populações naturais de *P. coriacea*. A metodologia utilizada foi baseada em marcadores RAPD, embora seu caráter dominante possa causar vieses nas estimativas de parâmetros genéticos populacionais, como o decréscimo da heterozigosidade esperada, além de problemas com a repetibilidade dos resultados (Zucchi, 2002; Isabel et al., 1995).

A repetibilidade dos marcadores RAPD vem sendo discutida desde a origem dessa técnica, sendo considerada uma desvantagem para sua utilização (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Por isso, foram realizados vários trabalhos a fim de testar a repetibilidade desse marcador. De um modo geral, foram encontrados altos níveis de repetibilidade para locos RAPD, sendo este considerado um marcador confiável para realização de estudos populacionais (Thompson et al., 2002; Uptmoor et al., 2003; Kjolner et al., 2004; Telles et al., 2005).

A técnica de PCR utilizada para obtenção dos marcadores RAPD, é muito mais sensível do que outras técnicas como isoenzimas. Por isso, requer cuidados especiais como a padronização das condições de montagem das reações e a utilização de apenas um termociclador para análise com um dado *primer*, para garantir a qualidade dos dados. Ainda que alguns problemas com as estimativas enviesadas não pudessem ser solucionados, obteve-se resultados interessantes sob a estrutura genética dessas populações de *P. coriacea*.

Alguns trabalhos com espécies nativas do Cerrado como barú (*Dipteryx alata*), araticum (*Annona crassiflora*), mangaba (*Hancornia speciosa* Gomez) e cagaita (*Eugenia dysenterica*) utilizando marcadores RAPD, tem demonstrado que existe grande número de locos polimórficos nas populações estudadas e que essas populações apresentaram uma alta diversidade genética (Moura, 2003; Soares, 2006; Bandeira, 2002; Telles et al., 2001; Zucchi et al., 2005; Trindade, 1998). Este alto nível de diversidade genética também foi encontrado com *P. coriacea* o que indica uma alta variabilidade genética nas populações, permitindo a adaptação destas a diversos tipos de ambientes e a manutenção do seu potencial evolutivo.

Soares (2006), em estudos sobre estrutura e padrão espacial da variabilidade genética de *Dipteryx alata*, com 45 locos RAPD, encontrou um polimorfismo de 75,6%, considerando o critério de polimorfismo de 99%. O número médio de polimorfismo por *primer* foi de 6,8 e o valor de Φ_{ST} encontrado foi igual a 0,15.

Em estudos com *Annona crassiflora*, foi encontrado um polimorfismo de 97% trabalhando com 70 locos RAPD (Bandeira, 2002). Este polimorfismo pode ser considerado alto quando comparado com espécies florestais tropicais que em geral apresentam um polimorfismo médio de 65,6%. Nos trabalhos realizados com populações naturais de *Eugenia dysenterica* utilizando 74 locos RAPD e SSR foi encontrado um polimorfismo de 73% e 85% respectivamente (Trindade, 1998; Zucchi, 2002). E no trabalho realizado com populações naturais de Mangaba (*Hancornia speciosa*), utilizando 60 locos RAPD foi encontrado um polimorfismo de 88,6% (Moura, 2003).

Os resultados obtidos com RAPD neste trabalho assim como os resultados obtidos com outras espécies nativas, revelaram um alto nível de variabilidade genética para essa espécie, o que é de grande importância, pois o conhecimento da distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações naturais de *P. coriacea* é essencial para o estabelecimento de programas de conservação de germoplasma e manejo em condições *in situ* e *ex situ*, pois é ela que permite que a população se adapte a diversos tipos de ambientes. Os baixos níveis de diversidade podem causar sérios efeitos na população como efeitos deletérios na adaptação e persistência destas populações (Reed & Frankham, 2003). E como se trata de uma espécie medicinal, o conhecimento dessa variabilidade genética é fundamental para verificar se essa diferenciação genética entre as populações pode causar também uma variabilidade no princípio ativo encontrado, o que pode ser assunto para uma nova pesquisa.

O conhecimento da estruturação de variabilidade serve também para estabelecer programas de coleta para ser apresentado aos raizeiros e com a comunidade em geral, a fim de conscientizar a população sobre o problema do extrativismo predatório para esta espécie. Pois, nas viagens de prospecção e coleta deste trabalho, esse problema foi detectado em grande escala. Locais que, segundo a comunidade local, havia grande quantidade de *P. coriacea* no passado, atualmente sua ocorrência é rara, devido não só ao extrativismo predatório, mas também a degradação dos ambientes de Cerrado para implantação de grandes lavouras de soja.

No momento da coleta do material vegetal, evitou-se a coleta de indivíduos muito próximos, na tentativa de amostrar a maior variabilidade possível da espécie em determinado local. Porém, havia também a preocupação de não coletar indivíduos geneticamente idênticos originados por reprodução assexuada. Não há estudos comprovando este tipo de reprodução em *P. coriacea*, porém, devido ao seu sistema radicular extenso e superficial formando uma espécie de “rede” em volta da planta, há a suposição de que possa ocorrer a formação de novas plantas por reprodução assexuada do tipo estolão. Mas nas análises com marcadores RAPD, não foi detectada a presença de nenhum clone entre as populações avaliadas e nem de locos privados para cada população.

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a maioria da variação genética para essa espécie, se encontra entre indivíduos dentro de populações. No entanto, houve uma significativa estrutura genética das populações com um valor de Φ_{ST} igual a 0,23, sendo praticamente confirmado pelo valor do θ^B de 0,22 (Tabela 8). De acordo com Moraes et al. (2005), a estrutura genética espacial dentro de populações é determinada principalmente pelo efeito da dispersão de sementes e pólen por agentes dispersores como animais, vento e outros. Porém, para a espécie *P. coriacea* este efeito ainda não é mensurável, pois sua biologia reprodutiva é desconhecida. Mas, durante a realização das coletas, foi observado que nem todos os indivíduos floresciam e frutificavam ao mesmo tempo em uma população, o que evidencia a ocorrência de um fluxo gênico restrito. Porém, estas hipóteses de florescimento e frutificação são apenas especulativas, sendo necessários estudos mais aprofundados para compreensão dos resultados obtidos.

A ausência de informações sobre biologia floral para a espécie *P. coriacea* dificulta o conhecimento sobre o seu agente polinizador. Alguns pesquisadores como o professor Piero Delprete da Universidade Federal de Goiás, especialista na família Rubiácea, acredita que o polinizador dessa espécie seja a borboleta, pois segundo ele, suas

flores são heterostílicas, brancas e cheirosas, o que poderia facilitar a polinização ser feita por borboletas e mariposas (comunicação pessoal). Um outro dado sobre a polinização de *P. coriacea* é que foi observado durante as coletas uma grande quantidade de abelhas e outros insetos visitando suas flores.

O fluxo gênico encontrado para as populações de *P. coriacea* refere-se a um fluxo gênico aparente, pois retrata o que ocorreu nessas populações nas gerações passadas. O valor do fluxo gênico aparente encontrado neste trabalho foi de 0,835, considerado baixo e segundo Slatkin (1987), a deriva genética resultará em diferenciação populacional se o valor do fluxo for menor que um migrante por geração. De acordo com Valva & Coelho (1997), quando o fluxo gênico for restrito, as populações tenderão a ter um menor tamanho efetivo e consequentemente tenderão a endogamia resultando em uma maior probabilidade de se diferenciarem. Estudo sobre taxas de fluxo gênico em espécies com diferentes síndromes de polinização revelou que, para espécies predominantemente de autopolinização o fluxo gênico médio foi de 0,83 como o encontrado para a espécie *P. coriacea*; para espécies polinizadas por animais, o fluxo gênico médio foi de 1,21, enquanto que em espécies polinizadas pelo vento, o fluxo gênico médio foi de 2,91 (Govindaraju, 1989).

Através das análises com estatística Bayesiana realizadas neste trabalho, o valor do coeficiente de fixação " f " (equivalente ao F_{IS}) foi de 0,98 sugerindo a possibilidade dessa espécie se comportar como uma espécie autógama. Outro resultado que corrobora esta afirmativa advém do valor do fluxo gênico encontrado para *P. coriacea*, 0,835, sugerindo que, nessas populações, ocorra predominantemente a autopolinização.

Existem vários modelos de fluxo gênico (Futuyma, 1992), mas o modelo mais provável a estas populações de *P. coriacea*, de acordo com os resultados obtidos, é o modelo de ilhas, pois de acordo com esse modelo a migração ocorre ao acaso entre um grupo pequeno de populações não ocorrendo uma estruturação da diversidade no espaço geográfico. Fato que foi demonstrado nas análises de divergência e no teste de Mantel.

Analizando os dendrogramas (Figura 7 e 9) pôde-se observar que não existe uma correlação entre distância genética e distância geográfica. Todas as nove populações se agrupam aleatoriamente, não obedecendo a sua origem geográfica. Assim, a hipótese previamente formulada de que populações geograficamente próximas teriam que ser geneticamente próximas, foi descartada pelos resultados obtidos pelo teste de Mantel com uma correlação de apenas 0,155, indicando não haver correlação entre distância genética e

geográfica. Este resultado também indica que pode estar havendo um alto nível de endogamia dentro das populações estudadas provavelmente pelo baixo nível de fluxo gênico estimado.

O que também pode ser observado neste trabalho é que apesar de algumas populações terem sido coletadas em um mesmo ambiente de Cerrado, estas não apresentaram as mesmas características morfológicas o que leva a crer que essa divergência morfológica observada não deve ser atribuída somente a variações ambientais como clima e tipo de solo, mas, possivelmente, a uma variação genética devido a grande estruturação observada nas populações.

Embora os resultados aqui apresentados sobre *P. coriacea* representem importantes avanços no entendimento da biologia da espécie, muito ainda precisa ser feito. Deve-se, portanto, evidenciar algumas prioridades de pesquisa. Segundo Vieira et al. (2002) estas prioridades estariam assim listadas: coleta de germoplasma, caracterização agrônômica, conservação *in situ*, manejo sustentável, conservação de sementes, conhecimento do sistema reprodutivo/biologia floral, diversidade genética, dinâmica das populações, pesquisa de mercado, conservação *in vitro*, distribuição geográfica, estudos taxonômicos, caracterização química e conservação a campo.

No que diz respeito a conservação *ex situ* de *P. coriacea* seria necessário a coleta de um grande número de populações, pois, de acordo com o que foi demonstrado pelos valores de Φ_{ST} e θ^B encontrados, as populações possuem grandes diferenças genéticas entre elas. Cada população possui alelos diferentes e coletando indivíduos de um maior número de populações, uma maior amostragem do genoma dessa espécie seria conservado.

No ponto de vista de conservação *in situ* seria necessário estabelecer estratégias de conservação das áreas onde ainda restam populações de *P. coriacea*. Importância maior deve ser dada pelo fato da espécie ser medicinal. Assim, o princípio ativo dessa espécie pode estar relacionado com o ambiente ou local de coleta dessas populações. Sugere-se que, com a variabilidade genética, ocorra também uma variabilidade do princípio ativo e talvez uma população possua maior teor do princípio ativo ou, talvez, o princípio ativo de uma população seja “melhor” do que de outra população, e, se a que possuir um melhor princípio ativo for extinta, extingue-se também a possibilidade de se obter um remédio fitoterápico de melhor qualidade.

De acordo com os resultados obtidos e a partir da expressão de Vencovsky &

Crossa (1999), para a espécie *P. coriacea*, seria necessária a conservação de um mínimo de 230 populações, para a obtenção de um N_e ideal, igual a 500. E isso, sob o ponto de vista de conservação *in situ*, evidencia, mais uma vez, a importância da conservação de manchas de Cerrado em propriedades particulares além das reservas legais já existentes.

6 CONCLUSÕES

- A espécie *P. coriacea* não ocorre especificamente em um tipo fisionômico de Cerrado e nem está associada a um tipo específico de solo. Estas apresentaram alto nível de diversidade genética, indicando uma alta variabilidade genética nas populações sendo que esta variabilidade está fortemente estruturada, com um valor de $\Phi_{ST} = 0,23$ (θ^B de 0,22) indicando que 23% dessa variabilidade encontra-se entre populações e 77% encontra-se dentro das populações. E o teste de Mantel revelou que não existe correlação entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas, demonstrando que a variabilidade genética presente nestas populações não está estruturada no espaço.
- O baixo número de migrantes por geração ($Nm = 0,83$), a ausência de estruturação espacial, a alta estruturação genética das populações e, principalmente, o valor do índice de fixação ($f = 0,98$) estimado pela Estatística Bayesiana, sugerem que a espécie seja preferencialmente autógama.
- As estratégias para conservação *ex situ*, indicam que se deve coletar o maior número de populações possíveis, para se ter uma maior amostragem do genoma dessa espécie. Do ponto de vista da conservação *in situ*, sugere-se a preservação do maior número de áreas de Cerrado onde a espécie ocorra sendo que de acordo com o valor encontrado de N_e seriam necessárias a conservação de no mínimo 230 populações, para obtenção de um N_e ideal igual a 500.
- É de fundamental importância estabelecer estratégias de manejo e coleta sistematizadas com raizeiros, curandeiros e comunidade em geral, para evitar o extrativismo predatório e, como consequência, a extinção da espécie.

7 REFERÊNCIAS

AGNOL, L. D. A. Indústria Brasileira de Fitoterápicos: desafios e perspectivas. In: PRIMEIRA REUNIÃO TÉCNICA SOBRE RECURSOS GENÉTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS: ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO E MANEJO SUSTENTÁVEL, 2002, Brasília. **Resumos.....** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), 2002. p. 184.

ALFENAS, A.C.; DUSI, A.; ZERBINI JÚNIOR, F.M.; ROBINSON, L.P.; MICALES, J.A.; OLIVEIRA, J.R.; DIAS, L.A.S.; SCORTICHINI, M.; BONDE, M.R.; ALONSO, S.K.; JUGHANS, T.G.; BRUNE, W. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins – fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 574 p.

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 242 p.

BANDEIRA, L. F. **Caracterização genética de populações naturais de *Araticum Annona crassiflora* Mart.** 2002. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia)-Programa de Pós-graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2002.

BARBOSA, A. S. **Andarilhos da Claridade: Os primeiros habitantes do Cerrado**. 1. ed. Goiânia: Universidade Católica de Goiás, 2002. 414 p.

BECKMANN, J. S. Genomic genetics and plant genetic improvement. In: SCHOOK, L. B.; LEWIN, H. A.; MCLAREN, D. G. (Ed.). **Gene-mapping techniques and applications**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 201-229.

BIOTECNOLOGIA. **Quatro espécies do Cerrado são selecionadas para estudo de potencial fitoterápico**. Brasília: EMBRAPA-CERRADOS, 2004. Disponível em: <<http://www.alertamedico.com.br/mat/html>>. Acesso em: 22 nov. 2004.

BORRIS, R. P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal Ethnopharmacology**, London, v. 51, n. 1, p. 29-38, 1996.

BOTSTEIN, D; WHITE, R,L; SKOLNICK, M; DAVIS, R,W, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetic**, Boston, v. 32, p. 314-331, 1980.

BRANDÃO, M. Plantas portadoras de substâncias medicamentosas, de uso popular, nos cerrados de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 61, n. 6, p. 19-23, 1980.

BRITO, A. R.; M. S.; NUNES, D. S. Ethnopharmacology and the sustainable development of new plant – derived drugs. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 49, n. 5/6, p. 402-408, 1997.

BROWN, A. H. D.; Isoenzymes, plant population genetic structure and genetic conservation. **Theoretical Applied Genetics**, Philadelphia, v. 52, p.145-157, 1978.

BUSO, G. S.; RANGEL, P. H.; FERREIRA, M. E.; Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 1, p.107-117, Jan. 1998.

CABRERA, A. L.; WILLINK, A. **Biogeografia da América Latina**. Washington D.C: Monografias nº13, Série de Biologia, 1980.

CABRERA, A. L.; YEPES, J. **Mamíferos Sul Americanos v.1 e 2**. 2. ed. Editar: Buenos Aires, 1960.

CAMPÊLO, C. R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais no Estado de Alagoas I. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 9., 1882. **Anais...** Maceió: Sociedade Botânica do Brasil, 1982.

CAMPÊLO, C. R. & SILVA, M. C. Contribuição ao estudo das plantas medicinais no Estado de Alagoas II. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 9., 1882. **Anais...** Maceió: Sociedade Botânica do Brasil, 1982.

CAMPÊLO, C. R. Contribuições ao estudo das plantas medicinais no Estado de Alagoas, In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 52., 1990, Manaus. **Anais...** Brasília: Sociedade Botânica do Brasil, 1990.

CAVALCANTI, R. B.; JOLY, C. A. Biodiversity and conservation priorities in the Cerrado region. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS R. J. **The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna**. New York: Columbia University Press, 2002.p.350-368.

CAVALLARI, M. M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação.** 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CHARLESWORTH, B.; SHIGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, Londres, v. 371, n. 15, p. 215-220, set. 2002.

CHAVES, L. J. Melhoramento e conservação de espécies frutíferas do Cerrado. In: 1º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Goiânia, 2001. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2001.

CHAVES, S. R. **Caracterização da estrutura genética de populações naturais de *Caryocar brasiliense* Camb. No estado de Goiás utilizando marcadores moleculares microssatélites.** 2005. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)–Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade federal de Goiás, Goiânia, 2005.

COCKERHAM, C. C. Variance of Gene Frequencies. **Evolution**, Lawrence, v. 23 p.72-84, 1969.

COCKERHAM, C. C. Analyses of gene frequencies. **Genetics**, Bethesda, v. 74 p.679-700, 1973.

COELHO, C. P.; BARBOSA, A. A. A. Biologia Reprodutiva de *Palicourea macrobotrys* RUIZ & PAVON (Rubiaceae): um possível caso de homostilia no gênero *Palicourea* Aubl. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 403-413, jul./set. 2003.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas.** 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994.162 p.

COSTA, R. B. da; SCARIOT, A. A. Fragmentação Florestal e os Recursos Genéticos. In: COSTA, R. B. da (org.) **Fragmentação florestal e alternativas de desenvolvimento rural na região Centro-Oeste.** Campo Grande: UCDB, 2003. cap. 3, p. 53-74.

DALEY, L.S.; MENENDEZ, R.A.; STEBBINS, R.L. Identification of red-fruted pears by fourth derivate spectroscopy of intacta lamina. **Journal of Environmental Horticulture**, Washington, v.1, p.25-28, 1987.

DIAS, B.F.S. A implementação da Convenção sobre Diversidade Biológica no Brasil: desafios e oportunidades. In: WORKSHOP BIODIVERSIDADE: PERSPECTIVAS E OPORTUNIDADES TECNOLÓGICAS, 1996, Campinas. **Anais eletrônicos...** Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1996. Disponível em: <http://www.cbd.int/doc/world/br/br-nr-01-p9-en.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2006.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. Variação genética em espécies arbóreas e consequências para o melhoramento florestal. **Agrotrópica**, Ilhéus, v. 3, n. 3, p. 119-127, 1991.

EHLRICH, P. R.; WILSON, E. O. Biodiversity studies: science and policy. **Science**, Washington DC, v. 253, n. 16, p. 758-762, Ago. 1991.

EXCOFFIER, L. P. E. SMOUSE & QUATTRO, J. M. Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to Human Mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Bethesda, v. 131, p.479-491, 1992.

FACHINELLO, J.C.; MUSACCHI, S.; ZUCCHERELLI, S.; SANSAVINI, S. Polimorfismo Enzimático nos tecidos de Pereira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 7, p. 1427-1432, jul. 2000.

FERNANDES, A.; BEZERRA, P. Estudo fitogeográfico do Brasil. **Stilus comunicações**, Fortaleza, p. 130-131, 1990.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Brasília, DF: EMBRAPA – CENARGEN, 1998. 220p.

FISCHER, E. A.; ARAÚJO, A.C. Spatial organization of a bromeliad community in the Atlantic Rain-Forest, south-eastern Brazil. **Journal Tropical Ecology**, New York, v. 11, n. 4, p. 559-567, 1995.

FISHER, M.; HUSI, R.; PRATI, D.; PEINTINGER, M.; KLEUNEN, M. V.; SCHMID, B. RAPD variation among and within small and large population of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 87, n. 8, p. 1128-1137, 2001.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2ª. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, cap.4, p.86-125, 1992.

GOODLAND, R. J. A.; FERRI, M. G. **Ecologia do Cerrado**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1979. 120 p.

GOVINDARAJU, R. D. Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. **Journal of evolutionary biology**, Basel, v. 2, p. 173-181, 1989.

HAIG, S. M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, New York, v. 79, n. 2, p. 413-425, 1998.

HAMILTON, C. W. Variation on a distylous theme in Mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). **Memoirs of the New York Botanical Garden**, New York, v. 55, p. 52-65, 1990.

HAMRICK, J. L.; GOT, J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLE, A. L. (Ed.). **Plant Population genetics, breeding and genetic resources**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1989. p. 43-63.

HOLSINGER, K.E. Analysis of genetic diversity in geographically structured populations: a Bayesian perspective. **Hereditas**, v.130, p.245-255, 1999.

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

HOLSINGER, K. E.; LEWIS, P. O. **Hickory**: A Package for Analysis of Population Genetic Data v. 1.0. Department of Ecology & Evolutionary Biology, The University of Connecticut, 2003. Disponível em: <<http://darwin.eeb.uconn.edu/hickory>> Acesso em: 05 dez. 2005.

HOLSINGER, K. E.; WALLACE, L. E. Bayesian approaches for the analysis of population genetic structure: an example from *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 887-894, 2004.

HUFF, D. R.; PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. RAPD Variation within and among natural populations of out crossing buffalograss. **Theor. Appl. Genet.** Philadelphia, v. 86, p.927-934, 1993.

ISABEL, N.; BEAULIEU, J.; BOUSQUET, J. Complete congruence between gene - diversity estimatives derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington DC, v. 92, p. 6369-6373, 1995.

JORDANO, P.; GODOY, J. A. RAPD Variation and population genetic structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae), and animal-dispersed tree. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 1293-1305, 2000.

KAGEYAMA, P.; GANDARA, F. B.; VENCOSKY, R. Conservação *in situ* de espécies arbóreas tropicais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Eds.). **Recursos Genéticos e Melhoramento - Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. cap. 7, p. 149-158.

KJOLNER, S.; SASTAD, S. M.; TABERLET, P.; BROCHMANN, C. Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 81-86, 2004.

KLINK C. A.; MOREIRA, A. G. Past and Current Human Occupation, and Land Use. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Ed.). **The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna**. New York: Columbia University Press, 2002. cap. 6, p. 69-88.

LAINETTI, R.; BRITO, N. R. S. **A Saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro**. Rio de Janeiro: Tecnoprint, 1980. 163 p.

LAUREANO, L. C. **Morfoanatomia, perfil fitoquímico e aspectos etnobotânicos das espécies medicinais do Cerrado: *Palicourea coriacea* (Cham.) Schum.; *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth, (RUBIACEAE)**. 2001. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biologia)-Programa de Pós-graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2001.

LEVIN, D. A.; KESTER, H. W. Gene flow in seed plants. In: FUTUYMA, D. J. (Ed.). **Evolutionary Biology**. Connecticut, 1997. v. 7, p. 139-220.

LIM, SAW-HOON; CHYE-PENG, T. P.; LEE, YEW-HWA.; GOH, CHONG-JIN. RAPD Analysis of Some Species in the Genus *Vanda* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 83, p.193-196, 1999.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

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

MALHEIROS, R. **A rodovia e os corredores da fauna do Cerrado**. Goiânia: Universidade Católica de Goiás, 2004. 172 p.

MANLY, B. F. J. **Randomization, Bootstrap and Monte Carlo methods in biology**. Londres: Chapman & Hall, 1997.

MARIOT, A. **Distribuição da diversidade genética e aspectos da fenologia e dispersão de sementes da Pariparoba (*Piper cernnun* Vell. – Piperaceae)**. 2000. 133 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)-Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Medicinais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 205 p.

MATOS, D. M. S.; WATKINSON, A. R.; FRECKLETON, R. P. The role of density dependence in the population dynamics of a tropical palm. **Ecology**, Washington D.C., v. 8, p.2635-2650, Dez. 1999.

MITTERMEIER, R. A.; AYRES, J. M.; WERNER, T.; FONSECA, G. A. B. O país da Megadiversidade. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 81, p. 20-27, 1992.

MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R.; VENCOSKY, R. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Laurácea) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 237-248, 1999.

MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sob diferentes condições antrópicas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 281-289, Mar./Abr. 2005.

MORI, E. S. **Estrutura genética e populações naturais de canafístula *Peltophorum dubium* (Spreng) Taub.** 2000. 145 f. Tese (Livre-docência)–Falcudade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

MOURA, N. F. **Estrutura genética de subpopulações de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez,) nos Cerrados do Brasil Central.** 2003. 70 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)–Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2003.

MULLIS, K.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, California, v. 55, p. 335-350, 1987.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA G. B. A.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, Londres, v. 403, p.853-858, fev. 2000.

NARASIMHAN, S.; PADMESH, P.; NAIR, G. M. Assessment of genetic diversity in *Coscinium fenestratum*. **Biologia Plantarum**, Czech Republic, v. 50, n. 1, p. 111-113, 2006.

NASCIMENTO, C, A. **Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de *Palicourea coriacea* (RUBIACEA).** 2005. 130 f. Dissertação (Mestrado em Química)–Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

NAVES, R.V. **Espécies frutíferas nativas dos Cerrados de Goiás: caracterização e influencia do clima e dos solos.** 1999. 206p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)–Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1999.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, Chicago, v. 106, p. 283-292, 1972.

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

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Bethesda, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

NETO, G. G.; MORAIS, R. G. Recursos Medicinais de Espécies do Cerrado de Mato Grosso: Um estudo bibliográfico **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 17, n. 4, p.561-584, Out./Dez. 2003.

NUPLAM. Núcleo de Plantas Medicinais e Aromáticas. IBAMA, Brasília, 2001.

OLIVEIRA, K. A. K. B. **Variabilidade genética entre e dentro de populações de Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) do Sudeste de Goiás**. 1998. 106 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1998.

OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. Introduction: Development of research in the Cerrados. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. **The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna**, New York: Columbia University Press, cap. 1, p. 01-10, 2002.

PADMESH, P.; REJI, J. V.; JINISH DHAR, M.; SEENI, S. Estimation of genetic diversity in varieties of *Mucuna pruriens* using RAPD. **Biologia Plantarum**, Czech Republic, v. 50, n. 3, p.367-372, 2006.

PARKER, P. G.; SNOW, A. A.; SCHUG, M. D.; BOOTONS, C.; FUREST, P. A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, Washington D.C, v. 79, n. 12, p. 361-382, mar. 1998.

PERECIN, M. B. **Diversidade genética em populações naturais de espécies de espinheira-santa, *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex. Reiss. (Celastráceae)**. 2000. 134 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

PÉREZ, T.; ALBORNOZ, J. DOMÍNGUEZ, A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 1347-1357, 1998.

PINTO, M. N. **Cerrado**. 2. ed. Brasília: Universidade de Brasília, 1994. 210 p.

REED, D.H.; FRANKHAM, R. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. **Conservation Biology**, Gainesville, v. 17, n. 1, p. 230-237, fev. 2003.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As Matas de Galeria no contexto do bioma Cerrado. In: RIBEIRO, J. F.; FONSECA C. E. L. da; SOUSA-SILVA, J. C. (Ed.). **Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001. cap. 1, p 28-47.

RIZZINI, C. T. A flora do Cerrado. In: **Simpósio sobre o Cerrado**. São Paulo: Ed. Da Universidade de São Paulo, p. 125-177, 1963.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Plantas Medicinais no Domínio dos Cerrados**. Lavras: Universidade Federal de lavras, 2001.180 p.

ROHLF, F. J. **NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System** (software). New York: Exeter publishers, 1986-1998.

SALES, E.; NEBAUER, S. G.; MUS, M.; SEGURA, J. Population genetic study in Balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 88, n. 10, p. 1750-1759, 2001.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; PÍPOLO, V.C. Uso de Marcadores Moleculares na Análise da Variabilidade Genética em Acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 015-022, abr. 2002.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin Ver. 2.000**: A software for population genetic data analysis. Universidade de Geneva: Geneva, mar. 2000. Disponível em: <<http://anthro.unige.ch/arlequin>>. Acesso em: 05 jun. 2005.

SHAW, P. C.; BUT, P. P. H. Authentication of panax species and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction. **Planta Médica**, New York, v. 61, n. 5, p. 466-469, out. 1995.

SILVA, J. M. C. da; J. M. BATES. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. **BioScience**, Washington DC, v. 52, p. 225-233, mar. 2002.

SILVA, S. R. **Plantas do Cerrado utilizadas pelas comunidades da região do Grande Sertão Veredas**. Brasília: Fundação Pró-Natureza, 1998. 45 p.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999. 410 p.

SIQUEIRA, J. C. **Utilização popular das plantas do Cerrado**. São Paulo: Ed. Loyola, 1981. 60 p.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, p. 787-792, mai. 1987.

SOARES, T. N. **Estrutura e Padrão Espacial da Variabilidade Genética de *Dipteryx alata* Vogel (Barueiro) no Cerrado**. 2006. 126 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

SOKAL, R. R.; SMOUSE, P. E.; NEEL, J. V. The genetic structure of a tribal population, the *Yanomama* indians. XV patterns inferred by autocorrelation analysis. **Genetics**, v. 114, p. 259-287, 1986.

SPIEGELHALTER, D. J.; BEST, N. G.; CARLIN, B. P.; VAN DER LINDE, A. Bayesian measures of model complexity and fit. **Journal of the Royal Statistical Society Series B**, Nottingham, v. 64, p. 483-689, 2002.

STAVISKI, M. N. R. Notas preliminares sobre as plantas medicinais ocorrentes em áreas de restinga, no Estado de Alagoas, In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 1990. Manaus. **Resumos...** Brasília: Sociedade Botânica do Brasil, 1990. p. 388.

TAYLOR, C. M. Revision of *palicourea* (Rubiaceae) in Mexico and Central America. **Systematic Botany Monography**, v. 26, p. 1-102, 1989.

TAYLOR, C. M. Revision of *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotrieae) in the West Indies. **Moscoso**, v. 7, p. 201-241, 1993.

TAYLOR, C. M. Conspectus of the genus *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotrieae) with the description of some new species from Ecuador and Colombia. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 84, p. 224-262, 1997.

TELLES, M. P. C. **Diversidade genética e estrutura populacional de Cagateira (*Eugenia dysenterica* D C.) do Sudeste de Goiás**. 2000. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000.

TELLES, M. P. C.; SILVA, R. S. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G. DINIZ FILHO, J. A. F.; Divergência entre subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica*) em resposta a padrões edáficos e distribuição espacial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 11, p. 1387-1394, nov. 2001.

TELLES, M. P. C.; VALVA, F.; BANDEIRA, L. F.; COELHO, A. S. G. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. - Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 123-129, mar. 2003.

TELLES, M. P. C. **Estrutura genética populacional de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 (Anura: Leptodactylidae) e padrões de ocupação humana no Estado de Goiás**. 2005. 91 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

THOMPSON, J. R.; MARCELINO, L. A.; POLZ, M. F. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by “reconditioning PCR”. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 2083-2088, 2002.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas: Variabilidade genética em plantas**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 175 p.

TRINDADE, M. G.; CHAVES, L. J. Genetic structure of natural *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) populations in northeastern Goiás, Brazil, accessed by morphological traits and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 3, p. 373, 1998.

UPTMOOR, R.; WENZEL, W.; FRIEDT, W.; DONALDSON, G.; AYISI, K.; ORDON, F. Comparative analysis on the genetic relatedness of *Sorghum bicolor* accessions from Southern Africa by RAPDs, AFLPs and SSRs. **Theoretical and Applied Genetics**, Philadelphia, v. 106, p. 1316-1325, 2003.

VALVA, F. A.; COELHO, A. S. G. Estrutura genética das populações vegetais: estratégias adaptativas em plantas do Cerrado p.37, In: XLIII CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 53., 1997, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: SBG, 1997. p. 369.

VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. Measures of representativeness. In: BORÉM, A.; GIÚDICE, M. P.; SAKIYAMA, N. S. (Ed.) **Plant Breeding in the Turn of the Millennium**. Viçosa: UFV, p. 335-354, 1999.

VENCOVSKY, R. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasmas de espécies alógamas. **IPEF**, Piracicaba, n. 35, p. 79-84, abr. 1987.

VIEIRA, E. A.; CASTRO, C. M.; OLIVEIRA, A. C.; IRAJÁ, F.; CARVALHO, F.; ZIMMER, P. D.; MARTINS, L. F. Genetic Structure of annual Ryegrass (*Lolium multiflorum*) Populations Estimated by RAPD. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 4, p. 407-413, 2004.

VIEIRA, R. F.; SILVA, S. R.; ALVES, R. B. N.; SILVA, D. B.; DIAS, T. A. B.; WETZEL, M. M. V. S.; UDRY, M. C.; MARTINS, R. C. **Estratégias para Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas: Resultados da 1º Reunião Técnica**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), 2002. 184 p.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNEES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, nov. 1995.

WADT, L. H. O. **Estrutura genética de populaces naturais de pimento longa (*Pipiper hispidinervum* C.DC) Visando seu Uso e Conservação**. 2001. 95 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e melhoramento de Plantas)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

WADT, L. H. O.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética e sistema de acasalamento de *pipiper hispidinervum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 2, p. 151-157, fev. 2004.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, Netherlands, v. 51, n. 1, p. 239-254, abr. 1996.

WEIR, B. S. **Genetic Data Analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 455 p.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lawrence, v. 38, p. 1358-1370, nov. 1984.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. **DNA fingerprinting in plants principles, methods and applications**. 2. ed. Oxford: University Press, 2005. 472 p.

WELSH, J.; McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, dez. 1990.

WILLIAMS, J. G. W.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI J, A.; TINGEY, S. V. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p.6531-6535, nov. 1990.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, Chicago, v. 15, p. 323-354, 1951.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. **POPGENE**: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis: version 1.3: manual. Edmonton: University of Alberta, 1999. 29 p.

YUNES, R. A. & FILHO, V. C. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 523 p.

ZHANG, YI.; YANG, JI.; GUANG – YUAN RAO. Genetic diversity of an amphicarpic species, *Amphicarpaea edworthii* Benth. (Leguminosae) based on RAPD markers. Biochemical. **Systematics and Ecology**, New York, v. 33, p. 1246-1257, jul. 2005.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)–anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, Boston, v. 20, n. 2, p.176-183, mar. 1994.

ZIMBACK, L.; MORI, E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; VEIGA, R. F. de A.; MELLO JUNIOR, J. R. S. Genetic structure of *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) population by RAPD marks. **Scientia forestalis**, Piracicaba, n. 65, p. 114-119, jun. 2004.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e melhoramento de Plantas)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; COUTO, M. A.; MORAIS, L. K.; VENCovsky, R. Genetic structure and gene flow of *Eugenia Dysenterica* natural populations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 10, p. 975-980, out. 2005.

ANEXOS

Anexo A. Tabela geológica 91

Anexo B. Protocolo de extração de DNA 92

Anexo1. Tabela geológica

TEMPO GEOLÓGICO

Eras	Períodos	Época	Tempo decorrido	Formas de Vida	
				Vegetal	Animal
Cenozóico	Quaternário	Holoceno	11.000	Plantas como as de hoje.	Homem
		Pleistoceno	1 ma		-
	Terciário	Plioceno	12 ma	-	-
		Mioceno	23 ma	Pinheiros	-
		Oligoceno	35 ma	-	Ancestrais dos Mamíferos modernos.
		Eoceno	55 ma	-	-
		Paleoceno	70 ma	-	Mamíferos do tipo arcaico.
Mesozóica	Cretáceo	-	135 ma	Angiospermas, primeiras dicotiledoneas	Aves do tipo primitivo, pequenos mamíferos, desenvolvimento dos répteis, mar: Amonóides e Belemnites.
	Jurássico	-	180 ma	Pinheiros, coníferas, junco, palmeiras cicadales.	Dinossauros, répteis voadores, ictiossauros, plesiossauro, primeiras aves, no mar: Amonites e Belemnites.
	Triássico	-	220 ma	Primeiras gimnospermas (menos as dicotiledóneas)	Surgimento dos dinossauros e dos répteis adaptados à vida marinha.
Paleozóica	Permiano	-	270 ma	Grandes florestas.	-
	Carbonífero	-	350 ma	Pteridospermae	Surgem os répteis.
	Devoniano	-	400 ma	Desaparecem as Psilophytales	Insetos mais antigos surgem os anfíbios.
	Siluriano	-	430 ma	Plantas terrestres mais antigas.	-
	Ordoviciano	-	490 ma	-	Surgem os peixes de água doce.
	Cambriano	-	600 ma	Criptógamas algas marinhas.	Primeiros insetos, invertebrados, mar: Graptólitos, trilobites, moluscos, briozoários, braquiópodes, equinodermos e corais.
Pré-Cambriano	Proterozóico	Algonquiano	3,9 b.a.	Algas	Primeiros seres vivos.
	Arqueozóico	Arqueano		Collenia, etc.	Moldes de Medusa.
-	Início da Terra	-	Mais ou menos 4,5	Nenhum sinal de vida.	

Fonte: A.T. Guerra, A.J.T. Novo Dicionário Geográfico-Geomorfológico. R.J. Bertrand Brasil, 1997.

Anexo 2. Protocolo de Extração de DNA da espécie *Palicourea coriacea***Mini-Preparação de DNA Genômico de folhas de *P. coriacea* (CTAB 2%) -
Versão 2.0**

Extração:

1. Colocar aproximadamente 100 mg de folhas cortadas em tiras, com aproximadamente 1 mm de espessura, em um microtubo de 2 ml com fundo arredondado (Tubo 1). Congelar com N₂ líquido e, com a ajuda da chave “Phillips”, macerar as folhas por aproximadamente 30s, evitando a compactação de material no fundo do tubo. Guardar as amostras moídas no freezer enquanto macera as demais amostras.
2. Na capela, terminar o preparo do **Tampão de Extração**, adicionando o volume apropriado de β -Mercaptoetanol. Misturar bem. (*Ponteiras contaminadas com β -Mercaptoetanol devem ser descartadas no pote com água indicando DESCARTE CLOROFÓRMIO (SÓLIDOS) que fica dentro da capela*).
3. Imediatamente após a adição do β -Mercaptoetanol, adicionar 750 μ l do **Tampão de Extração** ao microtubo com a folha macerada. Misturar bem com a ajuda do vortex.
4. Incubar no banho-maria a 65°C por 60 min. Misturar bem de 10 em 10 min. Misturar bem com a ajuda do vortex.
5. Desligar e fechar o banho-maria. Deixar os microtubos a temperatura ambiente por 3 min. Centrifugar a 1.000 rpm por 1 min.
6. Adicionar 500 μ l de **CIA** (*Clorofórmio:Álcool Isoamílico*). Misturar por inversão por 5 min. (*Ponteiras contaminadas com clorofórmio devem ser descartadas no pote com água indicando DESCARTE CLOROFÓRMIO (SÓLIDOS)*).
7. Centrifugar a 13.000 rpm por 5 min, temperatura ambiente.
8. Transferir a fase aquosa (*fase superior*) para um microtubo de 1,5 ml limpo (Tubo 2). (*A fase orgânica (fase inferior) deve ser descartada no frasco indicando DESCARTE CLOROFÓRMIO (LÍQUIDOS)*). Os microtubos contaminados com clorofórmio devem ser descartados no pote com água indicando DESCARTE CLOROFÓRMIO (SÓLIDOS).
9. Repetir os passos 6 e 7, transferindo a fase aquosa para novo microtubo (Tubo 3).
10. Adicionar 350 μ l (100 μ l : 5ml : 1 : 48 + 250 μ l : 12,5ml : 1 : 48) de **2-propanol** (**isopropanol**) (*2/3 do volume de 500 μ l recuperados*). Misturar por inversão por 5 min.

11. Manter o microtubo a -20°C até o dia seguinte.
12. Centrifugar a 13.000 rpm por 5 min, temperatura ambiente.
13. Descartar o sobrenadante, tomando o cuidado para não descartar o pellet.
14. Adicionar 500 μl (500 μl : 25ml : 1 : 48) de **NaCl 2M**.
15. Incubar no banho-maria a 65°C por 30 min. Misturar de 5 em 5 min.
16. Desligar e fechar o banho-maria. Deixar os microtubos na geladeira por 30 min.
17. Centrifugar a 13.000 rpm por 10 min, temperatura ambiente.
18. Transferir o sobrenadante contendo o DNA ressuspendido para um microtubo de 1,5 ml limpo (Tubo 4). (*O microtubo contendo o restante do pellet deve ser descartado em descarte apropriado para posterior lavagem e reutilização*).
19. Adicionar 350 μl (100 μl : 5ml : 1 : 48 + 250 μl : 12,5ml : 1 : 48) de **2-propanol (isopropanol)** (2/3 do volume de 500 μl recuperados). Misturar por inversão por 5 min.
20. Manter o microtubo a -20°C por, no mínimo, 2 h.
21. Centrifugar a 13.000 rpm por 5 min, temperatura ambiente.
22. Descartar o sobrenadante, tomando o cuidado para não descartar o pellet.
23. Adicionar 1 ml (2X 500 μl : 25ml : 1 : 48) de **Etanol 70%** gelado. Misturar por inversão por 30s.
24. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 min, temperatura ambiente.
25. Descartar o sobrenadante, tomando o cuidado para não descartar o pellet.
26. Repetir os passos 23 e 24, descartando o sobrenadante, tomando o cuidado para não descartar o pellet.
27. Adicionar 1 ml (2X 500 μl : 25ml : 1 : 48) de **Etanol Absoluto** gelado. Misturar por inversão por 30 s.
28. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 min, temperatura ambiente.
29. Descartar o sobrenadante, tomando o cuidado para não descartar o pellet. Secar o *pellet* deixando o microtubo de 15 a 20 min. invertido sobre uma folha de papel absorvente.
30. Ressuspender o *pellet* em 50 μl de **TE**.
31. Adicionar 5 μl de **RNAse** a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (concentração final de 0,1 $\text{ng}/\mu\text{l}$).

32. Vedar as tampas dos microtubos com PARAFILM. Manter o DNA ressuspensando a temperatura ambiente até o dia seguinte. Antes da quantificação, aquecer a 65° C por 30 min.
33. Caso for utilizar o DNA imediatamente após a extração, guardar as amostras a 4°C. Caso contrário, guardar as amostras a -20°C.

