

**VARIABILIDADE GENÉTICA E QUÍMICA ENTRE  
E DENTRO DE POPULAÇÕES DE *Casearia sylvestris* Sw.  
(SALICACEAE) NO ESTADO DE SÃO PAULO**

**MARCELO MATTOS CAVALLARI**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências  
da Universidade Estadual Paulista – Campus  
de Botucatu (SP), para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências Biológicas (Genética).

**B O T U C A T U**

Estado de São Paulo – Brasil

Julho – 2008

**VARIABILIDADE GENÉTICA E QUÍMICA ENTRE  
E DENTRO DE POPULAÇÕES DE *Casearia sylvestris* Sw.  
(SALICACEAE) NO ESTADO DE SÃO PAULO**

**MARCELO MATTOS CAVALLARI**

Orientador: Prof. Dr. **MARCOS APARECIDO GIMENES**

Co-orientador: Prof. Dr. **ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências  
da Universidade Estadual Paulista – Campus  
de Botucatu (SP), para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências Biológicas (Genética).

**B O T U C A T U**

Estado de São Paulo – Brasil

Julho – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Cavallari, Marcelo Mattos.

Variabilidade genética e química entre e dentro de populações de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) no Estado de São Paulo / Marcelo Mattos Cavallari. – Botucatu: [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu 2008

Orientador: Marcos Aparecido Gimenes

Co-orientador: Alberto José Cavalheiro

Assunto CAPES: 20203004

1. Genética vegetal 2. Variação(Biologia) - *Casearia sylvestris* 3. Química dos produtos naturais

CDD 581.15

Palavras-chave: *Casearia sylvestris*; Casearinas; Diversidade química; Estrutura genética de populações; Microssatélites

## AGRADECIMENTOS

Para a realização desta tese tive a orientação do Prof. Dr. Marcos A. Gimenes (IBB/UNESP, Botucatu) e co-orientação do Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro (IQ/UNESP, Araraquara).

Esta tese foi desenvolvida em parceria com o *Centre de Coopération Internationale en Recherche pour le Développement* (CIRAD) através de um doutorado-sanduíche (CAPES-PDEE) e de uma convenção de estágio assinada entre o IBB/UNESP e o *Département Systèmes Biologiques* do CIRAD. No CIRAD, fui orientado pela Dra. Claire Billot e pelo Dr. Jean-Marc Bouvet.

Também participaram grandemente do desenvolvimento deste trabalho, em etapas diversas, a Dra. Roseli B. Torres (Instituto Agrônomo de Campinas - taxonomia de *Casearia*), a Dra. Maria Imaculada Zucchi (Instituto Agrônomo de Campinas - construção da biblioteca enriquecida com microssatélites), o Dr. Marcos Eduardo Paron (FCA/UNESP – enraizamento das estacas) e o aluno de graduação em Ciências Biológicas pelo IBB/UNESP, Eduardo Hermógenes Moretti (grande auxílio no trabalho de campo e processamento do material).

Colaboraram ainda o Dr. Dario Abel Palmieri (Universidade Católica do Salvador), o Prof. Dr. Lin Chau Ming (FCA/UNESP), o Eng. Agrônomo Gil Simões, os técnicos Ronan Rivalan, Benedicte Favreau e Alexandre Vaillant (CIRAD), os colegas de pós-graduação do IBB/UNESP, Julio Santos Otto, Vanusa Socorro Leite, Fábio Severino, e o então aluno de doutorado pelo IQ/UNESP, André Gonzaga dos Santos.

*A todas estas pessoas, meus sinceros agradecimentos.*

Agradeço à Comissão Técnico-Científica do Instituto Florestal de São Paulo e aos diretores das Unidades de Conservação visitadas pelas autorizações de coleta concedidas. Agradeço especialmente à Dra. Giselda Durigan (Estação Ecológica de Assis) e ao Dr. Léo Zimback (Floresta Estadual de Botucatu) pelas informações a respeito da ocorrência de *C. sylvestris* nas áreas de estudos. Agradeço a todos os demais funcionários do Instituto Florestal que me auxiliaram nos trabalhos de campo.

Esta pesquisa foi apoiada financeiramente pela FAPESP (através de “Auxílio à Pesquisa”, PROCESSO 04/11689-0), pelo CNPq (através da bolsa de doutorado que me foi concedida) e pela CAPES (através da bolsa de doutorado-sanduíche PDEE que me foi concedida, PROCESSO BEX-3318060).

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO.....	1
1. Estrutura genética de populações e implicações para a conservação e exploração de espécies.....	1
2. Marcadores microssatélites: ferramentas para o estudo da estrutura genética de populações.....	5
3. <i>Casearia sylvestris</i> Swartz.....	7
3.1. Posicionamento filogenético do gênero <i>Casearia</i> e suas implicações.....	7
3.2. <i>Casearia sylvestris</i> : informações ecológicas e taxonômicas.....	10
3.3. <i>Casearia sylvestris</i> : biologia reprodutiva e estrutura genética de populações.....	12
3.4. <i>Casearia sylvestris</i> : interesse farmacológico.....	15
3.5. Diterpenos clerodânicos em <i>C. sylvestris</i> : casearinas.....	17
OBJETIVOS.....	21
CAPÍTULO I - DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE <i>Casearia sylvestris</i> Sw. (SALICACEAE) NO ESTADO DE SÃO PAULO..	22
I.1. Isolation and characterization of microsatellite markers for <i>Casearia sylvestris</i> Sw. (Salicaceae), a neotropical medicinal tree.....	30

I.2. Population genetic relationships between <i>Casearia sylvestris</i> Sw. (Salicaceae) varieties found in the Cerrado, Atlantic Forest and ecotones of south-east Brazil: hybridization and divergence of <i>taxa</i> influenced by habitat preference.....	34
CAPÍTULO II - DIVERSIDADE QUÍMICA EM POPULAÇÕES DE <i>Casearia sylvestris</i> Sw (SALICACEAE) NO ESTADO DE SÃO PAULO.....	58
II.1. Enraizamento de estacas de <i>Casearia sylvestris</i> Sw. (Salicaceae) tratadas com ácido indolbutírico.....	61
II.2. Diversidade de casearinas entre e dentro de populações de <i>C. sylvestris</i> Sw. (Salicaceae).....	73
CONCLUSÕES GERAIS.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
ANEXOS.....	103

**VARIABILIDADE GENÉTICA E QUÍMICA ENTRE E DENTRO DE  
POPULAÇÕES DE *Casearia sylvestris* Sw. (SALICACEAE) NO  
ESTADO DE SÃO PAULO**

Autor: MARCELO MATTOS CAVALLARI

Orientador: Prof. Dr. MARCOS APARECIDO GIMENES

Co-orientador: Prof. Dr. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO

**RESUMO**

O presente trabalho teve como objetivo produzir ferramentas e informações úteis para a conservação e exploração racional de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae), uma espécie que produz diterpenos clerodânicos de grande importância farmacológica (casearinas), e que é explorada por extrativismo. Tal objetivo foi alcançado através do desenvolvimento de marcadores microssatélites específicos para *C. sylvestris* e de um estudo da diversidade genética e química existente entre e dentro de populações do Estado de São Paulo. Tradicionalmente são reconhecidas duas variedades em *C. sylvestris* (var. *sylvestris* e var. *lingua*), o que é motivo de debate devido à existência de formas intermediárias. Este trabalho objetivou, adicionalmente, contribuir com argumentos genéticos para esta discussão. Foi construída uma biblioteca enriquecida em microssatélites, a partir da qual obtiveram-se e validaram-se dez pares de iniciadores (*primers*) microssatélites específicos para *C. sylvestris*. Estes pares de iniciadores foram utilizados para o estudo da estrutura genética de populações de *C. sylvestris* através da amostragem de 376 indivíduos em nove populações distribuídas em quatro ecossistemas (Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semidecidual, Cerrado e ecótonos). As duas

variedades foram amostradas de acordo com sua distribuição nestes ecossistemas. A genotipagem dos indivíduos para os locos amostrados foi realizada através de eletroforese em gel de acrilamida lido a 700 e 800 nm por um seqüenciador *IR<sup>2</sup>-DNA Analyser (LI-COR)*. Os dados foram analisados através de abordagens frequentistas, bayesianas e baseadas na teoria de coalescência, utilizando-se diversos programas computacionais. Para o estudo da diversidade química, as mesmas populações foram amostradas, selecionando-se 12 indivíduos por população, totalizando 108 indivíduos. Adicionalmente, foram feitas estacas destes indivíduos para o cultivo em casa de vegetação e posterior coleta para análises químicas. O objetivo foi comparar qualitativamente e quantitativamente as casearinas produzidas por indivíduos de diversas localidades e por seus clones cultivados sob condições homogêneas. Por ser uma espécie não-cultivada, o enraizamento de estacas mostrou-se problemático, e uma metodologia foi desenvolvida para tal. Apenas 46 estacas sobreviveram após mais de um ano de cultivo em casa de vegetação. As casearinas destas 154 (108 + 46) amostras foram extraídas e analisadas em duplicata por CLAE-DAD. Os resultados da análise genética sugerem duplicações gênicas na espécie, detectadas através da observação de mais de dois alelos para um mesmo loco em 8% dos indivíduos da var. *sylvestris* e em 70% dos indivíduos da var. *lingua*. Estudos adicionais são necessários para confirmar a hipótese de duplicações gênicas. Observou-se que as populações que abrigam as duas variedades possuem maior diversidade genética. O fluxo gênico detectado entre os ecossistemas foi baixo. A análise de variância molecular indicou que 76% da diversidade genética amostrada encontra-se dentro de cada população, e revelou que as diferenças genéticas entre as variedades são maiores do que as diferenças entre os ecossistemas ou populações. O agrupamento realizado pela abordagem bayesiana coincidiu com a classificação morfológica dos indivíduos com relação à variedade, evidenciando importantes diferenças genéticas entre estes táxons. De modo geral, os resultados indicam que as duas variedades são, atualmente, unidades evolutivas distintas, que trocam informação genética nos ecótonos e em outras poucas localidades onde se encontram e hibridizam. São propostos mecanismos de manutenção dos dois táxons face à hibridação. As análises químicas revelaram uma grande diversidade de casearinas produzidas por um mesmo indivíduo. Cada população apresenta um padrão típico de

casearinas, e há grandes diferenças entre os padrões de cada população. As variedades também se mostraram quimicamente diferenciadas. Os resultados revelaram que um ano de cultivo em casa de vegetação não foi suficiente para homogeneizar a produção de casearinas por parte de indivíduos provenientes de diferentes localidades. Tal resultado sugere que o genótipo é bastante determinante na produção de casearinas, ainda que estudos adicionais sejam necessários.

**Palavras-chave:** *Casearia sylvestris*, casearinas, microssatélites, estrutura genética de populações, diversidade química

**GENETIC AND CHEMICAL DIVERSITY IN *Casearia sylvestris* Sw.  
(SALICACEAE) POPULATIONS FROM SÃO PAULO STATE, BRAZIL**

Author: MARCELO MATTOS CAVALLARI

Adviser: Prof. Dr. MARCOS APARECIDO GIMENES

Co-adviser: Prof. Dr. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO

**ABSTRACT**

This work aimed obtaining tools and information for the conservation and rational exploitation of *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae), a tree species which produces casearins, pharmacologically important clerodane diterpenes. This goal was achieved through the development of a set of polymorphic microsatellite markers, and through the study of chemical and genetic diversity in populations of *C. sylvestris* from São Paulo State. Also, we aimed contributing for the debate on the existence of two varieties within this species (var. *sylvestris* e var. *lingua*). A genomic library was constructed and 10 primer pairs were obtained. Those primers were utilized for a population genetic structure analysis, in which 376 individuals from nine populations distributed on four different ecosystems (Evergreen Atlantic Forest, Semideciduous Atlantic Forest, Cerrado and ecotones) were sampled. The two varieties were sampled according to its distribution among these populations. Genotyping was performed at 700 and 800 nm by electrophoresis on an IR2-DNA Analyser (*LI-COR*). The data were analyzed through frequentist, Bayesian and coalescence-based approaches, through the use of several softwares. Chemical diversity was studied by sampling in the same populations (12 individuals per

population, i.e. 108 individuals). Also, cuttings of these individuals were prepared, aiming to verify its' chemical compounds after a year of green-house cultivation. Cuttings' rooting was problematic and a methodology was developed. Only 46 cuttings survived. Casearins from these 154 individuals (108 + 46) were extracted and analyzed by HPLC. Genetic analysis results suggests a partial genome duplication, as more than two alleles for the same locus were observed in 8% of var. *sylvestris* individuals and in 70% of var. *lingua* individuals. Additional studies are necessary to verify the hypothesis of partial genome duplication. It was observed that the populations harbouring the two varieties present higher levels of genetic diversity. Gene flow among ecosystems showed to be reduced. Analysis of molecular variance showed that 76% of the total genetic diversity sampled is attributable to differences among individuals within populations, and that varieties' genetic divergence is higher than that observed among ecosystems or populations. Bayesian clustering successfully assigned individuals to varieties, evidencing important genetic differences between these *taxa*. Results suggest that the two varieties are relatively independent units, which met only in the ecotones, where hybridization takes place. The maintenance of two distinct *taxa* face to gene flow and hybridization is discussed. Chemical analyses revealed great casearins' diversity, even within a single individual. Each population presents a pattern of casearins diversity, which is different from the others populations' pattern. Varieties also showed to be differentiated. Results revealed that a year of green-house cultivation was not enough to homogenize the casearins' production from individuals originated from different localities. This result suggests a great importance of the genotype for casearins production.

**Keywords:** *Casearia sylvestris*, casearins, microsatellites, population genetic structure, chemical diversity

# INTRODUÇÃO

## 1. Estrutura genética de populações e implicações para a conservação e exploração de espécies

Populações de plantas são compostas por genótipos distribuídos de forma estruturada no espaço e no tempo (Loveless & Hamrick, 1984). Esta estruturação pode se manifestar entre diferentes populações ou entre grupos dentro de populações. A partição da variabilidade genética entre e dentro de populações de uma determinada espécie é resultado de processos dinâmicos de fluxo gênico, seleção, endogamia, deriva genética e mutação (Hartl & Clark, 1997), ou em outras palavras, é o resultado das interações entre uma série de mecanismos evolutivos e ecológicos (Martins, 1987).

Tradicionalmente, a estrutura genética de populações é estudada através da abordagem frequentista de Wright (1921, 1931, 1951) ou seus derivados. Populações são determinadas (subjetivamente) *a priori*, e a frequência dos alelos e genótipos em cada uma destas populações é analisada (Mank & Avise, 2004). Normalmente, é feito um levantamento da diversidade genética em várias populações através da quantificação da variabilidade genética existente em um conjunto particular de marcadores moleculares, e da verificação de como esta variabilidade está distribuída entre as populações. Com base nestes dados, é possível fazer inferências quanto o tamanho efetivo das populações, padrões de cruzamentos e dispersão, fluxo gênico e histórico biogeográfico da espécie (Schnabel et al., 1998).

Atualmente sabe-se que os modelos de estrutura de populações, migração, demografia e evolução idealizados por Wright não correspondem à realidade de populações naturais (Whitlock and McCauley 1999) ou de biomas brasileiros (Coelho, 2002). Os pressupostos de inexistência de reprodução assexuada, de não

sobreposição de gerações, de constância de taxa de fecundação cruzada e de populações de tamanho “infinito” dificilmente podem ser verificados para a maioria das espécies perenes nativas do Cerrado, por exemplo (Coelho, 2002). Além disso, a própria delimitação *a priori* das populações provoca um viés nos resultados (Baloux & Lugon-Moulin, 2002; Mank & Avise, 2004). No entanto, apesar de suas limitações, o  $F_{ST}$  de Wright (1951) ainda é o parâmetro padrão utilizado para descrever a diferenciação entre populações e estimar migração (Pearse & Crandall, 2004).

Ferramentas estatísticas mais modernas vêm permitindo a aplicação de novas abordagens, que exigem menos pressupostos e são mais flexíveis quanto às hipóteses a serem testadas. A abordagem bayesiana, implementada, por exemplo, nos programas computacionais STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) e PARTITION (Dawson & Belkhir, 2001), vêm ganhando espaço nas análises populacionais (Shoemaker et al., 1999; Coelho, 2002). No modelo de Pritchard (2000), por exemplo, são assumidas  $K$  populações (sendo que o valor de  $K$  é desconhecido), cada uma delas caracterizada por um conjunto de frequências alélicas em cada loco. O método busca determinar a população a qual pertence cada indivíduo, e, simultaneamente, estima as frequências alélicas de cada população. Em outras palavras, o programa procura, a partir do conjunto de dados, criar  $K$  populações que estejam o mais próximo possível do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, sem nenhuma informação *a priori* a respeito dos locais de coleta (Pritchard et al., 2000). Isto é útil, por exemplo, para determinar estruturas populacionais crípticas, onde o examinador não tem nenhuma pista a respeito dos limites reais dos grupos mais panmíticos. Para tal, o modelo utiliza a abordagem bayesiana, estabelecendo “*priors*” para cada população (desconhecida) e para as frequências alélicas. Maiores detalhes sobre a inferência bayesiana são encontrados em Shoemaker et al., 1999 e Coelho, 2002.

Adicionalmente, análises baseadas na teoria da coalescência, introduzida por Kingman (1982), vêm também ganhando espaço, apesar da grande demanda de tempo de análise computacional. A teoria da coalescência enfoca os alelos amostrados e calcula a probabilidade de que dois alelos amostrados tenham um ancestral comum no tempo  $t$  no passado (Schnabel et al., 1998). Alguns programas (e.g. MIGRATE - Beerli and Felsenstein, 1999, 2001; FLUCTUATE – Kuhner et al., 1995; GENETREE – Bahlo & Griffiths, 2000) constroem e verificam todas as

genealogias possíveis entre os indivíduos, e a probabilidade cada genealogia ser verdadeira é calculada com base nos parâmetros estimados e no conjunto de dados. Vários parâmetros são estimados simultaneamente, procurando-se o melhor conjunto de parâmetros para descrever os dados (Pearse & Crandall, 2004). Através desta abordagem, é possível estimar, com o programa MIGRATE, por exemplo, o número de subpopulações geneticamente identificáveis na amostra e verificar o fluxo gênico de maneira assimétrica entre duas ou mais populações (i.e., não apenas a taxa de migração entre A e B, mas as taxas de migração de A para B e de B para A) (Pearse & Crandall, 2004). Outro programa computacional com estimadores baseados em coalescência é o programa BOTTLENECK (Piry et al., 1999), que detecta reduções recentes no tamanho efetivo da população, verificando se a heterozigosidade observada é maior do que aquela esperada em situações de equilíbrio entre mutação e deriva, assumindo um determinado modelo de mutação.

Revisões a respeito das diferentes abordagens para o estudo da estrutura genética de populações, bem como os a respeito dos principais programas computacionais disponíveis, podem ser observadas nos artigos de Schnabel et al. (1998) e Pearse & Crandall (2004), entre outros.

Estudos a respeito da estrutura genética de populações e distribuição da variabilidade genética de uma espécie possuem grande importância para a sua conservação e exploração racional, além de contribuírem para a compreensão dos mecanismos evolutivos de maneira geral. O conhecimento do modo como a variação genética de uma espécie está distribuída entre e dentro de suas populações é essencial para a sua conservação (Reis, 1999, Frankham et al., 2005). Estudos genético-ecológicos, tanto em florestas não perturbadas como em matas secundárias, vêm demonstrando o efeito das ações antrópicas em suas populações, auxiliando na definição dos parâmetros genéticos mais adequados para orientar e monitorar as ações nesses ecossistemas (Kageyama et al., 1998). Os dados gerados por pesquisas em genética de populações podem ser utilizados para definir unidades de conservação e prioridades para o manejo de recursos genéticos (Coates & Atkins, 2001; Fleishman et al., 2001, Oliveira et al., 2006), indicando áreas e populações de maior ou menor importância para a preservação dos táxons em questão e permitindo

o desenvolvimento de estratégias efetivas de conservação (Holsinger & Gottlieb, 1991, Frankham et al., 2005).

A conservação de espécies depende da manutenção de sua diversidade genética no habitat natural (*in-situ*) e de reservas genéticas *ex-situ*, ou bancos de germoplasma. Em ambos os casos, estas reservas genéticas devem ser otimizadas no sentido de abrigarem, idealmente, toda a diversidade genética da espécie (Martins, 1988, Frankham et al., 2005). No entanto, na grande maioria dos casos, os recursos financeiros e o tempo são limitados, sendo praticamente impossível preservar toda a variabilidade genética de uma espécie. Desta forma, o estudo da estrutura genética de populações pode fornecer informações essenciais para o planejamento e execução de programas de conservação. De acordo com os padrões de distribuição da variabilidade genética observados, podem-se definir populações ou regiões prioritárias para conservação *in-situ*. Da mesma forma, para a conservação *ex-situ*, o conhecimento da estrutura genética de populações permite a definição de estratégias de amostragem mais eficientes para a captação da diversidade genética (Frankham et al., 2005, Oliveira et al., 2006).

Por “conservação”, neste contexto, deve-se entender “manutenção da variabilidade genética”, tenha esta objetivos puramente conservacionistas (preservação da espécie), ou objetivos agronômicos / econômicos (conservação de recursos genéticos). Atualmente, existe uma preocupação em se preservar a variabilidade genética de variedades selvagens de espécies cultivadas ou de espécies selvagens proximamente relacionadas à espécies exploradas economicamente (e.g. *Arachis*, Valls & Pizarro, 1994). Tal preocupação reside no fato de que esta variabilidade genética contém genes de interesse agronômico, tais como aqueles relacionados à resistência a patógenos e pragas e a estresses hídricos, salinos, ao frio, etc, sendo importante para o desenvolvimento da agricultura (Vilela-Morales & Valois, 2000).

Além da conservação de recursos genéticos de espécies de interesse agronômico ou econômico, existe ainda a preocupação com a conservação de espécies de interesse medicinal (Farnsworth & Soejarto, 1991). Neste contexto, biomas inteiros são vistos como detentores de um enorme potencial ainda não totalmente reconhecido (Vieira, 1994). O Cerrado, por exemplo, apresenta grande

potencial em recursos genéticos farmacêuticos (Vieira e Martins, 2000; Guarim Neto & Morais, 2003).

A execução de estudos genéticos populacionais para todas as espécies que compõem um ecossistema é inviável. Uma abordagem interessante seria o estudo de espécies que sirvam como modelo e que, portanto, possam ser utilizadas como referência para a conservação genética *in situ* das demais espécies com as quais compartilha das mesmas características num mesmo ecossistema (Kageyama et al., 1998; Martins, 2005). Estas espécies representam grupos de espécies com características ecológicas comuns e que têm padrões genéticos e ecológicos extrapoláveis, até certo ponto, para todo o grupo (Kageyama et al., 2001).

## **2. Marcadores microssatélites: ferramentas para o estudo da estrutura genética de populações**

Existem muitas maneiras de se estudar a estrutura genética de populações e verificar o grau de variabilidade existente em uma determinada espécie (Ferreira e Grattapaglia, 1998). As técnicas em biologia molecular permitem hoje a observação de polimorfismo diretamente na seqüência gênica de organismos. Os marcadores moleculares abriram novas perspectivas para pesquisas em biologia populacional, e têm sido largamente utilizados no monitoramento da variabilidade genética (Zucchi, 2002).

Dentre os diversos marcadores moleculares disponíveis atualmente, os marcadores microssatélites destacam-se por serem altamente informativos. Sua herança co-dominante e alto nível de polimorfismo fazem destes marcadores uma ferramenta útil para diferentes aplicações (Stachel et al., 2000). Diversos estudos investigaram a estrutura genética de populações de plantas baseados em microssatélites (e.g. Collevatti et al., 2001; Saltonstall, 2003; Zucchi et al., 2003; Lexer et al., 2005; Valbuena-Carabaña et al., 2005; Lemes et al., 2007; Dias et al., 2008), visando responder a questões específicas em biologia evolutiva e conservação (Baloux & Lugon-Moulin, 2002). As variações em locos de microssatélites têm sido usadas para o estudo da história e estrutura genética de populações, verificação de fluxo gênico, deriva genética, estudos de paternidade, reconstrução de filogenias,

inferência de taxas de migração, construção de mapas genéticos e identificação de variedades ou indivíduos (Xu & Fu, 2004, Oliveira et al., 2006).

Microssatélites são também conhecidos por SSR (*simple sequence repeats*) ou STR (*short tandem repeats*), e são regiões normalmente não codantes de DNA repetitivo, compostas por curtos motivos de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em *tandem* (Oliveira et al., 2006). As regiões que contém as seqüências simples repetidas são amplificadas utilizando-se um par de *primers* específicos que flanqueiam o microssatélite. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco, e, por este motivo, os marcadores microssatélites são multialélicos. Além disso, ambos os alelos de um indivíduo heterozigótico podem ser visualizados no gel de eletroforese. Desta forma, os microssatélites constituem a classe mais polimórfica, e portanto mais informativa, de marcadores moleculares (Ferreira e Grattapaglia, 1998). A utilização de microssatélites permite estimar o número de alelos por loco, a heterozigosidade observada e a heterozigosidade esperada, isto é, os parâmetros genéticos mais utilizados para quantificar a variabilidade genética em populações de plantas (Zucchi, 2002).

Microssatélites estão presentes em genomas eucariotos e procaríotos. Porém, a frequência de microssatélites e os tipos de repetição variam entre táxons (Oliveira et al., 2006). Apesar de serem normalmente considerados como evolutivamente neutros, a significância funcional de alguns SSR tem sido demonstrada, especialmente para os microssatélites compostos por três nucleotídeos (Li et al., 2002). Microssatélites podem estar envolvidos na organização da cromatina, regulação de processos metabólicos do DNA e regulação da expressão de alguns genes (Li et al., 2002), ou com algumas doenças humanas (Jarne & Lagoda, 1996; Oliveira et al., 2006).

Sabe-se que a taxa de mutação em microssatélites é muito maior do que no restante do genoma (Oliveira et al., 2006). A maioria das mutações envolve a adição ou subtração de uma única repetição (Baloux & Lugon-Moulin, 2002). Vários fatores afetam a taxa de mutação em locos microssatélites, como a repetição do motivo, o tamanho do microssatélite, a porcentagem de GC na região flanqueadora, etc (Li et al., 2002)

A explicação mais aceita para a mutação dos locos microssatélites é a de “slippage” da DNA polimerase (Jarne & Lagoda, 1996; Li et al., 2002), ou seja, erros durante a replicação do DNA: uma das fitas se dissocia temporariamente da outra, re-associando-se em posição diferente, levando a uma adição no número de repetições se o erro ocorreu na fita complementar, ou a uma diminuição (deleção) se o erro ocorreu na fita molde (Oliveira et al., 2006). Devido à alta taxa de mutação em locos microssatélites, e devido ao fato do número de repetições possíveis nestes locos ter um limite (Baloux & Lugon-Moulin, 2002), alelos de locos microssatélites com o mesmo número de repetições não necessariamente possuem um ancestral comum, isto é, podem ser idênticos por simples acaso (homoplasia) (Estoup et al., 2002). A homoplasia de microssatélites pode causar distorções nas estimativas a respeito da conectividade entre populações e espécies (fluxo gênico, filogenias) (Estoup et al., 2002).

Uma das maiores limitações do uso de microssatélites é o fato de serem marcadores espécie-específicos (Squirrel, 2003), isto é, para cada espécie a ser estudada, é preciso procurar por locos microssatélites, verificar as seqüências (20 a 30 pares de bases) que o flanqueiam e, a partir destas seqüências, desenhar e sintetizar os pares de iniciadores que serão utilizados para amplificar os locos microssatélites. Em alguns casos, porém, é possível utilizar os iniciadores desenvolvidos para uma espécie para amplificar locos microssatélites de espécies próximas (Barbará et al., 2007).

### **3. *Casearia sylvestris* Swartz**

#### **3.1. Posicionamento filogenético do gênero *Casearia* e suas implicações**

O gênero *Casearia* Jacq. é pan-tropical e conta com cerca de 180 espécies. A América tropical e subtropical abriga a maior diversidade do gênero, com cerca de 75 espécies (Torres e Yamamoto, 1986). No Brasil, o gênero *Casearia* é representado por aproximadamente 70 espécies (Maistro et al., 2004). De acordo com Torres & Ramos, 2007, ocorrem 11 espécies de *Casearia* no Estado de São Paulo.

O gênero *Casearia* é tradicionalmente considerado como pertencente à família Flacourtiaceae (Cronquist, 1981). Esta família compreende aproximadamente 86 gêneros e cerca de 1300 espécies encontradas especialmente nas regiões tropicais da América do Sul, e caracteriza-se por plantas lenhosas com folhas inteiras, de disposição alterna, com estípulas caducas, flores pequenas, esverdeadas, em inflorescências axilares, hermafroditas ou de sexos separados (Joly, 1998).

Mais recentemente, com o advento da biologia molecular, novas abordagens para a sistemática de plantas foram sugeridas, uma vez que tornou-se possível estabelecer relações filogenéticas entre táxons baseadas em seqüências de DNA, e não apenas na semelhança morfológica (que pode ser resultado de convergência adaptativa). Assim surgiu o *Angiosperm Phylogeny Group* (APG), trazendo para a botânica sistemática um princípio de classificação que procura refletir a história evolutiva dos táxons, sendo baseado em cladística e aceitando apenas grupos monofiléticos como “verdadeiros” (Souza & Lorenzi, 2005).

A mais recente versão do APG (APG II, 2003) corrobora a taxonomia tradicional em muitos aspectos, já que se verificou que muitas de suas famílias são de fato grupos monofiléticos (Souza & Lorenzi, 2005). Além disso, confirmou-se a artificialidade já observada em muitos grupos, entre os quais, a família Flacourtiaceae (Souza & Lorenzi, 2005). Nenhuma outra família de angiospermas possui uma circunscrição tão variável e controversa quanto Flacourtiaceae (Chase et al., 2002).

Chase et al., 2002, demonstraram através de análise filogenética baseada em seqüências de cloroplasto que “Flacourtiaceae” é na realidade composta por dois clados, sendo cada um deles mais proximamente relacionados com outras Malphigiales do que entre si. Segundo os autores, o gênero *Casearia* é grupo irmão de Salicaceae (sensu stricto).

Adicionalmente, em uma análise filogenética realizada através de seqüências cloroplastidiais de diversas famílias, Flacourtiaceae, representada pelos gêneros *Idesia* e *Dovyalis*, apresentou-se como grupo irmão de Salicaceae, representada por *Salix* e *Populus*, compondo os quatro gêneros um clado monofilético com valor de “bootstrap” igual a 100%. (Azuma et al., 2000).

Além das evidências moleculares, diversas observações ecológicas, químicas e morfológicas também relacionam Flacourtiaceae com Salicaceae. Um histórico destas observações pode ser lido no artigo de Leskinen & Alström-Rapaport (1999), ou ainda no *Angiosperm Phylogeny Website* (<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>).

Devido a estas constatações, no sistema APG II (2003), Flacourtiaceae foi extinta, tendo sido a maioria dos seus gêneros transferidos para Salicaceae (entre eles, o gênero *Casearia*). Salicaceae (sensu APG II) é caracterizada por folhas alternas, serradas e com estípulas, flores com muitos estames e gineceu tricarpelar com placentação parietal (<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>).

Devido à proximidade filogenética do gênero *Casearia* com as Salicaceae sensu stricto (gêneros *Salix*, *Populus* e *Chosenia*), cabe aqui ressaltar algumas particularidades deste grupo de plantas. Tais observações adquirem um maior significado no contexto desta tese à luz dos resultados observados nas análises genéticas (ver Capítulo I).

Os gêneros *Salix* e *Populus* são notáveis por sua capacidade de hibridação interespecífica, sendo reconhecidas diversas zonas híbridas entre espécies de *Salix* (Hardig et al., 2000; Palmé et al., 2003) ou entre espécies de *Populus* (Lexer et al., 2005). Enquanto o gênero *Salix* apresenta espécies com diversos níveis de ploidia, *Populus* é diplóide (Leskinen & Alström-Rapaport, 1999). No entanto, indivíduos aneuplóides são frequentemente encontrados em espécies de *Populus* (Bradshaw Jr. & Stettler, 1993; Cervera et al 2001; Yin et al 2004).

O total seqüenciamento do genoma da espécie *Populus trichocarpa* (Tuskan et al., 2006) revelou a existência de 8.000 pares de genes parálogos de mesma idade, sugerindo a ocorrência de um evento de duplicação total do genoma seguido de parcial diploidização (perda de parte dos genes duplicados). A comparação de 1825 genes ortólogos de *Populus* e *Salix* derivados de ESTs de *Salix* sugere que o evento de duplicação do genoma ocorreu em um ancestral comum aos dois gêneros (Tuskan et al., 2006), e seria interessante verificar se outras Salicaceae (sensu APG II) também possuem esta duplicação.

### **3.2. *Casearia sylvestris*: informações ecológicas e taxonômicas**

*Casearia sylvestris* Sw. é uma espécie de ampla distribuição geográfica, ocorrendo do México até a Argentina em diversos ambientes (Sleumer, 1980, Torres & Ramos, 2007). É encontrada em todo o território brasileiro, em praticamente todas as formações florestais (Lorenzi, 1992), sendo conhecida por diversos nomes populares, tais como guaçatonga, erva-de-lagarto, café-bravo, entre muitos outros (Torres & Yamamoto, 1986). No estado de São Paulo, ocorre em Restinga, Floresta Ombrófila Densa de planície, encosta ou platô, Floresta Estacional Semidecídua Submontana e Montana, Mata Ciliar, Mata Higrófila, Floresta Ombrófila Mista, Transição entre Mata-Cerrado, Cerradão-Mata Ciliar ou Mata Atlântica - Campo de Altitude, Campo Cerrado, Cerrado, Cerradão, mata degradada ou secundária, sub-bosque e borda, sub-bosque de *pinus* ou eucalipto, clareira, beira de estrada, sobre solo argiloso, arenoso ou rochas calcáreas, do nível do mar até 1.500m de altitude. (Torres & Ramos, 2007). Trata-se de uma espécie de alta densidade e ampla distribuição em matas ciliares (Durigan et al., 2000) e em diversas outras formações: em um levantamento realizado em 86 áreas de Cerrado no Estado de São Paulo, *C. sylvestris* foi observada em 90% das localidades (Durigan et al., 2003); em um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual no município de Luminárias, MG, *C. sylvestris* apresentou-se como uma das espécies mais abundantes (Rodrigues et al., 2002). Na Figura 1 é apresentada uma fotografia de um exemplar de *C. sylvestris*.



Figura 1. Exemplar de *C. sylvestris* em sua ocorrência mais típica: árvores de porte médio, com copa arredondada, vegetando em pastos ou à beira de estradas.

*C. sylvestris* apresenta grande variação com relação ao tamanho, forma e textura das folhas, à pilosidade dos ramos mais jovens e da inflorescência, ao número de flores por inflorescência e ao comprimento dos pedicelos (Torres & Yamamoto, 1986). Sleumer (1980) considera duas variedades para esta espécie, *C. sylvestris* var. *sylvestris* e *C. sylvestris* var. *lingua* (Cambess.) Eichler, apesar de admitir a existência de formas intermediárias entre elas. *C. sylvestris* var. *lingua* havia sido anteriormente considerada por Saint-Hilaire (1829), como uma espécie distinta (*C. lingua*).

Torres e Yamamoto (1986), em revisão sobre a taxonomia das espécies de *Casearia* no Estado de São Paulo, confirmam a existência das formas intermediárias referidas por Sleumer (1980), relatando ser bastante problemático definir os limites entre as variedades *sylvestris* e *lingua*. Klein & Sleumer (1984), ao descreverem a variedade *lingua*, afirmam que ela está “ligada à variedade *sylvestris* por formas intermediárias”.

Em tratamento mais recente, na publicação a respeito da Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, Torres & Ramos (2007) não consideram níveis infra-específicos em *C. sylvestris*. As autoras relatam que os materiais de São Paulo que podem ser atribuídos a *C. sylvestris* var. *sylvestris* tendem a apresentar, em geral, folhas oblongas, membranáceas a papiráceas, com venação secundária inconspícua e a ocorrerem em formações florestais, enquanto que os espécimes que podem ser atribuídos a *C. sylvestris* var. *lingua* tendem a ter folhas elípticas a ovais, cartáceas, com venação secundária mais evidente e a ocorrerem, preferencialmente, em cerrado senso amplo. No entanto, de acordo com as autoras, a existência de um contínuo de variação torna a separação das variedades difícil e, por este motivo, não assumiu-se a divisão infra-específica proposta por Sleumer (1980) no referido trabalho.

Apesar da existência de duas variedades ser discutível do ponto de vista taxonômico, do ponto de vista prático a nomenclatura *C. sylvestris* var. *sylvestris* e *C. sylvestris* var. *lingua* é bastante útil. Referir-se a uma ou outra variedade resume um conjunto de características morfológicas e ecológicas mais ou menos bem definido, uma vez que a variedade *lingua* é restrita ao Cerrado, capoeiras ou savanas arbustivas (Sleumer, 1980; Klein & Sleumer, 1984). Os espécimes de *C. sylvestris* encontrados no Cerrado (i.e., “var. *lingua*”) possuem morfologia bastante distinta dos indivíduos da Mata Atlântica (“var. *sylvestris*”), desde o porte e hábito até a textura, tamanho e coloração das folhas (Sleumer, 1980; Silva, 2003). As características morfológicas de *C. sylvestris* observadas no Cerrado, como o hábito arbustivo e folhas menores e mais coriáceas, parecem estar relacionadas com adaptações e este ambiente (Silva, 1996).

### **3.3. *Casearia sylvestris*: biologia reprodutiva e estrutura genética de populações**

A biologia reprodutiva de *C. sylvestris* foi pouco estudada até o momento. No entanto, há diversas informações disponíveis na literatura que fornecem indícios a respeito de seus polinizadores, dispersores e sistema reprodutivo.

*Casearia sylvestris* apresenta inflorescência em fascículos, com cerca de 20 a 40 flores hermafroditas por inflorescência (Torres & Yamamoto, 1986),

podendo chegar a 70 flores por inflorescência (Torres & Ramos, 2007). A Figura 2 mostra um ramo de *C. sylvestris* florescendo. A morfologia da flor, associada à abundante produção de néctar, sugere que a espécie seja polinizada por pequenos insetos (Torres, comunicação pessoal). Machado & Oliveira, 2000, relatam que os polinizadores mais importantes de *Casearia grandiflora*, uma espécie próxima, são moscas da família Syrphidae, tendo sido observados também outros insetos. Assim como em *C. grandiflora*, as flores de *C. sylvestris* também apresentam coloração clara e opaca, odor imperceptível, néctar de fácil acesso e órgãos sexuais expostos, sendo provavelmente polinizadas por moscas. De fato, Barbosa (1997) observou moscas da família Bombyliidae e Calliphoridae visitando flores de *C. sylvestris* em uma comunidade de campo sujo em Minas Gerais.



Figura 2. Ramo de *C. sylvestris* florescendo.

A ocorrência de polinização por moscas (miiofilia) em espécies arbóreas tem sido observada para diversas árvores tropicais com flores pequenas (Pombal 1994, Pombal & Morellato 1995) e sugere que estes insetos podem ser importantes para a polinização nesses ambientes. Arruda & Sazima (1996) observaram que na mata mesófila do Estado de São Paulo, moscas Syrphidae utilizaram como recurso

alimentar 58 espécies de plantas. Muitas destas espécies possuem morfologia floral semelhante à de *Casearia* (Machado & Oliveira, 2000).

Machado & Oliveira, 2000, observaram mecanismos de auto-incompatibilidade em *C. grandiflora*. Tais mecanismos são muito comuns em árvores tropicais (Seavey & Bawa 1986, Oliveira & Gibbs 2002) e em plantas miiófilas, e.g. *Sterculia chicha* (Taroda & Gibbs 1982). A auto-incompatibilidade é amplamente distribuída entre as espécies arbóreas tropicais, que são predominantemente alógamas (Bawa 1974, Gibbs & Bianchi 1999, Oliveira & Gibbs 2002). Todas estas observações sugerem que a espécie *C. sylvestris* possa apresentar fecundação preferencialmente alógama com sistemas de auto-incompatibilidade. Apesar destas especulações, Barbosa (1997) realizou polinizações controladas em *Casearia sylvestris* e observou que se trata provavelmente de uma espécie auto-compatível.

As características do fruto sugerem que a dispersão de sementes seja realizada por aves. O fruto é uma cápsula ovóide, com cerca de 5 mm de diâmetro, vermelha, e que traz de uma a sete sementes envolvidas em arilo amarelo e pegajoso (Torres & Yamamoto, 1986). A dispersão das sementes por aves é relatada para outras espécies do gênero, como *C. corymbosa* (Howe & Kerckhove, 1979) e *C. nítida* (Howe & Primack, 1975), que possuem frutos com arilo semelhante aos de *C. sylvestris*. No caso de *C. corymbosa*, Howe & Kerckhove (1979) verificaram que pelo menos 14 espécies de aves se alimentam de seus frutos, regurgitando sementes viáveis nas imediações.

A estrutura genética de populações naturais de *C. sylvestris* foi estudada por Silva et al., 2006, através de marcadores RAPD. Conforme os autores, foi possível observar que a maior parte da diversidade genética amostrada (84%) deve-se a diferenças entre indivíduos da mesma população, contribuindo para a hipótese de que a espécie tenha a alogamia como sistema de cruzamentos preferencial. Este padrão (de maior porcentagem da diversidade genética ocorrer dentro de populações do que entre populações) é típico e comum a várias espécies preferencialmente alógamas (Loveless & Hamrick, 1984). Outras espécies de ocorrência no Cerrado e/ou Mata Atlântica que apresentam padrões semelhantes são *Swietenia macrophylla*, *Esenbeckia leiocarpa*, *Cariniana legalis*, *Cecropia pachystachya*, *Maytenus*

*aquifolia* (Kageyama et al. 2003), *Plathymentia reticulata* (Lacerda et al., 2001) e *Eugenia dysenterica* (Zucchi et al. 2003), entre outras, todas provavelmente alógamas.

### **3.4. *Casearia sylvestris*: interesse farmacológico**

Espécies do gênero *Casearia* são utilizadas na medicina popular no mundo todo. Por exemplo, *C. esculenta*, que ocorre na Índia, é utilizada na medicina tradicional no tratamento de diabetes (Prakasam et al., 2003). O potencial farmacológico desta e de outras espécies de *Casearia* vem sendo alvo de inúmeros estudos (Shen et al., 2005; Hunter et al., 1997; Prakash et al., 2002; Prakasam et al., 2003).

*Casearia sylvestris*, em particular, é vastamente utilizada na medicina popular da América Latina, sendo de aplicação diversa, principalmente em comunidades indígenas. Livros de medicina popular descrevem o uso de *C. sylvestris* como cicatrizante para doenças da pele, anestésico tópico, anti-diarréica, antiespasmódica, anti-hemorrágica, antimicrobiana, antiofídica, anti-reumática, anti-séptica, antiulcerogênica, calmante, depurativa do sangue, diurética, estimulante da circulação e fungicida. (Tininis, 2006). De acordo com Santos (2008) as indicações como antiofídico, antitérmico, cicatrizante e no tratamento de úlceras e gastrites são as mais citadas na literatura, sendo as folhas as partes mais utilizadas, seguidas por cascas do caule e raízes. Uma boa revisão sobre informações etnofarmacológicas a respeito de *C. sylvestris* é fornecida por Santos (2008). Muitas das aplicações populares desta espécie vêm sendo corroboradas por estudos científicos (Ferreira, 2006).

Uma de suas aplicações mais curiosas pela medicina popular é contra a picada de cobras. Segundo as crendices, lagartos picados por cobras procuram as raízes da “erva-de-lagarto” para curarem-se (Correa, 1975). Estudos científicos vêm, de fato, comprovando sua ação contra o veneno de jararacas (Borges et al., 2000; Borges et al., 2001).

O interesse nas propriedades farmacológicas de *C. sylvestris* pode ser evidenciado pelo grande número de pesquisas científicas realizadas com esta espécie,

tanto para a otimização de métodos de extração, isolamento e identificação de compostos, como em busca de novas drogas. Alguns exemplos são os trabalhos de Basile et al., 1990; Almeida, 1999; Carvalho et al., 1998; Santos, 2001; Santos et al., 2001; Jamal, 2002; Bandeira, 2004; Esteves et al., 2005; Tininis, 2006; Ferreira, 2006; Santos 2008. Foram demonstradas as atividades da *C. sylvestris* var. *lingua* contra *Aedes aegypti* (Rodrigues et al., 2006), *Plasmodium falciparum* (Mesquita et al. 2007), *Leishmania donovani* (Mesquita et al., 2005) e *Trypanosoma cruzi* (Espindola, 2004; Mesquita et al., 2005).

Apesar das inúmeras aplicações e pesquisas acima citadas, o grande interesse em *C. sylvestris* por parte da comunidade científica, e, sobretudo, por parte da indústria farmacêutica, surgiu após a descoberta de seus diterpenos clerodânicos, e de sua possível ação no tratamento do câncer. Uma equipe de pesquisadores japoneses, da *Tokyo College of Pharmacy and Pharmacognosy*, estudaram as propriedades anticancerígenas destes diterpenos, encontrando forte atividade antitumoral em ratos. Estes diterpenos foram então chamados *casearinas*, e foram imediatamente patenteados pela equipe como agentes antitumorais (Itokawa et al., 1988, Itokawa et al., 1989, Itokawa et al., 1990, Morita et al., 1991). Novos compostos foram descobertos em *Casearia sylvestris* por uma equipe de pesquisadores da Carolina do Norte, EUA, denominados casearvestrinas A, B e C. De acordo com os pesquisadores, tais compostos têm atividade citotóxica sobre linhagens de células cancerígenas e de fungos (Oberlies et al., 2002). Balunas et al., 2006, aponta o gênero *Casearia* como um dos mais promissores na descoberta de drogas contra o câncer.

O interesse comercial sobre os produtos da *Casearia* pode ser percebido através dos inúmeros fitoterápicos disponíveis para compra pela *Internet*, principalmente no exterior. A principal empresa que comercializa a guaçatonga no exterior é a *Raintree Nutrition*. A empresa utiliza como apelo o fato de a *Casearia sylvestris* ser uma espécie tropical com potencial ação benéfica no tratamento do câncer. Um frasco com aproximadamente 500g de folhas em pó custa em torno de 24 dólares (Rain Tree Nutrition, 2008: <http://www.rain-tree.com/guacatonga-powder.htm>).

### 3.5. Diterpenos clerodânicos em *C. sylvestris*: casearinas

Na literatura científica são encontrados vários estudos fitoquímicos com espécies de *Casearia*, os quais demonstram o predomínio de diterpenos do tipo clerodânico (Santos, 2008). A variedade destas moléculas é enorme: de 19 espécies de *Casearia* investigadas, 13 apresentaram mais de 120 diterpenos clerodânicos isolados de diferentes órgãos (Santos, 2008). Diterpenos clerodânicos semelhantes aos encontrados em *Casearia* foram isolados de outras espécies de Salicaceae sensu APG II (Santos, 2008).

Santos (2008) e Tininis (2006) fornecem completíssimas revisões a respeito dos diterpenos clerodânicos em *C. sylvestris*, informando desde sua estrutura básica e métodos de análise, até aplicações farmacológicas. O que se segue aqui é uma síntese das informações contidas naqueles trabalhos que são aqui relevantes.

De acordo com Santos (2008), 30 diterpenos clerodânicos foram isolados de *C. sylvestris*. São moléculas que apresentam características estruturais marcantes e são encontradas somente em algumas outras famílias de plantas. A estrutura básica destes diterpenos é formada pelos anéis A e B do sistema decalínico com duas metilas em C-8 (Me-17) e C-9 (Me-20), uma cadeia lateral com seis carbonos (C-11 a C-16) em C-9 com um dieno conjugado, um terceiro anel C diidrofurânico/diacetálico, além de substituintes oxigenados (ésteres, éteres, hidroxilas ou cetonas) que podem estar presentes nos carbonos 2, 6, 7, 18 e 19. O anel C diacetálico, altamente oxigenado, constitui-se num arranjo de funcionalidade observado em poucas substâncias na natureza e pode ser visto como um dialdeído protegido (Santos, 2008). A estrutura química destas moléculas é mostrada na Figura 3.

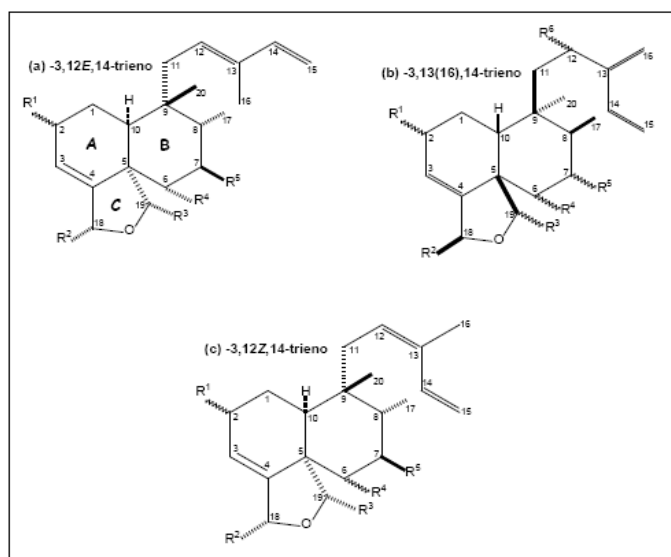


Figura 3. Esqueleto básico dos diterpenos *cis*-clerodânicos com anel diacetálico (anel C) presentes em espécies de *Casearia* (fonte: Santos, 2008).

Os dados da literatura têm demonstrado o predomínio de casearinas e casearvestrinas em *C. sylvestris* (Santos, 2008). Vinte e cinco casearinas (A-Y) são conhecidas até o momento, todas elas tendo sido obtidas de folhas (Santos, 2008). Carvalho et al. (2007) sugerem a presença de diterpenos clerodânicos típicos de *Casearia* em todos os órgãos da planta, porém com concentrações maiores de casearinas nas folhas.

As primeiras casearinas (A-F) foram isoladas e tiveram suas estruturas elucidadas por Itokawa et al. (1990), que verificaram sua atividade antitumoral e citotóxica. As casearinas G-R, com atividade citotóxica, foram isoladas por Morita et al. (1991) a partir das folhas de *C. sylvestris*. Carvalho et al. (1998) isolaram três casearinas (G, S e T). A casearina U foi obtida por Santos, 2001. As casearinas V (publicada quase que concomitantemente como caseargrewiina F por Kanokmedhakul et al., 2005), X e Y foram apresentadas por Tininis (2006). As principais diferenças estruturais entre essas casearinas estão no grupo éster ligado às posições 2, 6 e 7, 18 e 19, e na hidroxilação ou O-metilação na posição 2 (Tininis, 2006).

É importante ressaltar que as diferentes casearinas apresentam diferentes atividades, ou diferentes graus de atividade. Por exemplo, casearinas A-F apresentaram atividade citotóxica em linhagens de células de sarcoma e fibroblastos, porém, dentre elas, a casearina C foi a que se mostrou mais ativa (Itokawa et al., 1990). De acordo com Ferreira (2006), a degradação do anel diacetálico a um dialdeído produz diminuição da citotoxicidade em células tumorais, conforme observado para a casearina U dialdeído, produto de degradação da casearina U em  $\text{CDCl}_3$ . O autor relata que a casearina U apresentou maior potencial antitumoral do que as casearinas L e O. Já as casearinas G, S e T mostraram ação citotóxica seletiva em cepas mutantes de *Sacharomyces cerevisiae* (Carvalho et al., 1998). Do ponto de vista farmacológico, a gama de variações em torno de um esqueleto básico encontrada nos diterpenos de *Casearia* fornece modelos interessantes para o estabelecimento de relações entre estrutura e atividade destas substâncias (Santos, 2008).

É bem sabido que fatores ambientais, fisiológicos e genéticos afetam a biossíntese de metabólitos secundários (Freitas et al., 2004). Com relação aos fatores que influenciam a produção qualitativa e quantitativa de casearinas, porém, poucos estudos foram realizados. Tininis (2006) analisou amostras de folhas de dois indivíduos de *C. sylvestris* coletadas de 3 em 3 horas durante 24 horas consecutivas em fevereiro dos anos de 1998 e 1999 no Parque Estadual de Carlos Botelho. Observou que os teores relativos de casearinas variaram em função do horário de coleta, sendo maiores em torno das 18h30, e menores entre 0h30 e 3h30. Alguns estudos em *C. sylvestris* (não com casearinas) demonstram a relação entre diversidade química e fatores ambientais (Silva et al., 2006; Tininis et al., 2006). Quanto aos métodos de armazenagem, Bandeira (2004) demonstrou que a secagem de folhas realizada à sombra ou em estufa à 40°C não produziu diferenças no teor de casearinas observado.

Com relação aos métodos de isolamento e análise de casearinas, estes foram estudados por Santos (2001), Bandeira (2004) e Tininis (2006). A partir do extrato etanólico, e utilizando uma coluna cromatográfica empacotada com carvão ativo/ sílica gel (1:1), Tininis (2006) obteve uma fração rica em casearinas, livre de pigmentos lipofílicos e de impurezas polares. Santos (2008) apresentou uma

estratégia para a identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos (entre eles, as casearinas) do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* através de fracionamento biomonitorado, utilizando métodos cromatográficos para a purificação de substâncias, ensaios farmacológicos com o extrato, frações e substâncias purificadas e técnicas espectrométricas para a determinação estrutural. Os processos de obtenção do extrato, da fração concentrada em casearinas e de diterpenos purificados foram otimizados de modo a permitir seu escalamento e possível produção industrial.

## OBJETIVOS

Esta tese teve como objetivo fornecer informações úteis para a conservação e exploração racional da espécie *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae), que, como a maioria das espécies de interesse farmacológico de ocorrência natural no Brasil, não é cultivada, sendo obtida por extrativismo. Poucos estudos foram realizados no sentido de otimizar a coleta e obtenção dos compostos de interesse e verificar se há relação entre a qualidade e quantidade de compostos químicos obtidos e as populações de onde foram coletadas as amostras. A identificação de populações mais produtivas seria o primeiro passo para o melhoramento genético desta espécie, sua domesticação e manejo sustentado. Adicionalmente, o estudo da diversidade genética e da estrutura genética de populações, permite o desenvolvimento de estratégias para a conservação *in situ* e *ex situ*.

Especificamente, objetivou-se:

- o desenvolvimento de marcadores microssatélites específicos para esta espécie
- a análise da estrutura genética de populações da espécie, via marcadores microssatélites, através da amostragem de nove populações em diferentes ecossistemas do Estado de São Paulo;
- a análise da diversidade qualitativa e quantitativa de casearinas em amostras obtidas em nove populações em diferentes ecossistemas do Estado de São Paulo;
- evidenciar as relações genéticas entre as duas variedades propostas por Sleumer (1980).

# CAPÍTULO I

## DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Casearia sylvestris* Sw. (SALICACEAE) NO ESTADO DE SÃO PAULO

No presente trabalho, indivíduos de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) foram amostrados em nove localidades no Estado de São Paulo, e foram analisados utilizando-se marcadores microssatélites específicos para esta espécie.

Portanto, uma etapa inicial na realização desta pesquisa foi o desenvolvimento dos iniciadores (*primers*) para a amplificação de locos microssatélites em *C. sylvestris*. Para tal, utilizou-se o DNA de um indivíduo oriundo de Botucatu, devidamente identificado e com *voucher* depositado no Herbário IAC (Herbário do Núcleo de Pesquisas do Jardim Botânico do Instituto Agrônomo de Campinas). A partir desta amostra de DNA, procedeu-se à construção de uma biblioteca de DNA enriquecida em microssatélites, seguida de seqüenciamento de clones e desenho dos *primers*. Vinte pares de *primers* foram testados quanto à capacidade de amplificação de locos microssatélites polimórficos em um conjunto de indivíduos de *C. sylvestris* de diversas localidades. Dez pares de *primers* foram então selecionados para a etapa seguinte, onde foram estabelecidas as condições ótimas de reação de PCR e onde foi verificada a competência de cada um deles para a geração de parâmetros de diversidade genética. Os *primers* foram testados com o DNA de 90 indivíduos coletados nas localidades de Parque Estadual da Serra do Mar núcleo Santa Virgínia e Parque Estadual de Carlos Botelho. Para cada loco / população analisada foram obtidos os principais parâmetros de análise de diversidade genética (número de alelos por loco, heterozigiosidade esperada e observada e desvios em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg). Uma vez que os dez pares de *primers* mostraram-se competentes para o estudo da estrutura genética de populações de *C.*

*sylvestris*, procedeu-se à disponibilização desta informação para a comunidade científica através de uma publicação no periódico *Molecular Ecology Resources*, editado pela *Blackwell Publishing* Ltda. Trata-se, provavelmente, do primeiro conjunto de marcadores microssatélites disponibilizado para um gênero tropical de *Salicaceae* sensu APG II. O artigo “*Isolation and characterization of microsatellite markers for Casearia sylvestris Sw. (Salicaceae), a neotropical medicinal tree*”, conforme publicado, é apresentado nesta tese, no contexto deste capítulo (Cap.I.1.)

Ainda neste capítulo, é apresentado um artigo científico que trata da estrutura genética de populações de *C. sylvestris*, de acordo com os resultados obtidos com o uso deste conjunto de marcadores na análise das nove localidades amostradas (Cap. I. 2). Tal artigo foi submetido em maio de 2008 à apreciação pelos editores do periódico *Molecular Ecology (Blackwell Publishing)*, mas até o momento não dispõe-se de um parecer. Este artigo enfoca as relações genéticas entre as populações de diferentes ecossistemas e entre as duas variedades de *C. sylvestris*.

Foram amostrados 376 indivíduos em nove populações, sendo três de Floresta Ombrófila Densa, duas de Floresta Estacional Semidecidual, duas de Cerrado, e duas em ecótonos, regiões de transição entre a Floresta Estacional Semidecidual e o Cerrado. Em cada uma destas localidades, foram amostrados aproximadamente 40 indivíduos adultos. Na ocasião da amostragem, foi possível observar diversas características morfológicas e ecológicas da espécie, tais como diferenças no hábito, porte e textura de folhas em diferentes ambientes, polinizadores, épocas de florescimento e frutificação, etc. (Figuras 4, 5 e 6).



Figura 4. Polinizadores visitando flores de *C. sylvestris* na Estação Ecológica de Caetetus, em julho de 2006.



Figura 5. Variação no tamanho de indivíduos: na fotografia da esquerda estão destacadas flores em um indivíduo de menos de 30 cm, observado no Cerrado de Assis. Na fotografia da direita esta destacada a copa de um exemplar de *C. sylvestris* encontrado em Carlos Botelho, e uma pessoa embaixo para dar uma noção da altura da árvore.



Figura 6. Variação no hábito de indivíduos do Cerrado (esquerda) e Mata Atlântica (direita), observados em Assis e Carlos Botelho, respectivamente.

Uma excisata de cada indivíduo amostrado foi analisada com o auxílio da Dra. Roseli B. Torres (IAC), taxonomista de *Casearia*, e os indivíduos foram classificados como pertencentes às variedades *sylvestris* ou *lingua* de acordo suas características morfológicas. Parte dos indivíduos apresentou morfologia intermediária, não podendo ser classificados como pertencentes a uma ou outra variedade. Na Figura 7 são mostradas diferentes exemplares de cada variedade e de indivíduos com morfologia intermediária.



Figura 7. Diversidade morfológica observada em *C. sylvestris*. A. Conjunto de indivíduos classificados como pertencentes à var. *sylvestris*. B. Conjunto de indivíduos classificados como pertencentes à var. *lingua*. C. Conjunto de indivíduos com morfologia intermediária. Pode-se observar que mesmo dentro de cada categoria existe grande variação morfológica.

Observou-se que nas populações de Floresta Ombrófila Densa e Floresta Estacional Semidecidual, apenas a variedade *sylvestris* ocorre. No Cerrado de Botucatu, ocorre exclusivamente a variedade *lingua*. Já em Assis, a variedade *lingua* ocorre nas áreas de Cerrado, enquanto que a variedade *sylvestris* foi encontrada em áreas de Cerradão adjacentes. Nos ecótonos, as duas variedades, bem como indivíduos de morfologia intermediária, ora tendendo para uma variedade, ora para outra, foram observados. Um achado interessante (Figura 8) foi um indivíduo com características típicas da variedade *sylvestris* encontrado no Cerrado (Assis), em meio a diversos indivíduos da variedade *lingua*, mostrando que o ambiente do Cerrado não necessariamente determina a morfologia típica da variedade *lingua*.



Figura 8. Diferenças morfológicas entre as variedades (var. *lingua* à esquerda e var. *sylvestris* à direita). Este indivíduo de var. *sylvestris* foi encontrado no Cerrado de Assis, rodeado de vários outros da var. *lingua*. As folhas da var. *lingua* apresentam esta conformação de “canoa”, i.e., as folhas do exemplar fotografado não estão murchas, ao contrário do que pode parecer.

Os resultados das análises estatísticas, tanto através da abordagem frequentista, quanto através da abordagem bayesiana, sugerem que os ecossistemas são relativamente independentes uns dos outros, com características próprias de diversidade e frequência de alelos. Além disso, sugerem que as variedades de *C. sylvestris* comportam-se como unidades evolutivas relativamente independentes uma da outra, encontrando-se apenas nos ecótonos (zonas de contato ou zonas híbridas).

A existência de formas “puras” nas zonas híbridas, e a ausência de formas intermediárias fora delas, sugere que existem forças evolutivas e ecológicas que contribuem para a manutenção das variedades como unidades distintas, tais como alta especificidade com relação ao habitat, seleção contra híbridos fora das zonas de contato, assincronia de florescimento entre as variedades mesmo nas zonas de contato, etc.

Por fim, vale ressaltar que a análise com marcadores microssatélites permitiu a observação de diversos indivíduos com mais de dois alelos em um mesmo loco, o que não era esperado. Repetições de reações de PCR e géis, e mesmo a observação dos padrões obtidos, permitiram concluir (de maneira preliminar) que existe uma duplicação parcial de genoma nesta espécie. Tal duplicação parcial pode ser em partes do genoma ou pode ainda tratar-se de aneuploidia. Uma das perspectivas para a continuidade de estudos com esta espécie é justamente a investigação desta questão.

Dados os padrões observados, ficou claro, no entanto, que não se tratam de artefatos de PCR, problemas de coloração de géis ou de desenho de *primers*. Um dos indícios é o fato de que aproximadamente 70% dos indivíduos da variedade *lingua* apresentaram mais de dois alelos em pelo menos um loco, enquanto tal fenômeno ocorreu em menos de 8% dos indivíduos da variedade *sylvestris* (sendo que todas as amostras foram aleatorizadas nas reações de PCR e corridas eletroforéticas).

Uma implicação deste fenômeno foi a dificuldade em analisar os dados. Os programas computacionais e os modelos matemáticos desenvolvidos para a análise de locos microssatélites não comportam mais de dois alelos por loco por indivíduo. Desta forma, foi necessário tomar decisões quanto aos dados a serem utilizados em cada uma das diferentes análises. Em alguns casos, o viés causado por

estas decisões pode ser maior que em outros, e é sugerido um cuidado especial na interpretação dos resultados.

Todas as questões acima descritas são encontradas no corpo de texto do artigo apresentado no Cap.I. 2, “*Population genetic relationships between *Casearia sylvestris* Sw. (*Salicaceae*) varieties found in the Cerrado, Atlantic Forest and ecotones of south-east Brazil: hybridization and divergence of taxa influenced by habitat preference*”.

## **CAPÍTULO I**

### **DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Casearia sylvestris* Sw. (SALICACEAE) NO ESTADO DE SÃO PAULO**

- 1. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae), a neotropical medicinal tree**

## PERMANENT GENETIC RESOURCES

## Isolation and characterization of microsatellite markers for *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae), a neotropical medicinal tree

M. M. CAVALLARI,\*†‡C. BILLOT,†J. -M. BOUVET,‡B. FAVREAU,‡M. I. ZUCCHI,§D. A. PALMIERI¶ and M. A. GIMENES§

\*UNESP-Universidade Estadual Paulista 'Julio de Mesquita Filho', Departamento de Genética, Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu 18618-000, SP, Brazil, †CIRAD, Unité Mixte de Recherche 'Développement et Amélioration des plantes', TA A96-03, 34398 Montpellier cedex 5, France, ‡CIRAD, Unité Propre de Recherche de Génétique Forestière, Campus International de Baillarguet TA10/C, 34398 Montpellier cedex 5, France, §IAC – Instituto Agronômico de Campinas, Centro de Recursos Genéticos, Avenida. Barão de Itapura, 1481, Campinas 13020-902, SP, Brazil, ¶UCSal – Universidade Católica do Salvador, Laboratório de Estudos em Meio Ambiente, Avenida. Prof. Pinto de Aguiar, 2589, Salvador 41740-090, BA, Brazil, \*\*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Avenida W5 Norte, CP 02372, Brasília 70770-900, DF, Brazil

### Abstract

*Casearia sylvestris* Sw. is a widespread neotropical tree utilized in popular medicine. Recent research ranked *Casearia* as one of the most promising genus in the search of drugs against cancer. Despite its wide distribution and pharmacological importance, no microsatellite markers have yet been developed for this genus. In this study, we provide 10 polymorphic microsatellite loci specifically designed for *C. sylvestris*, used to analyse 90 individuals distributed in two populations from São Paulo state, Brazil. On average, 12.3 alleles per locus were identified, showing the ability of the markers to detect microsatellite polymorphism in this species.

**Keywords:** *Casearia sylvestris*, Flacourtiaceae, genetic diversity, microsatellites, molecular markers, Salicaceae

Received 29 September 2007; revision accepted 20 November 2007

The genus *Casearia* comprises about 180 species distributed in the tropics (Sleumer 1980). Traditionally considered belonging to the Flacourtiaceae (Cronquist 1981), the taxonomic position of *Casearia* has been recently suggested to fit among the Salicaceae (APG II 2003). *Casearia sylvestris* Sw. is a widespread neotropical tree, ranging from Mexico to Argentina (Sleumer 1980) and occurring abundantly in various habitats. Its fruits, small and copious, are an important resource for several bird species (R. Torres, personal communication).

Recent research ranked *Casearia* as one of the most promising genus in the search of drugs against cancer (Balunas *et al.* 2006). Antitumoral properties of *C. sylvestris* were found by Itokawa *et al.* (1990). Population genetic structure of *C. sylvestris* was studied by Silva *et al.* (2006)

through random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers.

Although *Casearia* is ecologically and pharmacologically important, no highly polymorphic and codominant markers, such as microsatellites, have yet been developed for this genus. To our knowledge, there are no specific microsatellite markers for any of the tropical genus of Salicaceae (*sensu* APG II 2003), the same applying to the Flacourtiaceae (*sensu* Cronquist 1981) genus.

In this study, we provide 10 highly polymorphic microsatellite (simple sequence repeat) loci specifically designed for *C. sylvestris* Sw. These markers may cross-amplify in other *Casearia* species, encouraging additional genetic diversity studies on this large genus.

Marker isolation involved construction of a genomic library enriched for (CT)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> repeats. The methodology was based on biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles, as

Correspondence: Marcelo Mattos Cavallari, Fax: +55 14 38153744; E-mail: mmcavall@ibb.unesp.br

Table 1 Characteristics of 10 microsatellite markers of *Casuarin sylvestris* Sw.

Locus name	GenBank	Motif repeat	Primers sequence	T <sub>a</sub>	Allele size	n <sub>a</sub>	N	n <sub>s</sub>		H <sub>O</sub>		H <sub>E</sub>		P-HW		Null alleles freq.	
								SV	CB	SV	CB	SV	CB	SV	CB	SV	CB
Coy04	EU179316	(CT) <sub>17</sub>	F: *CATRACTCTTTGCTTGCCCC R: TTGAACCTCGRCTTCGCTGCC	67.0	117-167	15	88	10	13	0.737	0.880	0.730	0.888	0.549ns	0.4095ns	0.0000	0.0043
Coy06	EU179317	(CT) <sub>17</sub>	F: *TACCGTCCCTAGGACATTCG R: GGRATGCGAGTGGATTTCTGA	65.0	280-322	20	82	18	19	0.628	0.659	0.909	0.849	0.0001†	0.0001†	0.1469	0.1028
Coy07	EU179318	(TC) <sub>19</sub>	F: *TCGTGACACATGCCAGCTC R: TGAAGCGAATTTCTGCTTTT	62.5	246-268	6	86	4	4	0.057	0.157	0.109	0.182	0.0172ns	0.1624ns	0.0474	0.0219
Coy08	EU179319	(TC) <sub>16</sub>	F: *GCCCTTAATTCCTTTGGCC R: AAAGAGGTGATGTGCTGCTC	65.0	145-167	11	66	9	7	0.206	0.156	0.738	0.467	0.0001†	0.0001†	0.3065	0.2120
Coy09	EU179320	(AG) <sub>12</sub>	F: *GTTTCATCTCTTTCRGA R: CGGCTAATTCCTATTGTTG	65.0	187-201	8	84	6	8	0.486	0.680	0.615	0.683	0.0348ns	0.4936ns	0.0800	0.0000
Coy11	EU179321	(AG) <sub>13</sub>	F: *TTGTAGCACACCTTTGGCCT R: GGTCACTGTTGAAGTTTCTGGA	65.0	140-180	19	89	15	13	0.897	0.820	0.876	0.813	0.5600ns	0.5679ns	0.0000	0.0000
Coy14	EU179322	(CA) <sub>10</sub>	F: *CTTTACATGGAAGGCGAAC R: TTTTCCCTCCTGCTTCTCAT	65.0	218-244	9	87	6	9	0.564	0.583	0.474	0.765	0.0568ns	0.0012*	0.0000	0.1034
Coy15	EU179323	(TC) <sub>11</sub>	F: *GATGGTCAATTCAGGAC R: TGTTCGCTCTAAATCGAA	65.0	251-285	16	82	12	11	0.473	0.545	0.718	0.746	0.0001†	0.0005*	0.1416	0.1151
Coy16	EU179324	(TG) <sub>10</sub>	F: *GCRCTGTGTTGGCTCAAAAT R: TGGCAGCGCTCGAGGATTT	65.0	272-284	5	90	4	4	0.461	0.196	0.440	0.243	0.6671ns	0.0978ns	0.0000	0.0382
Coy18	EU179325	(CT) <sub>11</sub>	F: *CCTAGTCCGTGGCAACATT R: GCAAGGAGCTTCAATCTGG	65.0	273-303	14	89	9	6	0.512	0.440	0.553	0.488	0.2130ns	0.1692ns	0.0258	0.0325

\*5' M13 tail: CACGACGTTGTAAAACGAC; F, forward sequence; R, reverse sequence; T<sub>a</sub>, optimized annealing temperature; allele size range expressed in base pairs not taking into account the 19 bp of the M13 tail; n<sub>a</sub>, number of observed alleles per locus; N, number of individuals successfully genotyped; H<sub>O</sub>, heterozygosity observed; H<sub>E</sub>, heterozygosity expected; SV, Santa Virginia population; CB, Carlos Botelho population; P-HW, P values for the HWE test, significance threshold adjusted using Bonferroni correction: P (5%) = 0.0025 corresponding to ns: P > 0.05; \*: 0.01 < P < 0.05; †: 0.001 < P < 0.01; null alleles frequencies estimated by the software MICRO-CHECKER 2.2.3 (Brekfield 1' method).

described by Billotte *et al.* (1999). For library construction, total genomic DNA was extracted from leaves of one individual (voucher LAC 48.646). The purified total DNA (6.5 µg) was digested with *RsaI* and enriched in (CT)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> repeats. Microsatellite-enriched DNA fragments were ligated into pGEM-T Easy vector (Promega) and used to transform DH5α competent cells. Positive colonies (blue/white β-galactosidase selection) were tested by polymerase chain reaction (PCR) to check for the presence of inserts. A total of 162 recombinant colonies were obtained and sequenced from the SP6 primer using the BigDye terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and a 3100 DNA Analyser (Applied Biosystems). Sequences obtained were analysed with the softwares PHRED, PHRAP, CONSED and CROSS\_MATCH (Laboratory of Phil Green, Genome Sciences Department, University of Washington, www.phrap.org/index.html). Fifty-two clones containing a simple sequence repeat motif were identified by the Microsatellite Identification Tool (available at <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>). Primers pairs were designed for 48 putative loci using the PRIMER 3 program ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)).

Ten microsatellite markers (Table 1) were tested using 90 samples collected from two natural populations (PESM-

Santa Virginia and SM-Carlos Botelho) from São Paulo State Atlantic Forest, Brazil. Fragments were amplified by PCR on a Mastercycler (Eppendorf) thermocycler in 15-µL reaction volume, according to the following conditions: 1× PCR buffer [16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 mM dNTP, 0.4 mg/mL BSA, 3 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.05% W-1 detergent solution Invitrogen, which is provided with the *Taq* DNA polymerase], 0.16 µM forward M13 (CACGACGTTGTAAAACGAC) 5'-tail-end primer and 0.2 µM of reverse primer, 0.30 µM IRDye fluorescent-labelled M13-primer (700 or 800 nm), 0.12 U/µL *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) and 5.0 ng of genomic template DNA. A 'touchdown' cycling programme was used: 95 °C for 5 min, then 7 cycles of 94 °C for 30 s, 67 °C decreasing to 55 °C at 2 °C per cycle for 1 min 30 s, 72 °C for 1 min followed by 24 cycles of 94 °C for 30 s, 53 °C for 1 min 30 s, 72 °C for 1 min and a final extension of 60 °C for 30 min.

Amplified fragments were analysed at 700 and 800 nm by electrophoresis on an IR2-DNA analyser (LI-COR 4200 sequencer) at the Montpellier Languedoc-Roussillon Genopole genotyping platform.

Allele scoring was performed with the SAGA software (LI-COR). Standard genetic diversity parameters were determined with FSTAT (Goudet 1995), which also performed

the tests of Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and of linkage disequilibrium between pairs of loci. The number of alleles per locus ranged from five (Csy16) to 20 (Csy06), and the mean number of alleles per locus was 12.3. The heterozygosity ranged from 0.109 (Csy07) to 0.909 (Csy06) in the Santa Virginia population, and from 0.182 (Csy07) to 0.888 (Csy04) in the Carlos Botelho population (Table 1). No significant linkage disequilibrium was observed for any pair of loci after Bonferroni correction. Three loci (Csy06, Csy08 and Csy15) in Santa Virginia population and four loci (Csy06, Csy08, Csy14 and Csy15) in Carlos Botelho population showed a significant deviation from HWE after Bonferroni correction (Table 1). The observed departures from HWE can be interpreted as the result of a Wahlund effect (substructuring of a population) and/or of the presence of null alleles. Presence of null alleles was verified with MICRO-CHECKER 2.2.3 (van Oosterhout *et al.* 2004). Null alleles were suggested to occur over most of loci, however, only the locus Csy08 presented systematic excess of homozygotes in seven other natural populations (data not shown).

The microsatellite markers presented here were also tested using eight individuals of *Casearia decandra* Jacq., one individual of *Casearia gossypiosperma* Briq. and one individual of *Casaria obliqua* Spreng. Amplification products were obtained only with Csy18 (for all three species). All other markers failed to generate amplification products in any of the three species. Additional tests should be performed with a larger number of samples to confirm these results.

The microsatellites selected in this study constitute an efficient tool to investigate genetic diversity and structure of *C. sylvestris* populations. They will be used to assess the genetic population structure of this species and to implement a strategy for its conservation and management.

### Acknowledgements

We thank Dr Roseli B. Torres (IAC herbarium, Campinas, Brazil), for the identification of individuals sampled, Ronan Rivallan (Montpellier Languedoc-Roussillon Genopole – UMR DAP of CIRAD) for technical assistance, and the CAPES and FAPESP foundations, Brazil, for partial funding for the research.

### References

- APG II. (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **141**, 399–436.
- Balunas MJ, Jones WP, Chin YW *et al.* (2006) Relationships between inhibitory activity against a cancer cell line panel, profiles of plants collected, and compound classes isolated in an anticancer drug discovery project. *Chemistry and Biodiversity*, **3**, 897–915.
- Billotte N, Lagoda PJJ, Risterucci A-M, Baurens F-C (1999) Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, **54**, 277–288.
- Cronquist A (1981) *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press, New York.
- Goudet J (1995) FSTAT, version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485–486.
- Itokawa H, Totsuka N, Morita H *et al.* (1990) New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). *Chemical and Pharmacological Bulletin*, **38**, 3384–3388.
- van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.
- Silva MAS, Ming LC, Pereira AMS *et al.* (2006) Phytochemical and genetic variability of *Casearia sylvestris* Sw. from São Paulo State Atlantic Forest and Cerrado populations. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, **8**, 159–166.
- Sleumer HO (1980) *Flora Neotropica Monograph n.22 (FLACOURTIACEAE)*. The New York Botanical Garden, New York.

## **CAPÍTULO I**

### **DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Casearia sylvestris* Sw. (SALICACEAE) NO ESTADO DE SÃO PAULO**

**2. Population genetic relationships between *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) varieties found in the Cerrado, Atlantic Forest and ecotones of south-east Brazil: hybridization and divergence of taxa influenced by habitat preference**

**Population genetic relationships between *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) varieties found in the Cerrado, Atlantic Forest and ecotones of south-east Brazil: hybridization and divergence of *taxa* influenced by habitat preference**

Cavallari, MM <sup>(1, 2, 3)</sup>, Gimenes, MA <sup>(1, 6)</sup>, Billot, C <sup>(3)</sup>, Torres, RB <sup>(4)</sup>, Cavalheiro, AJ <sup>(5)</sup>, Bouvet, JM <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>UNESP -Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Departamento de Genética, Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, 18618-000, SP, Brazil

<sup>(2)</sup>CIRAD, Unité Propre de Recherche de Génétique Forestière, Campus International de Baillarguet TA10/C, 34398 Montpellier cedex 5, France

<sup>(3)</sup>CIRAD, Mixed Unit of Research “Plant Development and Adaptation”, CIRAD/AGROPOLIS, TA A-96/03, Avenue d'Agropolis, F-34398 Montpellier Cedex 5, France

<sup>(4)</sup>Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Jardim Botânico, Instituto Agrônomo – IAC, Av. Barão de Itapura, 1481, Campinas, SP, Brasil

<sup>(5)</sup>UNESP - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Chemistry Institute. Rua Prof. Francisco Degni s/n, 14800-900, Araraquara, SP, Brazil

<sup>(6)</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Av. W5 Norte, CP 02372, Brasília, 70770-900, DF, Brazil

**Corresponding author:**

Marcelo Mattos Cavallari

UNESP, Departamento de Genética, Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, 18618-000, SP, Brazil mmcavall@ibb.unesp.br

Phone: +55 14 38116229

Fax: +55 14 38153744

**Keywords:**

*Casearia sylvestris*, microsatellites markers, hybrid zones, ecotones, population genetic structure, guaçatonga.

**Running title:** *Population structure of C. sylvestris complex*

## Abstract

This work aimed to analyse the genetic relationships between the two varieties of *C. sylvestris* Sw. (Salicaceae/Flacourtiaceae), *C. sylvestris* var. *sylvestris* and *C. sylvestris* var. *lingua*, in different ecosystems of south-east Brazil. Nine populations distributed in the Cerrado (savanna), Atlantic Forest *sensu stricto*, Semideciduous Atlantic Forest and ecotonal zones were sampled. All 376 individuals sampled were classified at the infraspecific level based on key morphological traits. The two varieties showed to meet only in ecotonal zones and in one of the Cerrado populations (contact zones). We utilized nine specific microsatellite markers and analysed the data through classical (frequentist) and Bayesian approaches to evidence the evolutionary forces promoting the divergence between the two *taxa*. According to unexpected band patterns obtained, partial genome duplication is suggested to occur in ~8% of var. *sylvestris* and ~70% of var. *lingua* individuals sampled. Analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that there is considerable differentiation among ecosystems and between varieties. Bayesian clusterization arranged individuals according to their variety or ecosystem rather than to sampling site, suggesting high differentiation between the *taxa* and among the populations inhabiting different habitats. Gene flow showed to be reduced among ecosystems, which may contribute to varieties divergence. The Bayesian analysis of individual's

genome proportion originated from each variety corroborated the hypothesis of hybridization in the contact zones, suggested by morphological intermediacy of individuals. Strong ecological differentiation coupled with limited gene flow and flowering asynchrony are proposed to maintain the *taxa* separated face to hybridization in contact zones.

## Introduction

Habitat heterogeneity combined with natural selection frequently results in multiple genetically distinct ecotypes within a single species (Hufford & Mazer 2003), often considered as “varieties” or “subspecies” (Morgan-Richards & Wolf 1999). These different *taxa*, ecologically and genetically differentiated, can meet and exchange genetic information in ecotones, establishing hybrid zones (Arnold 1997). Ecotones (transition zones between different habitats) are considered “natural laboratories” where evolutionary forces and barriers to gene exchange can be studied (Schilthuizen 2000). For this reason, the landscape of south-east Brazil, which is a mosaic of Atlantic Forest, Cerrado (savanna) and ecotonal patches, offers an interesting framework to the study of plant speciation.

The study of population genetic structure of tree species from Cerrado or Atlantic Forest has increased in the last years (e.g. Collevatti et al. 2001, Lacerda et al. 2001, Kageyama et al. 2003, Zucchi et al. 2003), in part due to the recognition of these biomes as world'

“hotspots” (Myers et al. 2000). Nevertheless, most of these works are restricted to one single *taxa* occurring in one or other biome, and the meeting of two related *taxa* in ecotonal zones was rarely accessed. In one of the few works published addressing this issue, Lacerda et al. (2002) studied two species of *Plathymenia* (Fabaceae) meeting in transition zones between Cerrado and Atlantic Forest. However, although gene flow between the species was suggested, population genetic relationships and evolutionary processes occurring in the putative hybrid zone were not the main questions addressed in that study, which aimed to differentiate the two *taxa* based on RAPD markers.

In the present work we evidenced the genetic relationships among populations of *Casearia sylvestris* Sw. var. *sylvestris* (Salicaceae – APG II 2003/ Flacourtiaceae – Cronquist 1981) and *C. sylvestris* var. *lingua* occurring in different biomes (Atlantic Forest and Cerrado) and in ecotonal zones, where putative hybrids between the varieties occur. *C. sylvestris* (guaçatonga) is a very widespread tree in Central and South America, ranging from Mexico to Argentina and Uruguay (Sleumer 1980) and occurring in several habitats within this range, presenting great morphological variation. While *C. sylvestris* var. *sylvestris* inhabit humid, dense forests and can also be found in open areas, *C. sylvestris* var. *lingua* seems to be restricted to the Cerrado biome (Sleumer 1980), presenting characteristics related to drought and fire stress, as smaller, coriaceous

leaves and shrubby habit (Silva 1996). These varieties had already been considered as separated species (Saint-Hilaire 1829, Sleumer 1980). However, individuals with intermediate morphology are frequently observed, and the delimitation of these two *taxa* is very tenuous (Sleumer 1980, Torres & Yamamoto 1986, Silva et al. 2006). In a recent revision of the Flacourtiaceae of São Paulo State, Torres & Ramos (2007) did not recognize infraspecific levels in *C. sylvestris*. Although not currently threatened by extinction, the species have been experiencing strong exploitation of its natural populations to supply pharmaceutical industry, as it provides promising drugs against cancer (Itokawa 1990), as well as extracts with antiulcer and anti-inflammatory (Esteves et al. 2005), antileishmanial and trypanocidal (Mesquita et al. 2005) activities, among others. Knowledge on population genetic structure of *C. sylvestris* can provide useful information for its conservation and reasonable exploitation. Also, of the growing pharmacological literature about *C. sylvestris*, few articles states which variety had been used in the experiments, reflecting the little concern of the existence of two different *taxa* by the pharmacological scientific community. This work aimed to verify the genetic relationships between *C. sylvestris* var. *sylvestris* and *C. sylvestris* var. *lingua* in Cerrado, Atlantic Forest and ecotones in São Paulo State, south-east Brazil. We hypothesized that the two varieties of *C. sylvestris* represent divergent lineages

prompted by habitat differentiation. Utilizing microsatellite markers, we intended to evidence the evolutionary forces promoting the divergence of the two *taxa*, assessing the genetic differentiation of populations and comparing patterns of gene flow and genetic diversity within and between varieties and/or ecosystems.

## Material and Methods

### Sampling

Two main biomes (highly fragmented) occur in São Paulo State, Brazil, both harbouring *C. sylvestris*: the Atlantic Forest *sensu lato* and the Cerrado (Fig. 1). The Atlantic Forest biome can be divided in two main ecosystems: the Atlantic Forest *sensu stricto*, a dense, humid, evergreen broadleaf forest which occurs in the mountains along the coast, and the Semideciduous Atlantic Forest, which takes place in more continental areas of São Paulo state and presents a well-characterized dry season. To avoid miscomprehension, we will refer hereafter to these ecosystems respectively as “Evergreen Forest” and “Semideciduous Forest”. The Cerrado biome is characterized by shrub savannas under fire regime occurring on acid, aluminium-rich soils, with a very dry season (Ratter et al. 1997). Contact zones (ecotones) between the two biomes are found throughout the landscape.

We sampled in nine populations of São Paulo State (Fig. 1, Table 1), representing four different ecosystems (Evergreen Forest, Semideciduous Forest, Cerrado and ecotones).

The Cerrado of Assis comprises two different vegetation formations, the Cerrado *sensu stricto* (an open formation with low trees density) and the Cerradão (a dense arrangement of Cerrado trees). Even presenting two different vegetation formations, this site is not considered to be an ecotone, because the differences are not comparable to those found between biomes.

Average distance among populations is 320 km, varying from 25 km (Ilha Anchieta - Santa Virginia) to 745 km (Ilha Anchieta - Morro do Diabo). In each population, approximately 40 individuals were sampled (Table 1). Leaf samples were dried in sealed plastic bags containing silica gel and stored at -20°C prior to DNA extraction.

### Classifying individuals at variety level

For each individual sampled, a voucher was deposited in the IAC (Instituto Agronômico de Campinas) Herbarium, Campinas, Brazil. Morphological traits were used to assign the individuals to one or other variety according to Sleumer (1980): var. *lingua* presents more coriaceous, oval leaves, with prominent reticulation and slender petiole. We also considered cymbiform leaves to be characteristic to var. *lingua*, based on the field and taxonomic experience of R.B. Torres (IAC Herbarium) on the genus *Casearia*. Individuals were classified as “*lingua*”, “*sylvestris*” and “dubious”.

### *DNA isolation*

DNA was isolated from leaf samples according to the acid protocol presented by Csaikl et al. (1998). We included 2% (w/v) sodium bisulphite in the extraction buffer to avoid oxidation of var. *sylvestris* samples.

### *Markers utilized, PCR and electrophoresis conditions and allele scoring*

We tested the 10 microsatellite markers specifically designed for *C. sylvestris* (Cavallari et al. 2008). The locus Csy08 was suggested to present null alleles by the MICRO-CHECKER software (Van Oosterhout et al. 2004) and was discarded from the subsequent analysis. The remaining nine loci showed to be polymorphic and were utilized in this study. PCR conditions followed Cavallari et al., 2008. The amplified fragments were analysed at 700 and 800 nm by electrophoresis on an IR-DNA analyser (LI-COR 4200 sequencer) at the Montpellier Languedoc-Roussillon Genopole genotyping platform. Allele scoring was performed with the SAGA Generation 2 v.3.2 (LI-COR) software. We searched for individuals with identical multilocus genotypes within each population and utilized the program MLGsim (Stenberg et al. 2003) to calculate their probability of being a clone. The program calculates significance values for the likelihood that a multilocus genotype observed more than once in a population is the result of sexual reproduction. Clones were excluded of further analysis.

### *Statistical analysis*

Standard genetic diversity parameters were determined for populations and ecosystems, as well as tests of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) within populations using FSTAT 2.9.3.2 software (Goudet 1995). To allow comparison among populations/ecosystems, the number of alleles per locus per population/ecosystem was calculated adopting the rarefaction method following El Mousadik & Petit (1996) with FSTAT. A paired *t*-test was realized to compare the mean values of diversity parameters estimated among populations/ecosystems with the software XLSTAT-PRO v. 7.5 (Addinsoft), and significance levels were verified after Bonferroni correction.

Recent bottleneck events or founder effects due to recent colonization were tested by the *Wilcoxon* sign-rank test through the software BOTTLENECK (Piry et al. 1999). This test is based on the fact that populations which have experienced a recent reduction on effective size should exhibit higher gene diversity than the equilibrium heterozygosity estimated from the observed allele numbers assuming mutation drift equilibrium (Luikart & Cornuet 1998). As recommended for microsatellites by Piry et al. (1999), a two-phased mutation model (TPM) with 95% of single-step mutations and 5% of multiple-steps mutation was used.

To estimate standard genetic diversity parameters and perform the analysis of recent

bottleneck, individuals with more than two alleles in some locus (partial genome duplication, see RESULTS and DISCUSSION sections) were excluded of the data set. In the cases where this would drastically reduce the sample size (Botucatu, Assis, Mogi-Guaçu and Porto Ferreira), no more than two randomly chosen alleles per individual were considered. We made several random exclusions of alleles and verified that  $H_o$ ,  $H_e$  and  $F_{is}$  did not change significantly (data not shown). Nevertheless, results must be observed with caution.

To perform population genetic structure analyses described below, all detected alleles were considered, but the data were transformed in presence/absence and analyzed as dominant markers. This procedure was utilized in the genetic analysis of polyploidy plant species (Becher et al. 2000, Creste et al. 2003, Saltonstall 2003) and was adopted to make possible the incorporation of the individuals with partial genome duplication in the population genetic structure analyses.

Population genetic structure was inferred by Analysis of Molecular Variance (AMOVA) with ARLEQUIN v.2.0 software (Schneider et al. 2000). Molecular genetic diversity was hierarchized in: 1. ecosystems /populations/ individuals and 2. varieties / individuals (in this latter case, individuals were arranged to create two populations representing the varieties). ARLEQUIN was also used to estimate  $\Phi_{st}$ , an  $F_{st}$  analogue (Excoffier et al. 1992), among all populations, between pairs

of populations, among ecosystems, between pairs of ecosystems and between varieties.  $\Phi_{st}$  values obtained among pairs of populations were utilized to replace  $F_{st}$  in the estimation of isolation-by-distance effects. We followed Rousset (1997), comparing  $F_{st} / (1 - F_{st})$  against  $\log_{10}$  distance geographic, for all pairs of populations. Since population pairs are not independent, a Mantel test (Mantel 1967) was used to evaluate significance.

The Bayesian approach of Pritchard et al. (2000), implemented in the software STRUCTURE 2.2 was utilized to verify population/ecosystem/variety ancestry of individuals. For this analysis, the number of clusters was defined from  $K=1$  to  $K=10$ , and five runs of each  $K$  were conducted with the admixture model and correlated alleles frequencies, 200,000 burn-in period and 500,000 MCMC. The *ad hoc* statistic related to the rate of change in the log probability of data according to the number of  $K$  proposed by Evanno et al. (2005),  $\Delta K$ , was used as a predictor of the real number of clusters.

The admixture model estimates the proportion of each individual's genome that is originated from each of the  $K$  inferred (Pritchard et al. 2000). Thus, at  $K=2$ , once the clusters formed highly agreed with the morphological classification of the individuals (see Results), admixture proportions ( $Q$ ) of each individual were used to reveal hybrids (where  $0.05 < Q < 0.95$ ) and to give an idea of the extent of hybridization occurring in each population.

Graphical display of STRUCTURE results was made by the software DISTRUCT (Rosenberg 2004).

The amount of historical connectivity among the ecosystems was measured by estimating the migration rates per generation among them using MIGRATE v. 2.0.3 (Beerli & Felsenstein 1999, 2001). The software uses a maximum likelihood framework based on the coalescence theory and investigates possible genealogies with migration events using a Markov chain Monte Carlo approach (Beerli & Felsenstein 2001). We used the Brownian motion approximation to the ladder model (Ohta & Kimura 1973) with the default options, and assumed equal mutation rates among loci. To incorporate the genetic information of the individuals with partial genome duplication to the analysis, we followed a suggestion by P. Beerli, personal communication: those individuals were represented in the infile by two multilocus genotypes differing only in the duplicated loci. Thus, if four alleles were detected, two pairs were randomly formed, each of them composing one of the multilocus genotypes. If three alleles were detected, one of the multilocus genotypes for this individual received a “missing data”. The program assumes that alleles behave like individuals; therefore, in a data set of two diploid individuals plus one individual presenting three alleles for the same locus, this would give a sample size of  $(2 \times 2) + (1 \times 3)$  chromosomes. This approach is believed to provide more accurate results than if

exceeding alleles were randomly excluded (which was also performed for comparison and gave similar results, which will not be shown).

## RESULTS

### *Detection of clones*

Two identical multilocus genotypes were found in Caetetus and Mogi-Guaçu populations, and they were considered by the MLGsim analysis to be clones. In Botucatu, six groups of identical multilocus genotypes were detected, totalizing 19 individuals, and 13 of them were considered to be clones and excluded of the data set (the number of individuals sampled presented in Tables 1 and 2 refer only to non-clonal individuals). Clones detected were on average 4 m apart in the field.

### *Classification of individuals at variety level and its distribution among the ecosystems*

For the majority of individuals sampled, classification at variety level was not problematic (Table 2). Key morphological features were in general evident, leading to immediate recognition of the variety. As a general rule, all individuals sampled in the Cerrado were easily recognized as var. *lingua*, and all individuals sampled in the Atlantic Forest (both Evergreen and Semideciduous) are undoubtedly of var. *sylvestris*. The ecotones showed to harbour the two varieties, with a predominance of var. *sylvestris*. Of the 92 individuals sampled in this ecosystem, 34 presented dubious morphology and could not

be assigned to one or other variety. The population of Assis (Cerrado) also presented the two varieties, being var. *sylvestris* restricts to Cerradão areas and var. *lingua* restricts to Cerrado *sensu stricto* areas.

#### *Detection of partial genome duplication in C. sylvestris*

While scoring alleles to individuals, we found several individuals with more than two alleles at the same locus, which was not expected for microsatellite markers in diploid species. A new set of PCR reactions was made with 90 randomly chosen individuals, and the same results were obtained, proving that it was not a PCR artefact. The phenomenon was observed in 83 (22%) of the 376 individuals, and in 64 of them, was restricted to only one locus. The highest percentage of PCR products with more than two alleles occurred in the locus Csy04 (12%). Over all loci, it was observed in only 3.4% of the PCR products. There are much more cases of PCR products with three alleles (106) than with four alleles (only 4). While 67.9% of var. *lingua* individuals presented more than two alleles per locus, this was observed in only 7.7 % of var. *sylvestris* individuals and in 27% of the morphologically dubious individuals.

#### *Patterns of diversity at each locus*

Table 3 shows the main diversity parameters observed for each locus per ecosystem in order to summarize the information. It can be observed that ecotones presented, in a general

manner, higher allele richness, higher variation in allele size and higher  $F_{is}$ . Diversity parameters estimated for each ecosystem did not differ significantly (*t*-test, data not shown), and mean allele number after correction for the sample size for 63 individuals by the rarefaction method was 11.3 (Table 4).

#### *Intra population diversity parameters and Hard-Weinberg Equilibrium*

Allele numbers per locus ranged from 8 (Csy16) to 24 (Csy06 and Csy11), and mean allele number per locus was 17 (data not shown). Mean number of alleles per locus per population was 9.0, ranging from 3.1 (Botucatu) to 12.3 (Porto Ferreira) (Table 4) and showing to be significantly different according to the *t*-test (data not shown). After correction for the sample size for 20 individuals, the mean number of alleles per population ranged from 2.8 in Botucatu to 9.8 in Porto Ferreira (mean of 8.5, Table 4), and values were significantly different only between Botucatu and Porto Ferreira and Botucatu and Caetetus (*t*-test, data not shown). Mean expected ( $H_e$ ) and observed heterozygosity ( $H_o$ ) ranged from 0.383 to 0.763 and from 0.468 to 0.640, respectively.  $H_e$  was significantly different only between Botucatu and Porto Ferreira (*t*-test, data not shown). Values of the fixation index ( $F_{is}$ ) evidence departure from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE), and this was found to be statistically significant at 1% level after Bonferroni correction over loci (Table 4).

Population of Botucatu presented negative value of  $F_{is}$ , indicating heterozygous excess.

#### *Test of recent Bottleneck*

*Wilcoxon* sign-rank test for recent population bottlenecks was not significant for any of the populations. However, the difference between heterozygosity at mutation drift equilibrium and gene diversity was smaller in Botucatu than in the other populations (data not shown).

#### *Population genetic structure*

The hierarchic Analysis of Molecular Variance (AMOVA, not shown) evidenced that 75.73%, 12.81% and 11.46% of the total molecular genetic diversity are attributable to differences among individuals within populations, among populations within ecosystems and among ecosystems, respectively. The AMOVA made with artificial populations representing the varieties showed that differences between these *taxa* correspond to 25.38% of the total genetic diversity sampled ( $\Phi_{st} = 0.25$ , not shown).

Minor non-hierarchic AMOVAs (not shown) evidenced significant ( $P < 0.001$ ) differentiation among populations and ecosystems ( $\Phi_{st} = 0.23, \Phi_{st} = 0.18$ , respectively). Given the particular characteristics of Botucatu sampling site (small size and recent colonization, see DISCUSSION section), we also calculated the differentiation among populations without this population, and  $\Phi_{st}$  decreased

from 0.23 to 0.17. Mean pairwise  $\Phi_{st}$  between populations (not shown) was 0.23, ranging from 0.04 (between Caetetus and Porto Ferreira) to 0.56 (between Botucatu and Santa Virginia). No significant relationship was found between pairwise genetic and geographical distance for all populations (Mantel test  $r = -0.064, P = 0.524$ ). When Botucatu was excluded of the data set, the value for the  $r$  coefficient became positive, but was not significant (Mantel test  $r = 0.225, P = 0.139$ ). When pairs of ecosystems were compared, highest differentiation was observed between the Cerrado and other ecosystems ( $\Phi_{st} > 0.20$ ), while Semideciduous Forest and Ecotones presented the lowest value of  $\Phi_{st}$  (0.05).

The rates of migration per generation obtained with MIGRATE are summarised in Table 5. The smallest numbers of immigrants were observed from and to the Cerrado. Mean number of immigrants per generation among ecosystems was 1.87.

Bayesian analysis made by STRUCTURE with increasing  $K$  from 1 to 10 provided support for two and three ancestral populations. The predictor of real number of  $K$  ( $\Delta K$ , proposed by Evanno et al. 2005) indicates that there is poor statistical support for  $K > 3$  (Fig. 2).

Bayesian admixture analysis at  $K = 2$  (Fig. 3) indicated that the majority (86%) of the individuals are pure (coefficients for each individual  $Q > 0.950$  or  $Q < 0.050$ ). When comparing the pure individuals of each cluster to our morphological classification, a

great similarity was found (80%), meaning that the Bayesian analysis clustered the individuals according to the variety. This allows us to consider individuals with  $Q$  values between 0.05 and 0.95 as hybrids between the two varieties. While those hybrids accounted for only 7.5% of the total number of individuals of the populations of Atlantic Forest, Semideciduous Forest and Cerrado (only Botucatu), they accounted for 23% of the ecotones (Mogi-Guaçu and Porto Ferreira), and for 28% of the population of Assis (Cerrado), which harbours the two varieties but is not an ecotone. If these three mixed populations are considered separately, little agreement (60%, instead of 80%) between the bayesian admixture analysis and the morphological classification of the individuals is observed. In Assis, 86% of the disagreements are due to individuals morphologically considered as var. *lingua* that were considered to be hybrids by the bayesian analysis. In Mogi-Guaçu and Porto Ferreira, 47% and 67% of the disagreements (respectively) are due to phenotypically dubious individual which were revealed to be pure var. *sylvestris* specimens.

At  $K=3$ , clustering highly accorded to the ecosystems sampled (Fig. 3). At  $K=4$ , the population of Carlos Botelho became separated from the other populations of the Evergreen Forest (not shown), and this follows up to reach, at  $K=9$ , the nine populations sampled (not shown).

## DISCUSSION

### *Detection of clones*

There are two non-exclusive explanations to the presence of clones in the populations. First, the dense arrangement of individuals with shrub-like habit in Botucatu leads to sampling errors. Second, the presence of clones due to sprouting of root buds was suggested by Rodrigues et al. (2004) to be a common feature in tree species of Semideciduous Forest (as Caetetus and Mogi-Guaçu) or under fire regime (as Botucatu). Presence of clones is increased in dry xeric environment as an adaptive strategy for improving survival (Lhuiller et al. 2006)

### *Partial Genome Duplication in C. sylvestris*

Microsatellite markers allowed us to detect the occurrence of partial genome duplication in *C. sylvestris*. We can not distinguish between small-scale duplication (segmental duplication) and aneuploidy (one or more chromosomes entirely duplicated) with the tools utilized in this work. The genus *Casearia* has been recently suggested to fit among the Salicaceae (APG II 2003), for which aneuploids has been reported in the genus *Populus* (Bradshaw Jr. & Stettler 1993, Cervera et al. 2001, Yin et al. 2004). Aneuploidy in *C. sylvestris* must be cytologically verified.

Partial genome duplication in *C. sylvestris* may represent an important difference between the two varieties, as it was verified in no more than 8% of var. *sylvestris* individuals while revealed in about 68% of

var. *lingua* individuals. It is important to have in mind that identical copies of the duplicated genes do not appear in the electrophoresis gel, implying that the real number of partially duplicated-genome individuals in var. *lingua* can reach 100%. Segmental duplication generate paralogous gene pairs which may be subject to changes in DNA sequence or gene expression, leading to sub- or neo-functionalization (Cui et al. 2006). The establishment of duplicate-gene cytotypes can result in operational heterozygosity and increased genetic variation, and this can be used to exploit unstable habitats (Lawton-Rauh 2003). Thus, it is possible that var. *lingua* take advantage of this condition to challenge the xeric habitats in which it dwells. Table 3 shows higher percentage of partially genome-duplicated individuals in the Cerrado, followed by the ecotones, which is explained by the higher percentage of var. *lingua* present in these ecosystems.

#### *Patterns of genetic diversity at population and ecosystem level*

Although fragmentation and population size reduction are expected to decrease gene diversity (Young et al. 1996), apart from Botucatu (which presents a reduced size area and its an ancient cattle pasture recently colonized by *C. sylvestris*), gene diversity observed was not positively correlated to fragment size or conservation status: Porto Ferreira and Assis, relatively small and disturbed populations, presented the higher values of  $H_e$  detected (0.763 and 0.720,

respectively). This may be explained by the presence of the two varieties in these populations (and also in Mogi-Guaçu, whose  $H_e = 0.641$ ). In these “mixed” populations, even considering only the individuals of the major variety found (var. *sylvestris* in Porto Ferreira, var. *lingua* in Assis),  $H_e$  was still higher than in the other populations (0.722 and 0.684, respectively), which may be explained by allelic introgression from minor to major *taxa* in these populations.

All populations present significant departures from HWE after Bonferroni correction. This can be caused by mating system (Loveless & Hamrick 1984), null alleles (van Oosterhout et al. 2004), statistical sampling (Weir 1996) or intrapopulation substructure (Hartl & Clark 1997). Although *C. sylvestris* is most likely outcrossing (see below), we do not have any information of preferential crossings among related individuals, and even self-crossing may occur. Null alleles are thought to have been eliminated after the MICRO-CHECKER analysis, but it is possible that some hard-to-detect null alleles remained. Statistical sampling is a possibility due to relatively low number of individuals sampled related to the high number of different genotypes at microsatellite loci existing in a population. Finally, a Wahlund effect (Hartl & Clark 1997) may be responsible for part of the departures from HWE observed, since preliminary Bayesian analyses within each population (data not shown) evidenced some substructure in Assis, Mogi-Guaçu, Porto Ferreira and Botucatu

populations. It should be noted that the Botucatu population presents negative value of  $F_{is}$ . This can be explained by the fact that over 50% of the individuals of this population presented partial genome duplication: to obtain homozygote genotypes of these individuals, it would be necessary that all (three or four) gene copies were identical, which is more difficult to occur than when there are only two copies.

Genetic diversity parameters estimated per locus for each ecosystem evidenced higher variance in allele size and higher allele richness (for several loci) in the ecotones. Also, this ecosystem presented the highest number of loci deviating from HWE for several loci, with the higher values of  $F_{is}$ . All these parameters are consistent with more frequent departures from random mating occurring where two varieties occur (Lexer et al 2005). Hybridization in these sites may have resulted in increased levels of genetic variability compared to pure var. *lingua* or var. *sylvestris* populations.

#### *Population genetic structure*

Silva et al. (2006) used RAPD markers to study populations of *C. sylvestris* in the Cerrado and Atlantic Forest (but not in ecotones). They observed that 84% of total genetic diversity was found among individuals within populations, a result similar to the obtained here. This pattern of molecular diversity distribution is commonly found in preferably outcrossing species (Loveless & Hamrick 1984). *C. sylvestris*

presents hermaphrodite flowers similar to those of *Casearia grandiflora*, a related species showing auto-incompatibility systems (Machado & Oliveira 2000). Thus, although *C. sylvestris* mating system has never been directly studied, we suggest that it is preferably outcrossing. Other probably outcrossing tree species studied (with different markers) in Brazilian Cerrado and Atlantic Forest showed similar patterns of population structure [e.g. *Esenbeckia leiocarpa*, *Cariniana legalis*, *Cecropia pachystachya*, *Maytenus aquifolia* (Kageyama et al. 2003), *Eugenia dysenterica* (Zucchi et al. 2003)]. Significant ( $P < 0.001$ ) differentiation among *C. sylvestris* populations was here evidenced by the  $\Phi_{st}$  value obtained ( $\Phi_{st} = 0.17$  among all populations excluding Botucatu). According to Balloux & Lugon-Moulin (2002), and references therein, a value of  $F_{st}$  between 0.15 and 0.25 indicates large differentiation among populations.

No correlation between genetic and geographic distances was found when all populations were considered, and this may be related to landscape fragmentation, which increases genetic divergence among populations due to genetic drift and reduction of gene flow (Young et al. 1996). Soares et al. (2008) studied populations of *Dipterix alata* in a fragmented landscape of Cerrado and observed that genetic discontinuities found coincided with regions of more intense human occupation. Impact of Atlantic Forest/Cerrado fragmentation on gene flow is

suggested for several other tree species (e.g. Collevatti et al. 2001, Ribeiro et al. 2005).

Among-ecosystem relationships were evidenced by analysing gene flow between pairs of ecosystems by the analysis made by MIGRATE, which evidences long-term gene flow (Pearse & Crandall 2004). Results revealed higher connectedness between the Semideciduous and Evergreen Forest, ecosystems that harbours exclusively the var. *sylvestris*. The smallest numbers of immigrants were observed from and to the Cerrado, which, contrary to the other ecosystems, harbours almost exclusively var. *lingua*. Levels of gene flow detected were, in a general manner, relatively low (smaller than 2.0, on average). Although one migrant per generation is considered sufficient to prevent differentiation caused by genetic drift, Wang (2004) demonstrated that in the stepping-stone migration model, higher levels of gene flow would be necessary.

Clusterization made by STRUCTURE at  $K=3$  (Fig. 3) arranged the individuals in a manner that highly corresponds to the ecosystems sampled, and individuals sampled in the ecotones appears as inheriting their genome from Cerrado or/and Semideciduous Forest, as expected. The agreement of the clusters with the ecosystems sampled indicates a non-random distribution of the alleles among the ecosystems. It may be stressed here that  $\Delta K$  (Fig. 2) indicates poor statistical support for  $K>3$ , i.e., subdivision of the specie's genetic diversity in different ecosystems is very strong, and each ecosystem, rather than the

sampling sites, behaves as a discrete unit. This is also valid for the varieties, as it will be discussed below.

#### *Relationships between varieties*

Apart from the different levels of partial genome duplication observed between varieties, other results suggest divergence between these *taxa*. Of the 155 alleles detected, only 63.23% are shared by the two varieties, the rest being private to one or other variety. The AMOVA detected that approximately 25% of the total genetic diversity sampled is attributable to genetic differences between varieties ( $\Phi_{st} = 0.25$ ). This result is comparable to the observed between *Croton alabamensis* varieties separated by more than 1000 km (Van Ee et al. 2006) and between two species of *Iliamna* (Malvaceae) (Slotta & Porter 2006). Although there is no absolute measure of genetic differentiation for determining species separation (Morgan-Richards & Wolff 1999), this result indicates strong differentiation between the two *taxa*.

The most striking result about the divergence between the two *C. sylvestris* varieties is provided by the Bayesian analysis of population ancestry for each individual. The clusters obtained at  $K=2$  highly agree with our morphological classification at the variety level. Thus, regardless of being morphologically recognizable, the two varieties present also significant differences at neutral (microsatellite) loci, behaving as independent evolutionary units.

Our field work indicated that the two varieties meet only in ecotonal regions between Semideciduous Forest and Cerrado, or where two different vegetation formations come in contact (e.g. the Cerradão and Cerrado *sensu stricto* in Assis). As expected, the populations harbouring the two varieties contains a higher number of hybrids (approximately 25% of the individuals sampled) which displays a wide range of admixture proportions (revealed by  $Q$  values), suggesting the co-existence of many hybrid generations and backcrosses. According to these observations, these regions may be considered as hybrid zones, a pattern extensively reported in the literature at the species level (e.g. Fritsche & Kaltz 2000, Lexer et al. 2005, Valbuena-Carabaña et al. 2005, Remington & Robichaux 2007).

The study of plant species hybrid zones in the Cerrado/Atlantic Forest geographic region is incipient. A putative hybrid zone was studied by Lacerda et al. (2002) and Goulart et al. (2005), in ecotonal regions where species of *Plathymenia reticulata* (from Cerrado) and *P. foliolosa* (from Atlantic Forest) meet. Authors evoked the “refuge theory” to explain the origin of the two species: changes in vegetation cover and distribution of plant species during the climatic changes of the Pleistocene would have restricted some populations to dry areas, which may have evolved into *P. reticulata*, whereas populations of warmer and humid refuges evolved into *P. foliolosa*. This may be applicable to *Casearia sylvestris* populations

in the same geographic region, leading to the differentiation between populations from humid refuges (which may have evolved into var. *syvestris*) and xeric areas (which may have evolved into var. *lingua*).

Habitat specificity of hybrids between the two varieties of *C. sylvestris* would be one reasonable explanation for the co-existence of these two forms face to gene flow and hybridization. Indeed, the ecotones studied seem to be intermediate habitats, and ecological selection may play an important role as parental habitats take part. This pattern (of environmental selection-gradient model) was observed by Fritsche & Kaltz (2000) in hybrid zones of *Prunella* (Lamiaceae): the position and width of the hybrid zone studied appear to be maintained by diverging selection pressures on the gradient, with local adaptation of the parental species at both ends. As some traits of var. *lingua* (compact habit, smaller, coriaceous leaves) seem to be associated to the harsh habitats where it grows, morphological characters that distinguish the two *taxa* may be maintained by strong disruptive selection (as suggested by Morgan-Richards & Wolff, 1999, for *Plantago major* ecotypes) and differential gene flow (as observed by Lawton-Rauh et al., 2007, in *Dubautia* species). Also, given the little gene flow detected between Atlantic Forest and Cerrado, it is reasonable to propose that the ecological differences between these habitats (e.g. different pollinators, habitat preference of pollinators and seed dispersers, different

pluviometric regimes leading to flowering asynchrony) represent strong barriers to gene exchange between the varieties, helping maintain the *taxa* separated.

It would be interesting to verify if there are preferential crossings or partial reproductive barriers between the two *taxa* in the ecotones. During sampling procedure, we observed that pure parental forms are persisting sympatrically with intermediate forms. Our field annotations indicate absence of flowering synchrony between the two varieties (in Assis, Mogi-Guaçu and Porto Ferreira, we observed that only individuals of var. *lingua* were flowering), but there is no statistical robustness in this analysis, and more detailed studies would be necessary.

#### *Implications for taxonomy, conservation and pharmacology*

Although Torres & Ramos (2007), in a recent taxonomic treatment of *Casearia* species from Sao Paulo State, did not recognize varieties for *C. sylvestris*, our results suggest that the two *taxa* may be considered separately. However, more detailed studies would be required, especially quantitative genetic analyses on morphological and adaptive traits to separate genetic effects from environmental effects. For conservation purposes, we believe that the two varieties shall be considered separately, because of the genetic differences detected between them. Ecosystems studied showed to contain different genetic resources, and ecotones must be viewed as areas of important genetic

diversity of the species. Pharmacological essays utilizing *C. sylvestris* should consider the existence of two varieties, and the variety used in these studies should be reported.

#### REFERENCES

- APG II: An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants (2003). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **141**, 399-436.
- Arnold ML (1997) Natural hybridization and evolution. Oxford University Press, Oxford
- Balloux F, Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with population structuring and microsatellites. *Molecular Ecology*, **11**, 155-165.
- Becher SA, Steinmetz K, Weising K et al. (2000) Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. *Theoretical and Applied Genetics*, **101**, 643-651.
- Berli P, Felsenstein J (1999) Maximum likelihood estimation of migration rates and population numbers of two populations using a coalescent approach. *Genetics* **152**, 763-773.
- Berli P, Felsenstein J (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **98**:4563-4568.
- Bradshaw HD, Stettler RF (1993) Molecular genetics of growth and development in *Populus*. I. Triploidy in hybrid poplars. *Theoretical and Applied Genetics*, **86**, 301-307.
- Cavallari MM, Billot C, Bouvet J-M et al. (2008) Isolation and characterization of microsatellite markers for *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae), a neotropical medicinal tree. *Molecular Ecology Resources* doi: 10.1111/j.1471-8286.2008.02069.x
- Cervera M-T, Storme V, Ivens B et al (2001). Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics*, **158**, 787-809.

- Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD (2001) Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, **10**, 349–356.
- Creste S, Tulmann-Neto A, Silva SO, Figueira A (2003) Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. *Euphytica*, **132**, 259–268.
- Cronquist A (1981) An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Csaikl UM, Bastian H, Brettschneider, R et al. (1998) Comparative analysis of different DNA extraction protocols: a fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. *Plant Molecular Biology Reporter*, **16**, 69–86.
- Cui L, Wall PK, Leebens-Mack JH et al. (2006) Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research*, **16**, 738–749.
- El Mousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, **92**, 832–839.
- Esteves I, Souza IR, Rodrigues M et al (2005) Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *Journal of Ethnopharmacology*, **101**, 191–196.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611–2620.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes - application to human mitochondrial - DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479–491.
- Fritsche F, Kaltz O (2000) Is the *Prunella* (Lamiaceae) hybrid zone structured by an environmental gradient? Evidence from a reciprocal transplant experiment. *American Journal of Botany*, **87**, 995 – 1003.
- Goudet J (1995) FSTAT version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485–486.
- Goulart MF, Lemos Filho JP, Lovato MB (2005) Phenological variation within and among populations of *Plathymenia reticulata* in Brazilian Cerrado, the Atlantic Forest and transitional sites. *Annals of Botany*, **96**, 445–455.
- Hartl DL, Clark AG (1997) Principles of Population Genetics. Sinauer & Associates, Sunderland.
- Hufford KM, Mazer SJ (2003) Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology & Evolution*, **18**, 147–155.
- Itokawa, H., Totsuka, N., Morita, H et al. (1990) New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). *Chemical and Pharmacological Bulletin*, **38**, 3384–88.
- Kageyama PY, Sebbenn, AM, Ribas, LA et al. (2003) Genetic diversity in tropical three species from different successional stages determined with genetic markers. *Scientia Forestalis*, **64**, 93–107.
- Lacerda DR, Acedo MDP, Lemos-Filho JP, Lovato MB (2001) Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from Brazilian Cerrado. *Molecular Ecology*, **10**, 1143–1152.
- Lacerda DR, Lemos Filho JP, Acedo MDP, Lovato MB (2002) Molecular differentiation of two vicariant neotropical tree species, *Plathymenia foliolosa* and *P. reticulata* (Mimosoideae), inferred using RAPD markers. *Plant Systematic and Evolution*, **235**, 67–77.
- Lawton-Rauh A (2003) Evolutionary dynamics of duplicated genes in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29**, 396–409.
- Lawton-Rauh A, Robichaux RH, Purugganan MD (2007) Diversity and divergence patterns in regulatory genes suggest differential gene flow in recently-derived species of the Hawaiian silversword alliance adaptive radiation (Asteraceae). *Molecular Ecology*, **16**, 3995–4013.
- Lexer C, Fay MF, Joseph JA, Nica MS, Heinze B (2005) Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life

- history in gene introgression. *Molecular Ecology*, **14**, 1045–1057.
- Lhuillier E, Butaud J-F, Bouvet J-M (2006) Extensive clonality and strong differentiation in the insular Pacific tree *Santalum insulare*: implications for its conservation. *Annals of botany* **98**, 1061-1072.
- Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **15**, 65-95.
- Luikart G, Cornuet J-M (1998). Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, **12**, 228-237.
- Machado AO, Oliveira PEAM (2000) Biologia floral e reprodutiva de *Casearia grandiflora* Camb. (Flacourtiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, **23**, 283-290.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209–220.
- Mesquita ML, Desrivot J, Bories C, et al. (2005) Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**, 783-787.
- Morgan-Richards M, Wolff K (1999) Genetic structure and differentiation of *Plantago major* reveals a pair of sympatric sister species. *Molecular Ecology*, **8**, 1027–1036.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853–858.
- Ohta T, Kimura M (1973) A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetical Research* **22**, 201–204.
- Pearse DE, Crandall KA (2004) Beyond FST: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics* **5**, 585–602.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**, 502–503.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945 – 959.
- Ratter JA, Riveiro JF, Bridgewater S (1997) The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*, **80**, 223-230.
- Remington DL, Robichaux RH (2007) Influences of gene flow on adaptive speciation in the *Dubautia arborea*-*D. ciliolata* complex. *Molecular Ecology*, **16**, 4014–4027.
- Ribeiro RA, Ramos ACS, Lemos Filho JP, Lovato MB (2005) Genetic Variation in remnant populations of *Dalbergia nigra* (Papilionoideae), an endangered tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Annals of Botany*, **95**, 1171–1177.
- Rodrigues RR, Torres RB, Matthes LAF, Penha AS (2004) Tree species sprouting from root buds in a Semideciduous Forest affected by fires. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **47**, 127-133.
- Rosenberg NA (2004) Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 137-138.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219–1228.
- Saint-Hilaire A (1829). *Flora brasiliae meridionalis*, **2**, 236.
- Saltonstall K (2003) Microsatellite variation within and among North American lineages of *Phragmites australis*. *Molecular Ecology*, **12**, 1689–1702.
- Schilthuizen M (2000) Ecotone: speciation-prone. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 130–131.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) ARLEQUIN: a software for population data analysis, Version 2.0. University of Geneva.
- Silva, JF (1996) *Biodiversity and Stability in Tropical Savannas* In: Solbrig OT, Medina E, Silva J.F. (Editors). Biodiversity and savanna ecosystem processes: a global perspective. Springer-Verlag, Berlin. 233 pp.
- Silva MAS, Ming LC, Pereira AMS et al. (2006) Phytochemical and genetic variability of *Casearia sylvestris* Sw. from São Paulo State Atlantic Forest and Cerrado populations. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **8**, 159-166.

- Sleumer HO (1980) Flora Neotropica Monograph n.22 (FLACOURTIACEAE). The New York Botanical Garden, New York .
- Slotta TAB, Porter DM (2006) Genetic variation within and between *Iliamna corei* and *I. remota* (Malvaceae): implications for species delimitation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **151**, 345–354.
- Soares TN, Chaves LJ, Telles MPC, Diniz-Filho AF, Resende LV (2008) Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* (“baru” tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. *Genetica*, **132**, 9–19.
- Stenberg P, Lundmark M, Saura A (2003) MLGsim: a program for detecting clones using a simulation approach. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 329–331.
- Torres RB, Ramos R (2007). Flacourtiaceae. In: Wanderley MGL, Shepherd GJ, Melhem TSA & Giulietti AM (coord.). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo.
- Torres RB, Yamamoto K (1986) Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacq. (Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica*, **9**, 239–258.
- Valbuena-Carabaña M, González-Martínez SC, Sork VL et al. (2005) Gene flow and hybridization in a mixed oak forest [*Quercus pyrenaica* Willd. and *Q. petraea* (Matts.) Liebl.] in central Spain. *Heredity*, **95**, 457–465.
- Van Ee BW, Jelinski N, Berry PE, Hipp AL (2006) Phylogeny and biogeography of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae), a rare shrub from Texas and Alabama, using DNA sequence and AFLP data. *Molecular Ecology* **15**, 2735–2751.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.
- Wang J (2004) Application of the One-Migrant-per-Generation rule to conservation and management. *Conservation Biology* **18**, 332–343.
- Weir BS (1996) Genetics data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sinauer & Associates, Sunderland.
- Yin TM, DiFazio SP, Gunter LE, Riemenschneider D, Tuskan GA (2004) Large-scale heterospecific segregation distortion in *Populus* revealed by a dense genetic map. *Theoretical and Applied Genetics*, **109**, 451–463.
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 413 – 418.
- Zucchi MI, Brondani RPV, Pinheiro JB et al. (2003) Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genetics and Molecular Biology*, **26**, 449–457.

### Acknowledgements

This work was supported by FAPESP/Brazil. M. Cavallari has received a PhD fellowship from CNPq and CAPES/Brazil. We thank the staff of the Conservation Units visited, especially Dra. Giselda Durigan (Assis) and Dr. Léo Zimback (Botucatu), Instituto Florestal de São Paulo, for information provided on site historic and *C. sylvestris* distribution, Eduardo Moretti for help on field work, and Peter Beerli for help with MIGRATE utilisation. Part of this work was carried out by using the resources of the CBSU from Cornell University, which is partially funded by Microsoft Corporation.

Table 1. Main characteristics of *C. sylvestris* populations sampled. *N* = number of individuals sampled

Population	<i>N</i>	Ecosystem	Coordinates	Altitude (m)	Pluviosity (mm)	Temp.(°C)	Area (ha)	Dry season	Site characteristics
Ilha Anchieta	32	Evergreen Forest	23°32'S 45°03'W	100	2,500	22.4	828	absent	oceanic island/ moderate disturb
Santa Virginia	39	Evergreen Forest	23°20'S 45°08'W	900	3,000	21.0	17,000	absent	part of a larger continuous forest/low disturb
Carlos Botelho	51	Evergreen Forest	24°02'S 47°57'W	800	2,100	19.0	37,000	absent	part of a larger continuous forest/low disturb
Morro do Diabo	54	Semidecidual Forest	22°30'S 52°19'W	450	1,500	22.0	34,000	moderate	large fragment isolated/low disturb
Caetetus	33	Semidecidual Forest	22°23'S 49°42'W	600	1,200	20.0	2,178	moderate	medium fragment isolated/ medium disturb
Mogi-Guaçu	47	Ecotone	22°15'S 47°11'W	650	1,300	20.0	980	moderate	fragmented/disturbed
Porto Ferreira	45	Ecotone	21°51'S 47°25'W	560	1,400	20.0	612	moderate	fragmented/disturbed
Assis	46	Cerrado	22°34'S 50°24'W	550	1,400	21.0	1,170	severe	fragmented/disturbed
Botucatu	29	Cerrado	22°56'S 48°27'W	850	1,400	19.4	33	severe	very small fragment isolated and disturbed

Table 2. Number of *C. sylvestris* individuals of each variety (classification based in the morphology) and total sampled in each population and ecosystem.

Ecosystems/Populations	var. <i>sylvestris</i>	var. <i>lingua</i>	dubious morphology	Total sampled
<i>Evergreen Forest</i>	122	-	-	122
Ilha Anchieta	32	-	-	32
Santa Virginia	39	-	-	39
Carlos Botelho	51	-	-	51
<i>Semideciduous Forest</i>	87	-	-	87
Morro do Diabo	54	-	-	54
Caetetus	33	-	-	33
<i>Ecotones</i>	48	10	34	92
Mogi-Guaçu	16	6	25	47
Porto Ferreira	32	4	9	45
<i>Cerrado</i>	4	68	3	75
Assis	4	39	3	46
Botucatu	-	29	-	29
<i>Total</i>	261	78	37	376

Table 3. Main parameters estimated for each locus per ecosystem, including percentage of partially genome-duplicated individuals sampled (% g-d ind.), allele richness (number of observed alleles per population after correction for the sample size for 63 individuals by the rarefaction method), variation in allele size in base pairs (Var.), expected heterozygosity ( $H_e$ ) and Wright's Fixation Index ( $F_{is}$ ).

		Csy_04	Csy_06	Csy_07	Csy_09	Csy_11	Csy_14	Csy_15	Csy_16	Csy_18
% g-d ind.	<i>Evergreen Forest</i>	0.90	2.88	0.00	0.93	2.65	0.00	1.92	0.00	0.00
	<i>Semidecidual Forest</i>	6.49	4.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>Cerrado</i>	36.51	4.23	0.00	8.00	5.88	17.57	12.31	0.00	0.00
	<i>Ecotones</i>	14.29	1.16	2.60	7.69	3.49	3.37	4.60	2.25	0.00
Allele Richnes	<i>Evergreen Forest</i>	12.76	19.64	6.43	8.56	17.63	9.24	15.10	3.80	8.94
	<i>Semidecidual Forest</i>	11.76	17.75	12.96	6.94	11.87	6.82	16.85	5.99	9.43
	<i>Cerrado</i>	14.00	10.53	9.94	8.79	17.55	6.96	13.88	4.68	5.66
	<i>Ecotones</i>	14.78	19.97	12.75	11.58	15.83	7.62	15.92	6.60	8.80
Var	<i>Evergreen Forest</i>	52	38	30	14	28	22	34	10	40
	<i>Semidecidual Forest</i>	52	38	30	14	28	22	34	10	40
	<i>Cerrado</i>	50	40	30	15	38	18	34	8	24
	<i>Ecotones</i>	52	50	32	24	42	24	36	16	42
He	<i>Evergreen Forest</i>	0.831	0.911	0.163	0.668	0.880	0.613	0.779	0.408	0.710
	<i>Semidecidual Forest</i>	0.612	0.924	0.880	0.401	0.807	0.426	0.890	0.595	0.701
	<i>Cerrado</i>	0.834	0.613	0.641	0.741	0.838	0.679	0.860	0.521	0.252
	<i>Ecotones</i>	0.614	0.885	0.870	0.785	0.830	0.482	0.869	0.574	0.622
Fis	<i>Evergreen Forest</i>	0.148**	0.244**	0.419**	0.151**	0.018	0.158	0.387**	0.145	0.319**
	<i>Semidecidual Forest</i>	0.009	0.18**	0.655**	0.197**	0.012	0.287**	0.504**	0.134**	0.128
	<i>Cerrado</i>	0.075	-0.233**	0.834**	0.394**	0.095	-0.307**	0.149**	-0.145**	0.111
	<i>Ecotones</i>	0.164**	0.231**	0.734**	0.151	0.304**	0.375**	0.357**	0.261**	0.139

\*\* Significance test of HW departures; threshold adjusted using Bonferroni correction:  $P$  (1%)  $\leq 0.00556$  corresponding to  $P < 0.01$

Table 4. Diversity parameters observed per population: Mean  $n_a$ , mean number of observed alleles per population; Corr. Mean  $n_a$ , mean number of observed alleles per population after correction for the sample size for 20 individuals by the rarefaction method;  $H_e$ , heterozygosity expected;  $H_o$ , heterozygosity observed;  $F_{is}$ , Wright's Fixation Index;  $P_{HW}$ ,  $P$ -values for the HWE test, significance threshold adjusted using Bonferroni correction:  $P(1\%) \leq 0.000124$  corresponding to \*\*:  $P < 0.01$ .

Population	Mean $n_a$	Corr. Mean $n_a$	$H_e$	$H_o$	$F_{is}$	$P - HW$
<i>Evergreen Forest</i>	12.3	11.3	0.662	0.530	0.199	
Ilha Anchieta	8.8	7.9	0.648	0.513	0.208	0.0001 **
Santa Virginia	8.9	7.4	0.593	0.524	0.117	0.0001 **
Carlos Botelho	8.9	7.4	0.607	0.546	0.100	0.0001 **
<i>Semideciduous Forest</i>	11.3	11.2	0.693	0.522	0.247	
Morro do Diabo	9.8	8.1	0.677	0.513	0.243	0.0001 **
Caetetus	9.2	8.6	0.677	0.539	0.204	0.0001 **
<i>Ecotones</i>	13.4	12.6	0.725	0.502	0.308	
Mogi-Guaçu	9.7	7.8	0.641	0.468	0.270	0.0001 **
Porto Ferreira	12.3	9.8	0.763	0.539	0.294	0.0001 **
<i>Cerrado</i>	10.4	10.2	0.664	0.591	0.110	
Assis	10.0	8.0	0.720	0.564	0.217	0.0001 **
Botucatu	3.1	2.8	0.382	0.640	-0.672	0.0001 **
<i>Mean (populations)</i>	9.0	8.5	0.660	0.542	0.179	
<i>Mean (ecosystems)</i>	11.9	11.3	0.686	0.538	0.215	
<i>Total</i>			0.771	0.534	0.307	

Table 5. Number of effective immigrants per generation among ecosystems detected by the ML analysis made by MIGRATE.

	to Evergreen Forest	to Semidecidual Forest	to Cerrado	to Ecotones
from Evergreen Forest	–	1.5796	1.0310	1.9492
from Semidecidual Forest	2.7803	–	1.4652	1.4794
from Cerrado	1.4176	0.9233	–	1.4978
from Ecotones	1.4193	1.6520	1.2282	–

Figure 1: Map showing (approximately) the original ecosystems' distribution in Sao Paulo state and populations of *Casearia sylvestris* Sw sampled. AS = Assis, BT = Botucatu, CB = Carlos Botelho, CT = Caetetus, IA = Ilha Anchieta, MD = Morro do Diabo, MG= Mogi-Guaçu, PF = Porto Ferreira, SV = Santa Virginia.

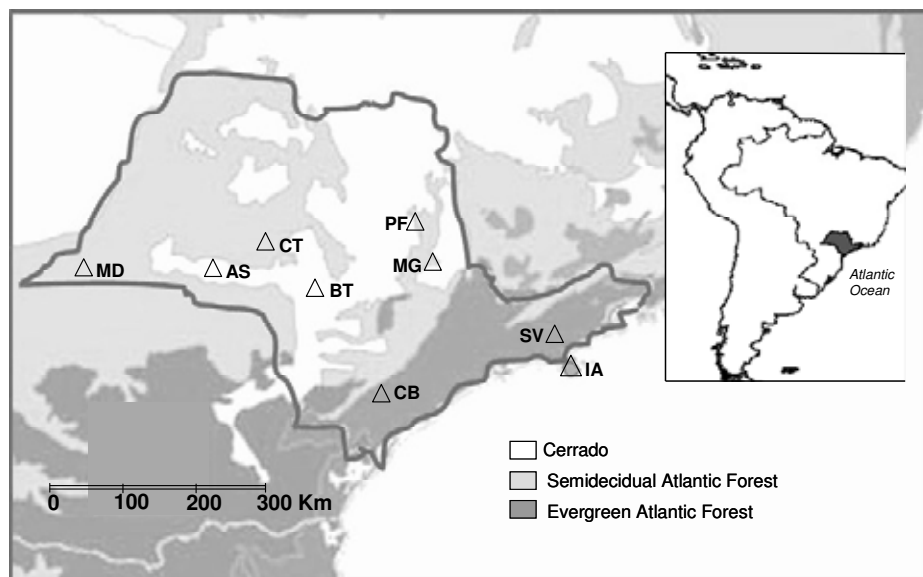


Figure 2  $\Delta K$  value for each  $K$ , calculated as  $\Delta K = mL''(K)/s[L(K)]$  (Evanno et al., 2005).

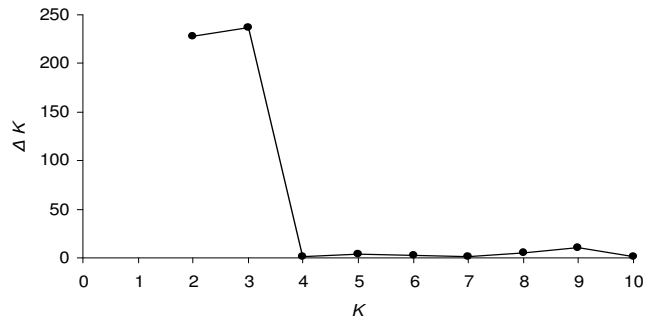
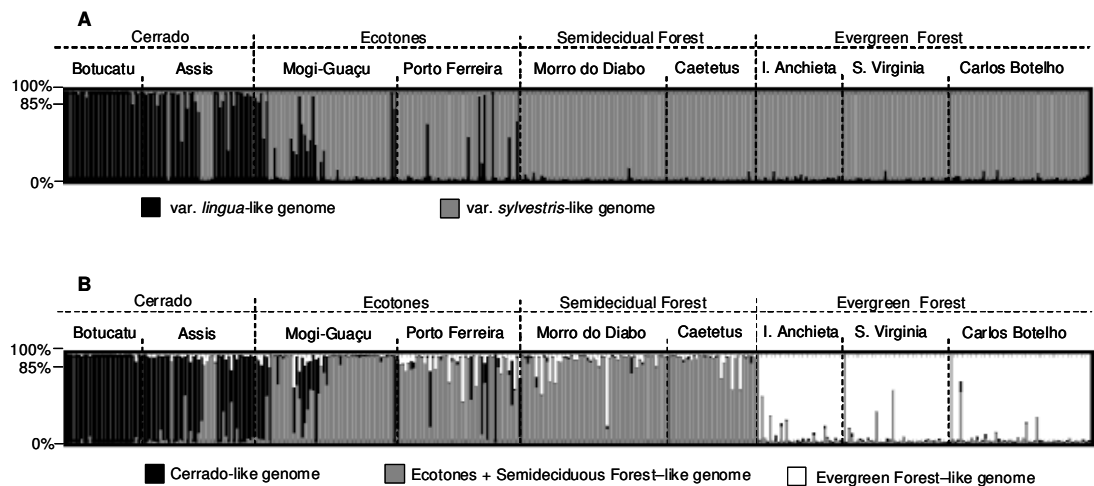


Figure 3. Clustering of individuals made by STRUCTURE at  $K=2$  and  $K=3$ . Individuals are represented by vertical coloured lines. Same colour in different individuals indicates that they pertain to the same cluster. Different colours in the same individual indicate the percentage of the genome which was inherited from each cluster.



## **CAPÍTULO II**

### **DIVERSIDADE QUÍMICA EM POPULAÇÕES DE *Casearia sylvestris* Sw (SALICACEAE) NO ESTADO DE SÃO PAULO**

Nesta pesquisa foi observada a diversidade quantitativa e qualitativa de casearinas em amostras de *Casearia sylvestris* Sw. oriundas de nove localidades no Estado de São Paulo, representando alguns dos diversos ambientes onde esta espécie ocorre.

Amostrou-se em duas áreas de Cerrado [Estação Ecológica (E.E.) de Assis e Floresta Estadual (F.E) de Botucatu], em três áreas de Floresta Ombrófila Densa [Parque Estadual (P.E.) Carlos Botelho, P.E. da Serra do Mar núcleo Picinguaba e P.E. da Serra do Mar núcleo Santa Virgínia], em duas áreas de Floresta Estacional Semidecidual (E.E. Caetetus e P.E. Morro do Diabo) e em dois ecótonos entre o Cerrado e a Floresta Estacional Semidecidual ( P.E. de Porto Ferreira e E.E. de Mogi-Guaçu). Em cada uma destas localidades, 12 indivíduos foram amostrados, totalizando 108 amostras (estas 108 amostras fazem parte daquelas 376 que foram analisadas geneticamente – Cap. I).

Dois tipos de amostras foram preparados: o primeiro tipo compõe-se de um conjunto de folhas de cada um dos 108 indivíduos, retiradas do terço médio de um ramo maduro, obtidas no campo e imediatamente armazenadas em envelope de papel pardo, e acondicionadas em embalagem plástica contendo sílica gel. O segundo tipo de amostra coletada compõe-se de folhas que foram obtidas de estacas (clones dos mesmos indivíduos amostrados no campo) cultivadas durante um ano em casa de vegetação. Como os compostos químicos podem variar de acordo com as condições da coleta e do ambiente onde a planta se desenvolveu, considerou-se interessante excluir estes efeitos para a realização das análises químicas. Isto permitiria uma

comparação mais direta entre as amostras obtidas nos diferentes locais, isto é, as diferenças observadas entre as amostras oriundas de cada população poderiam ser atribuídas com mais segurança ao componente genético. Já a comparação entre os dois tipos de amostra (folhas do campo e folhas das estacas) para um mesmo indivíduo, e também entre as amostras de folhas obtidas diretamente em cada Unidade de Conservação, permitiria observar os efeitos do ambiente sobre a diversidade e quantidade de casearinas.

Para o cultivo das estacas em casa de vegetação, determinou-se experimentalmente um tratamento para o enraizamento de estacas de *C. sylvestris*, uma vez que, de acordo com os pouquíssimos relatos na literatura, é muito difícil obter estacas enraizadas desta espécie.

Os resultados destes experimentos foram transformados em um artigo científico, que foi submetido ao periódico *Acta Botanica Brasilica* (Sociedade Botânica do Brasil) em dezembro de 2006 (no entanto ainda não se recebeu nenhum parecer a respeito). Este artigo, intitulado “Enraizamento de estacas de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) tratadas com ácido indolbutírico”, é aqui apresentado (Cap. II. 1). Fotografias das estacas sendo enraizadas são apresentadas na Figura 9.

Infelizmente, no decorrer do ano de 2007, muitas estacas morreram, tendo restado apenas 46. Todas estas plantas foram então utilizadas para as análises químicas, embora nem todas as populações estejam representadas.

A metodologia de análise de diversidade de casearinas, e os resultados obtidos são apresentadas e discutidos no Cap.II.2., onde apresenta-se o artigo “Diversidade de casearinas entre e dentro de populações de *C. sylvestris* Sw. (Salicaceae)” (ainda não submetido para publicação).



Figura 9. Fotografias do experimento de enraizamento de estacas.

## **CAPÍTULO II**

### **DIVERSIDADE QUÍMICA EM POPULAÇÕES DE *Casearia sylvestris* Sw (SALICACEAE) NO ESTADO DE SÃO PAULO**

- 1. Enraizamento de estacas de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) tratadas com ácido indolbutírico**

## **Enraizamento de estacas de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) tratadas com ácido indolbutírico**

Marcelo Mattos Cavallari<sup>(1\*)</sup>, Lin Chau Ming<sup>(2)</sup>, Marcos Aparecido Gimenes<sup>(3)</sup>, Eduardo Hermogenes Moretti<sup>(1)</sup> e Marcos Eduardo Paron<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, CEP 18618-000, Botucatu, SP. <sup>(2)</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, Caixa Postal 237 CEP18603-970 - Botucatu, SP. <sup>(3)</sup> Instituto Agronômico Campinas – RGV. Caixa Postal 28 CEP 13001-970 Campinas, SP. <sup>(\*)</sup> Autor para correspondência: [mmcavall@ibb.unesp.br](mailto:mmcavall@ibb.unesp.br)

**RESUMO** – (Enraizamento de estacas de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) tratadas com ácido indolbutírico). *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) é uma espécie arbórea que apresenta diversas propriedades farmacológicas. Apesar do interesse comercial, a guaçatonga não é cultivada, sendo obtida por extrativismo. A propagação vegetativa seria uma maneira de minimizar a pressão extrativista, além de favorecer a manutenção de coleções de germoplasma. O presente trabalho teve como objetivo estudar condições favoráveis à propagação vegetativa de *C. sylvestris*, utilizando-se de dois tipos de estacas, tratadas por imersão lenta em solução com diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB). No total, foram utilizadas 360 estacas, distribuídas em 18 tratamentos (experimento fatorial 9 x2) em delineamento inteiramente casualizado. Cem dias após a instalação do experimento registrou-se o

número de estacas vivas e o número de estacas com raiz. Foi feita Análise de Variância através do programa estatístico SAS v.8.2 (*Statistical Analysis System*). Estacas apicais mostram-se mais adequadas para o enraizamento do que estacas medianas. A concentração de 60 ppm garante maior sobrevivência de estacas, enquanto que a concentração de 90 ppm mostra-se a mais adequada para o enraizamento. Porém estes resultados não são estatisticamente diferentes daqueles obtidos nas concentrações mais baixas de AIB. Concentrações superiores a 90 ppm mostram-se inadequadas.

**Palavras-chave:** *Casearia sylvestris*, estaquia, AIB, propagação vegetativa

**ABSTRACT** – (Effect of indolebutyric acid on rooting ability of *Casearia sylvestris* Sw. - Salicaceae)

*Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) is a tree species which presents pharmacological properties. Despite its commercial interest, this species is not cultivated. Vegetative propagation could help minimize collection pressure over native populations and to maintain germplasm banks. The present work aimed to establish favorable conditions for vegetative propagation of *C. sylvestris* through two types of cuttings treated with different indolebutyric acid (IBA) concentrations. A total of 360 cuttings were utilized, distributed in 18 treatments (9 x 2 factorial experiment) in a completely randomized design. After 100 days, the number of cuttings alive and the number of rooted cuttings was registered. The Statistical Analysis System (SAS v.8.2) was utilized for the data analysis. Apical cuttings showed to survive and root more efficiently.

The concentration of 60 ppm of IBA resulted in the higher number of alive cuttings, while the concentration of 90 ppm of IBA resulted in the higher number of rooted cuttings. However, results were not statistically different from those obtained with lower IBA concentrations. IBA concentrations superior to 90 ppm showed to be inadequate.

**Key-words:** *Casearia sylvestris*, cuttings, IBA, vegetative propagation

## Introdução

*Casearia sylvestris* Sw, ou guaçatonga, é uma espécie arbórea de ampla ocorrência no Cerrado e Mata Atlântica, que apresenta diversas propriedades de interesse farmacológico. O gênero *Casearia*, que na América Tropical é representado por aproximadamente 75 espécies (Torres & Yamamoto, 1986), é tradicionalmente considerado como pertencente à Família Flacourtiaceae (Joly, 1998). No entanto, Flacourtiaceae foi recentemente considerada um grupo não monofilético, e o gênero *Casearia* passou a ser considerado como pertencente à Família Salicaceae (Souza & Lorenzi, 2005).

Os compostos químicos produzidos por esta espécie têm despertado o interesse de diversos grupos de pesquisadores,

principalmente pela sua ação no tratamento da úlcera e do câncer. Tais compostos vêm sendo testados como antibióticos, anticancerígenos, inibidores da replicação do HIV, entre outras atividades. (Itokawa et al., 1988, Itokawa et al., 1990, Morita et al., 1991). O interesse nas propriedades farmacológicas de *Casearia sylvestris* pode ser evidenciado pelo grande número de pesquisas realizadas com esta espécie, tanto para a otimização de métodos de extração, isolamento e identificação de compostos, como em busca de novas drogas (Borges et al., 2000; Borges et al., 2001; Santos, 2001).

Apesar do interesse comercial, a guaçatonga, como a maioria das espécies de interesse farmacológico nativas do Brasil, não é cultivada, sendo obtida por extrativismo (Silva, 2003). A propagação vegetativa, através de estacas, seria uma maneira de minimizar a pressão extrativista, possibilitando seu cultivo em larga escala. Pereira et al. (2003), obtiveram 13% de estacas de *Casearia sylvestris* enraizadas, evidenciando a dificuldade de obtenção de estacas enraizadas desta espécie.

O presente trabalho teve como objetivo a propagação vegetativa de *Casearia sylvestris* pelo processo da estaquia, utilizando-se de dois tipos de estacas tratadas com diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB), visando contribuir com o acúmulo de conhecimentos necessários para o cultivo desta espécie.

### **Material e Métodos**

O experimento foi realizado em área experimental do Departamento de Horticultura, Fazenda Experimental Lageado, pertencente à Faculdade de Ciências Agronômicas, Unesp, Campus de Botucatu, localizada a 22° 50' 42" de latitude sul e a 48° 25' 59" de longitude a oeste, com altitude de 784m. O clima da região é do tipo Cwb, que significa mesotérmico com inverno seco, conforme a classificação de Köppen. (Lauretti et al., 2001). O experimento foi conduzido em casa de vegetação protegida por plástico e sombrite (50%), com microaspersor funcionando por 1 minuto a cada 50 minutos.

O Experimento foi montado no dia 22 de novembro de 2005, com

estacas obtidas no campus de Rubião Júnior, UNESP, Botucatu, de árvore previamente identificada pela Dra. Roseli B. Torres (Instituto Agrônômico de Campinas). Foram utilizados dois tipos de estacas: 1. estacas apicais, obtidas da porção mais apical (não lenhosa) de cada ramo e 2. estacas chamadas aqui de "medianas", obtidas da porção mais apical de cada ramo após a retirada das estacas do tipo 1. Todas as estacas possuíam aproximadamente 5 gemas e entre 3 e 5 folhas. O menor espaçamento entre as gemas existentes na porção mais apical do ramo resultou em estacas de diferentes tamanhos, isto é, as estacas apicais apresentavam aproximadamente 7 cm enquanto que as medianas apresentavam aproximadamente 12 cm.

Foram testadas 9 diferentes concentrações de Ácido Indol Butírico (AIB), a saber: 0 ppm (água destilada), 30 ppm, 60 ppm, 90 ppm, 120 ppm, 150 ppm, 300 ppm, 450 ppm e 600 ppm. Foi realizada uma imersão lenta (24 horas) das estacas em solução contendo AIB em água destilada. Após o tratamento com AIB, as estacas foram colocadas em bandejas de isopor contendo vermiculita. No

total, foram utilizadas 360 estacas, distribuídas em 18 tratamentos (experimento fatorial 9 x2) em delineamento inteiramente casualizado. Cada tratamento constituiu-se de 4 repetições de cinco estacas (apicais ou medianas) tratadas com uma determinada concentração de AIB, totalizando 72 parcelas. O experimento foi avaliado aproximadamente 100 dias após a instalação. Em cada repetição observou-se o número de estacas vivas e o número de estacas com raiz.

Foi feita uma análise estatística baseada em Análise de Variância e Teste de Tukey, através do programa estatístico SAS v.8.2 (*Statistical Analysis System*), para verificação da significância estatística dos resultados.

### **Resultados e discussão**

As estacas apicais apresentaram uma maior porcentagem de sobrevivência e de enraizamento, conforme pode ser observado na Fig. 1. A porcentagem de sobrevivência de estacas apicais, decorridos 100 dias da instalação do experimento, foi de aproximadamente 60%, enquanto que apenas aproximadamente 25% das estacas medianas sobreviveram. Com

relação ao enraizamento, as estacas apicais também apresentaram melhores resultados (21,1%) do que as estacas medianas (7,7%). O Teste de Tukey confirma a existência de duas classes estatisticamente distintas de estacas (A e B). De acordo com a análise de variância, o tipo de estaca utilizado resultou em diferenças significativas na sobrevivência ( $p<.0001$ , Tab. 1) e enraizamento ( $p<0.05$ , Tab. 2).

Estes resultados indicam que a utilização de estacas apicais, pouco lignificadas, é muito mais eficiente do que o uso de estacas medianas. Resultados semelhantes foram obtidos por Bastos et al. (2004), em experimentos de enraizamento de estacas de caramboleira (*Averrhoa carambola* L.).

Os resultados da análise de variância mostram que houve diferença significativa entre os tratamentos de concentração de AIB com relação à sobrevivência ( $p<.0001$ , Tabela 1) e com relação ao enraizamento ( $p<0.01$ , Tab. 2). Com relação à porcentagem de sobrevivência, os dados indicam que houve uma interação entre o tipo de estaca e a concentração de AIB (Tab.

1), não tendo esta influencia sobre o enraizamento, entretanto.

Pode-se observar, através da Fig. 2, que os melhores resultados foram obtidos com concentrações de AIB inferiores a 120 ppm. O Teste de Tukey classificou os tratamentos de concentração de AIB em 3 grupos (A, B e C) com relação à sobrevivência de estacas. As parcelas dos tratamentos de 60 ppm de AIB apresentam médias estatisticamente superiores às demais, apresentando a maior porcentagem de sobrevivência de estacas (50%). Com relação ao enraizamento de estacas, o Teste de Tukey identificou dois grupos distintos (A e B), tendo as parcelas dos tratamentos de 90 ppm médias estatisticamente superiores às parcelas demais tratamentos, apresentando a maior porcentagem de enraizamento (25%).

Os tratamentos de 60 ppm foram os que garantiram maior sobrevivência de estacas, sendo estatisticamente diferentes dos tratamentos com concentrações maiores do que 120 ppm. No entanto, não foram significativamente diferentes dos demais tratamentos (inferiores a 120 ppm). Já com relação ao enraizamento de estacas, os

tratamentos de 90 ppm mostraram-se superiores, média de enraizamento das parcelas estatisticamente diferentes das dos tratamentos classificados como “B” pelo teste de Tukey. Entretanto, não diferiram significativamente dos tratamentos “AB”, todos eles inferiores a 150 ppm (com exceção do tratamento de 300 ppm).

De acordo com o Teste de Tukey, portanto, as concentrações de AIB entre 0 ppm e 90 ppm produzem resultados estatisticamente semelhantes. Isto é, as porcentagens de sobrevivência e enraizamento obtidas sugerem que a melhor faixa de concentração de AIB está entre 60 e 90 ppm, porém os testes estatísticos não apontam diferenças significativas entre estas concentrações e os tratamentos testemunha (0 ppm).

Andrade & Martins (2003), ao estudarem o efeito de diferentes concentrações de AIB sobre a sobrevivência e enraizamento de estacas de citros, não observaram diferenças estatisticamente significativas para tratamentos com concentrações de AIB variando de 0 a 400 mg/L.

As condições de umidade e temperatura da casa de vegetação utilizada parecem assegurar a sobrevivência das estacas, que por fim acabam enraizando mesmo sem a presença de hormônios. Em experimentos preliminares (dados não mostrados), estacas de *C. sylvestris* permaneceram vivas e não enraizadas nesta mesma casa de vegetação por mais de 120 dias, quando então começaram a emitir raízes. Isto sugere que as estacas podem enraizar mesmo sem a presença de hormônios exógenos, e explicaria as médias não significativamente diferentes dos tratamentos entre 0 e 90 ppm. Concentrações de hormônio superiores a 90 ppm são definitivamente inadequadas, visto que causaram a morte da maioria das estacas.

De modo geral obteve-se uma baixa porcentagem de enraizamento de estacas. A porcentagem mais elevada (25%) apesar de ainda insatisfatória, foi superior àquela obtida por Pereira et al. (2003), que obtiveram no máximo 13% de estacas de *Casearia sylvestris* enraizadas. Tal resultado foi obtido pelos autores utilizando estacas apicais tratadas com 500 ppm de AIB

em imersão lenta, e não corrobora os resultados aqui apresentados.

### **Agradecimentos**

À Dra. Roseli B. Torres, Departamento de Botânica, Instituto Agronômico de Campinas, pela identificação taxonômica do indivíduo utilizado para o estudo. À Fapesp pelo auxílio ao projeto.

### **Referências bibliográficas**

- Andrade, R.A.; Martins, A.B.G. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.134-136, 2003;
- Bastos D. C.; Martins, A. B. G.; Scaloppi Junior, E. J.; Sarzi, I.; Fatinansi, J.C. Influência do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas apicais e basais de caramboleira (*Averrhoa carambola* L.) sob condições de nebulização intermitente **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 284-286, 2004.
- Borges, M.H.; Soares, A.M.; Rodrigues, V.M.; Andriao-Escarso, S.H; Diniz, H.; Hamaguchi, A.; Quintero, A.; Lizano, S.; Gutierrez, J.M.; Giglio, J.R.; Homs-

- Brandeburgo, M.I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A(2). **Comp. Biochem. Physiol.** v. 127, p.21-30, 2000.
- Borges, M.H.; Soares, A.M.; Rodrigues, V.M.; Oliveira, F.; Fransheschic, A.M; Rucavadoc, A.; Giglio, J.R.; Homs-Brandeburgo, M.I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon** v.39, p.1863-1869 2001.
- Itokawa, H.; Totsuka, N.; Takeya, K. *et al.* Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), structure and elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. **Chem. Pharm. Bull.** v.36, p.1585-88, 1988.
- Itokawa, H., Totsuka, N.; Morita, H.; Takeya, K.; Iitaka, Y.; Schenkel, E.P.; Motidome, M. New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) **Chem. Pharm. Bull.** v.38, p.3384-88, 1990.
- Joly, A.B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal.** 12ª ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1998. 777p.
- Lauretti, R.L.B.; Machado, J.R.; Crusciol, C.A.C.; Andreotti, M. Efeitos de diferentes manejos de água no estabelecimento de plantas de arroz no sistema pré-germinado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.1093-1099, 2001.
- Morita, H.; Nakayama, M.; Kojima, H.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Schenkel, E.P.; Motidome, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chem. Pharm. Bull.** v.39, p. 693-97, 1991.
- Pereira, V.A.M.; Paron, M.E.; Ming, L.C. Enraizamento de estacas de *Casearia sylvestris* Swartz. IN: VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, 2003, São Pedro: **CD ROM de Resumos da VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais.** São Pedro, 2003.
- Santos, A. G. **Desenvolvimento de metodologia para análise de casearinas em *Casearia sylvestris***

**Sw (Flacourtiaceae).** 2001. Tese (mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.

Silva, M.A.S. **Variabilidade genética e fitoquímica de *Casearia sylvestris* Sw. em populações do cerrado e mata atlântica do Estado de São Paulo.** 2003. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.”

Souza, V.C.; Lorenzi, H. **Botânica Sistemática – Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

Torres, R.B; Yamamoto, K. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacq. (Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.9, p.239-258, 1986.

**Tab. 1** – Resultado da Análise de Variância em relação aos dados de sobrevivência de estacas de *C. sylvestris*.

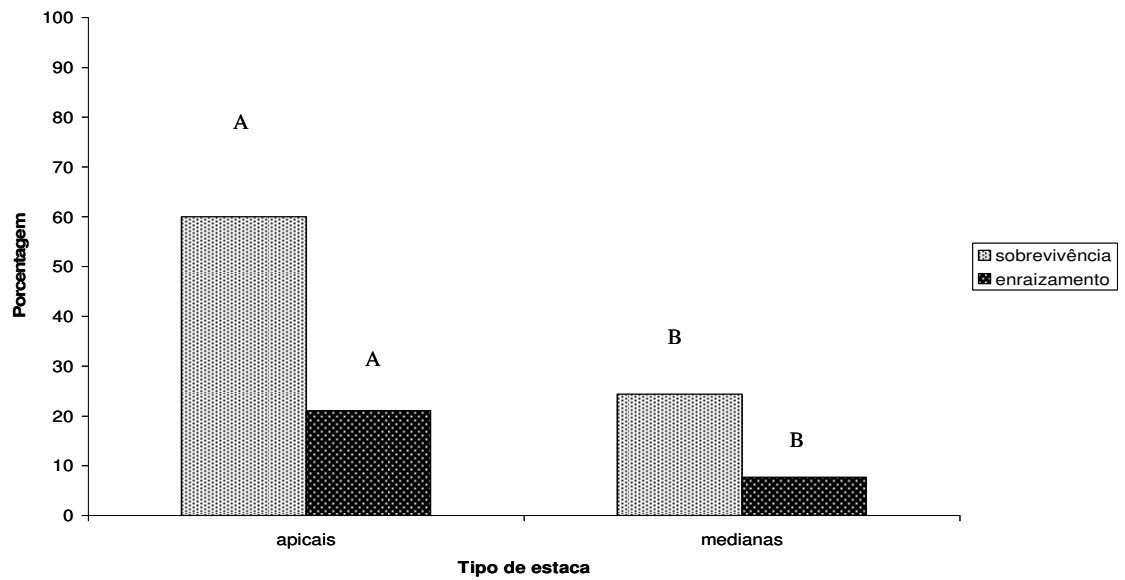
FV	GL	SQ	QM	F	p > F
TRAT	8	60.77	7.59	17.47	<.0001**
EST	1	15.12	15.12	34.78	<.0001**
TRAT*EST	8	16.00	2.00	4.60	0.0003**
bloco	3	1.69	0.56	1.30	0.2850

FV=fonte de variação; GL=graus de liberdade; SQ=soma de quadrados; QM=quadrado médio; F=teste F de Fisher; p=probabilidade de que o resultado obtido é devido ao acaso; TRAT=tratamentos de AIB; EST=tipo de estaca; TRAT\*EST=interação tratamento de AIB x estaca.

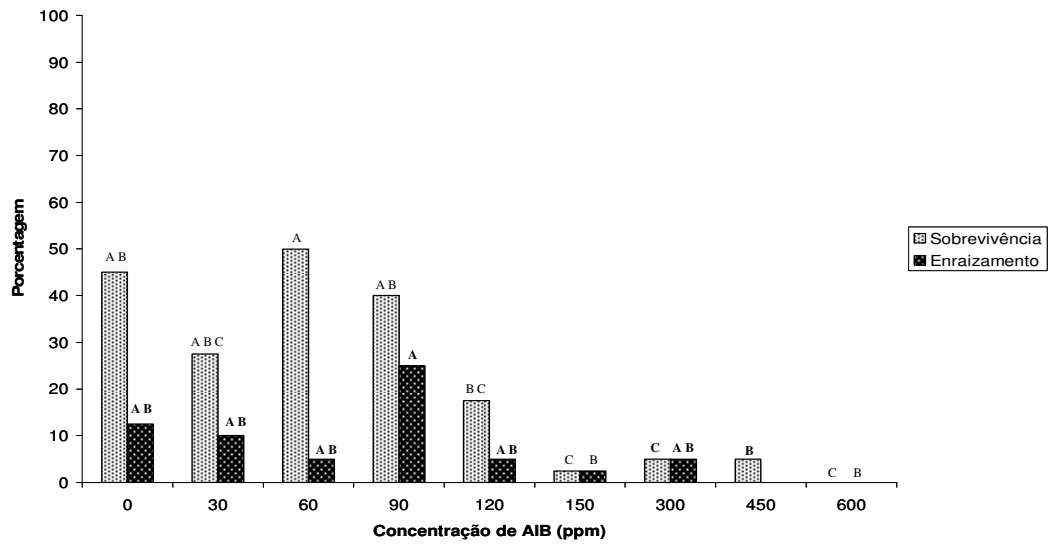
**Tab. 2** – Resultado da Análise de Variância em relação aos dados de enraizamento de estacas de *C. sylvestris*.

FV	GL	SQ	QM	F	p > F
TRAT	8	9.62	1.20	3.00	0.0079**
EST	1	2.17	2.17	5.40	0.0241*
TRAT*EST	8	2.73	0.34	0.85	0.5626
bloco	3	1.20	0.40	1.00	0.4005

FV=fonte de variação; GL=graus de liberdade; SQ=soma de quadrados; QM=quadrado médio; F=teste F de Fisher; p=probabilidade de que o resultado obtido é devido ao acaso; TRAT=tratamentos de AIB; EST=tipo de estaca; TRAT\*EST=interação tratamento de AIB x estaca.



**Fig. 1** – Porcentagem de sobrevivência e de enraizamento de estacas de *C. sylvestris* observada para cada tipo de estaca utilizada. As barras sob letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 1% (sobrevivência) e de 5% (enraizamento).



**Fig. 2** – Porcentagem de sobrevivência e de enraizamento de estacas de *C. sylvestris* observada para cada tratamento de concentração de AIB utilizado. As barras sob letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 0,1% (sobrevivência) e de 1% (enraizamento).

## **CAPÍTULO II**

### **DIVERSIDADE QUÍMICA EM POPULAÇÕES DE *Casearia sylvestris* Sw (SALICACEAE) NO ESTADO DE SÃO PAULO**

#### **2. Diversidade de casearinas entre e dentro de populações de *C. sylvestris* Sw. (Salicaceae)**

## Diversidade de casearinas entre e dentro de populações de *C. sylvestris* Sw. (Salicaceae)

### INTRODUÇÃO

*Casearia sylvestris*, ou guaçatonga, é uma espécie vegetal de ampla ocorrência no Cerrado e Mata Atlântica que apresenta diversas propriedades de interesse farmacológico. Os compostos químicos produzidos por esta espécie têm despertado o interesse de diversos grupos de pesquisadores, principalmente pela sua ação no tratamento da úlcera e do câncer. Entre os compostos encontrados em *C. sylvestris*, os diterpenos clerodânicos vêm sendo testados como antibióticos, anticancerígenos, inibidores da replicação do HIV, entre outras atividades. Uma equipe de pesquisadores japoneses, da *Tokyo College of Pharmacy and Pharmacognosy*, estudou as propriedades anticancerígenas destes diterpenos, encontrando forte atividade antitumoral em ratos. Estes diterpenos foram então chamados *casearinas*, e foram imediatamente patenteados pela equipe como agentes antitumorais (Itokawa et al., 1989).

As casearinas vêm desde então sendo estudadas por diversos grupos de pesquisa, tanto no Brasil quanto no exterior (Itokawa et al., 1988; Itokawa et al., 1990; Morita et al., 1991; Carvalho et al., 1998; Santos, 2001; Bandeira, 2004; Ferreira, 2006; Tininis, 2006; Santos et al., 2007, entre outros).

O interesse comercial sobre os produtos da *Casearia* pode ser percebido através dos inúmeros fitoterápicos disponíveis para compra pela *Internet*, principalmente no exterior. A principal empresa que comercializa a guaçatonga no exterior é a *Raintree Nutrition*. A empresa utiliza como apelo o fato de a *Casearia sylvestris* ser uma espécie tropical com potencial ação benéfica no tratamento do câncer. Um pote com aproximadamente 500g de folhas em pó custa em torno de 24 dólares (Rain Tree Nutrition, 2008: <http://www.rain-tree.com/guacatonga-powder.htm>).

Apesar do enorme potencial farmacológico, e do interesse comercial, *C. sylvestris*, como a maioria das espécies de interesse farmacológico nativas do Brasil, não é cultivada, sendo obtida por extrativismo (Silva, 2003). Poucos estudos foram realizados no sentido de otimizar a coleta e obtenção dos compostos de interesse. Poucos estudos verificaram se há relação entre a qualidade e quantidade de compostos químicos obtidos e as populações de onde foram coletadas as amostras. Silva, 2003, verificou que existe variabilidade no conteúdo de rutina entre populações do cerrado e mata atlântica. Porém, com relação às casearinas, nenhum estudo comparativo entre populações foi realizado. Por fim, cabe ressaltar que poucos estudos fazem menção à variedade (var. *sylvestris* ou var. *lingua*) utilizada nos ensaios biológicos.

Vinte e cinco casearinas (A-Y), diferindo basicamente no grupo éster ligado às posições 2, 6 e 7, 18 e 19, e na hidroxilação ou O-metilação na posição 2 (Tininis, 2005) são conhecidas até o momento, todas elas tendo sido obtidas de folhas (Santos, 2008). Estas diferentes moléculas de casearina apresentam diferentes atividades, ou diferentes graus de atividade. Do ponto de vista farmacológico, a gama de variações em torno de um esqueleto básico encontrada nos diterpenos de *Casearia* fornece modelos interessantes para o estabelecimento de relações entre estrutura e atividade destas substâncias (Santos, 2008).

Sabe-se que fatores ambientais, fisiológicos e genéticos afetam a biossíntese de metabólitos secundários (Freitas et al., 2004). Com relação aos fatores que influenciam a produção qualitativa e quantitativa de casearinas, porém, poucos estudos foram realizados. Tininis (2006) analisou amostras de folhas de dois indivíduos de *C. sylvestris* coletadas de 3 em 3 horas durante 24 horas consecutivas em fevereiro dos anos de 1998 e 1999 no Parque Estadual de Carlos Botelho. Observou que os teores relativos de casearinas variaram em

função do horário de coleta, sendo maiores em torno das 18h30, e menores entre 0h30 e 3h30. Alguns estudos em *C. sylvestris* (não com casearinas) demonstram a relação entre diversidade química e fatores ambientais (Silva et al., 2006; Tininis et al., 2006).

A identificação de populações mais produtivas, se é que existe tal relação, seria de grande interesse para o melhoramento genético desta espécie, sua domesticação e manejo sustentado. O entendimento das relações entre a qualidade e quantidade dos compostos químicos obtidos em cada amostra com a população de origem ofereceria a possibilidade para o início de programas de pré-melhoramento e domesticação desta espécie, reduzindo a pressão antropológica sobre as populações naturais.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade de casearinas entre e dentro de nove populações no Estado de São Paulo, que representam as duas variedades reconhecidas para a espécie (var. *sylvestris* e var. *lingua*) e quatro ecossistemas onde a espécie ocorre (Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semidecidual, Cerrado e ecótonos). Adicionalmente, verificou-se a produção de casearinas por indivíduos oriundos de diferentes localidades cultivados em casa de vegetação, subtraindo-se assim o efeito ambiental na produção quantitativa e qualitativa das casearinas, e permitindo uma comparação mais direta entre os perfis químicos de indivíduos de diferentes localidades.

## METODOLOGIA

### Amostragem

Amostrou-se em duas áreas de Cerrado [Estação Ecológica (E.E.) de Assis e Floresta Estadual (F.E.) de Botucatu], em três áreas de Floresta Ombrófila Densa [Parque Estadual (P.E.) Carlos Botelho, P.E. da Serra do Mar núcleo Picinguaba e P.E. da Serra do Mar núcleo Santa Virgínia], em duas áreas de Floresta Estacional Semidecidual (E.E. Caetetus e P.E. Morro do Diabo) e em

dois ecótonos entre o Cerrado e a Floresta Estacional Semidecidual ( P.E. de Porto Ferreira e E.E. de Mogi-Guaçu). Em cada uma destas localidades, 12 indivíduos foram amostrados, totalizando 108 amostras. O horário da coleta de cada amostra foi anotada, bem como outras variáveis observadas (insolação, data da última chuva, fenologia, etc.).

### Preparo das amostras

Dois tipos de amostras foram utilizados para as análises químicas: 1. amostras coletadas no campo; 2. amostras coletadas em estacas obtidas no campo, enraizadas e cultivadas por um ano em casa de vegetação. Enquanto as amostras do tipo 1 visaram a comparação do perfil de casearinas produzidas por indivíduos de diferentes populações (sujeitos à influência do ambiente), as amostras do tipo 2 visaram comparar a produção de casearinas por diferentes genótipos (oriundos de indivíduos de diferentes populações) cultivados em um mesmo ambiente. Além disso, todos os indivíduos do tipo 2 amostrados possuem uma amostra do tipo 1, o que permite comparar os padrões de casearinas obtidos no campo e na casa de vegetação, para o mesmo genótipo.

As amostras do tipo 1 foram coletadas durante as expedições de amostragem do material para as análises genéticas, no ano de 2006. No campo, uma amostra de aproximadamente 10 folhas do terço médio de ramos maduros foi imediatamente armazenada em envelope de papel pardo e acondicionada em embalagem plástica contendo sílica gel, sendo a hora da coleta de cada amostra anotada. As amostras permaneceram armazenadas em presença de sílica-gel. Foram selecionados ao acaso 12 indivíduos de cada população para análise por CLAE-DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV com arranjo de diodos), totalizando 108 amostras.

Para o preparo das amostras do tipo 2, foi também coletado, na mesma ocasião, um feixe de estacas de cada indivíduo amostrado. Estas estacas foram

parcialmente desfolhadas e armazenadas em caixa de isopor contendo gelo-gel. A caixa foi fechada até sua abertura no laboratório, onde se deu a continuidade ao tratamento. No laboratório, cada estaca foi preparada de modo a possuir aproximadamente cinco folhas e dois entrenós. As estacas foram mergulhadas em solução de ácido indol-butírico (AIB) a 90 ppm durante 24 horas. Após este período, as estacas foram plantadas em bandejas de isopor contendo vermiculita. Tais condições para enraizamento foram estabelecidas experimentalmente conforme descrito no por Cavallari et al. (submetido).

As bandejas foram mantidas em casa de vegetação, protegidas por sombrite 50%, sendo irrigadas por microaspersão durante 1 minuto a cada 50 minutos. Duas vezes por semana as estacas foram irrigadas com solução nutritiva contendo macro e micronutrientes. Em fevereiro de 2007, as estacas foram transplantadas para vasos individuais de volume de 4,5 litros, contendo substrato preparado com terra, areia e esterco (3:1:1). Cada estaca teve seu número anotado em plaqueta plástica, amarrada junto ao colo da estaca. Os vasos contendo as estacas foram mantidos em casa de vegetação do Departamento de Genética, IBB, UNESP, Botucatu, que possui sistema de aspersão automática. Ao longo do ano de 2007 foram realizados trabalhos de manutenção tais como: retirada de ervas daninhas dos vasos, adubação com NPK 4-14-08 a cada dois meses.

Em março de 2008, isto é, um ano após o transplante, foram coletadas folhas do terço médio de ramos maduros das estacas. No decorrer do ano de 2007 muitas estacas morreram, tendo restado apenas 46. Todas estas plantas foram utilizadas para as análises químicas, embora nem todas as populações estejam representadas.

Todas as 154 amostras (108 + 46) foram secas em estufa a 38°C por 12 horas antes do início das atividades laboratoriais para extração de casearinas. Em seguida, foram moídas individualmente em um processador de alimentos, peneiradas e

armazenadas em frascos de vidro devidamente etiquetados. De cada amostra pesou-se 100 mg, colocados em microtubos plásticos de 1,5 ml também devidamente etiquetados. Cada amostra foi preparada em duplicata, totalizando 308 amostras a serem analisadas por CLAE-DAD.

As amostras selecionadas para a análise química são listadas na Tabela 1, onde constam informações sobre a população de origem e a variedade de cada indivíduo (determinada visualmente com base nas características morfológicas descritas por Sleumer, 1980).

#### **Extração de casearinas**

As casearinas de cada amostra foram extraídas a partir dos 100 mg de folhas secas previamente alíquotados em cada microtubo. O método de extração utilizado é específico para a obtenção de casearinas, e foi desenvolvido pela equipe do Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro, Depto. de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara. Apesar de não ter sido ainda publicado (publicação em preparação), o método já está bem estabelecido e validado, e todos os testes que medem e comprovam sua eficiência já foram realizados pela equipe (por exemplo, curva de calibração para uma casearina conhecida, avaliação de repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação). O procedimento é descrito a seguir:

A cada 100 mg de tecido desidratado moído, foram adicionados 1.500 µL de solução de Hexano, Acetato de Etila e Isopropanol nas proporções de 08:91:01. Essa mistura extratora foi previamente saturada com NH<sub>4</sub>OH. Três amostras controle foram feitas sem material vegetal, servindo de controles negativos (ou brancos). Entre as duas repetições de cada amostra, uma recebeu 0,05 mg/mL caseargrewiina F hidrolisada (Vhb), para servir de padrão interno de cada amostra, e permitindo a comparação entre diferentes amostras. O padrão interno não foi utilizado nas duas repetições de cada amostra, pois era necessário também obter os resultados sem a Vhb: seu pico poderia

coincidir com o pico de uma casearina da amostra, mascarando um eventual composto produzido pela planta.

As amostras foram deixadas por 1 h em ultra-som, sendo então centrifugadas a 9.000 rpm por 10 minutos. Quinhentos microlitros do sobrenadante foram então alíquotados para um frasco de vidro de 1,8 mL. As amostras foram deixadas secar ao ar ou em bomba a vácuo. Depois de secas, foram ressuspensas com 350 µL de metanol 98%. Após a ressuspensão, todo o volume (350 µL) foi submetido à extração em fase sólida (EFS) em cartucho Strata C18-E (*Phenomenex*), o qual recebeu em seguida três alíquotas de 350 µL de metanol 98%. Todo o volume (4 x 350 µL) foi recolhido em frascos de 1,5 mL e diretamente analisado por CLAE-DAD.

#### **Análise por CLAE-DAD**

O método de análise foi também estabelecido e validado pela equipe do Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro. Vinte microlitros da amostra, preparada como descrito acima, foram injetados no cromatógrafo. Os cromatogramas foram obtidos em coluna *Phenomenex Gemini C18 110 A* (250 x 4,6 mm, 5 µm), eluída no modo gradiente com ácido acético 0,01% em água (A), metanol (B) e acetonitrila (C), a uma vazão de 0,6 mL/min. As concentrações de A, B e C variaram de acordo com o tempo decorrido, iniciando com A:B:C 34:22:44 e chegando a A:B:C 00:47:53 (v/v) em 42 minutos, permanecendo nesta condição final por 10 minutos e retornando à condição inicial em três minutos. O tempo de equilíbrio foi de 15 minutos. Assim, cada amostra foi analisada em um tempo total de 70 minutos. Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) *Varian ProStar* configurado com uma bomba ternária modelo 240, injetor automático modelo 410 e detector UV/Vis com arranjo de diodos modelo 330. Os dados foram recolhidos pelo programa computacional *Star* (*Varian*). Os cromatogramas foram analisados visualmente, e foi feita uma comparação

entre os cromatogramas obtidos entre e dentro de populações, e entre amostras obtidas no campo e em casa de vegetação para o mesmo indivíduo (quando aplicável). Neste estudo comparativo, foram observados apenas os picos de maior intensidade (maior do que 100 mAU).

#### **RESULTADOS**

Como esperado, os controles negativos não apresentaram nenhum pico significativo (Figura 1).

De modo geral os cromatogramas obtidos para as repetições são similares. Nos casos em que se mostraram muito discrepantes, uma terceira repetição foi realizada. Os cromatogramas apresentam, além de picos para as casearinas, picos que, de acordo com seu espectro obtido no ultra-violeta, são de flavonóides (a esquerda do cromatograma, com tempos de retenção menores que 8 minutos). No entanto, uma análise detalhada destes flavonóides necessitaria de um método de extração e análise exclusivos. De maneira grosseira, porém, a produção dos prováveis flavonóides pôde também ser comparada entre as amostras, em função da área relativa total obtida para os picos eluídos entre 3 e 8 minutos.

Foi verificada uma grande diversidade de casearinas, tanto entre amostras quanto dentro da mesma amostra. A identificação destes picos como sendo de casearinas foi feita com base em seu espectro no ultra-violeta e em dados da literatura. Os principais resultados que emergem desta análise são:

1. Algumas amostras possuem mais de 10 picos diferentes de casearinas, indicando grande diversidade de moléculas produzidas pela mesma planta; em outras amostras, observa-se somente um ou dois picos majoritários (Figura 2 e ANEXOS).

2. Numa mesma amostra, a intensidade dos picos de casearina varia muito, sendo em alguns casos, algumas moléculas destacadamente majoritárias (Figura 2 e ANEXOS).

3. Foi detectada grande variabilidade tanto com relação às casearinas produzidas quanto com relação à intensidade (quantidade) de cada uma delas (Figura 2 e ANEXOS).

4. É possível, porém, observar um perfil típico para cada população (ver ANEXOS). De modo geral os diferentes indivíduos de uma mesma população produziram perfis cromatográficos similares, porém diferentes dos cromatogramas produzidos por indivíduos de outras populações. Por exemplo, as amostras da Ilha Anchieta produziram cromatogramas onde há apenas um pico majoritário, enquanto a população de Carlos Botelho já apresenta uma maior diversidade de picos. A população do Morro do Diabo apresenta, além de grande diversidade, as maiores intensidades de picos. Na Figura 2 é mostrado o perfil de uma amostra representativa de cada população. NoS ANEXOS são apresentados os cromatogramas de todos os indivíduos analisados, agrupados por população. Os ANEXOS podem ser diretamente comparadas, uma vez que a escala é a mesma (todos os cromatogramas são apresentados com os valores máximos de 500 mAU no eixo das ordenadas e 53 minutos no eixo das abscissas).

5. Os perfis da variedade *lingua* diferem marcadamente daqueles obtidos com a variedade *sylvestris*, tanto em relação às casearinas quanto em relação aos flavonóides. Isto fica evidente na população de Assis: os únicos 2 indivíduos da variedade *sylvestris* apresentam perfis cromatográficos semelhantes aos de indivíduos da variedade *sylvestris* de outras populações, diferindo dos indivíduos da variedade *lingua* amostrados na mesma população (Figura 3).

6. Em alguns casos, os indivíduos amostrados no campo e cultivados em casa de vegetação (isto é, amostras do tipo 1 e 2 para um mesmo indivíduo) produziram perfis cromatográficos muito semelhantes (ANEXO 11, indivíduos do Parque Estadual do Morro do Diabo); no entanto, isto nem sempre foi observado,

sendo que em alguns casos há grandes diferenças (por exemplo, nos indivíduos de Santa Virgínia, ANEXO 4).

7. Os diferentes indivíduos cultivados em casa de vegetação produziram diferentes perfis cromatográficos (Figura 4). Não há um perfil cromatográfico padrão para todas as amostras cultivadas em casa de vegetação.

## DISCUSSÃO

Foi detectada grande diversidade de casearinas dentro de cada amostra. Isto já havia sido observada por Tininis (2006) em amostras de folhas de indivíduos de *C. sylvestris* coletadas no Parque Estadual de Carlos Botelho.

O presente trabalho, porém, analisou um número maior de indivíduos, de diferentes localidades, revelando perfis cromatográficos bastante variáveis entre amostras. Trata-se, provavelmente, da maior amostragem e análise de casearinas já realizada. Foi possível observar perfis bastante diferenciados daqueles observados por Tininis (2006).

Durante as coletas, os indivíduos foram amostrados ao longo de trilhas nas Unidades de Conservação. Por este motivo, cada amostra foi coletada em um horário do dia. Além disso, dentro de cada população, foram observadas diferenças ambientais. Por exemplo, no P.E. de Carlos Botelho coletou-se em clareira, em mata primária densa, e em pasto. No P.E. do Morro do Diabo, coletou-se em mata densa, à beira do Rio Paranapanema (locais úmidos) e também no topo do morro, local bastante seco onde os indivíduos de *C. sylvestris* estavam murchos. Todos estes fatores podem ter influencia na produção quantitativa e qualitativa de casearinas. No entanto, observando-se as 12 amostras de cada população não foi possível atribuir nenhum padrão a nenhuma condição ambiental ou horário de coleta. Além disso, de maneira geral, as 12 amostras de cada população são normalmente bastante semelhantes entre si (ver ANEXOS), exceto nos casos de Mogi-Guaçu, Caetetus, Porto Ferreira e Assis (no caso

de Assis, as diferenças observadas devem-se às diferentes variedades amostradas).

Entre as localidades de amostragem há também grandes diferenças ambientais (por exemplo, Cerrado  $\times$  Mata Atlântica). Além desta variação ambiental, as coletas foram realizadas ao longo do ano, implicando em variação sazonal e fenológica. A coleta na Ilha Anchieta foi realizada em plena estação chuvosa, enquanto que na Estação Ecológica de Caetetus, na ocasião da coleta, fazia mais de dois meses que não chovia na região. Na Estação Ecológica de Mogi-Guaçu, a maioria das plantas estava frutificando, enquanto que na Floresta Estadual de Botucatu, todas as plantas estavam com botões florais. Todas estas diferenças podem, teoricamente, ocasionar diferenças na produção de casearinas e podem ser, em parte, responsáveis pelas diferenças observadas entre as amostras de diferentes populações. Em outras palavras, não é possível atribuir aos ecossistemas as diferenças observadas entre amostras de diferentes localidades, pois estas podem ser devido às variações sazonais e fenológicas intrínsecas ao procedimento de amostragem.

No entanto, as amostras obtidas das estacas cultivadas por um ano em casa de vegetação sugerem que as diferenças observadas entre as populações são devidas em grande parte aos diferentes genótipos que nelas ocorrem, mais do que às diferenças ambientais, fenológicas ou sazonais. Isto por que os perfis cromatográficos obtidos para amostras de estacas foram, em muitos casos, muito semelhantes aos perfis obtidos para as amostras coletadas no campo, para um mesmo indivíduo. Uma vez que as condições da casa de vegetação não correspondem às condições de campo, sejam estas ambientais, fenológicas ou sazonais, se tais condições fossem realmente determinantes da produção de casearinas, esperar-se-ia observar diferenças nos perfis cromatográficos obtidos para um mesmo indivíduo em amostras do campo e cultivadas, o que não foi observado na maioria dos casos.

Além disso, e não menos importante, o longo tempo de cultivo no ambiente homogêneo da casa de vegetação (mesmo solo, irrigação, temperatura, sazonalidade) não foi suficiente para resultar em perfis cromatográficos homogêneos entre as amostras de diferentes localidades. Isto é, cada amostra da casa de vegetação produziu perfis cromatográficos mais similares às demais amostras da mesma localidade obtidas diretamente no campo do que às demais amostras da casa de vegetação oriundas de diferentes localidades, sugerindo, preliminarmente, relativamente pouca influência do ambiente na produção de casearinas.

Deve-se ter em mente, porém, que mesmo que os genótipos tenham maior importância na produção de casearinas do que o ambiente, os mesmos genótipos já foram, por sua vez, selecionados pelo ambiente. Em outras palavras, o ambiente pode determinar a produção de casearinas de duas maneiras: 1. selecionando, ao longo de gerações, indivíduos que produzem um determinado conjunto de casearinas que possuem maior valor adaptativo naquele ambiente (fatores demográficos estocásticos podem participar desta seleção, e, neste caso, não necessariamente as casearinas de maior valor adaptativo seriam selecionadas) e 2. influenciando a expressão gênica, dado um determinado genótipo. As duas situações certamente ocorrem e estudos mais aprofundados são necessários, tais como transplantes recíprocos (intercâmbio de genótipos entre ambientes e observação de sua produção química) e estudos de norma de reação (mesmo genótipo cultivado em diversos ambientes). Os resultados sugerem, preliminarmente, que o ambiente, sozinho, não é capaz de alterar a produção de casearinas por um determinado genótipo; ao contrário, o genótipo parece ter grande importância para a determinação das casearinas que são produzidas, devendo existir uma norma de reação para explicar os resultados da interação genótipo  $\times$  ambiente na produção de casearinas.

Com relação à diferença entre variedades, as mesmas observações

podem ser feitas, ainda que nenhum exemplar da variedade *lingua* tenha sobrevivido ao processo de enraizamento de estacas, não se dispondo, desta forma, de amostras obtidas em casa de vegetação para esta variedade. Porém, de modo geral, os perfis cromatográficos diferem grandemente entre as variedades. Na variedade *lingua*, há uma maior expressão de flavonóides, uma menor expressão de casearinas e uma tendência à produção de picos de casearina mais intensos em tempos de retenção maiores (maior do que 40 minutos), sobretudo na população de Botucatu. A propósito, o pico com tempo de retenção de 35 minutos parece ser exclusivo desta variedade, ocorrendo com frequência nas amostras de Botucatu e raramente nas amostras de Assis.

Ainda com relação aos perfis cromatográficos de cada variedade, a população de Assis fornece um caso interessante: os perfis da variedade *lingua* e os perfis da variedade *sylvestris* amostradas nesta localidade diferem drasticamente. Enquanto os primeiros são semelhantes àqueles obtidos a partir de amostras da variedade *lingua* em Botucatu, os últimos são semelhantes aos perfis de amostras da variedade *sylvestris* da Mata Atlântica (por exemplo, de Carlos Botelho).

Os cromatogramas obtidos abriram perspectivas para estudos mais detalhados em *C. sylvestris*. Com relação às casearinas, estas podem ser estudadas mais detalhadamente (por exemplo, pode ser feita uma análise biométrica dos diversos picos obtidos, levando-se em consideração também os picos de menor intensidade). Uma vez que foi observada diversidade entre as amostras com relação aos flavonóides, um estudo destes metabólitos em *C. sylvestris* poderá produzir resultados bastante interessantes. Para tal, é preciso estabelecer um método de extração e análise que permita uma melhor visualização dos picos destes compostos. Um estudo conjunto de terpenos (casearinas) e flavonóides poderá eventualmente revelar estratégias de produção de metabólitos secundários adotadas pelas plantas em diferentes

ambientes, evidenciando padrões de investimento em uma ou outra rota metabólica em determinada condição.

Seria válido ainda investigar a utilidade das casearinas para as plantas. Por serem terpenos, estão provavelmente relacionados com a defesa da planta contra patógenos e/ou herbívoros (Cheng et al., 2007). Mas qual seria a função exata de cada uma das diversas casearinas produzidas pela planta? Teriam todas elas mais ou menos a mesma função, ou seriam elas respostas de defesa específicas para diferentes agressões?

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANDEIRA, K. F. **Otimização e comparação de metodologias de extração de casearinas em *Casearia sylvestris***. Araraquara, 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.
- CAVALLARI, M.M.; MING, L.C.; GIMENES, M.A.; MORETTI, E.H.; PARON, M.E. Enraizamento de estacas de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) tratadas com ácido indolbutírico. **Acta Botânica Brasílica** (submetido).
- CARVALHO, P.R.F.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. *et al.* Acetylated DNA-Damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v.49, p.1659 - 1662, 1998.
- CHENG, A.X.; LOU, Y.G.; MAO, Y.B. *et al.* Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.49, p.179–186, 2007.
- FERREIRA, P.M.P. **Determinação do potencial antitumoral de terpenos isolados das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz**. Fortaleza, 2006. 116 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2006.
- FREITAS, M.S.M; MARTINS, M.A.; VIEIRA, I.J.C. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de

- fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.887-894, 2004.
- ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; OBATA, E.. Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. **Chem. Pharm. Bull.**, v.36, p.1585-88, 1988.
- ITOKAWA, H., *et al.* Isolation of diterpenes as antitumor agents from plants. **Patente** Japão: Kokai Tokyo Koho-01; 149, 779: 6pp. 1989.
- ITOKAWA, H., TOTSUKA, N., MORITA, H *et al.* New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chemical and Pharmacological Bulletin**, v.38, p.3384-88, 1990.
- MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E.P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chem. Pharm. Bull.** v.39, p. 693-97.. 1991.
- SANTOS, A. G.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Química Nova**, v. 30, n. 30, p. 1100-1103, 2007.
- SANTOS, A. G. **Desenvolvimento de metodologia para a análise de variabilidade intraespecífica e dinâmica de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae).** Araraquara, 2001. 120 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.
- SANTOS, A.G. **Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de *Casearia sylvestris*: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico.** Araraquara, 2008. 174 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.
- SILVA, M. A. S., MING, L. C., PEREIRA, A. M. S., Bertoni, B. W., Batistini, A. P., Pereira, P.S.. Phytochemical and genetic variability of *Casearia sylvestris* Sw. from São Paulo State Atlantic Forest and Cerrado populations. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.159-166, 2006.
- SILVA, M.A.S. **Variabilidade genética e fitoquímica de *Casearia sylvestris* Sw. em populações do cerrado e mata atlântica do Estado de São Paulo.** Botucatu, 2003. 110p. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
- SLEUMER, H.O. **Flora Neotropica Monograph n.22 (FLACOURTIACEAE).** New York: The New York Botanical Garden, 1980. 499 p.
- TININIS, A. G. **Desenvolvimento, otimização, validação e utilização de métodos de extração e análise de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw.** Araraquara, 2006. 182 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.

Tabela 1. Informações sobre a população de origem e a variedade de cada indivíduo utilizado na análise de diversidade química. Indivíduos em negrito foram analisados com amostras do tipo 1 e 2 (campo e casa de vegetação).

Amostra	População de Origem	Variedade	Amostra	População de Origem	Variedade
<b>Cs_024</b>	Ilha Anchieta	<i>sylvestris</i>	<b>Cs_245</b>	Carlos Botelho	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_026</b>	Ilha Anchieta	<i>sylvestris</i>	<b>Cs_247</b>	Carlos Botelho	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_027</b>	Ilha Anchieta	<i>sylvestris</i>	Cs_250	Carlos Botelho	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_030</b>	Ilha Anchieta	<i>sylvestris</i>	<b>Cs_254</b>	Carlos Botelho	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_036</b>	Ilha Anchieta	<i>sylvestris</i>	Cs_258	Carlos Botelho	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_037</b>	Ilha Anchieta	<i>sylvestris</i>	Cs_269	Carlos Botelho	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_040</b>	Ilha Anchieta	<i>sylvestris</i>	Cs_274	Caetetus	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_042</b>	Ilha Anchieta	<i>sylvestris</i>	Cs_279	Caetetus	<i>sylvestris</i>
Cs_043	Ilha Anchieta	<i>sylvestris</i>	Cs_282	Caetetus	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_046</b>	Ilha Anchieta	<i>sylvestris</i>	Cs_284	Caetetus	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_049</b>	Ilha Anchieta	<i>sylvestris</i>	<b>Cs_285</b>	Caetetus	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_054</b>	Ilha Anchieta	<i>sylvestris</i>	Cs_288	Caetetus	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_076</b>	Morro do Diabo	<i>sylvestris</i>	Cs_291	Caetetus	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_078</b>	Morro do Diabo	<i>sylvestris</i>	Cs_301	Caetetus	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_079</b>	Morro do Diabo	<i>sylvestris</i>	Cs_302	Caetetus	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_094</b>	Morro do Diabo	<i>sylvestris</i>	Cs_304	Caetetus	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_096</b>	Morro do Diabo	<i>sylvestris</i>	Cs_312	Caetetus	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_106</b>	Morro do Diabo	<i>sylvestris</i>	Cs_315	Caetetus	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_109</b>	Morro do Diabo	<i>sylvestris</i>	Cs_320	Assis	<i>lingua</i>
<b>Cs_111</b>	Morro do Diabo	<i>sylvestris</i>	Cs_325	Assis	<i>lingua</i>
<b>Cs_119</b>	Morro do Diabo	<i>sylvestris</i>	Cs_326	Assis	<i>lingua</i>
<b>Cs_124</b>	Morro do Diabo	<i>sylvestris</i>	Cs_331	Assis	<i>lingua</i>
<b>Cs_126</b>	Morro do Diabo	<i>sylvestris</i>	Cs_332	Assis	<i>lingua</i>
<b>Cs_128</b>	Morro do Diabo	<i>sylvestris</i>	Cs_342	Assis	<i>lingua</i>
Cs_130	Botucatu	<i>lingua</i>	<b>Cs_344</b>	Assis	indeterminada
Cs_132	Botucatu	<i>lingua</i>	<b>Cs_345</b>	Assis	<i>sylvestris</i>
Cs_138	Botucatu	<i>lingua</i>	<b>Cs_347</b>	Assis	<i>sylvestris</i>
Cs_140	Botucatu	<i>lingua</i>	Cs_350	Assis	<i>lingua</i>
Cs_142	Botucatu	<i>lingua</i>	Cs_359	Assis	<i>lingua</i>
Cs_144	Botucatu	<i>lingua</i>	Cs_364	Assis	<i>lingua</i>
Cs_145	Botucatu	<i>lingua</i>	<b>Cs_374</b>	Mogi-Guaçu	indeterminada
Cs_146	Botucatu	<i>lingua</i>	<b>Cs_384</b>	Mogi-Guaçu	indeterminada
Cs_148	Botucatu	<i>lingua</i>	Cs_397	Mogi-Guaçu	<i>sylvestris</i>
Cs_154	Botucatu	<i>lingua</i>	<b>Cs_398</b>	Mogi-Guaçu	<i>sylvestris</i>
Cs_160	Botucatu	<i>lingua</i>	<b>Cs_400</b>	Mogi-Guaçu	<i>sylvestris</i>
Cs_164	Botucatu	<i>lingua</i>	<b>Cs_402</b>	Mogi-Guaçu	<i>sylvestris</i>
Cs_169	Santa Virgínia	<i>sylvestris</i>	<b>Cs_404</b>	Mogi-Guaçu	<i>sylvestris</i>
<b>Cs_172</b>	Santa Virgínia	<i>sylvestris</i>	<b>Cs_406</b>	Mogi-Guaçu	indeterminada
Cs_173	Santa Virgínia	<i>sylvestris</i>	<b>Cs_408</b>	Mogi-Guaçu	<i>sylvestris</i>
Cs_181	Santa Virgínia	<i>sylvestris</i>	<b>Cs_409</b>	Mogi-Guaçu	indeterminada
<b>Cs_183</b>	Santa Virgínia	<i>sylvestris</i>	<b>Cs_413</b>	Mogi-Guaçu	indeterminada
<b>Cs_185</b>	Santa Virgínia	<i>sylvestris</i>	<b>Cs_416</b>	Mogi-Guaçu	indeterminada
Cs_199	Santa Virgínia	<i>sylvestris</i>	Cs_435	Porto Ferreira	<i>lingua</i>
Cs_200	Santa Virgínia	<i>sylvestris</i>	Cs_440	Porto Ferreira	<i>sylvestris</i>
Cs_202	Santa Virgínia	<i>sylvestris</i>	Cs_443	Porto Ferreira	<i>sylvestris</i>
Cs_206	Santa Virgínia	<i>sylvestris</i>	Cs_448	Porto Ferreira	<i>sylvestris</i>
Cs_209	Santa Virgínia	<i>sylvestris</i>	Cs_452	Porto Ferreira	<i>sylvestris</i>
Cs_215	Santa Virgínia	<i>sylvestris</i>	Cs_456	Porto Ferreira	<i>sylvestris</i>
Cs_218	Carlos Botelho	<i>sylvestris</i>	Cs_460	Porto Ferreira	indeterminada
Cs_219	Carlos Botelho	<i>sylvestris</i>	Cs_463	Porto Ferreira	<i>lingua</i>
Cs_222	Carlos Botelho	<i>sylvestris</i>	Cs_465	Porto Ferreira	indeterminada
<b>Cs_229</b>	Carlos Botelho	<i>sylvestris</i>	Cs_469	Porto Ferreira	<i>lingua</i>
Cs_235	Carlos Botelho	<i>sylvestris</i>	Cs_472	Porto Ferreira	<i>sylvestris</i>
Cs_240	Carlos Botelho	<i>sylvestris</i>	Cs_473	Porto Ferreira	<i>lingua</i>

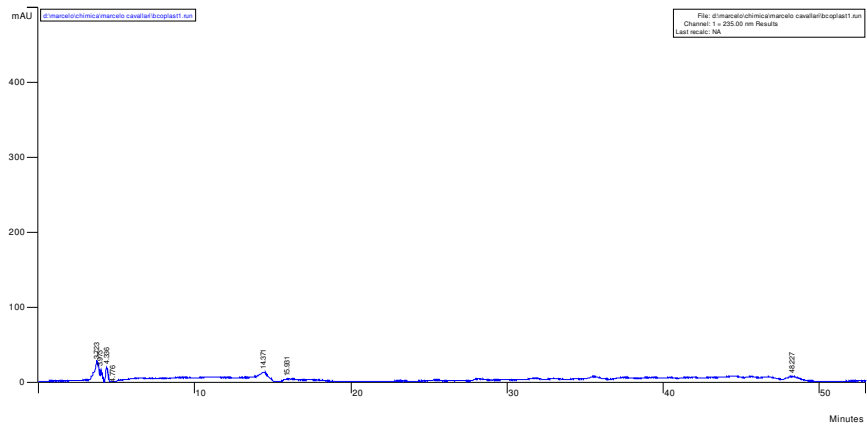


Figura 1. Controle negativo para as extrações de casearina. Não há nenhum pico significativo.

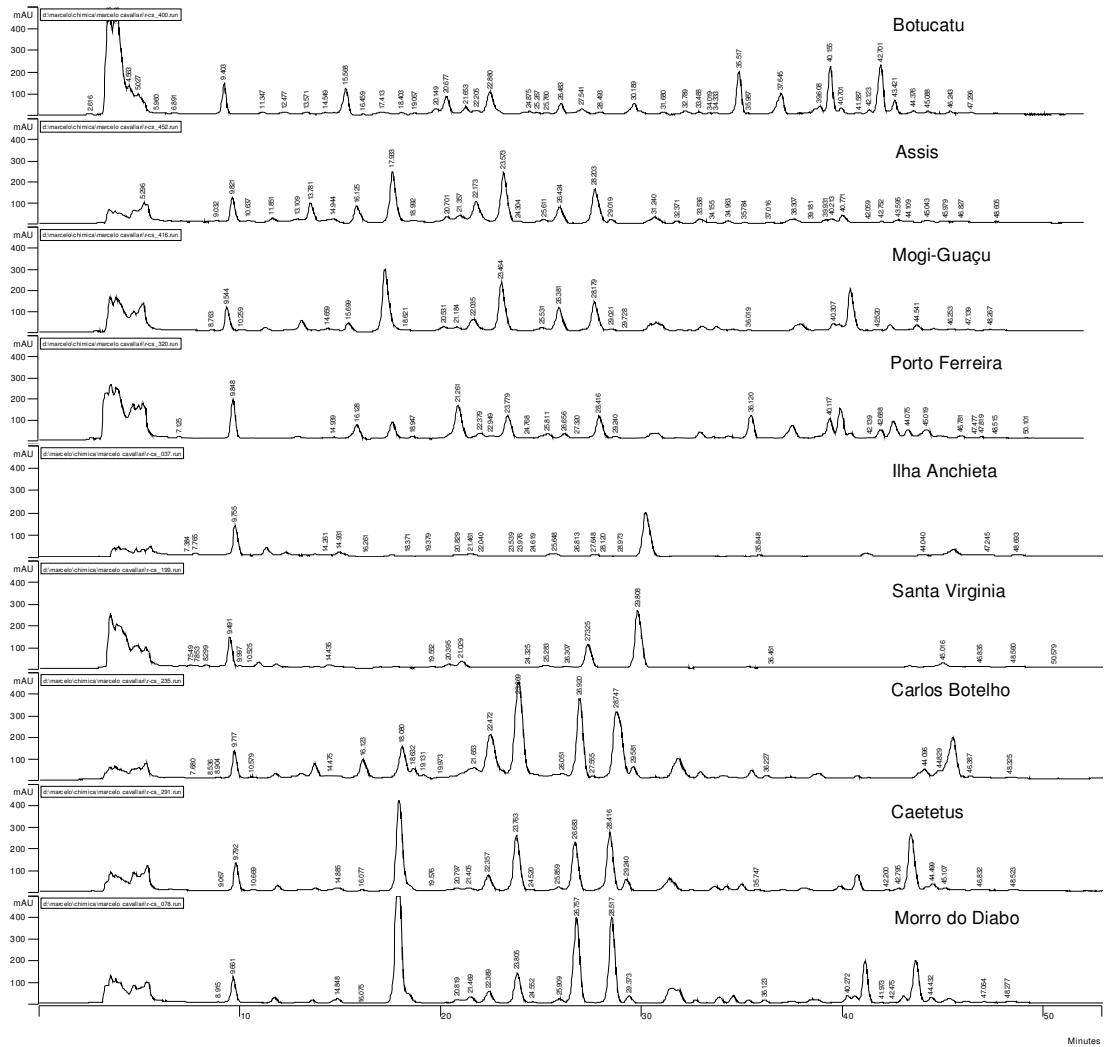


Figura 2. Perfis cromatográficos de 9 indivíduos, representando as 9 populações amostradas. O pico observado em aproximadamente 10 minutos é o padrão interno (Vhb, caseargrewiina F hidrolisada).

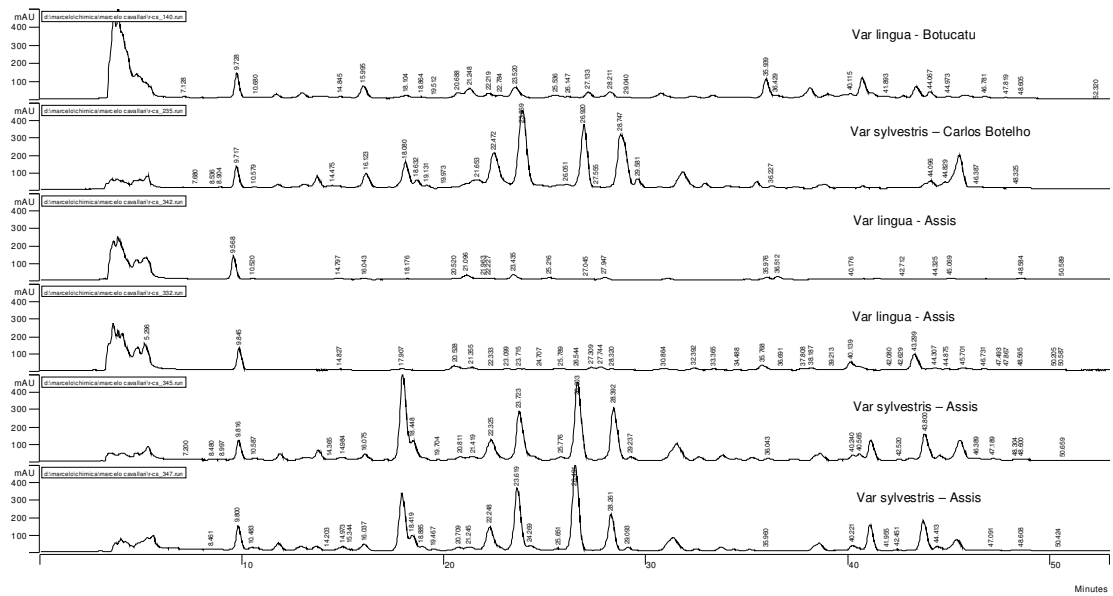


Figura 3. Comparação entre os perfis cromatográficos de amostras da var. *lingua* e var. *sylvestris* na população de Assis e em comparação com amostras de Botucatu (var. *lingua*) e Carlos Botelho (var. *sylvestris*). Os flavonóides aparecem agrupados à esquerda, com tempos de retenção menores do que 8 minutos.

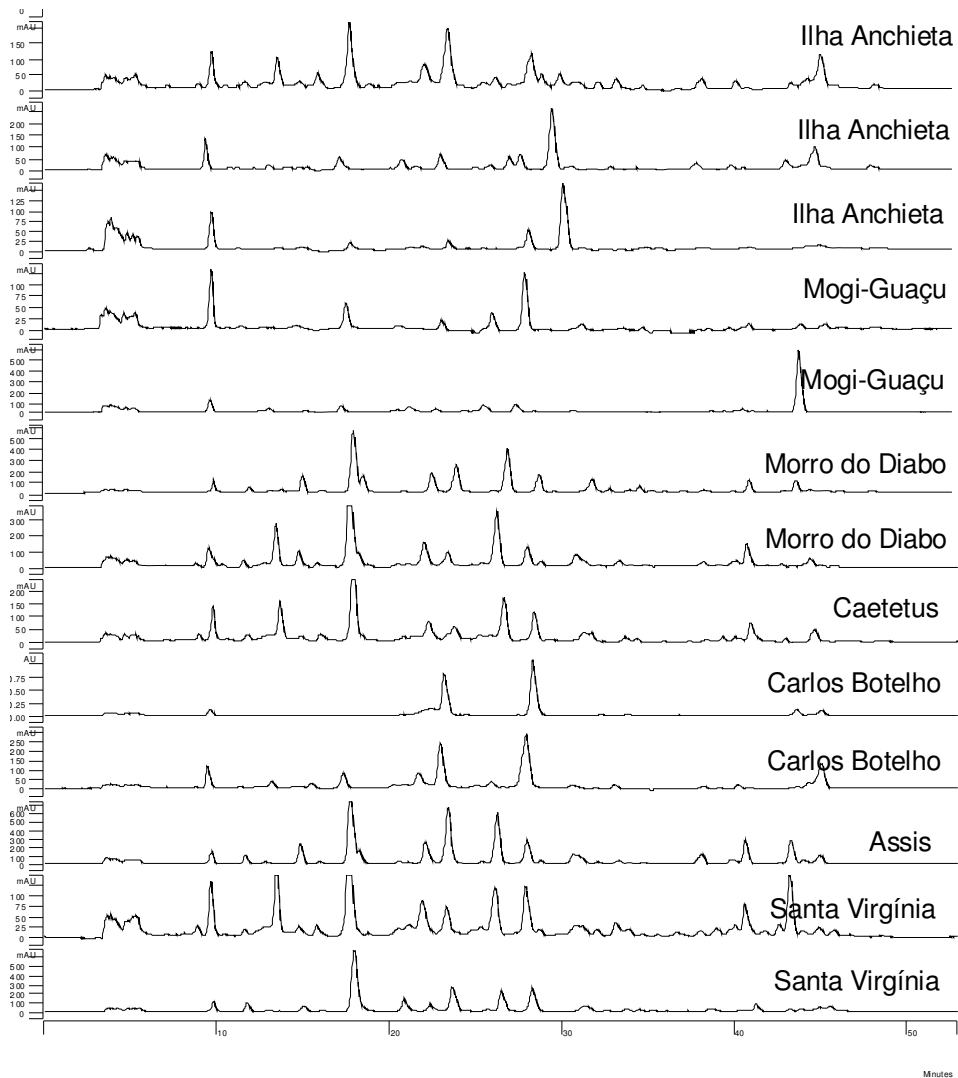


Figura 4. Comparação entre os cromatogramas obtidos para os indivíduos de *Casearia sylvestris* oriundos de diferentes localidades e amostrados após um ano de cultivo em casa de vegetação. Da esquerda para a direita nos cromatogramas, observam-se os flavonóides, o padrão interno (caseargwiina F hidrolisada) e os picos de casearina.

## CONCLUSÕES

A presente pesquisa revelou importantes aspectos da diversidade genética e química entre e dentro de populações de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). Tais aspectos são de grande importância para a conservação e exploração racional desta espécie, além da importância como contribuição ao estudo da sistemática infra-específica de *C. sylvestris* e à compreensão dos mecanismos e padrões de evolução em espécies arbóreas neotropicais de modo geral. Este trabalho fornece informações úteis para a realização de pesquisas científicas, projetos de pré-melhoramento ou de conservação que visem amostrar a diversidade química e genética de *C. sylvestris*.

Com relação à contribuição deste trabalho para a conservação *in-situ* e *ex-situ* da espécie *C. sylvestris*, bem como para programas de pré-melhoramento visando à produção de casearinas ou à captação e conservação de recursos genéticos, ou ainda para o direcionamento de estudos fitoquímicos, é relevante:

- a constatação de que as populações que abrigam as duas variedades (ecótonos e Assis) abrigam maior diversidade genética do que as demais populações, mesmo considerando-se apenas a variedade majoritária;
- a constatação de que a população de Botucatu apresenta baixos níveis de diversidade genética, devido, provavelmente, à sua fundação recente por poucos colonizadores;
- a constatação de que a maior parte da diversidade genética encontra-se dentro de cada população;
- a constatação de que cada variedade e cada um dos diferentes ecossistemas devem ser considerados como repositórios de diversidade genética e química;

- a constatação de que existe grande diversidade química entre as diferentes populações, ecossistemas e variedades;

- a constatação de que o ambiente, sozinho, não é capaz de alterar a produção de casearinas dado um determinado genótipo; ao contrário, o genótipo parece ter grande importância para a determinação das casearinas que são produzidas, devendo existir uma norma de reação para sua produção;

- a constatação de que a população do P. E. Morro do Diabo possui a maior diversidade e os maiores teores de casearina observados;

- a disponibilização de marcadores moleculares específicos para *C. sylvestris*, que permitem estudos populacionais bem como a caracterização de futuros bancos de germoplasma da espécie;

- a necessidade de progresso na área de horticultura, dada a difícil propagação vegetativa desta espécie;

Com relação à contribuição deste trabalho ao direcionamento de estudos farmacológicos em *C. sylvestris*, além dos já citados acima, é relevante evidenciar a necessidade de se fazer referência à variedade utilizada em ensaios biológicos e estudos químicos e farmacológicos de modo geral, bem como ao local de origem da amostra, devido às diferenças na composição química que estas variáveis encerram.

Com relação aos aspectos evolutivos e de contribuição ao estudo da sistemática infra-específica de *C. sylvestris* evidenciados por este trabalho, é relevante:

- a verificação de que as variedades propostas por Sleumer (1980) comportam-se como unidades evolutivas distintas, que trocam informação genética apenas em algumas zonas de contato;

- a verificação da existência de diferenças genéticas significativas entre as variedades;

- a verificação da existência de zonas híbridas entre as duas variedades;

- o levantamento da hipótese de existência de forças evolutivas que mantém as variedades relativamente separadas;

- a observação (preliminar) de assincronia de florescimento entre as variedades, mesmo ocorrendo na mesma localidade;

- a constatação de que os diferentes ecossistemas estudados estão relativamente isolados uns dos outros, e de que os processos demográficos estocásticos que ocorrem em cada um destes ecossistemas é independente dos processos que ocorrem nos demais ecossistemas;

- a sugestão de que a espécie é preferencialmente alógama;

- a verificação de uma possível duplicação parcial do genoma da espécie, abrindo perspectivas para estudos adicionais neste sentido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. **Antitumor and anti-inflammatory effects of extract from *Casearia sylvestris*: comparative study with Piroxicam and Meloxicam.** São Paulo, 1999. Dissertação (doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- APG II: An update of the AngiospermPhylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.
- ARRUDA, V.L.V.; SAZIMA, M. Flores visitadas por sirfídeos (Diptera: Syrphidae) em mata mesófila de Campinas, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, v.19, p.109-117, 1996.
- AZUMA, T.; KAJITA, T.; YOKOYAMA, J. et al. phylogenetic relationships of *Salix* (Salicaceae) based on *rbcl* sequence data. **American Journal of Botany**, v.87, p. 67-75, 2000.
- BAHLO, M.; GRIFFITHS, R.C. Inference from gene trees in a subdivided population. **Theoretical Population Biology**, v.57, p.79-95, 2000.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with population structuring and microsatellites. **Molecular Ecology**, v.11, p.155-165, 2002.
- BALUNAS, M.J.; JONES, W.P.; CHIN, Y.W. et al. Relationships between inhibitory activity against a cancer cell line panel, profiles of plants collected, and compound classes isolated in an anticancer drug discovery project. **Chemistry and Biodiversity**, v.8, p.897-915, 2006

- BANDEIRA, K. F. **Otimização e comparação de metodologias de extração de casearinas em *Casearia sylvestris***. Araraquara, 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.
- BARBARA, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G. et al. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 3759-3767, 2007.
- BARBOSA, A.A.A. **Biologia reprodutiva de uma comunidade de campo sujo, Uberlândia/MG**. Campinas, 1997. 202 f. Tese (Doutorado). Instituto de Biologia, Universidade de Campinas.
- BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; AZZOLINI, C. A pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of ethnopharmacology**, v.30, p.185-97, 1990.
- BAWA, K.S. Breeding system of tree species of a lowland tropical community. **Evolution**, v. 28, p. 85-92, 1974.
- BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. **Proc Natl Acad Sci U.S.A**, v.98, p.4563–4568, 2001.
- BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of migration rates and population numbers of two populations using a coalescent approach. **Genetics**, v.152, p.763–773, 1999.
- BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. et al. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v.39, p.1863-1869, 2001.
- BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M., et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A(2). **Comp. Biochem. Physiol.**, v.127, p.21-30, 2000.
- BRADSHAW, JR.; STETTLER, R.F. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. I. Triploidy in hybrid poplars. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.301-307, 1993.

- CARVALHO, E. S.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J. Diterpeno  $\Delta^{13(16),14}$  – diênico do caule de *Casearia sylvestris* Swartz. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 8, 2007, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2007. 1 CD-ROM.
- CARVALHO, P.R.F.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. *et al.* Acetylated DNA-Damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v.49, p.1659 - 1662, 1998.
- CERVERA, M-T ; STORME, V. ; IVENS, B. *et al.* Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. **Genetics**, v.158, p.787–809, 2001.
- CHASE, M.W.; ZMARTZTY, S.; LLEDÓ, .D.; WURDAC, K.J.; SWENSEN, S. M.; FAY, M.F. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid rbcL DNA sequences. **Kew Bulletin**, v.57, p.141-181, 2002.
- COATES, D.J.; ATKINS, K.A. Priority setting and the conservation of Western Australia's diverse and highly endemic flora. **Biological Conservation**, v.97, p.251-263, 2001.
- COELHO AGS. **Abordagem Bayesiana na análise genética de populações utilizando dados de marcadores moleculares**. Piracicaba, 2002. 76 p. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v.10, p. 349–356, 2001.
- CORREA MP. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura - IBDF, 1975. p. 514-516.
- CRONQUIST A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1261p.
- DAWSON, K.J.; BELKHIR, K. A Bayesian approach to the identification of panmictic populations and the assignment of individuals. **Genet. Res.**, v.78, p.59–77, 2001.

- DIAS, P.M.B. ; JULIER, B. ; SAMPOUX, J-P. et al. Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers. **Euphytica** v.160, p.189-205, 2008.
- DURIGAN, G.; RODRIGUES, R.R.; SCHIAVINI, I. A heterogeneidade ambiental definindo a metodologia de amostragem da floresta ciliar. In: RODRIGUES, R.R.; LEITÃO FILHO, H.F.(eds.). **Matas ciliares: conservação e recuperação**. EDUSP, São Paulo. 2000. p. 159-167.
- DURIGAN, G.; SIQUEIRA, M.F.; FRANCO, G.A.D.C.; BRIDGEWATER, S.; RATTER, J.A. The vegetation of priority areas for cerrado conservation in São Paulo State, Brazil. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 60, p. 217-241, 2003.
- ESPINDOLA, L.S.; VASCONCELOS JUNIOR, J.R, DE MESQUITA, M.L., et al. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Medicine**, v. 70, p. 1093-1095, 2004.
- ESTEVES, I.; SOUZA, I.R; RODRIGUES, M. et al. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p.191-196, 2005.
- ESTOUP, A. ;JARNE, P. ; CORNUET, J.M. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. **Molecular Ecology**, v.11, p.1591-1604, 2002.
- FARNSWORTH, N.R.; SOEJARTO, D.D. Global importance of medicinal plants. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. (Eds.). **The conservation of medicinal plants**. Cambridge: University Press, 1991. p.25–51.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa, 1998. 220p.
- FERREIRA, P.M.P. **Determinação do potencial antitumoral de diterpenos isolados das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz**. Fortaleza, 2006. 116 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2006.
- FLEISHMAN, E., LAUNER, A.E, SWITKY, K.R. et al. Rules and exceptions in conservation genetics: genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications for management planning. **Biological Conservation** v.98, p.45-53, 2001.

- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to Conservation Genetics**. 5 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 617 p.
- FREITAS, M.S.M; MARTINS, M.A.; VIEIRA, I.J.C. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesq. agropec. brás.**, v.39, p.887-894, 2004.
- GIBBS, P.E.; BIANCHI, M.B. Does late-acting self-incompatibility (LSI) show family clustering? Two more species of Bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany** v.84, p.449-457, 1999.
- GUARIM NETO, G.; MORAIS, R.G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasileira**, v.17, p.561-84, 2003.
- HARTL DL; CLARK, A.G. **Principles of population genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1997, 542p.
- HOLSINGER, K.E.; GOTTLIEB, L.D. Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (Eds.) **Genetics and Conservation of Rare Plants**. Oxford: Oxford University Press, 1991. p.195-223.
- HONGYAN XU, H; FU, Y.X. Estimating effective population size or mutation rate with microsatellites. **Genetics**, v.166, p.555-563, 2004.
- HOWE, H. F.; KERCKHOVE G. A. V. Fecundity and seed dispersal of a tropical tree. **Ecology** v. 60, pp. 180-189, 1979.
- HOWE, H.F.; PRIMACK, R.B. Differential seed dispersal by birds of the tree *Casearia nitida* (Flacourtiaceae) **Biotropica** v.7, p. 278-283, 1975.
- HUNTER, M. S.; CORLEY, D. G.; CARRON, C. P.; ROWOLD, E.; KILPATRICK, B. F.; DURLEY, R. C. Four new clerodane diterpenes from the leaves of *Casearia guianensis* wich inhibit the interaction of leukocyte function antigen 1 with intercellular adhesion molecule 1. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 894-899, 1997.
- ITOKAWA, H., *et al.* Isolation of diterpenes as antitumor agents from plants. **Patente Japão: Kokai Tokyo Koho-01; 149, 779: 6pp.** 1989.

- ITOKAWA, H., TOTSUKA, N., MORITA, H et al. New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chemical and Pharmacological Bulletin**, v.38, p.3384-88, 1990.
- ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; OBATA, E. . Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. **Chem. Pharm. Bull**, v.36, p.1585-88, 1988.
- JAMAL, C. M. **Estudo fitoquímico de *Casearia sylvestris* Sw e *Abatia tomentosa* Mart. (Flacourtiaceae) – Análise de derivados fenólicos por CLAE.** Belo Horizonte, 2002. 187p. Tese (doutorado) - Instituto de Química, Universidade Federal de Minas Gerais.
- JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution** v.11, p.424-429, 1996.
- JOLY, A.B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal.** 12<sup>a</sup> ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1998. 777p.
- KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.; SOUZA, L.M.I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **IPEF**, v. 12, p.65-70, 1998.
- KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B; VENCOSKY, R. Conservação in situ de espécies arbóreas tropicais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S DE; VALADARES INGLIS, M.C. (Eds.) **Recursos Genéticos e Melhoramento — Plantas.** Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.149-158.
- KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M.; RIBAS, L.A. et al. Genetic diversity in tropical three species from different successional stages determined with genetic markers. **Scientia Forestalis**, v.64, p.93-107, 2003.
- KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; KANARSA, T.; BUAYAIRAKSA, M. New bioactive clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia grewiifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 183-188, 2005.
- KINGMAN, J.F.C. The coalescent. **Stochastic Processes and Applications.**, v.13, p.235–248, 1982.
- KLEIN, R. M.; SLEUMER, H. O. **Flora ilustrada catarinense: flacourtiáceas.** Itajaí: FLAC, 1984. p. 78-87.

- LACERDA, D.R., ACEDO, M.D.P., LEMOS-FILHO, J.P., LOVATO, M.B. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathyenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology** v.10, p.1143-1152, 2001.
- LEMES, M.R.; GRATTAPAGLIA, D.; GROGAN, J. et al. Flexible mating system in a logged population of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae): implications for the management of a threatened neotropical tree species. **Plant Ecology** v. 192, p.169-172, 2007.
- LESKINEN, E.; ALSTRÖM-RAPAPORT, C. Molecular phylogeny of Salicaceae and closely related Flacourtiaceae: evidence from 5.8S, ITS1, and ITS2 of the rDNA. **Plant Systematics and Evolution** v.215, p.209–227, 1999.
- LEXER, C.; FAY, M.F.; JOSEPH, J.A. *et al.* . Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression. **Molecular Ecology**, v.14, p.1045–1057, 2005.
- LI, Y.C., KOROL, A.B., FAHIMA, T.. et al.. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.2453–2465, 2002.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. p. 115.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.15, p.65-95, 1984.
- MACHADO, A.O.; OLIVEIRA, P.E.A.M., Biologia floral e reprodutiva de *Casearia grandiflora* Camb. (Flacourtiaceae). **Revista Brasileira de Botânica** v.23, p.283-290, 2000.
- MAISTRO, E.L.; CARVALHO, J.C.; MANTOVANI; M. S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology In Vitro**, v.18, p. 337-342, 2004.
- MANK, J.E; AVISE, J.C. Individual organisms as units of analysis: Bayesian-clustering alternatives in population genetics. **Genet. Res., Camb.** 84, 135–143, 2004.

- MARTINS, K. **Diversidade genética e fluxo gênico via pólen e semente em populações de *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) no sudeste de Goiás.** Piracicaba, 2005. 128p. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MARTINS, P.S. Preservação e genética evolutiva IN: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1988, Jaboticabal: **Anais do Encontro sobre Recursos Genéticos.** Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1988. p.62-66.
- MARTINS, P.S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “in situ”. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, v.35, p.71-78, 1987.
- MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA, L. S. In vitro antiplasmodial activity of brazilian cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 165-170, 2007.
- MESQUITA, M.L ; DESRIVOT, J. ; BORIES, C. *et al.* Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p.783-787, 2005.
- MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E.P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chem. Pharm. Bull.** v.39, p. 693-97.. 1991.
- OBERLIES, N. H., *et al.* Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products.**, v.65, p.95-99, 2002.
- OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G, ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology** v.29, p.294-307, 2006.
- OLIVEIRA, P. E. A. M. ; GIBBS, P. E. . Pollination and reproductive biology in cerrado plant communities. In: Paulo S. Oliveira; Robert J. Marquis. (Org.). **The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna.** Washington: Columbia University Press, 2002, p. 329-347.
- PALMÉ, A.E.; SEMERIKOV, V.; LASCoux, M. Absence of geographical structure of chloroplast DNA variation in willow, *Salix caprea* L. **Heredity**, v.91, p.465–474, 2003.

- PEARSE, D.E.; CRANDALL, K.A. Beyond FST: Analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetics** v.5, p.585–602, 2004.
- PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J.M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v.90, p.502–503, 1999.
- POMBAL, E.C.P. 1994. **Biologia floral de duas espécies dicogâmicas, *Metrodorea nigra* e *M. stipularis* (Rutaceae), em matas semidecíduas no sudeste do Brasil.** Rio Claro, 1994. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista.
- POMBAL, E.C.P.; MORELLATO, P.C. Polinização por moscas em *Dendropanax cuneatum* Decne. & Panch. (Araliaceae) em floresta semidecídua no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** v.18, p.157-162, 1995.
- PRAKASAM, A.; SETHUPATHY, S.; PUGALENDI K. V. Effect of *Casearia esculenta* root extract on blood glucose and plasma antioxidant status in streptozotocin diabetic rats. **Pol. J. Pharmacol.**v.55, p. 43–49, 2003.
- PRAKASH, C.V.S.; HOCH, J.M.; KINGSTON, D.G.I. Structure and stereochemistry of new cytotoxic clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia lucida* from the Madagascar rainforest. **Journal of Natural Products**, v.65, p.100 -107, 2002.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945 – 959, 2000.
- REIS, A.M.M. **Distribuição da variabilidade genética em aroeira (*Myracrodruon urundeuva*, Anacardiaceae) por marcadores RAPD e polimorfismo de sequência de cpDNA.** Piracicaba, 1999. 60p. Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- RODRIGUES, A. M. S.; PAULA, J. E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J. F.; ESPÍNDOLA, L. S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Association**, v. 22, p. 314-317, 2006.
- RODRIGUES, L. A.; CARVALHO, D. A. de; GOMES, L. J.; BOTREL, R. T. Espécies vegetais nativas usadas pela população local em Luminárias-MG. **Boletim Agropecuário da Universidade Federal de Lavras**, v.52, p.1-34, 2002.

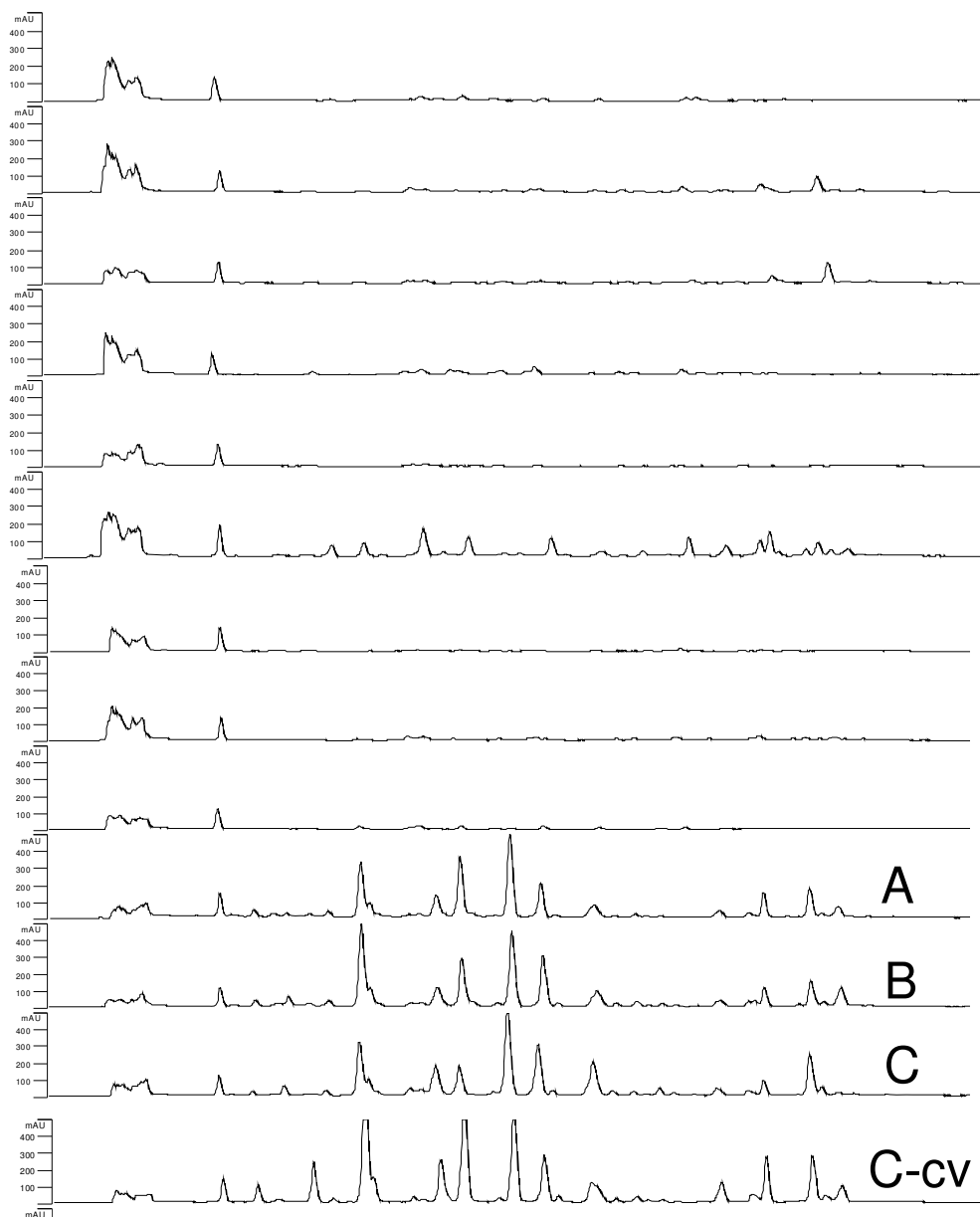
- SAINT-HILAIRE, A. *Casearia lingua*. **Flora brasiliae meridionalis**, v.2, p.236, 1829.
- SALTONSTALL, K. Microsatellite variation within and among North American lineages of *Phragmites australis*. **Molecular Ecology**, v.12, p.1689–1702, 2003.
- SANTOS, A. G. Desenvolvimento de metodologia para a análise de variabilidade intraespecífica e dinâmica de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). Araraquara, 2001. 120 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.
- SANTOS, A.G. Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de *Casearia sylvestris*: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico. Araraquara, 2008. 174 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.
- SCHNABEL, A.; BEERLI, P.; ESTOUP, A. et al. 1998. A guide to software packages for data analysis in molecular ecology. In Carvalho G, eds. **Advances in Molecular Ecology**. Amsterdam: IOS Press. 1998. pp 291-303.
- SEAVEY, S.R.; BAWA, K.S. Late-acting self-incompatibility in Angiosperms. **Botanical Review** v.52, p.195-219, 1986.
- SHEN, Y.C.; CHENG, Y.B.; CHEN, Y.H.; KHALIL, A.T.; KO, C.L. Three new clerodane diterpene derivatives from *Casearia membranacea*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.52, 1263-1268, 2005.
- SHOEMAKER, J.S.; PAINTER, I.S.; WEIR B.S. Bayesian statistics in genetics: a guide for the uninitiated. **Trends in Genetics** v.15, p.354-358, 1999.
- SILVA, J.F. *Biodiversity and Stability in Tropical Savannas* In: SOLBRIG OT, MEDINA E, SILVA J.F. (Eds). **Biodiversity and savanna ecosystem processes: a global perspective**. Springer-Verlag, Berlin. 1996. 233 pp.
- SILVA, M. A. S., MING, L. C., PEREIRA, A. M. S., Bertoni, B. W., Batistini, A. P., Pereira, P.S.. Phytochemical and genetic variability of *Casearia sylvestris* Sw. from São Paulo State Atlantic Forest and Cerrado populations. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.159-166, 2006.

- SILVA, M.A.S. **Variabilidade genética e fitoquímica de *Casearia sylvestris* Sw. em populações do cerrado e mata atlântica do Estado de São Paulo.** Botucatu, 2003. 110p. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
- SLEUMER, H.O. **Flora Neotropica Monograph n.22 (FLACOURTIACEAE).** New York: The New York Botanical Garden, 1980. 499 p.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática – Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.
- SQUIRRELL, J.; HOLLINGSWORTH, P.M; WOODHEAD, M; RUSSELL, J; LOWE, A.J.; GIBBY, M; POWELL, W. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? **Molecular Ecology** v.12, p.1339-1348, 2003.
- STACHEL, M.; LELLEY, T.; GRAUSGRUBER, H. et al. Application of microsatellites in wheat (*Triticum aestivum* L.) for studying genetic differentiation caused by selection for adaptation and use. **Theoretical and Applied Genetics** v.100, p.242–248, 2000.
- TARODA, N.; GIBBS, P.E. Floral biology and breeding system of *Sterculia chicha* S.Hil. (Sterculiaceae). **New Phytologist** v.90, p.735-743, 1982.
- TININIS, A. G. **Desenvolvimento, otimização, validação e utilização de métodos de extração e análise de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw.** Araraquara, 2006. 182 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.
- TININIS, A. G.; ASSONUMA, M. M.; TELASCREA, M.; PEREZ, C. C.; SILVA, M. R. S. R. M.; FAVORETO, R.; CAVALHEIRO, A. J. Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* SW. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 132-136, 2006.
- TORRES, R. B; YAMAMOTO, K. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacq. (Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.9, p.239-258, 1986.
- TORRES, R.B.; RAMOS, R. Flacourtiaceae. In: WANDERLEY MGL, SHEPHERD GJ, MELHEM TSA & GIULIETTI AM (coord.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo.** São Paulo: Instituto de Botânica. 2007. p. 201-223.

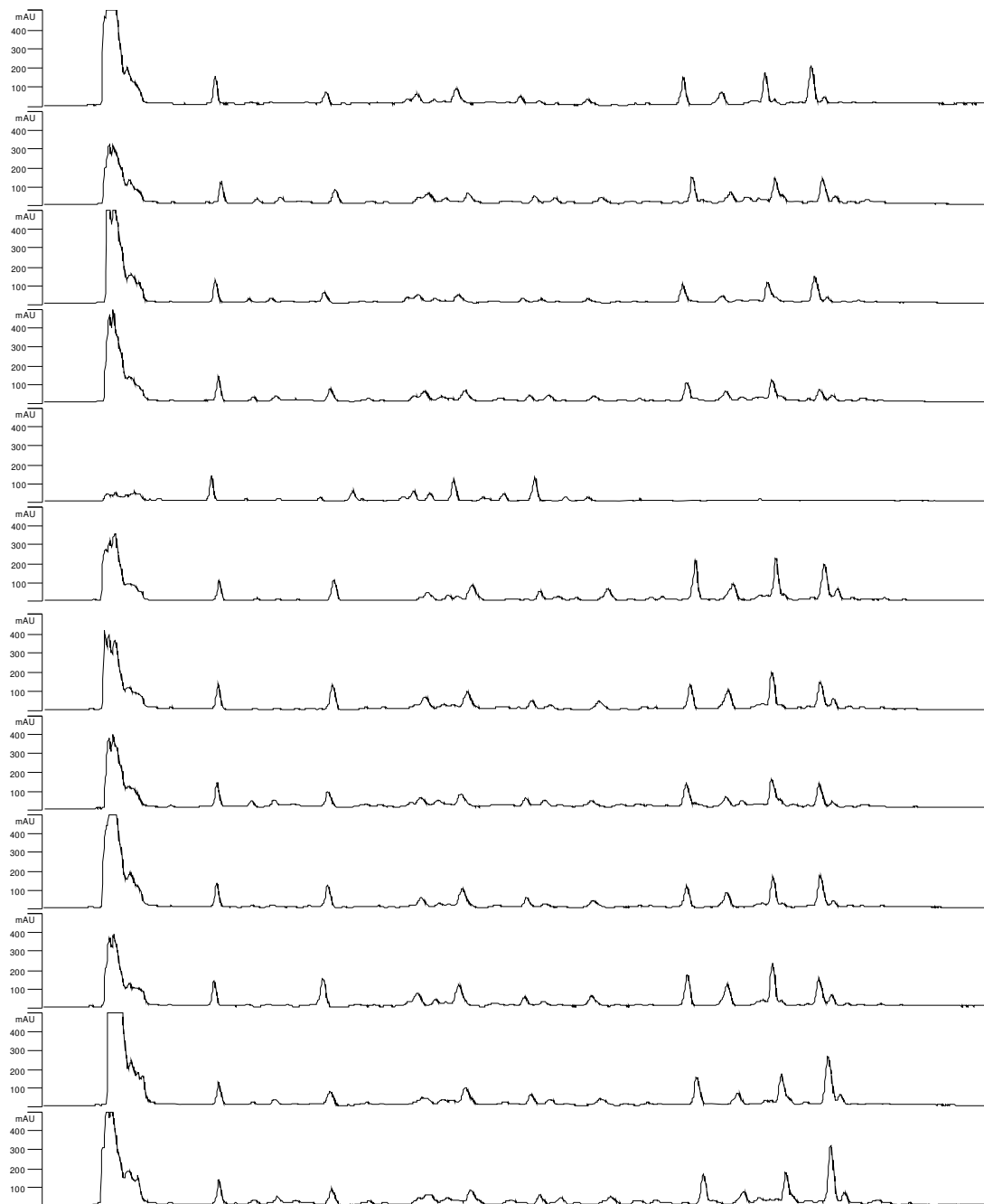
- TUSKAN, G.A.; DIFAZIO, S.; JANSSON, S. et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). **Science** v.313, p.1596 – 1604, 2006.
- VALBUENA-CARABAÑA, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C., SORK, V.L. et al. Gene flow and hybridization in a mixed oak forest [*Quercus pyrenaica* Willd. and *Q. petraea* (Matts.) Liebl.] in central Spain. **Heredity**, v.95, p.457–465, 2005.
- VALLS J.F.M.; PIZARRO E.A. Collection of wild *Arachis* Germplasm. In: KERRIDGE, P C. AND HARDY, B. (Eds.) **Biology and Agronomy of Forage Arachis**. CIAT publication No. 240.1994.p.19-27.
- VIEIRA, R.F. Coleta e conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA E TERAPIAS NATURAIS, 1., 1994, Brasília. **Trabalhos...** São Paulo: Instituto Médico Seraphis, 1994. p.44-49.
- VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.3, p.13-36, 2000.
- VILELA-MORALES E.A. AND A.C.C.VALOIS. Recursos genéticos vegetais autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**,v.17, p. 11-42, 2000.
- WHITLOCK, M.C.; MCCAULEY, D.E. Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST} \approx 1/(4Nm+1)$ . **Heredity** v.82, p.117-125, 1999.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v.16, p.97-159, 1931.
- WRIGHT, S. Systems of mating. **Genetics**, v.6, p.111–178, 1921.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v.15, 395-420, 1951.
- YIN, T.M.; DIFAZIO, S.P. ; GUNTER, L.E. et al. Large-scale heterospecific segregation distortion in *Populus* revealed by a dense genetic map. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, 451–463, 2004.
- ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. Piracicaba, 2002. 130p. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO, J.B.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G., VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p.449–457, 2003.

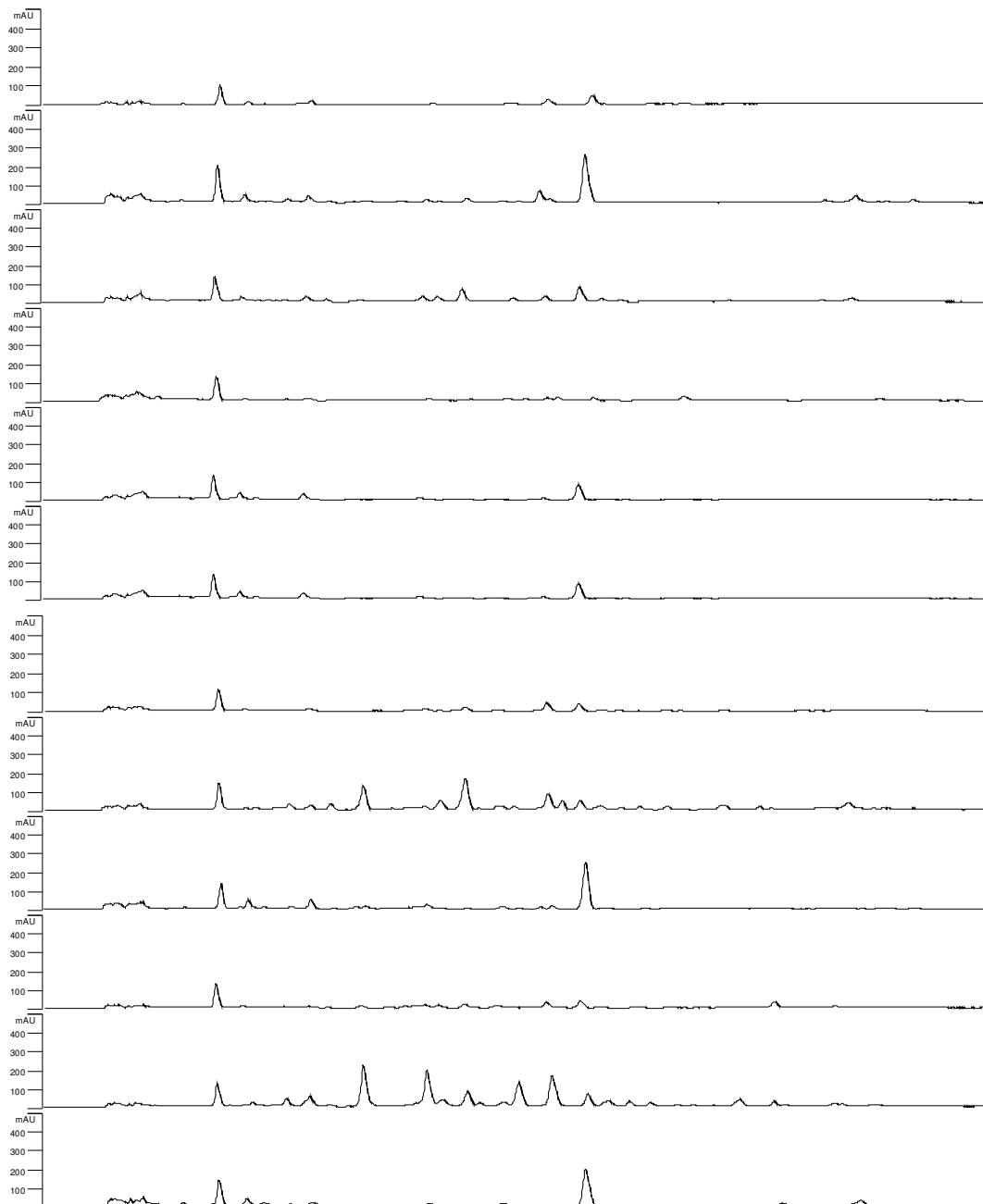
# ANEXOS



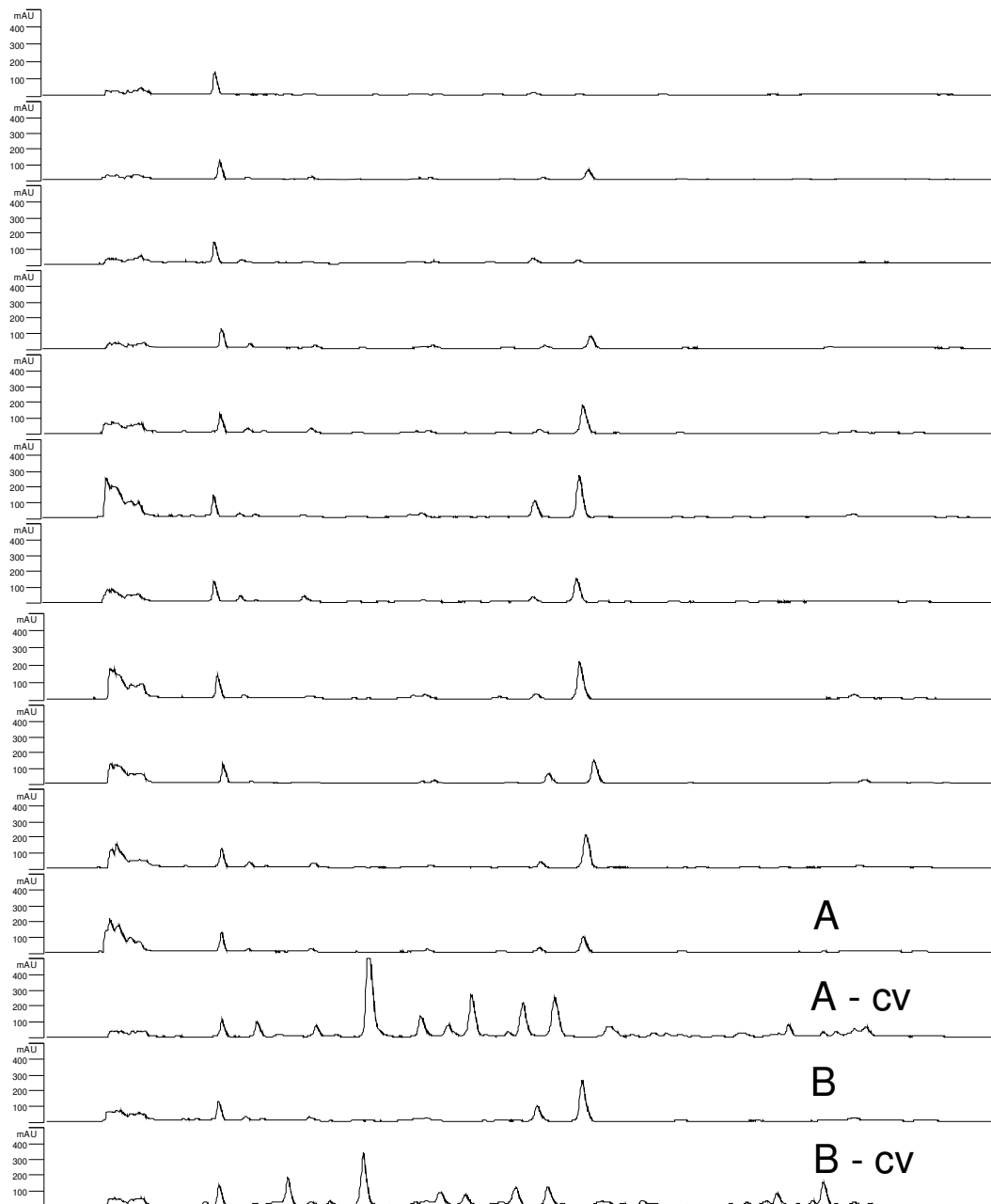
ANEXO 1. Cromatogramas obtidos para os indivíduos de *Casearia sylvestris* amostrados na Estação Ecológica de Assis (Cerrado). Os cromatogramas A, B, C e C-cv foram obtidos de indivíduos da variedade *sylvestris*, enquanto que os demais, de indivíduos da var. *lingua*. O cromatograma C-cv foi obtido a partir do clone do indivíduo C cultivado em casa de vegetação. Da esquerda para a direita nos cromatogramas, observam-se os flavonóides, o padrão interno (caseargrewiina F hidrolisada) e os picos de casearina.



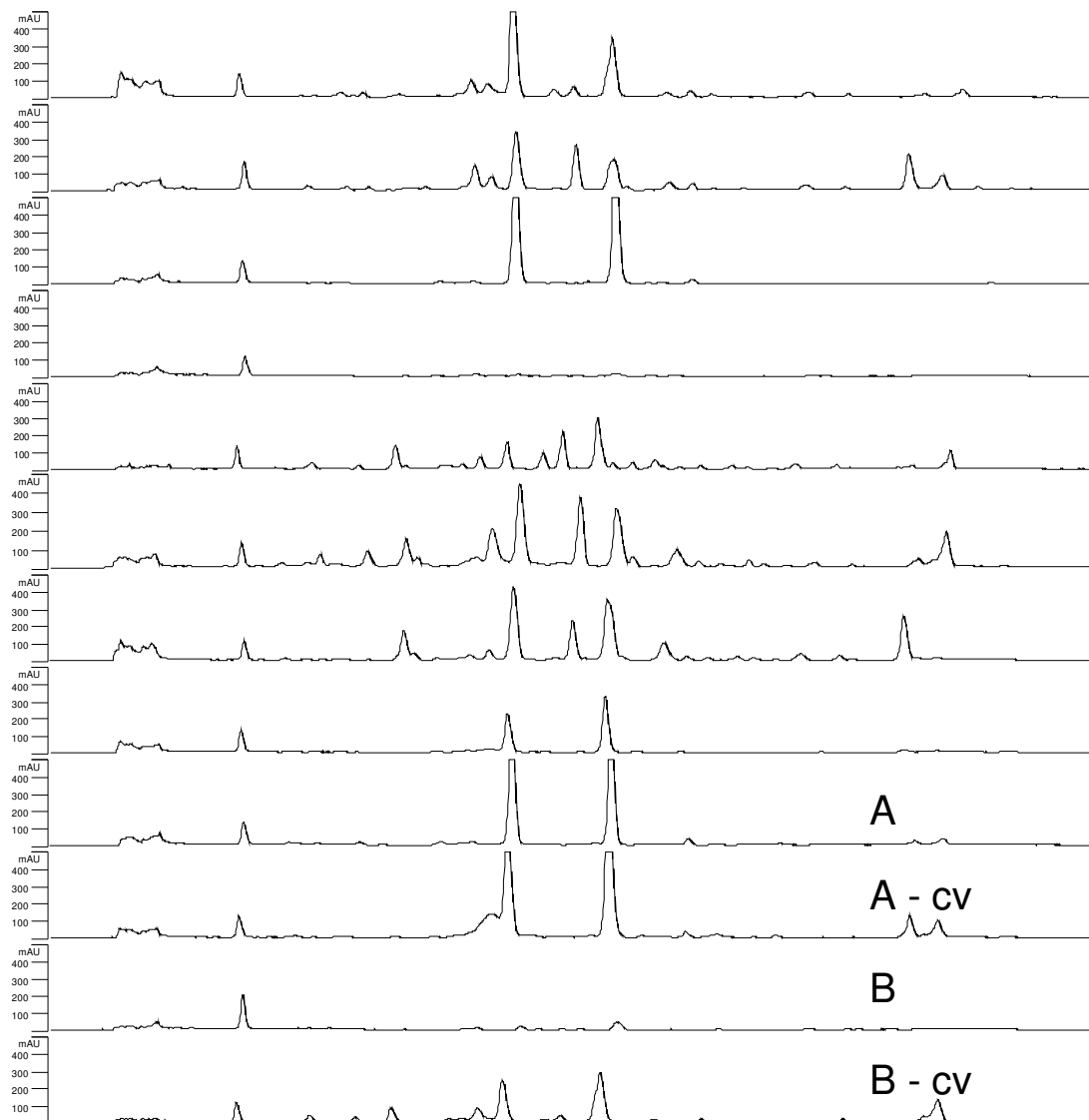
ANEXO 2. Cromatogramas obtidos para os indivíduos de *Casearia sylvestris* amostrados na Floresta Estadual de Botucatu (Cerrado). Da esquerda para a direita nos cromatogramas, observam-se os flavonóides, o padrão interno (caseargrewiina F hidrolisada) e os picos de casearina.



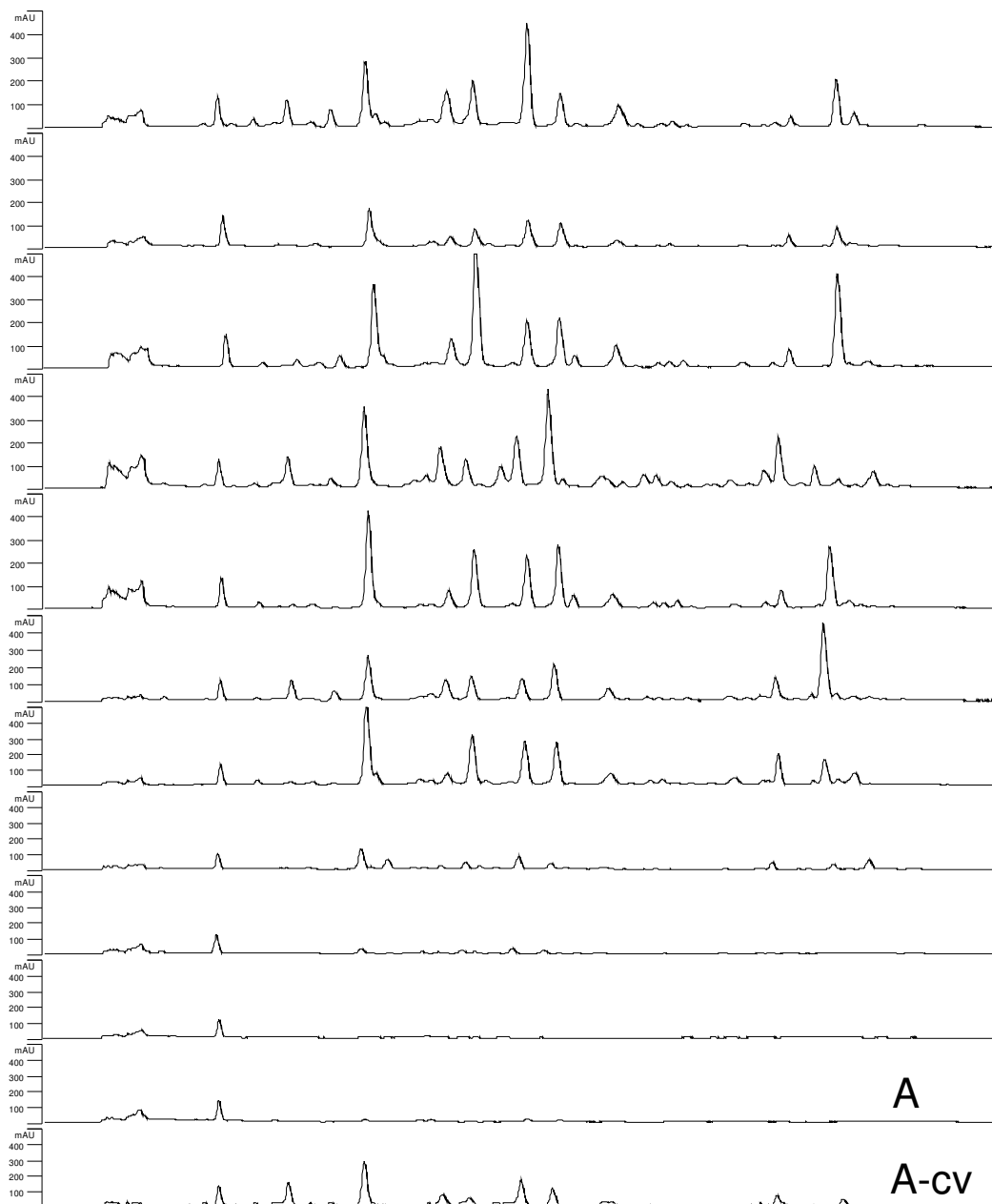
ANEXO 3. Cromatogramas obtidos para os indivíduos de *Casearia sylvestris* amostrados no Parque da Ilha Anchieta (Floresta Ombrófila Densa). Da esquerda para a direita nos cromatogramas, observam-se os flavonóides, o padrão interno (caseargrewiina F hidrolisada) e os picos de casearina.



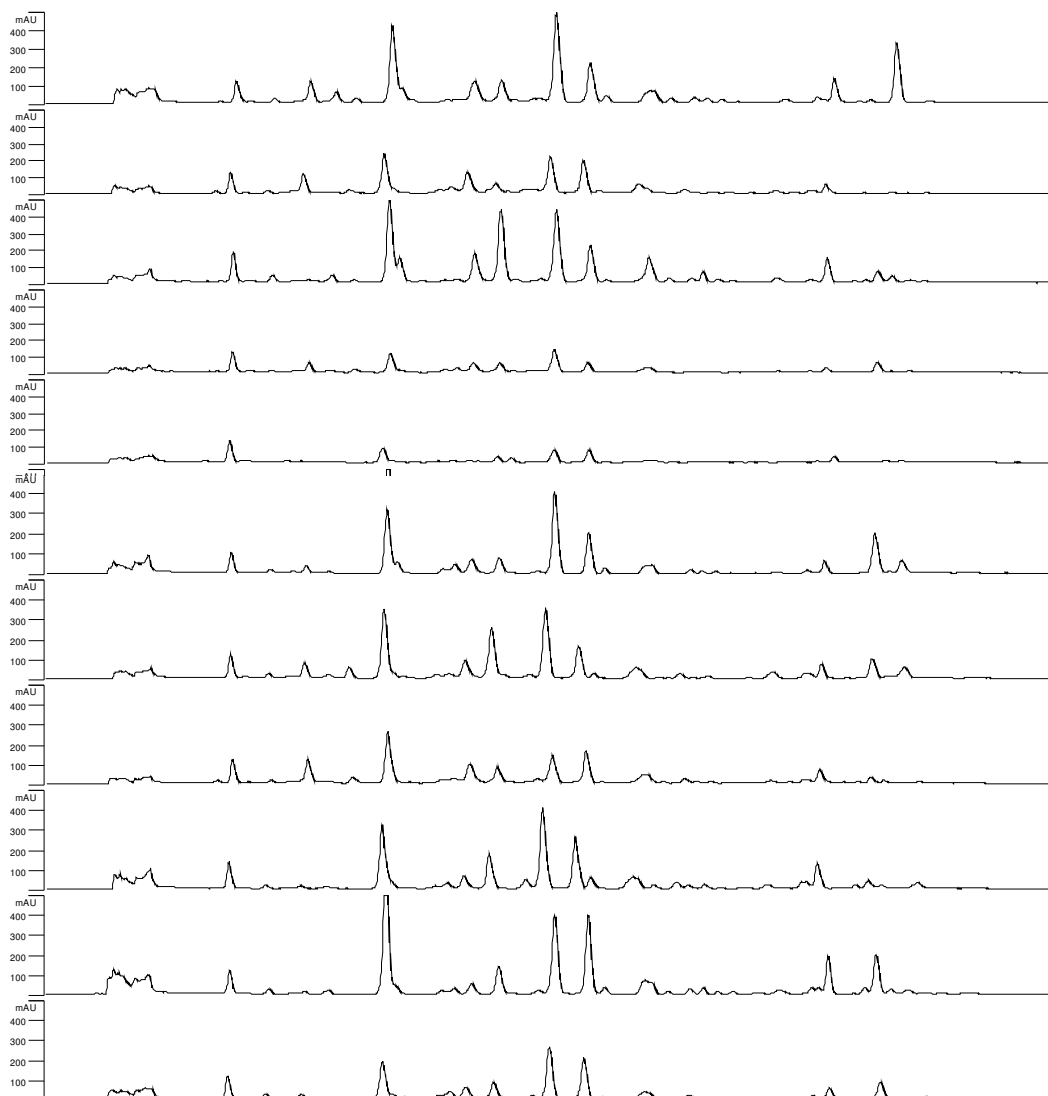
ANEXO 4. Cromatogramas obtidos para os indivíduos de *Casearia sylvestris* amostrados no Parque Estadual da Serra do Mar núcleo Santa Virgínia (Floresta Ombrófila Densa). Para os indivíduos A e B são apresentados também os cromatogramas obtidos para seus clones cultivados em casa de vegetação (A-cv e B-cv). Da esquerda para a direita nos cromatogramas, observam-se os flavonóides, o padrão interno (caseargrewiina F hidrolisada) e os picos de casearina.



ANEXO 5. Cromatogramas obtidos para os indivíduos de *Casearia sylvestris* amostrados no Parque Estadual de Carlos Botelho (Floresta Ombrófila Densa). Para os indivíduos A e B são apresentados também os cromatogramas obtidos para seus clones cultivados em casa de vegetação (A-cv e B-cv). Da esquerda para a direita nos cromatogramas, observam-se os flavonóides, o padrão interno (caseargrewiina F hidrolisada) e os picos de casearina.



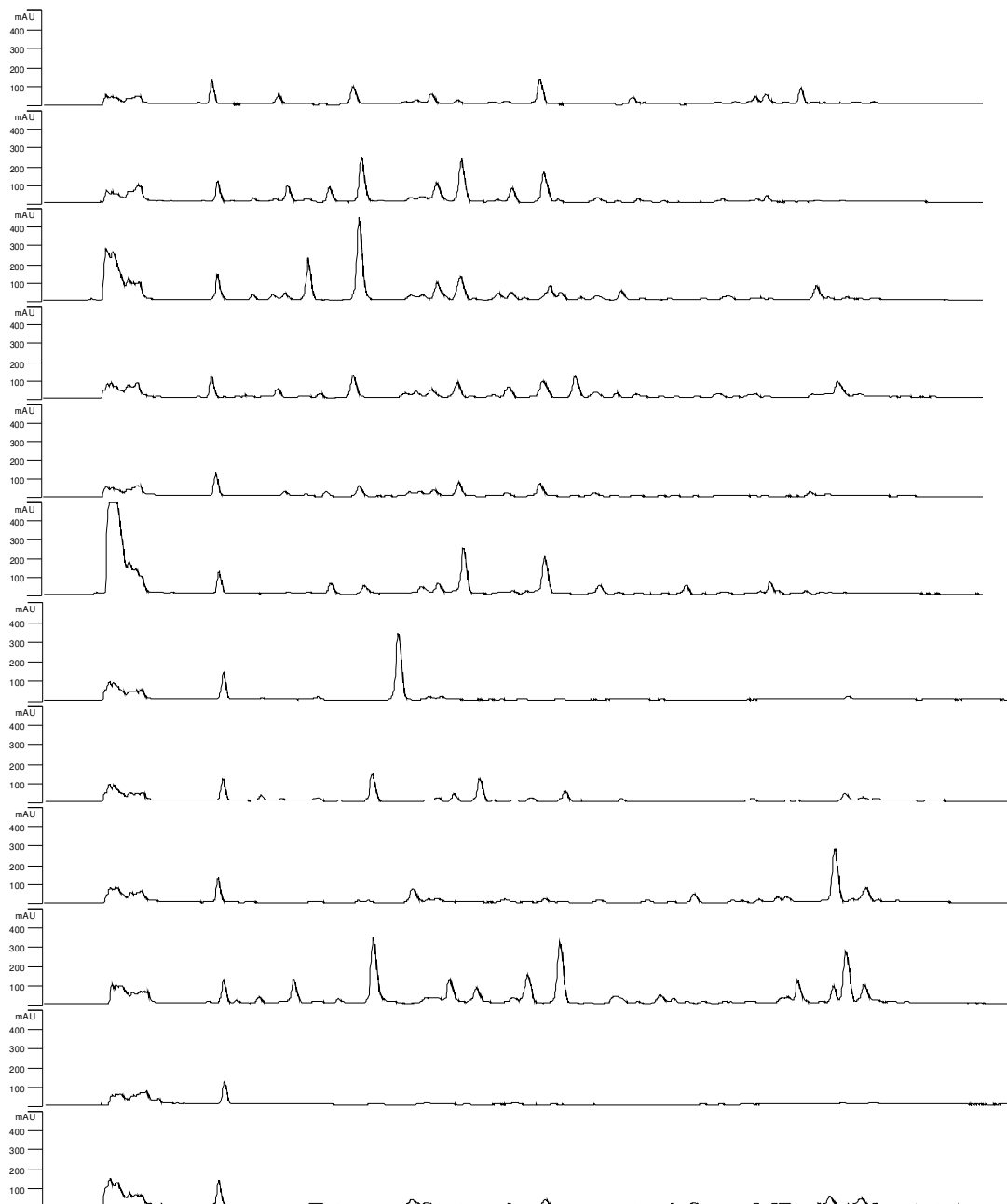
ANEXO 6. Cromatogramas obtidos para os indivíduos de *Casearia sylvestris* amostrados na Estação Ecológica de Caetetus (Floresta Estacional Semidecidual). Para o indivíduo A é apresentado também o cromatograma obtido para seu clone cultivado em casa de vegetação (A-cv). Da esquerda para a direita nos cromatogramas, observam-se os flavonóides, o padrão interno (caseargrewiina F hidrolisada) e os picos de casearina.



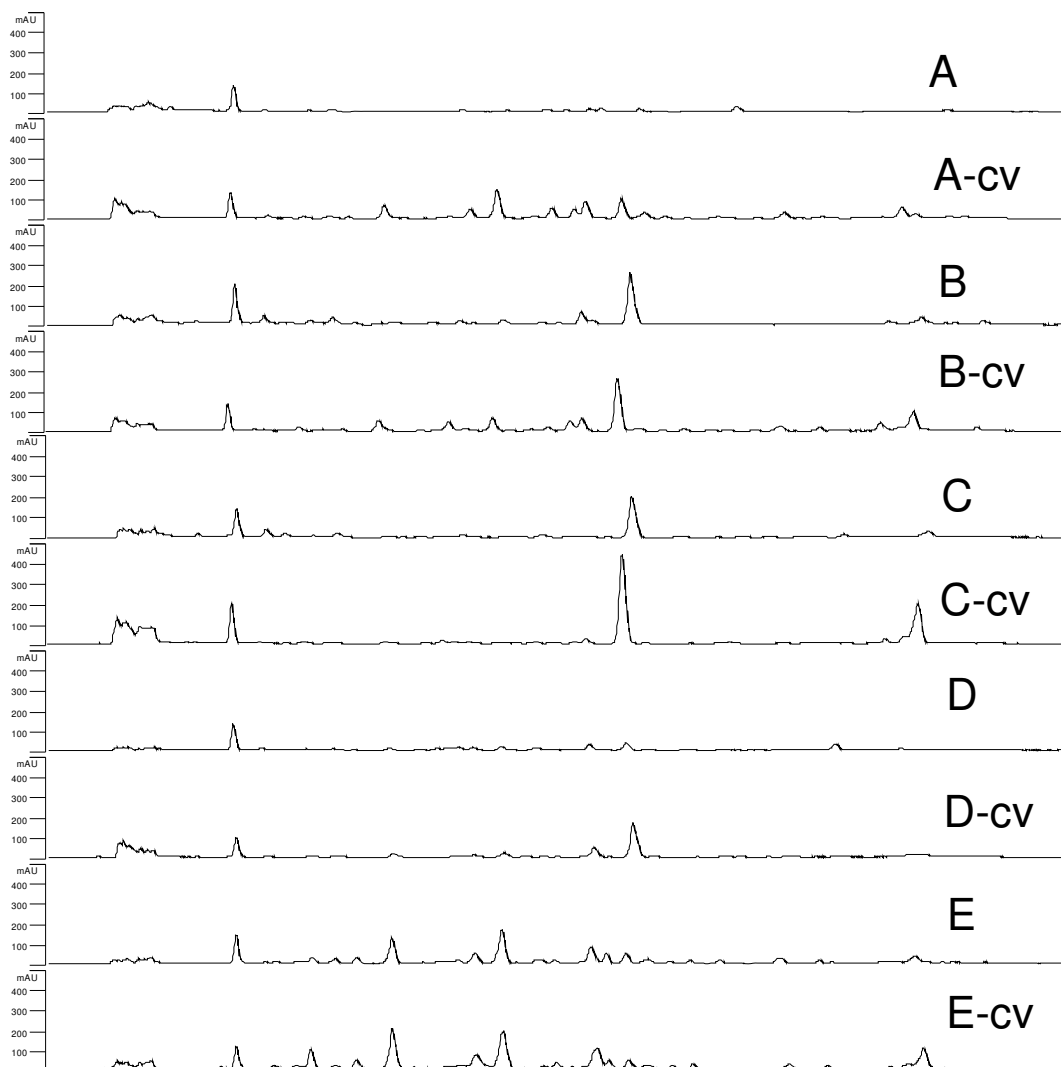
ANEXO 7. Cromatogramas obtidos para os indivíduos de *Casearia sylvestris* amostrados no Parque Estadual do Morro do Diabo (Floresta Estacional Semidecidual). Da esquerda para a direita nos cromatogramas, observam-se os flavonóides, o padrão interno (caseargrewiina F hidrolisada) e os picos de casearina.



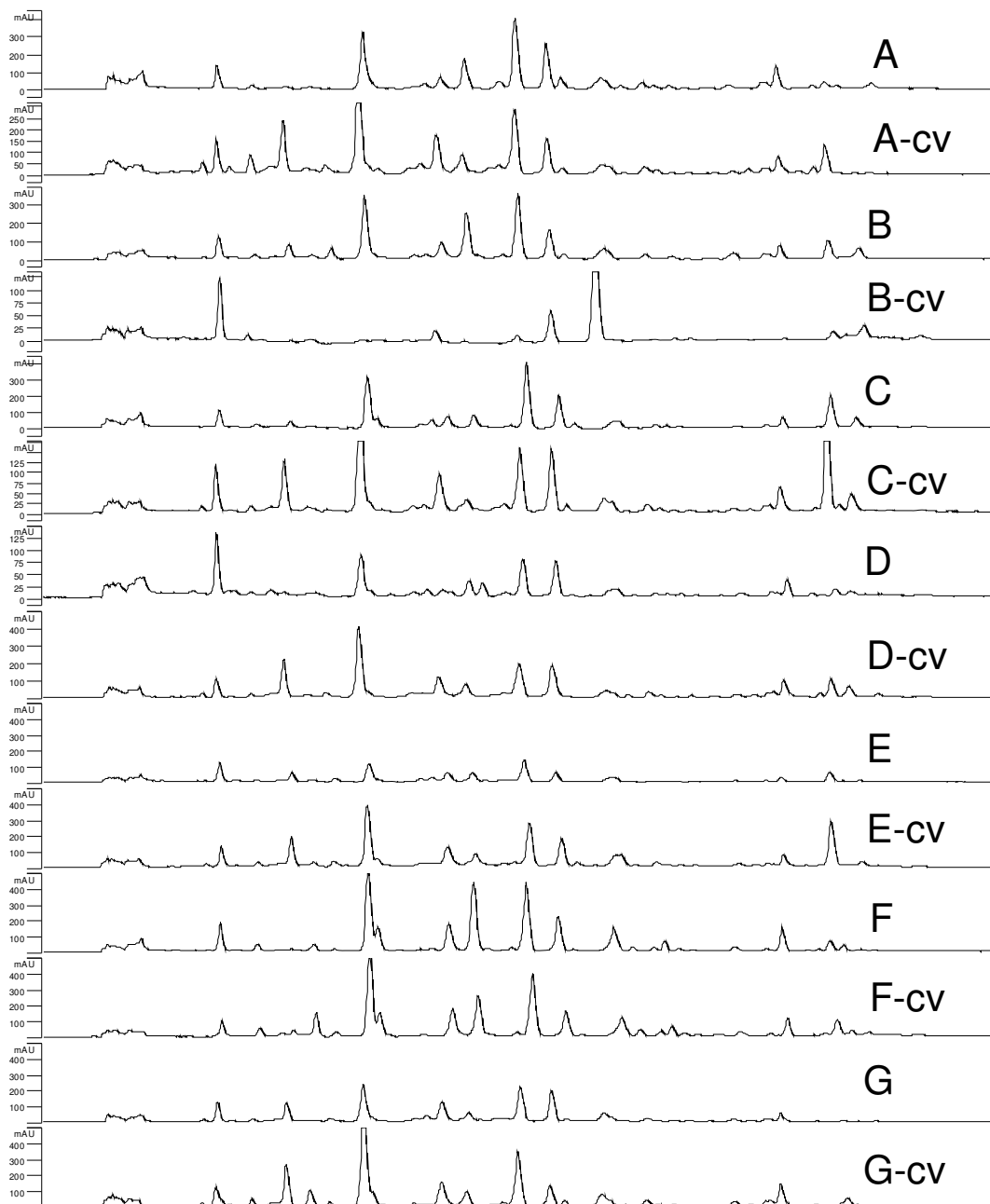
ANEXO 8. Cromatogramas obtidos para os indivíduos de *Casearia sylvestris* amostrados na Estação Ecológica de Mogi-Guaçu (ecótono). Da esquerda para a direita nos cromatogramas, observam-se os flavonóides, o padrão interno (caseargrewiina F hidrolisada) e os picos de casearina.



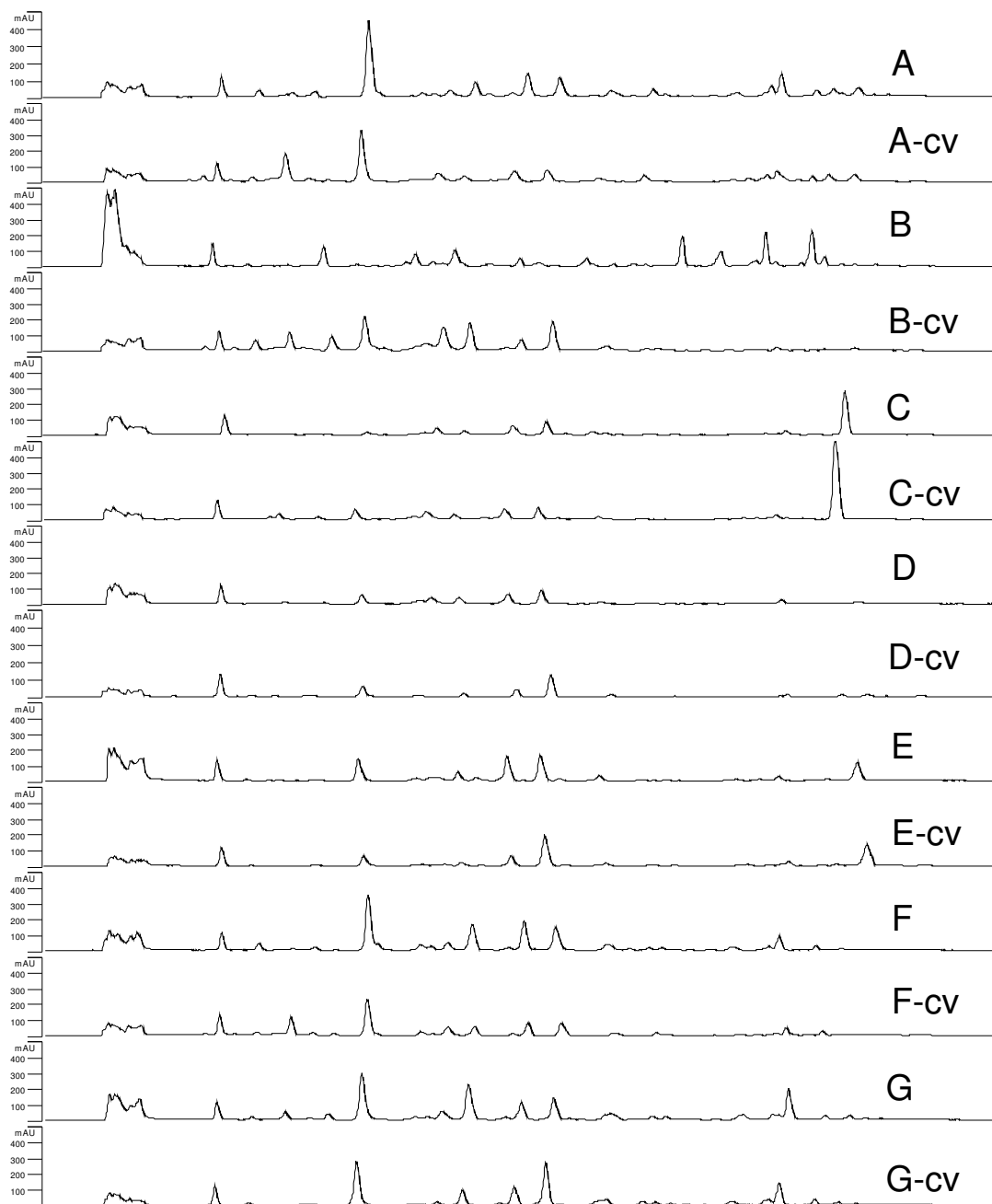
ANEXO 9. Cromatogramas obtidos para os indivíduos de *Casearia sylvestris* amostrados na população do Parque Estadual de Porto Ferreira (ecótono). Da esquerda para a direita nos cromatogramas, observam-se os flavonóides, o padrão interno (caseargrewiina F hidrolisada) e os picos de casearina.



ANEXO 10. Comparação entre os cromatogramas obtidos para os indivíduos de *Casearia sylvestris* amostrados no Parque da Ilha Anchieta (Floresta Ombrófila Densa) e seus clones cultivados em casa de vegetação (X-cv). Da esquerda para a direita nos cromatogramas, observam-se os flavonóides, o padrão interno (caseargrewiina F hidrolisada) e os picos de casearina.



ANEXO 11. Comparação entre os cromatogramas obtidos para os indivíduos de *Casearia sylvestris* amostrados no Parque Estadual do Morro do Diabo (Floresta Estacional Semidecidual) e seus clones cultivados em casa de vegetação (X-cv). Da esquerda para a direita nos cromatogramas, observam-se os flavonóides, o padrão interno (caseargrewiina F hidrolisada) e os picos de casearina.



ANEXO 12. Comparação entre os cromatogramas obtidos para os indivíduos de *Casearia sylvestris* amostrados na Estação Ecológica de Mogi-Guaçu (ecótono) e seus clones cultivados em casa de vegetação (X-cv). Da esquerda para a direita nos cromatogramas, observam-se os flavonóides, o padrão interno (caseargrewiina F hidrolisada) e os picos de casearina.

Nome do arquivo: Tese Casearia definitiva  
Pasta: C:\Documents and Settings\Admin\Meus  
documentos\MARCELO\Tese  
Modelo: C:\Documents and Settings\Admin\Dados de  
aplicativos\Microsoft\Modelos\Normal.dot  
Título: 1  
Assunto:  
Autor: Usuario  
Palavras-chave:  
Comentários:  
Data de criação: 14/7/2008 18:17:00  
Número de alterações:2  
Última gravação: 14/7/2008 18:17:00  
Salvo por: Usuario  
Tempo total de edição: 0 Minutos  
Última impressão: 14/7/2008 18:18:00  
Como a última impressão  
Número de páginas: 127  
Número de palavras: 32.198 (aprox.)  
Número de caracteres: 173.870 (aprox.)