

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville POR MARCADOR
MOLECULAR AFLP E TRANSFERÊNCIA DE MICROSSATÉLITES**

PATRÍCIA CALLIGIONI DE MENDONÇA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas
da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia (Horticultura).

BOTUCATU – SP

Dezembro – 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville POR MARCADOR
MOLECULAR AFLP E TRANSFERÊNCIA DE MICROSSATÉLITES**

PATRÍCIA CALLIGIONI DE MENDONÇA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares Pereira

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bianca Waleria Bertoni

Tese apresentada á Faculdade de Ciências Agronômicas
da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia (Horticultura).

BOTUCATU – SP

Dezembro – 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M539c Mendonça, Patrícia Calligioni de, 1971-
Caracterização da diversidade genética de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville por marcador molecular aflp e transferência de microssatélites / Patrícia Calligioni de Mendonça. - Botucatu : [s.n.], 2011
viii, 74 f., il., gráfs., tabs.

Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2011
Orientador: Ana Maria Soares Pereira
Co-orientador: Bianca Waleria Bertoni
Inclui bibliografia

1. Marcador molecular. 2. Barbatimão. 3. Cerrado. 4. Conservação. I. Pereira, Ana Maria Soares. II. Bertoni, Bianca Waleria. III. Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho"(Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville POR MARCADOR
MOLECULAR AFLP E TRANSFERÊNCIA DE MICROSSATÉLITES".

ALUNA: PATRÍCIA CALLIGIONI DE MENDONÇA

ORIENTADORA: PROFª DRª ANA MARIA SOARES PEREIRA
CO-ORIENTADORA: PROFª DRª BIANCA WALÉRIA BERTONI

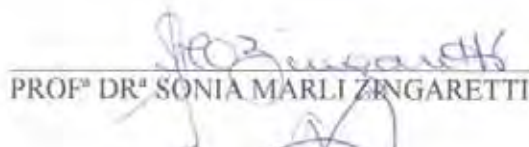
Aprovado pela Comissão Examinadora



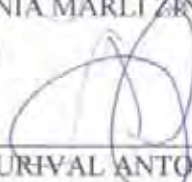
PROFª DRª ANA MARIA SOARES PEREIRA



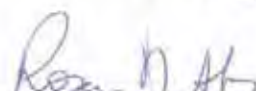
PROFª DRª GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA



PROFª DRª SONIA MARLI ZENGARETTI



PROF. DR. LAURIVAL ANTONIO VILAS-BOAS



PROFª DRª ROSA DE BELEM DAS NEVES ALVES

Data da Realização: 09 de dezembro de 2011

Ne me quitte pas, Il faut oublier,
tout peut s'oublier qui s'enfuit déjà.
Oublier le temps des malentendus
et le temps perdu a savoir comment.
Oublier ces heures qui tuaient parfois a coups de pourquoi
Jacques Brel, 1959

BIOGRAFIA DA AUTORA

Patricia Calligioni de Mendonça nasceu em Ribeirão Preto em 16 de novembro de 1971. Iniciou a graduação em Biologia - Licenciatura Plena em março de 1990 concluindo seu curso pelo Centro Universitário Barão de Mauá, em Ribeirão Preto/SP, em dezembro de 1994. Em janeiro de 2001 obteve o título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / FCAV, Campus de Jaboticabal. Com esta tese conclui os requisitos para a obtenção do título de Doutora em Agronomia (Horticultura) pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Ciências Agrônomicas / FCA, Campus de Botucatu, em dezembro de 2011. Por mais de dez anos atuou como professora do ensino fundamental e médio nas disciplinas de Biologia, Ciências e Práticas de Laboratório na rede particular e estadual de ensino. Participa atualmente do grupo de pesquisa de Preservação de Recursos Genéticos de Plantas na linha de pesquisa de preservação da biodiversidade no laboratório de Biotecnologia de Plantas Medicinais - Unidade de Biotecnologia Vegetal - UNAERP em Ribeirão Preto.

À Deus

acima de todas as coisas....

OFEREÇO

Ao meu companheiro de todos os momentos

Rodrigo

Pelo apoio constante e amor incondicional.

As minhas filhas

Olivia e Alice

Por ser a razão do meu viver, o melhor de mim, alegria da minha vida, meus melhores
presentes.

Aos meus pais

Teresa e Pedro (in memoriam)

Pela graça da minha reencarnação, amor eterno e dedicação a minha educação.

Aos meus irmãos

Junior e Mateus

Pela certeza de não estar nunca sozinha.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares Pereira, pela orientação, amizade, exemplo ético e o profundo amor que se dedica a mim e a todos. *“De flor, em flor, vai levando seu amor”...*

À Prof^a. Dr^a. Bianca Waleria Bertoni, pela dedicação e paciência da qual sempre teve comigo, pela orientação, exemplo de organização e correção para com os trabalhos dos quais se dedica, mas principalmente pela amizade e sinceridade para comigo. *“Inesquecíveis exemplos, imperecíveis lições”...*

Aos amigos Rosa, Taíce, Lucas, Mayara, Camila, Marielle, Tiago, Edieidia, Juliana, Carlos Ono, Patricia Roberto e Simone pelo apoio constante no trabalho e fora dele.

Às colegas de Botucatu, em especial Bárbara, Mel, Caroline Mateus e Rosângela pelo apoio na cidade, por todas as vezes que me receberam e me abrigaram em suas casas.

Ao Lori, Gys e Lucia, por serem os irmãos que escolhi, pelo profundo amor que sinto por vocês, por fazerem parte da minha vida!

Aos professores doutores, Sônia Marli Zingaretti, Laurival Antonio Vilas Bôas, Rosa de Belem das Neves Alves e Giuseppina Pace Pereira Lima, membros da Banca Examinadora por aceitarem contribuir tão grandiosamente para minha formação e aperfeiçoamento.

Aos professores do Departamento de Horticultura da FCA, em nome da Prof^a Rummy Goto, por fazerem parte da minha formação.

À equipe da Secretaria da Pós Graduação, Marlene, Jaqueline, Taynan e Kátia por me receberem sempre com um sorriso nos rostos, compreensão das distâncias e absoluta correção no trabalho.

À Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), funcionários e professores, em nome da Prof^a Suzelei de Castro França, por me receberem para o desenvolvimento deste projeto.

À Terra de Ismael, em nome da Carmem Silva, por me proporcionar um lugar de paz, absoluta felicidade e sentimento de estar em casa com os meus. Vó, você deixa seu exemplo!

À CAPES, pela bolsa concedida.

À todos aqueles que direta ou indiretamente torcem para que eu cumpra minhas missões nessa Terra (ou que pelo menos tente cumprir!).

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO	1
SUMMARY	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1. O uso de plantas medicinais	8
2.2. Características da Espécie	10
2.2.1. A família Leguminosae-Fabaceae	10
2.2.2. O gênero <i>Stryphnodendron</i>	11
2.2.3. Hierarquia taxonômica	11
2.2.4. Características morfológicas	11
2.2.5. Distribuição geográfica:	13
2.2.6. Etnobotânica e etnofarmacologia	14
2.2.7. Farmacologia e fitoquímica	16
2.2.8. Relações ecológicas.....	16
2.3. Estudo da variabilidade genética	23
2.3.1. Variabilidade genética	23
2.3.1.1 Estruturação das populações.....	25
2.3.2. Marcadores genéticos	28
2.3.2.1. Marcador molecular do tipo AFLP.....	29
2.3.2.2. Marcador molecular do tipo Microsatélite.....	30
2.3.2.3. Tranferibilidade de marcadores microsatélites	32
3. OBJETIVO GERAL.....	34
3.1. Objetivos específicos.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Coleta.....	35
4.2. Extração do DNA	35
4.3. Preparação do material para análise por AFLP	38
4.3.1. Digestão do material	38
4.3.2. Ligação aos adaptadores	38
4.3.3. Pré-amplificação	38
4.3.4. Amplificação seletiva	39
4.3.5. Análises estatísticas	40
4.4. Ensaios de amplificação dos marcadores SSR heterólogos.....	40
4.4.1. Populações de <i>S. adstringens</i> utilizadas no experimento de transferência de microsatélites de <i>Anadenanthera colubrina</i>	40
4.4.2. Populações de <i>S. adstringens</i> utilizadas no experimento de transferência de microsatélites de <i>Hymenaea courbaril</i> e <i>Copaifera langsdorffii</i>	41
4.4.3. Iniciadores utilizados.....	41
4.4.4. Amplificação dos <i>loci</i> microsatélites	46
4.4.5. Eletroforese.....	46
4.4.6. Coloração do gel com nitrato de prata e secagem	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48

5.1. Marcador AFLP	48
5.2. Ensaios de transferência dos iniciadores do tipo Microsatélite	55
5.2.1. Microsatélites Acol (angico).....	55
5.2.2. Microsatélites Hc (jatobá) e CL (copaíba).....	55
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Informações etnobotânicas e etnofarmacológicas da espécie <i>S. adstringens</i> em diversas regiões do Brasil.....	15
Tabela 2. Compilação de trabalhos científicos indicando: atividade farmacológica, parte da planta usada, tipo de extrato, organismo testado e composto ativo de <i>S. adstringens</i>	18
Tabela 3. Espécies arbóreas de importância econômica e medicinal estudadas com marcadores genéticos.....	26
Tabela 4. Dados de passaporte dos acessos de <i>S. adstringens</i> para estudo da diversidade genética.....	36
Tabela 5. Dados de passaporte dos acessos de <i>S. adstringens</i> utilizados no experimento de transferência de microssatélites de <i>Anadenanthera colubrina</i>	40
Tabela 6. Dados de passaporte dos acessos de <i>S. adstringens</i> utilizadas no experimento de transferência de microssatélites de <i>Hymenaea courbaril</i> e <i>Copaifera langsdorffii</i>	41
Tabela 7. Locus microssatélite, repetição, sequência de iniciadores, tamanho esperado do alelo e temperatura de anelamento dos iniciadores da espécie <i>Anadenanthera colubrina</i> testados para transferência em <i>S. adstringens</i>	42
Tabela 8. Locus microssatélite, repetição, sequência de iniciadores, tamanho esperado do alelo e temperatura de anelamento dos iniciadores da espécie <i>Hymenaea courbaril</i> testados para transferência em <i>S. adstringens</i>	44
Tabela 9. Locus microssatélite, repetição, sequência de iniciadores, tamanho esperado do alelo e temperatura de anelamento dos iniciadores da espécie <i>Copaifera langsdorffii</i> testados para transferência em <i>S. adstringens</i>	45
Tabela 10. Combinações de iniciadores usados para obtenção de marcadores AFLP de <i>S. adstringens</i>	48
Tabela 11. Estatística descritiva básica das populações de <i>S. adstringens</i> por marcadores AFLP.....	50
Tabela 12. Análise Molecular de Variância (AMOVA) entre e dentro de uma	

amostragem das populações de <i>S. adstringens</i> baseado em marcadores AFLP.....	52
---	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Aspecto visual de uma planta adulta de <i>S. adstringens</i> em seu habitat natural (A); detalhes da inflorescência (B); detalhes da madeira (C).....	14
Figura 2. Locais de coleta das populações de <i>S. adstringens</i>	37
Figura 3. Gel de poliacrilamida a 6% para análise de AFLP pelas combinações E+AGT/M+TTC.....	49
Figura 4. Dendrograma das populações de <i>S. adstringens</i>	54
Figura 5. Gel de poliacrilamida com quatro dos 20 iniciadores testados. 1 a 5 – Acol 5; 6 a 10 – Acol 10; 11 a 15 Acol 11; 16 a 20 – Acol 13. 1, 6, 11, 16: população Paranapanema/SP; 2,7,12,17: população Campo Alegre/GO; 3 ,8 , 13, 18: população Cristais Paulista/SP- 1; 4,9,14,19: população Cristais Paulista/SP- 2; 5, 10, 15, 20: população Araxá/MG.....	56
Figura 6. Gel de poliacrilamida com amplificações de iniciadores SSR de <i>C.langsdorffii</i> . Números ímpares correspondem a amplificações de DNA de <i>C.langsdorffii</i> (Cop) e números pares correspondem a amplificações de DNA de <i>S. adstringens</i> (Barb). A: marcador molecular; 1- CL01 Cop; 2- CL01 Barb; 3- CL02 Cop; 4- CL02 Barb; 5- CL06 Cop; 6- CL06 Barb; 7- CL20 Cop; 8- CL20 Barb; 9- CL27 Cop; 10- CL27 Barb; 11- CL32 Cop; 12- CL32 Barb; 13- CL34 Cop; 14- CL34 Barb; 15- CL39 Cop; 16- CL39 Barb.....	56

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville POR MARCADOR MOLECULAR AFLP E TRASFERÊNCIA DE MICROSSATÉLITES

Autora: Prof^a. Me. Patrícia Calligioni de Mendonça (Bióloga)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares Pereira

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bianca Waleria Bertoni

RESUMO

A espécie *Stryphnodendron adstringens* (Leguminosae) é conhecida popularmente como barbatimão e o extrato das cascas é utilizado como cicatrizante. O objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética da espécie utilizando o marcador molecular de polimorfismo de comprimento amplificado (AFLP) e testar a transferência de microssatélites de *Anadenanthera colubrina*, *Hymenaea courbaril* e *Copaifera langsdorffii*. Foram coletados acessos localizados nos municípios de Cristalina, São João D’Aliança, Campo Alegre e Caldas Novas (GO); Delfinópolis, Luislândia, Lagoa Formosa, Sacramento e Araxá (MG) e Paranapanema, Cristais Paulista e Botucatu (SP). O DNA genômico foi extraído de folhas e as análises de polimorfismo seguiram as etapas de digestão, ligação, pré-amplificação e amplificação. Os produtos AFLP foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6% com tampão TBE 1X. A eletroforese foi realizada em voltagem constante de 80W em temperatura máxima de 50°C por 4 horas. O gel foi corado com solução de nitrato de prata e revelado em carbonato de sódio. Na análise por marcador AFLP foram produzidas 237 bandas polimórficas. A variabilidade dentro das populações foi maior (70,93%) que entre as populações (29,06%) com um valor de F_{st} 0.2906 indicando alta estruturação populacional. A população de Luislândia apresentou maior porcentagem de *loci* polimórficos (87,35), seguida da população de Cristalina (45,85). A menor variabilidade foi encontrada em Caldas Novas (22,92) e as demais ficaram na média (34,3). O Método da Média Aritmética não Ponderada (UPGMA) reuniu as populações em três grupos. Quanto aos testes de transferência de microssatélites, dos 20 iniciadores de *A. colubrina* testados, dez apresentaram resultados de

transferência, porém somente um (Acol 11) apresentou polimorfismo com somente dois alelos. Não houve transferência de microssatélites de *H. courbaril* e *C. langsdorffii*. A informação gerada por este trabalho mostrou que o marcador AFLP foi eficiente para diferenciar a variabilidade genética encontrada nas populações naturais de *Stryphnodendron adstringens* e que os dados gerados poderão ser utilizados no estabelecimento de estratégias de conservação dessa espécie medicinal do Cerrado.

Palavras chave: marcador molecular, barbatimão, conservação, Cerrado.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE GENETIC VARIABILITY OF *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville USING AFLP MARKERS AND TRANSFERENCE OF MICROSATELLITES. Botucatu, 2011. 87p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: Prof^a. Msc. Patrícia Calligioni de Mendonça (Bióloga)

Adviser: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares Pereira

Co- Adviser: Prof^a. Dr^a. Bianca Waleria Bertoni

SUMMARY

Stryphnodendron adstringens a Leguminosae species is popularly known as barbatimão and the extract of its barks is widely used as healing agent. The genetic variation of 12 populations of *S. adstringens* was determined in this study by using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) molecular markers transference of microsatellites of *Anadenanthera colubrina*, *Hymenaea courbaril* and *Copaifera langsdorffii*. Accessions were collected in the cities of Cristalina, São João D'Aliança, Campo Alegre and Caldas Novas (GO), Delfinópolis, Luislandia, Lagoa Formosa, Sacramento and Araxá (MG) and in Paranapanema, Cristais Paulista and Botucatu (SP). The genomic DNA was extracted from the leaves and the polymorphism analysis followed multiple steps including DNA digestion, ligation, pre-amplification and amplification. Amplification products were analyzed on denaturing polyacrylamide sequencing gel and running electrophoretic steps at 80 W with maximum temperature at 50°C for 4 h. The gel was stained with silver nitrate solution and developed in sodium carbonate. The AFLP analysis conducted with three primer combinations using the *EcoRI* and *MseI* restriction enzymes generated 237 polymorphic bands. The AFLP binary data were used to determine allele frequencies. Population structure was evaluated performing analysis of molecular variance (AMOVA) which allowed the estimation of the total genetic variance among and inside populations. A descriptive analysis of the total variability was obtained by calculating the percentage of polymorphic *loci*. Genetic variance

within populations was higher (70,93%) compared to the differentiation estimated among populations (29,06%). The fixation index (F_{st}) was 0.2906 indicating highly significant population structuring. The population from Cristalina showed higher percentage of polymorphic *loci* (87.35%), followed by the population of Luislândia (45.85%). Minor divergence was observed in the population from Caldas Novas (22.92%) all the other populations showed an average variance (34.3%). Phylogenetic trees created by UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) clustered the populations in 3 groups. In relation to the tests of transference of microsatellites, of the 20 iniciadores of *A. colubrina* tested, 10 presented results of transfer, but only one (Acol 11) showed polymorphism with only two alleles. There was no transfer of microsatellites from *H. courbaril* and *C. langsdorffii*. Obtained results demonstrated that the AFLP marker technology was efficient to detect the genetic variability among *Stryphnodendron adstringens* natural populations and that generated data might be used to establish strategies for the conservation of this medicinal species from the Cerrado.

Keywords: molecular marker, barbatimão, conservation, Cerrado.

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é um bioma de características únicas no planeta ocupando mais de 200 milhões de hectares do território nacional e contribui com parte dos recursos terapêuticos utilizados no país.

O Brasil, sendo o maior detentor da biodiversidade mundial, possui um imenso potencial de desenvolvimento de pesquisa na área de fitoterapia e produção de fitofármacos.

Stryphnodendron adstringens é uma espécie endêmica do Cerrado, conhecida popularmente como barbatimão, cujo extrato da entrecasca é utilizado pela população na forma de decocção no tratamento de úlceras externas e como antiinflamatório em enfermidades como diarreias e leucorréias.

A importância de se estabelecer estratégias de conservação e manejo sustentáveis de *S. adstringens* está relacionada também às suas propriedades medicinais cientificamente comprovadas em ensaios clínicos com humanos.

Recentemente foi lançada uma pomada denominada FITOSCAR[®] em uma parceria entre a empresa Apsen Farmacêutica e a Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). O medicamento é composto por extrato seco de *S. adstringens* (Mart.) Coville, sendo indicado como agente cicatrizante em vários tipos de lesões (<http://www.apsen.com.br>).

Esta informação vem reforçar a necessidade da implementação de programas de conservação para a espécie, produção de mudas e plantio comercial, além de se considerar áreas de proteção e uso sustentável da espécie.

Iniciativas de recuperação e conservação de espécies ameaçadas de extinção se fazem necessárias principalmente quando, como no caso do barbatimão, a espécie se encontra em biomas fragmentados além de possuírem alto interesse comercial, industrial ou farmacêutico.

O conhecimento do comportamento biológico de uma espécie e de suas populações em seu ambiente natural é uma contribuição importante para programas de conservação e/ou domesticação da mesma. Informações sobre sua variabilidade genética podem fornecer dados importantes para ações no que tange a adaptação destas populações às mudanças ocorrentes em seu habitat.

É possível fazer uso de marcadores moleculares como uma ferramenta útil para se adquirir conhecimentos adicionais sobre a estrutura e a organização do genoma das plantas. Marcadores moleculares do tipo AFLP são ferramentas da biologia molecular, capazes de fornecer dados consistentes e altamente informativos sobre a diversidade genética dentro e entre populações, proporcionando informações importantes para estabelecer ações de conservação e uso sustentável de espécies ameaçadas.

Para o estudo da estruturação de populações podemos fazer uso de marcadores microssatélites (ou somente SSR) que são um tipo de marcador molecular altamente informativo, porém com custo elevado devido à sua especificidade. Uma das estratégias para se diminuir o custo efetivo das análises por SSR é se testar a transferibilidade de iniciadores desenvolvidos para outras espécies, mas que possuam algum nível de parentesco.

S.adstringens pertence à família Leguminosae/Fabaceae e Sub-Família Mimosoideae. Arbóreas da mesma família como *Hymenaea courbaril* (jatobá) e *Copaifera langsdorffii* (copaíba) possuem iniciadores microssatélites já desenvolvidos. Ambas são da sub-família Caesalpinioideae e são encontradas em biomas brasileiros (Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado) e possuem atividades medicinais.

S.adstringens e *Anadenanthera colubrina* (angico vermelho) pertencem à família Leguminosae/Fabaceae e Sub-Família Mimosoideae. Esta espécie de angico possui atividade medicinal, tem distribuição por todo o território brasileiro e iniciadores SSR estão sendo desenvolvidos na Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo caracterizar geneticamente acessos de populações nativas de barbatimão através do AFLP e testar a transferência de

iniciadores SSR de outras espécies para fornecer informações relevantes a programas de conservação da espécie, possibilitando seu uso sustentável.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O uso de plantas medicinais

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2003), planta medicinal é uma espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos. É um recurso da natureza que estabelece, mantém e recupera a saúde, pois seu efeito terapêutico age no organismo de forma integrada (PEREIRA et al., 2008).

Os vegetais estão em constante processo de adaptação ao meio e isso resulta na produção de uma gama enorme de substâncias que são importantes à sobrevivência das mesmas. O homem primitivo aprendeu a se beneficiar destas estratégias químicas de sobrevivência desenvolvidas pelas plantas, passando a utilizá-las como alimento e medicamento, valendo-se de suas próprias experiências empíricas de acerto e erro, e da observação do uso de plantas pelos animais. Em suma, mitos, lendas, tradições e sítios arqueológicos apontam para o emprego amplo de plantas medicinais em todos os tempos, em todas as camadas sociais e por quase toda a humanidade (OLIVEIRA et al., 2006).

Ming et al. (2003) citam que o uso das plantas medicinais no Brasil, em suas várias categorias, tem sua origem nos povos nativos que habitavam o continente americano antes da chegada dos colonizadores e também nas diversas etnias que aqui chegaram posteriormente. O ressurgir do uso de plantas medicinais nos dias de hoje, apresenta-se como uma alternativa

terapêutica, menos agressiva ao paciente e viável para a saúde animal e humana (MARINHO et al., 2007).

O uso de plantas no tratamento de doenças é adotado por milhares de brasileiros que, encontram na flora brasileira um recurso terapêutico para resolver seus problemas de saúde. Segundo Ferro (2008) a fitoterapia tem tido, então, um papel cada vez mais importante dentro do contexto da medicina, pois cresce a cada ano o número de profissionais e pacientes que procuram este recurso para solucionar questões relacionadas a saúde .

Muitos dos recursos terapêuticos utilizados no Brasil são provenientes do Cerrado, um bioma de características únicas no planeta, ocupando mais de 200 milhões de hectares do território nacional. Guarim Neto e Moraes (2003) fizeram uma revisão de trabalhos sobre a flora medicinal no Cerrado matogrossense e compilaram trabalhos com citações de 509 espécies, distribuídas em 297 gêneros e 96 famílias. Constataram que as famílias com maior número de espécies medicinais foram Asteraceae e Fabaceae (7% das espécies), os gêneros mais citados foram *Hyptis* e *Tabebuia* (oito espécies), as espécies com maior número de citações bibliográficas foram *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stelf.

No Brasil, a implementação de ações e serviços governamentais relativos a práticas medicinais complementares, abrangendo a fitoterapia, ocorreu em 2006 e 2007, quando o Ministério da Saúde estabeleceu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2007) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006). Entretanto, o uso das plantas medicinais e de fitoterápicos, estimulado pela PNPMF, ainda requer regulamentação e pesquisas realizadas nas mais diferentes áreas do conhecimento humano (BRASIL, 2007).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 10 de março de 2010, publicou uma norma para a notificação de drogas vegetais, denominada RDC 10, para regulamentar a produção e o uso das mesmas, tanto pelas empresas produtoras, como pela população. Para cada espécie foram padronizadas indicações terapêuticas, forma de uso, posologia, cuidados e restrições a serem observados no seu uso (BRASIL, 2010). Nesta normativa da ANVISA, *Stryphnodendron adstringens* foi listada como uma das espécies cujo uso é recomendado na forma de droga vegetal.

Embora haja um interesse cada vez maior pela fitoterapia, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos no Brasil visando o estudo a respeito da diversidade biológica das plantas medicinais, o que poderá, no futuro, comprometer o fornecimento de matéria prima para a produção de fitoterápicos.

O Brasil é, com certeza, o país detentor da maior biodiversidade mundial, portanto possui um imenso potencial de desenvolvimento de pesquisa na área de fitoterapia e produção de fitofármacos. Pesquisas com plantas medicinais devem ser incentivadas, pois é necessário preservar ecossistemas ameaçados e biologicamente tão ricos. Desta forma, diante da importância da fitoterapia e da escassez de pesquisas, torna-se necessário aprofundar os estudos a respeito dos efeitos terapêuticos das plantas utilizadas no Brasil assim como seus planos de manejo e principalmente a conservação de suas espécies.

Elaborar estratégias de conservação de espécies com potencial farmacológico e industrial pode evitar uma exploração sem limites de populações naturais, que possuem sistemas de reprodução, relações ecológicas e níveis de variabilidade genética ainda desconhecidos.

2.2. Características da Espécie

2.2.1. A família Leguminosae-Fabaceae

Pertencente à ordem Fabales, representada por árvores, arbustos e ervas, é uma das maiores e mais importantes famílias botânicas sendo fonte de produtos alimentares, medicinais, ornamentais e madeireiros, entre outros. A família Leguminosae/Fabaceae Lindl. Benth, Sub-Família Mimosoideae Benth, compreende cerca de 80 gêneros com aproximadamente 3300 espécies, muitas delas de grande importância medicinal, distribuídos por regiões temperadas e tropicais (SCALON, 2007; MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2009).

2.2.2. O gênero *Stryphnodendron*

O *Stryphnodendron* é um gênero Neotropical ocorrendo da Nicarágua ao Sul do Brasil (Paraná). Apenas Venezuela e Equador possuem espécies exclusivas do gênero, que são *S. levelii* Cowan (1958) e *S. porcatum* eill & Occh. f. (1989), respectivamente. Dos 36 táxons do gênero cerca de 32 (89%) ocorrem em nosso território, sendo 13 exclusivos do Brasil, principalmente no Cerrado e na Floresta Amazônica (SCALON, 2007; OCCHIONI, 1990).

2.2.3. Hierarquia taxonômica

Domínio: Eucariota

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta Cronquist, Takht e W. Zimm ex Reveal

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superordem: Rosanae Takht.

Ordem: Fabales Bromhead

Família: Leguminosae/Fabaceae Lindl. Benth

Sub-Família: Mimosoideae Benth.

Gênero: *Stryphnodendron* (Mart.1837)

Espécie: *Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2009; FLORA BRASILIENSIS, MARTIUS 1876).

Sinonímias: *Acacia adstringens* Martius, *Mimosa barbadetimam* Vell., *S. barbatimão* Martius, *S. barbatimam* (Vell.)Martius, *Mimosa virginalis* Koster (OCCHIONI, 1990).

2.2.4. Características morfológicas

Lorenzi (1992) descreve a espécie como uma árvore de dois a seis metros de altura de tronco, uma planta decídua, heliófita, pioneira e seletiva, xerófita e endêmica do Cerrado. É uma espécie perenifólia, com pico de floração, produção de folhas novas e queda de folhas

entre julho e outubro. Floresce em meados de setembro, prolongando-se até final de novembro. Seus frutos requerem um longo período de maturação, cerca de um ano, alcançando a maturidade na época seca do ano seguinte à produção da flor, entre julho e setembro.

O fruto é uma vagem lenhosa, curta, grossa, carnosa, com 8 a 10 centímetros de comprimento. Suas sementes são achatadas e envoltas por uma faixa escura. As flores são dispostas em inflorescências do tipo racemo de espigas, pequenas e numerosas, em torno de seis milímetros de comprimento; corola de cor creme esverdeada, com pétalas livres, possui muitos estames, pólen em políades e anteras com glândula apical relacionada com fraco odor da flor. Os filetes possuem o dobro do comprimento da corola, ovário súpero, unilocular com óvulos parietais (LORENZI, 1992; FELFILI et al., 1999; ORTIZ et al., 2003).

A unidade básica de atração de polinizadores não é a flor individual, mas a inflorescência. A produção de frutos é baixa, características de algumas leguminosas, os frutos são legumes indeiscentes que amadurecem em agosto do ano seguinte ao da florada. A espécie é considerada andromonóica, ou seja, possui flores hermafroditas e masculinas dispostas por toda inflorescência. As flores masculinas são menores que as hermafroditas. A produção de néctar é muito pequena e as flores hermafroditas secretam mais néctar que as flores masculinas, porém as flores masculinas produzem uma quantidade maior de pólen, de forma muito acentuada na espécie *S. adstringens* (ORTIZ et al., 2003).

As folhas (folíolos) de *S. adstringens* são compostas bipinadas, com cinco a oito jugas, com seis a oito pares de folíolos por pina (LORENZI, 1992), de tamanho variado entre 30 a 60 mm com ambas as faces da mesma coloração, ausentes de pubescência (SANCHES et al., 2007). O trabalho de Oliveira e Figueiredo (2007) descreve as folhas de *S. adstringens* apresentando estruturas anatômicas xeromorfas nas folhas adultas, como estômatos em pequenas depressões, folíolos anfiestomáticos, longos tricomas tectores unicelulares, cutícula espessa e feixe vascular envolto por bainha esclerenquimática. Utilizando a microscopia de fragmentos, estes autores descreveram que os tricomas da espécie são mais longos do que os encontrados em *S. polyphyllum* e *Dimorphandra mollis*, sugerindo que esta característica pode auxiliar na diferenciação taxonômica do *S. adstringens*.

A característica morfológica da casca é muito uniforme, sendo recuadas no sentido transversal, com coloração pardo-esverdeada na superfície externa e pardo-avermelhada na

superfície interna, com espessura de aproximadamente 12 mm para o tronco e 4 mm para os ramos. A presença de líquens dos gêneros *Caloplaca* sp., *Lopadium* sp., *Haematomma* sp. e *Lecanora* sp são comuns na casca além de outros tipos em menor quantidade. Microscopicamente o ritidoma da espécie apresenta o seguinte padrão: o súber, originário do felogênio, evidenciado pelo espessamento de suberina nas paredes de suas células, substância esta que confere impermeabilidade à água e ao ar. As células são grandes, arredondadas e aparentemente sobrepostas. A presença de lignina nas células suberosas é evidenciada pela safranina. O felogênio possui células com aspecto retangular, radialmente achatada e enfileirada, com paredes delgadas e lume claro. A feloderme é caracterizada por células alongadas com paredes finas não lignificadas. O parênquima cortical apresenta um grande número de células esclerenquimáticas, distintas por sua forma, tamanho e bordas espessas, nomeadas como células pétreas. Essas células são dotadas de paredes secundárias com lignina, mostrando-se rosadas em Safrablau, sendo importantes na sustentação do vegetal. Além do floema, os feixes vasculares têm função de tecido mecânico e apresentam-se acompanhados de cristais prismáticos. Neste tecido, parênquima cortical, foi possível visualizar grãos de amido e células com conteúdo pardo que sugerem idioblastos taníferos (SANCHES et al., 2007).

O aspecto visual de uma planta adulta de *S. adstringens* em seu habitat natural com detalhes da inflorescência e da madeira pode ser observado na figura 1.

2.2.5. Distribuição geográfica:

A distribuição de *S. adstringens* é ampla e, segundo Lorenzi (1992) e Felfili et al. (1999), abrange os estados do Pará, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e norte do Paraná, porém Occhioni (1990) mostrou que a distribuição geográfica da espécie ocorre nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Norte do Paraná. O trabalho de Corrêa (2007; CORRÊA et al., 2011) corrobora com o de Occhioni (1990), elucidando que a distribuição geográfica da espécie está entre as latitudes 13° e 24° S, as longitudes 50° a 42° W-GR e altitudes variando entre 606 m a 1.047 m.

2.2.6. Etnobotânica e etnofarmacologia

O nome *Stryphnodendron* vem do grego e significa madeira dura (stryphnos = duro e dendron = madeira). As denominações do barbatimão, ybátimo ou uabatimõ, etimologicamente tem origem indígena e significam adstringente (MELO, 1998).

Popularmente a espécie é conhecida como barbatimão, barbatimão verdadeiro, barbatimão vermelho, barba-de-timão, charãozinho-roxo e casca-da-virgindade. A entrecasca é muito utilizada pela população, na forma de decocção, no tratamento de várias enfermidades descritas na Tabela 1.



Figura 1. Aspecto visual de uma planta adulta de *S. adstringens* em seu habitat natural (A); detalhes da inflorescência (B) e detalhes do tronco (C). Fotos: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares Pereira

Tabela 1. Informações etnobotânicas e etnofarmacológicas da espécie *S. adstringens* em diversas regiões do Brasil.

Localização	Parte utilizada	Forma de uso	Indicação terapêutica	Referências
Mato Grosso	Casca e entrecasca	Chá, molho e banho	Úlcera, inflamação, feridas, corrimento e dor de barriga.	CORETTE-PASA, 2011; SOUZA et al., 2010; MOREIRA; GUARIM-NETO, 2009
Mato Grosso do Sul (Ponta Porã)	*	Apenas para uso externo.	Age contra infecções, tumores, feridas, descarga, irritação vaginal e usado como adstringente .	PEREIRA et al., 2009.
Minas Gerais	(1) casca do caule (2) casca, raiz e folhas	(1) Decocto (2) Aplicação cutânea direta	(1) adstringente, cicatrizante, na blenorragia, na diarreia, na hemorragia, nas úlceras e uretrites (2) contra calvície.	RODRIGUES; CARVALHO, 2001
Paraíba	Casca	Chá	Gastrite, úlcera, diabetes, colesterol, inflamação do ovário e do útero.	ALVES et al., 2007
Paraná (Vale do Ribeira)	Casca	Decocção	Cicatrização.	LOPES, 2010
Pernambuco (Recife)	Caule (casca interna)	*	Inflamação, má circulação, cicatrização de feridas e limpeza de feridas uterinas.	ALBUQUERQUE et al., 2007
Região Nordeste	Casca	Decocção	Diarreia e hemorragia.	AGRA et al., 2008

(*) dados não informados

2.2.7. Farmacologia e fitoquímica

Trabalhos com plantas medicinais visando confirmar seus efeitos farmacológicos preconizados em levantamentos etnofarmacológicos têm aumentado ano a ano, reforçando a importância da fitoterapia no Brasil. A Tabela 2 resume as principais propriedades farmacológicas da espécie *S. adstringens* e seus constituintes ativos.

A partir de trabalhos como estes, recentemente foi lançada uma pomada denominada FITOSCAR[®] em uma parceria entre a empresa Apsen Farmacêutica e a Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). O medicamento é composto por extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, indicado como agente cicatrizante em vários tipos de lesões (<http://www.apsen.com.br>).

Atualmente existe a necessidade da implementação de programas de conservação da espécie, produção de mudas e plantio comercial, além de se considerar áreas de proteção e uso sustentável da espécie.

2.2.8. Relações ecológicas

Alguns trabalhos são encontrados na literatura sobre as relações ecológicas da espécie e a maioria deles visa estudar os impactos negativos entre *S. adstringens* e outros organismos.

Afonso e Pott (2002) citam o fruto de *S. obovatum* como abortivo para o gado e incluem outras espécies como *S. adstringens* (*S. barbatimao*) e *S. coriaceum* como tóxica. Brito et al (2001) apontam as taxas elevadas de taninos, tanto de *S. obovatum* quanto *S. adstringens* e *S. coriaceum*, como fator causal de toxicidade. Trabalho desenvolvido por Pereira et al (1989) corrobora com estes dados.

Os principais visitantes florais de *S. adstringens* são da classe Insecta com destaque para a ordem Hymenoptera (93,2% do total de visitas). outros visitantes florais são das ordens Diptera (4,7%), Lepidoptera (1,8%) e Coleoptera (0,2%). Em alguns casos, as abelhas (ordem Hymenoptera) são praticamente os únicos visitantes ou os mais frequentes (85,6% das visitas), coletando tanto néctar quanto pólen. Foram identificadas como *Exomalopsis analis* e

Exomalopsis sp. (Anthophoridae), *Scaptotrigona depilis* e *Geotrigona* sp. (Apidae, Meliponinae) e *Augochloropsis* sp. (Halictidae) (ORTIZ et al., 2003).

A longevidade das abelhas é significativamente afetada pelo teor de tanino do pólen e do néctar de *S. adstringens* (SANTORO et al., 2004) ou quando são tratadas com inflorescências desidratadas do barbatimão ou de *Dimorphandra mollis* (CINTRA et al., 2002). Souza et al (2006) também observaram a toxicidade de extratos metanólicos de barbatimão em *Apis mellifera*. Fato este em que os autores sugerem a criação de abelhas longe de regiões ricas em espécies de *Stryphnodendron*.

A dispersão das sementes do barbatimão é do tipo zoocórica (SILVA JUNIOR, 2005), entretanto não há dados na literatura mencionando quais espécies são responsáveis por esta dispersão. Porém, a dispersão pode ser afetada pelo ataque de insetos que se desenvolvem no interior das sementes, com destaque para a ordem Coleoptera, que interage nos ecossistemas florestais, em associações com frutos e/ou sementes de espécies arbóreas nativas. Esta interação inseto/semente pode afetar significativamente a disseminação e a perpetuação das espécies atacadas. Dentro da ordem Coleoptera foi encontrado uma associação negativa entre insetos da família Bruchidae (*Acanthoscelides* sp) e frutos e sementes de *S. adstringens*, interferindo na viabilidade e na dispersão de suas sementes afetando a composição e a estrutura de populações da espécie (ZIDCO, 2002).

Formigas de várias espécies também se relacionam à *S. adstringens*, provavelmente com a função de proteção da árvore e nutrição da formiga. A visita de nove espécies de formigas em nectários extraflorais de barbatimão foi observada, principalmente após queimadas, com predominância da espécie *Camponotus*, que de alguma forma é favorecida pela queimada. Como somente em casos excepcionais os nectários extraflorais possuem a função de promover a polinização, funcionando na maioria das vezes como atrativo para os polinizadores. As relações tri-tróficas deste sistema não são elucidadas supondo somente que estas formigas tenham a função de proteger a espécie contra ataques de herbívoros e patógenos (KNOECHELMANN; MORAIS, 2008).

Trabalhos sobre interações ecológicas entre espécies naturais do cerrado e seus predadores, polinizadores e/ou dispersores constituem um campo de estudo pouco explorado, porém de enorme importância para uma real interpretação de suas informações biológicas, taxonomia, ecologia e, conseqüentemente, conservação desta espécie já ameaçada.

Tabela 2. Compilação de trabalhos científicos indicando: atividade farmacológica, parte da planta usada, tipo de extrato, organismo testado e o composto ativo de *S. adstringens*.

Atividade farmacológica	Parte da planta	Tipo do extrato	Organismo testado	Composto ativo	Referência
Ação sobre o metabolismo do fígado	Casca	Extrato aquoso	Ratos Wistar	Taninos	REBECCA et al., 2003
Antibacteriana	Casca	Extrato hidroalcoólico	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Shigella flexneri</i>	Taninos, flavonóides, alcalóides e triterpenos	GONÇALVES, 2007
Antifúngica	Casca e folhas	Extrato hidroalcoólico	<i>Trichophyton rubrum</i>	*	MELO E SILVA et al., 2009
	Casca	Extrato bruto	103 isolados de secreção vaginal: - 96 <i>Candida albicans</i> - 01 <i>Candida parapsilosis</i> - 01 <i>Candida tropicalis</i> - 04 <i>Candida</i> sp - 01 gênero não identificado	Taninos condensados (polímeros de proantocianidinas prodelphinidin e unidades prorobinetinidin e ácido gálico)	ISHIDA et al., 2006

Antigenotóxica (antimutagênica)	*	Extrato etanólico comercial	Medula óssea de camundongos <i>Mus musculus</i>	*	SILVA-DE- ANDRADE et al., 2006
Antiinflamatória (artrite)	Casca	Fração solúvel em acetona	Ratos Wistar albino e Camundongos Swiss	Taninos, chalconas e compostos triterpenóides	LIMA et al., 1998
Antimicobacteriana	Casca	Extrato hidroalcoólico	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	*	OLIVEIRA et al., 2007
Antimicrobiana (principalmente antigonorréico e antidiarréico)	Casca	Extrato hidroalcoólico bruto	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Kocuria rizophila</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida krusei</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	*	ORLANDO, 2005
Antinociceptivo periférico (dor)	Casca	Extrato aquoso bruto e	Ratos Wistar Camundongos Swiss	*	MELO et al., 2007

fracionados					
Antioxidante e antimicrobiana	Casca	Extrato etanólico	<i>Candida albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>	Taninos	SOUZA et al., 2007
Antiparasitário	Casca	Extrato bruto e frações	<i>Herpetomonas samuelpessoai</i>	*	HOLETZ et al., 2005
Antiprotozoário	Casca	Extrato bruto	<i>Leishmania amazonensis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i>	*	LUIZE et al., 2005
Anti-séptico	Casca	Formulação de sabonete líquido	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>Escherichia coli</i>	Taninos	SOUZA et al., 2007
Antiviral	Casca	Extrato bruto aquoso	Poliovírus e herpesvírus bovino em células em suspensão	Taninos condensados	FELIPE et al., 2006
Ausência de genotoxicidade	Casca	Extrato fitoterápico	<i>Drosophila melanogaster</i>	*	SOUSA et al., 2003
Cicatrização de feridas cutâneas	Casca	Pomada com extrato aquoso da casca	Rato	*	COELHO et al., 2010
		Pomada com	Rato	Proantocianidinas	HERNANDES et al., 2010

		extrato da casca	Camundongos <i>Mus</i>		EURIDES et al.,
		Extrato aquoso	<i>musculus</i>	*	1996
Cicatrização em pele de equinos	*	Solução aquosa	Equinos adultos	*	MARTINS et al., 2003
Cicatrização de úlceras de decúbito (escaras)	Entrecasca	Pomada contendo 3% de fitocomplexo fenólico de barbatimão.	Pacientes com escaras de nível I a III (graus de profundidade)	Prorobinetinidinas e Prodelfinidinas	MINATEL et al., 2010
Contra infecções da cavidade oral, tais como estomatite, cárie dentária e periodontite.	Folhas e casca	Extratos etanólico, butanólico e hexânico	<i>Candida albicans</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	*	PEREIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2009
Controle da cárie dental	Casca seca	Extrato hidroalcoólico	<i>Streptococcus mitis</i> <i>Lactobacillus casei</i>	*	SOARES et al 2008
Não altera ciclo estral e atividade ovariana	*	*	Rato	*	OLIVEIRA; VANZELER, 2011

Não possui atividade genotóxica	Casca do caule	F2 aquoso	Rato	Proantocianidina	COSTA et al., 2010
Hirsutismo, hiperpigmentação da pele, foliculite e acne	Casca	Creme com 6% do extrato da casca	Mulheres de 18 anos ou mais com excesso de pêlos terminais (hirsutismo)	*	VICENTE et al., 2010
Toxicidade	*	Extrato total	Ratos Wistar	*	REBECCA et al., 2002
	Folhas	Extrato hidroalcoólico	Camundongos Swiss	*	ALMEIDA et al., 2010
Tripanocida	Casca	Extrato bruto etanólico	Camundongos	*	HERZOG-SOARES et al., 2006

(*) dados não informados

2.3. Estudo da variabilidade genética

2.3.1. Variabilidade genética

Para a sobrevivência e reprodução de populações de plantas em ambientes naturais pelo menos dois fatores são importantes: a variabilidade genética e a plasticidade fenotípica. É somente em ambientes extremos, talvez no limite do alcance da espécie, que a seleção natural torna-se forte o suficiente para causar uma mudança genética mensurável na população (PRIMACK; KANG 1989).

A variabilidade genética observada em populações naturais, tanto de plantas quanto de animais, é o resultado de um balanço complexo entre os processos de mutação, recombinação (migração ou fluxo gênico), deriva genética e seleção além de fatores como tamanho populacional, padrões de cruzamento, distribuição geográfica de indivíduos. O termo recombinação é restrito para o fluxo gênico do tipo vertical, ou seja, troca gênica entre populações. Esta distribuição não aleatória de alelos e genótipos, no espaço e no tempo, de ações evolutivas que atuam dentro do contexto de cada espécie e da população é tida como estrutura genética (HAMRICK, 1982; BEJA-PEREIRA; ALMEIDA, 2005; BORÉM, 2005; HARTL, 2008).

A determinação da estrutura genética de uma população depende de fatores ecológicos que afetam a reprodução e a dispersão de seus genes. O processo reprodutivo se encarrega de manter o padrão genotípico para as subseqüentes gerações, enquanto a dispersão de pólen e sementes determina os padrões de dispersão dos genes dentro e entre populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

É praticamente impossível estudar todas as espécies de ecossistemas com alta diversidade, como por exemplo, as florestas tropicais. O estudo de populações do ponto de vista genético tem sua importância, principalmente para interpretar a comunidade vegetal e extrapolar os resultados para espécies com características semelhantes. Algumas espécies podem servir de modelo para outras em função das suas características como é o exemplo de *Schizolobium parahyba* que é uma arbórea típica pioneira da família Leguminosae, de rápido crescimento e ampla distribuição geográfica, com dispersão anemocórica e polinização por abelhas (FREIRE et al., 2007; KAGEYAMA et al., 2003).

Padrões observados de estrutura genética se associam a padrões reprodutivos e demográficos. Espécies com maiores taxas de cruzamento, distribuição agregada e alta densidade populacional apresentam menor divergência entre as populações do que espécies com maiores taxas de autofecundação e baixa densidade populacional. Em diferentes estágios sucessionais não ocorrem padrões claros de distribuição de diversidade entre e dentro de populações. Espécies tipicamente pioneiras tendem a apresentar taxas mais altas de cruzamento entre indivíduos aparentados (endogamia) em relação a espécies de outras categorias sucessionais (KAGEYAMA et al., 2003).

O conhecimento do fluxo gênico e a variabilidade dentro e entre as populações são importantes para conservação das mesmas (ZUCCHI, 2002). Neste sentido, vários trabalhos visando a análise da estrutura genética das populações e a caracterização dos níveis de diversidade têm sido desenvolvidos a partir da determinação de porcentagem de *locus* polimórficos, números de alelos por *locus* e heterozigosidade média.

Todos os mecanismos que geram movimento de genes entre uma população e outra podem ser considerados fluxo gênico. Geralmente ocorre dentro das populações e também pode ser sinônimo para migração. É através do fluxo gênico que as mudanças genéticas das populações ocorrem. Porém ele afeta todos os *loci* da mesma forma (exceto quando a movimentação ocorre de DNA extra nuclear), mas cada *locus* genético e cada resposta fenotípica responderão a diferentes regimes seletivos e processos de mutação. Como resultado disso, alguns *loci* podem mostrar pouca diferenciação geográfica, enquanto outros extrema diferenciação (SLATKIN, 1985).

Valores relativamente elevados de fluxo gênico (Nm) para árvores tropicais são provavelmente associados com o fato de que muitos polinizadores e sementes são capazes de se movimentarem a longas distâncias (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Neste sentido, Schaberg et al (2009) consideram que o estreitamento de *pools* gênicos, ocasionado pela pressão antrópica moderada, diminui o potencial de uma espécie para se adaptar a novas mudanças ambientais, evidenciando a importância da variabilidade genética das espécies para sobreviver ao longo do tempo.

Populações pequenas ou que estejam diminuindo de tamanho sofrem endogamia acelerada e perda da diversidade genética, o que leva à depressão endogâmica e a uma menor habilidade para se adaptarem às mudanças ambientais. Assim, uma das possibilidades de

prevenção da perda da variabilidade genética é o fluxo gênico, uma vez que outros fatores como a mutação é um evento mais raro na natureza (PRIMACK; RODRIGUES 2001; FRANKHAM et al., 2008).

Para estimar os padrões de variabilidade genética em populações naturais, podem ser utilizados marcadores moleculares de diversos tipos, de forma rápida e eficiente, visando o levantamento de dados para tomadas de decisões na conservação de recursos genéticos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Na atualidade, o estudo de diversidade genética tem sido desenvolvido a partir de marcadores genéticos. A Tabela 3 apresenta algumas espécies arbóreas de importância econômica e medicinal e a técnica medicinal utilizada.

Na tentativa de amenizar a perda da variabilidade de *S. adstringens* um banco de germoplasma ativo de *S. adstringens* em uma unidade de conservação RPPN (Reserva Particular do Patrimônio Natural), denominada Eco Cerrado Brasil, foi estabelecido por Corrêa na cidade Araxá, MG (2007; CORRÊA et al., 2011).

2.3.1.1 Estruturação de populações

A ausência de panmixia, provoca a estruturação das populações na medida em que a probabilidade de reprodução entre dois indivíduos quaisquer da população diminui, dependendo de fatores biológicos e geográficos (SOLÉ-CAVA, 2001).

Segundo Wright, 1978 podemos classificar a estrutura de uma população em três tipos principais, dependendo do tipo de dispersão de seus genes. O modelo de isolamento por distância, onde a limitação da dispersão ocorre em função da distância geográfica; o modelo de ilhas, onde a diferenciação entre as populações não depende da distância entre elas (filopatria) e o modelo passo-a-passo, onde cada subpopulação somente pode trocar migrantes com as populações vizinhas.

Neste sentido, o estudo da estruturação de populações permite direcionar os esforços de conservação para uso mais eficiente dos recursos disponíveis.

Tabela 3. Espécies arbóreas de importância econômica e medicinal estudadas com marcadores genéticos.

Espécie	Técnica molecular utilizada	Referência
<i>Acacia senegal</i>	AFLP	SIRELKHATEM; GAALI, 2009
<i>Albizia sp</i>	AFLP	APARAJITA; ROUT, 2010
<i>Araucaria angustifolia</i>	AFLP, SSR	SOUZA, 2006; STEFENON et al., 2003; BITTENCOURT; SEBBEN, 2008
<i>Aspidosperma polyneuron</i>	AFLP	DAMASCENO et al., 2011
<i>Cabralea canjerana</i>	SSR	PEREIRA et al., 2011
<i>Caesalpinia echinata</i>	AFLP	CARDOSO et al., 2005
<i>Calophyllum brasiliense</i>	AFLP	CARNAVALE-BOTTINO, 2006
<i>Cariniana estrellensis</i>	SSR	GUIDUGLI et al., 2009; 2010
<i>C. legalis</i>		
<i>Cassia sp</i>	ISSR, RAPD, SSR	MOHANTY et al., 2010
<i>Cedrela fissilis</i>	SSR	GANDARA, 2009
<i>Copaifera langsdorffii</i>	SSR	MARTINS et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; TARAZI et al., 2010
<i>Eremanthus erythropappus</i>	RAPD	FREITAS et al., 2008
<i>Eucalyptus urophylla</i>	RAPD	PIGATO; LOPES, 2001
<i>Eugenia dysenterica</i>	RAPD, SSR	ZUCCHI, 2002
<i>Eugenia uniflora</i>	AFLP, SSR	FRANZON et al., 2010; FERREIRA-RAMOS et al., 2008
<i>Eurycoma longifolia</i>	SSR	TNAH et al., 2011
<i>Gmelina arborea</i>	AFLP	ARAYA et al., 2005
<i>Hymenaea courbaril</i>	SSR	SILVA, 2010; CIAMPI et al., 2008; FERES et al., 2009
<i>Malus sylvestris</i>	AFLP, SSR	COART et al., 2003

<i>Manilkara huberi</i>	cpSSR	AZEVEDO et al., 2008
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	AFLP, fAFLP	FREITAS et al., 2005; 2004
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	SSR	VIEGAS, 2009
<i>Myrcia splendens</i>	ISSR	BRANDÃO, 2008
<i>Picea abies</i>	AFLP, SSR e ESTP	ACHERÉ et al., 2005
<i>Pinus pinea</i>	RAPD, cpSSR, AFLP, SSAP	EVARISTO et al., 2007
<i>Plathymenia reticulata</i>	RAPD	LACERDA et al., 2001
<i>Populus cathayana</i>	AFLP	CHEN; PENG 2010
<i>Prunus armeniaca</i>	AFLP	HAGEN et al., 2002
<i>Prunus mume</i> , <i>P. persica</i>	fAFLP	WICKERT et al., 2007
<i>Schizolobium parahyba</i>	RAPD	FREIRE et al., 2007
<i>Sclerocarya birrea</i>	AFLP	MOGANEDI et al., 2011
<i>Sophora toromiro</i>	SSR, RAPD	MAUNDER et al., 1999
<i>Tabebuia heptaphylla</i>	SSR	MORITA, 2008
<i>Tabebuia roseoalba</i>	SSR	MARTINEZ, 2008

SSR (*Simple Sequence Repeat*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), cpSSR (*Chloroplast Simple Sequence Repeat*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), fAFLP (*fluorescence Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSAP (*Sequence Specific Amplification Polymorphism*), ESTP (*Expressed Sequence Tags Polymorphism*), ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*)

2.3.2. Marcadores genéticos

Marcadores genéticos podem ser empregados para revelar polimorfismos e avaliar diferenças entre dois ou mais indivíduos (BERED et al., 1997), sendo os mais adequados para o estudo de populações.

Ferreira e Grattapaglia (1998) definiram marcador molecular como: todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico do DNA, correspondentes a regiões expressas ou não do DNA.

Um *locus* molecular que apresenta segregação mendeliana é considerado um marcador genético. Por isso, os marcadores de DNA são usados para estudos de genética de populações, mapeamento e análises de similaridade e distância genética, visando à identificação de acessos de plantas, animais ou de isolados de um microrganismo ou ainda para contribuir com estudos de sistemática (LOPES et al., 2002).

Com o desenvolvimento da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) (MULLIS; FALOONA, 1987) surgiram novos marcadores moleculares. Entre eles, destacam-se as técnicas de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (WILLIAMS et al., 1990) e de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (VOS et al., 1995), que são métodos sensíveis, rápidos, relativamente simples e que revelam vários *loci* dispersos pelo genoma e não exigem conhecimento prévio da informação genética de seqüências-alvo, como no caso dos marcadores microssatélites (SSR - simple sequence repeats) (TAUTZ, 1989).

Uma característica dos marcadores RAPD e AFLP, diferente dos marcadores isoenzimáticos, RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) e microssatélites, é sua dominância. Alelos de um mesmo *locus* são revelados pela presença ou ausência de uma banda que, por sua vez, resulta da amplificação de um fragmento de determinado tamanho. No entanto, não é possível saber se o *locus* amplificado está em homozigose ou heterozigose. Sendo assim, marcadores dominantes, ao contrário dos codominantes, não permitem a distinção entre genótipos homozigóticos e heterozigóticos, os quais constituem apenas uma classe, isto é, a que apresenta o alelo amplificado. Os indivíduos nos quais o alelo não é amplificado constituem a outra classe, considerada homozigótica para ausência da banda, qualquer que seja o motivo pelo qual o fragmento não foi amplificado (LOPES et al., 2002).

Na atualidade os dois principais marcadores utilizados em estudos de diversidade genética são AFLP e microssatélite, sendo que a principal vantagem do primeiro é sua ampla cobertura do genoma, possibilitando trabalhos abrangentes sobre diversidade em populações e a do segundo é o fornecimento de dados que permitem investigar a estrutura da população (GAUDEUL et al., 2004).

2.3.2.1. Marcador molecular do tipo AFLP

O método do AFLP associa polimorfismos gerados por enzimas de restrição e PCR, onde em um primeiro momento envolve a restrição do DNA genômico por duas enzimas, uma de corte raro e outra de corte frequente, gerando um número extremamente elevado de fragmentos. Adaptadores são adicionados no final dos fragmentos de DNA digerido que vão parear com iniciadores específicos onde estas sequências serão amplificadas por PCR. A amplificação seletiva é alcançada pelo uso de iniciadores que se estendem aos fragmentos de restrição, amplificando apenas os fragmentos em que as extensões primárias correspondem aos nucleotídeos que flanqueiam a sítios de restrição. A amplificação é seletiva pelo uso de iniciadores com alguns nucleotídeos aleatórios na extremidade 3' (VOS et al., 1995; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os fragmentos gerados são então separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. O polimorfismo é detectado pela presença ou ausência de fragmentos amplificados e são normalmente dominantes. Com esta técnica pode-se detectar uma variação considerável do genoma, no qual se reflete no número de produtos amplificados com uma combinação de iniciadores. A eficiência do AFLP em detectar polimorfismo pode ser maior do que a obtida por RAPD e RFLP (BECERRA; PAREDES, 2000).

Segundo Vos et al (1995), a robustez e a confiabilidade da técnica de AFLP se devem à combinação do RFLP e da técnica de PCR.

Em trabalho realizado por Bertoni et al. (2010), a técnica de AFLP mostrou-se eficiente para determinar a estrutura genética de populações naturais de *Jacaranda decurrens*, uma espécie medicinal endêmica do Cerrado. Trabalho semelhante foi realizado com populações naturais de *Eugenia uniflora* (pitangueira) (FRANZON et al., 2010). Estes estudos comprovam que a técnica é uma excelente ferramenta de análise de diversidade genética em

populações naturais e de valor econômico importante, possibilitando subsídios a programas de melhoramento e conservação genética, pois AFLP é uma técnica adequada para estimar diversidade genética devido à sua ampla cobertura do genoma (GAUDEUL et al., 2004).

A diversidade genética de espécies arbóreas como *Araucaria angustifolia* (STEFENON et al., 2003), *Populus cathayana* (CHEN; PENG, 2010) e *Aspidosperma polyneuron* (DAMASCENO et al., 2011) foram determinadas através do AFLP, com o objetivo de auxiliar na elaboração de planos de manejo e conservação das mesmas.

Também em espécies medicinais a técnica tem sido utilizada com sucesso para determinar polimorfismos. Ma et al. (2010) utilizaram três combinações de iniciadores em oito populações de *Achillea millefolium* (mil folhas) e Strikic et al. (2010) também utilizaram a técnica para verificar o nível de diversidade em *Olea europaea* (oliveira).

2.3.2.2. Marcador molecular do tipo Microsatélite

Microsatélites formam uma classe de DNA que se caracteriza por sequências muito curtas (2 a 5 pares de bases) repetidas em *tandem*. São conhecidos também como *Simple Sequence Repeats*, ou simplesmente SSR. Para se obter esses marcadores é necessário a amplificação dessas regiões microsatélites, via PCR, através de iniciadores específicos, geralmente de tamanho entre 20 a 25 pb, o que requer a construção de bibliotecas genômicas, seleção e sequenciamento dos clones positivos e posterior desenho destes iniciadores; porém, em alguns casos, pode-se utilizar iniciadores já desenvolvidos para espécies geneticamente relacionadas, o que chamamos de transferibilidade. São sequências encontradas tanto em animais como em plantas e constitui uma classe muito polimórfica de marcadores (TAUTZ, 1989).

Segundo Chase et al. (1996), os marcadores moleculares microsatélites são ferramentas úteis para a construção de mapas genéticos, análise de paternidade, fluxo gênico, diagnóstico de doenças, investigação forense, análise populacional, estudos ecológicos e biologia da conservação.

Comparado com as demais técnicas de marcadores moleculares, os microsatélite são eficientes para detectar polimorfismo em espécies ou indivíduos de uma mesma população, apresentando como vantagem a característica de serem codominantes. Isso é de

fundamental importância para serem utilizados em análises genéticas e evolução de populações naturais, especialmente em espécies altamente heterozigóticas (ZUCCHI, 2002; BRONDANI et al., 2006).

A técnica de microssatélite tem sido aplicada com sucesso para várias espécies tropicais de importância econômica como: *Capsicum annuum* (pimentão), *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Cocos nucifera* (coco), *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Hymenaea courbaril* (jatobá) (BUSO et al., 2003), entre outras. Além disso, este marcador foi utilizado, de maneira vantajosa, para *Cariniana estrellensis* e *C. legalis*, o que permitiu maior entendimento sobre o sistema de fecundação, fluxo gênico, estrutura e dinâmica populacional destas espécies, colaborando para programas de conservação (GUIDUGLI et al., 2009; 2010).

Além disso, também tem sido utilizado para caracterizar o impacto do isolamento espacial no fluxo gênico, em fragmentos florestais e árvores isoladas, como mostra o trabalho realizado por Ferreira-Ramos et al. (2008) com *Eugenia uniflora* (pitanga) e por Martinez (2008) com *Tabebuia roseoalba* (ipê branco).

Estudos visando à caracterização genética de acessos mantidos em banco de germoplasma utilizam também marcadores microssatélites. Um exemplo pode ser citado com a espécie *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (jatobá) cuja diversidade genética e o tamanho efetivo da população foi determinada a partir de seis *loci* microssatélites (FERES et al., 2009).

Um conjunto de 24 iniciadores microssatélites de *Kirengeshoma palmata* foi desenvolvido para avaliar a estrutura genética de populações e padrão de cruzamento, fluxo gênico, parentesco e dinâmica populacional desta espécie criticamente ameaçada de extinção e com potencial medicinal. Estes marcadores foram testados em 37 indivíduos de quatro populações da China e do Japão, e 12 se mostraram polimórficos, com o número de alelos por *locus* variando de dois a oito. Os mesmos iniciadores também apresentaram amplificação em *K. koreana* (SUN et al., 2010).

Microssatélites também foram desenvolvidos para as espécies medicinais *Butia eriospatha* (NAZARENO et al., 2011), *Eurycoma longifolia* (TNAH, et al., 2011), *Halenia elliptica* (ZHANG et al., 2011), *Himatanthus drasticus* (BALDAUF et al., 2011), *Hypericum perforatum* (CORRAL et al., 2011), *Cabralea canjerana* (PEREIRA et al., 2011), *Arrabidaea chica* (FIGUEIRA et al., 2010), *Copaifera langsdorffii* (CARVALHO et al., 2010) e *Mormodica charantia* (WANG et al., 2010).

2.3.2.3. Transferibilidade de marcadores microssatélites

Se o desenvolvimento de iniciadores microssatélites para uma espécie necessita de alto investimento financeiro, de trabalho e de tempo, por outro lado é possível transferir iniciadores desenvolvidos de uma espécie para outra, uma vez que podem ocorrer os mesmos sítios microssatélites entre espécies relacionadas (BARBARÁ et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006).

A transferibilidade de microssatélites em plantas é bem sucedida, principalmente dentro de um gênero, com frequência de sucesso de quase 60% em eudicotiledôneas e perto de 40% em monocotiledôneas. Entre gêneros, as taxas de transferência são de aproximadamente 10% para eudicotiledôneas e quase nula para monocotiledôneas (BARBARÁ et al., 2007).

Brondani et al (1998) transferiram 100% de iniciadores desenvolvidos entre duas espécies de *Eucalyptus*, sendo que, dos 20 *locus* SSR observados, 12 foram derivados de bibliotecas genômicas de *E. grandis* e oito de *E. urophylla*, com absoluta transferibilidade entre as duas espécies. Esta informação permite uma rápida e fácil troca de informações entre laboratórios que trabalham com eucaliptos, facilitando a pesquisa genética das espécies de grande importância econômica. Mais de 230 iniciadores foram desenvolvidos mais tarde com o intuito de fornecer maiores informações sobre as espécies dentro deste subgênero com taxa de transferibilidade de 80% (BRONDANI et al., 2006).

Em trabalho realizado por Nazareno et al. (2009) foram realizadas amplificações heterólogas entre *Ficus citrifolia* e *F. eximia* permitindo estudos de parentesco detalhados em populações naturais.

A partir de 180 iniciadores microssatélites desenvolvidos para diferentes espécies, foram transferidos 23 microssatélites polimórficos para *Stryphnodendron adstringens*, sendo dez usados para genotipagem por apresentarem polimorfismo. Foram analisadas cinco populações localizadas no estado de São Paulo e pode-se constatar que as populações não estão estruturadas e apresentando inclusive, alta diversidade (BRANCO et al., 2010).

Iniciadores microssatélites da espécie *Butia eriospatha* foram transferidos para *Butia catarinensis*, que são duas espécies ameaçadas de palmeiras tropicais da Mata Atlântica (NAZARENO et al., 2011).

Em *Mormodica charantia*, uma espécie de importância comercial e alimentar, foram realizados testes de transferência com sucesso para as espécies relacionadas *Cucurbita pepo*, *Luffa cylindrica*, *Lagenaria siceraria* e *Cucumis sativus* (WANG et al., 2010).

Testes de transferência de microssatélites entre espécies e até entre gêneros podem diminuir muito o custo dos trabalhos e elevar a qualidade da pesquisa, gerando dados efetivos para a conservação de espécies naturais.

3. OBJETIVO GERAL

Caracterizar geneticamente acessos de populações naturais de barbatimão por meio de marcador molecular AFLP e avaliar a transferibilidade de marcadores microsatélites para *S. adstringens* desenvolvidos previamente para outras espécies da família Leguminosae/Fabaceae e Sub-Família Mimosoideae.

3.1. Objetivos específicos

- Extrair e quantificar o DNA de 12 acessos localizados nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás;
- Identificar combinações polimórficas para marcador AFLP;
- Determinar a estrutura genética de populações naturais de barbatimão a partir de marcadores AFLP;
- Avaliar a transferibilidade de marcadores microsatélites das espécies *Hymenaea courbaril*, *Copaifera langsdorffii* e *Anadenanthera colubrina* para *S. adstringens*;
- Detectar microsatélites polimórficos que sejam eficientes para os estudos de caracterização da estrutura genética de populações em *S. adstringens*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta

Foram coletadas folhas jovens em 12 populações naturais de *S. adstringens*, nos municípios de Botucatu, Cristais Paulista e Paranapanema (SP); Delfinópolis, Luislândia, Lagoa Formosa, Araxá e Sacramento (MG); Caldas Novas, Cristalina, São João D'Aliança e Campo Alegre (GO) (Tabela 4 e Figura 2). A escolha das áreas de coleta foi aleatória e a localização determinada com um GPS (satélite de posicionamento global). O programa de computador GPS TrackMaker 11.7 (FERREIRA, 2001) foi usado para o cálculo das distâncias geográficas entre as populações. Todos os acessos tiveram exsiccatas correspondentes devidamente preparadas e depositadas no Herbário de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto, SP, Brasil.

4.2. Extração do DNA

Tecidos de folhas jovens foram usados para isolar o DNA pelo método do CTAB - brometo de hexadeciltetrametilamônio (DOYLE; DOYLE, 1987) onde 1000 µL de tampão de extração (100 mM de Tris HCl pH 8,0; 100 mM EDTA; 1,4 M NaCl; solução 2% p/v de CTAB; solução 2% v/v 2 mercaptoetanol; PVP 2% p/v) foram adicionados à 100 mg de

Folhas, maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizado e incubado em banho-maria a 65° C por 30 min. Após resfriamento da amostra à temperatura ambiente, adicionou-se 200µL de clorofil (clorofórmio + álcool isoamílico 24:1). O material foi centrifugado a 16000 g durante dois minutos. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo e adicionados 600µL de isopropanol. Após centrifugação a 16000 g durante cinco minutos, recuperou-se o sedimento ao qual foi adicionado tampão de lavagem (etanol 70% v/v e acetato de amônio 10mM), por 20 minutos em temperatura ambiente.

A centrifugação foi repetida a 16000 g durante cinco minutos, o sobrenadante foi descartado. O sedimento (DNA) foi lavado duas vezes em etanol 70%, seguido de centrifugação a 16000 g durante cinco minutos. Após uma hora de secagem, à temperatura ambiente, o “pellet” foi ressuspensão em 100µL de água Mille-Q. Foram adicionados 2 µL de enzima RNase (10 mg/mL) e incubado em temperatura ambiente por até 12 horas. Em eletroforese em gel de agarose 1% foram analisadas a quantidade e a qualidade do DNA.

Tabela 4. Dados de passaporte dos acessos de *S. adstringens* para estudo da diversidade genética.

Cidades	Cód.	LAT. (S)	LON. (W)	ALT.	Nº de indivíduos
Araxá - MG	(Ar)	19°35'30,5"	47°07'37,3"	982m	20
Botucatu - SP	(Bo)	22°55'12,4"	48°28'36,3"	860m	20
Caldas Novas - GO	(CN)	17°43'14,8"	48°36'34,4"	697m	08
Campo Alegre - GO	(CA)	17°21'14,2"	47°47'21,4"	949m	20
Cristais Paulista - SP	(CP)	20°23'49,6"	47°25'47,9"	991m	20
Cristalina - GO	(Cr)	17°00'40,7"	47°13'04,5"	923m	20
Delfinópolis - MG	(Del)	20°19'56,5"	46°48'55,5"	832m	20
Lagoa Formosa - MG	(LF)	18°51'12,7"	46°23'48,1"	901m	19
Luislândia - MG	(VE)	17°46'25,5"	45°24'55,7"	900m	15
Paranapanema - SP	(SPA)	23°24'54,0"	48°33'59,8"	701m	19
Sacramento - MG	(Sa)	19°58'36,3"	47°23'25,2"	690m	20
São João D'Aliança - GO	(SJA)	14°35'31,3"	47°29'19,5"	987m	20
Total de indivíduos					221



Figura 2. Locais de coleta das populações de *S. adstringens* (Fonte: GPS TrackMaker 11.7 FERREIRA, 2001).

4.3. Preparação do material para análise por AFLP

4.3.1. Digestão do material

As enzimas *EcoRI* e *MseI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) foram utilizadas para a digestão dupla de 200ng de DNA genômico de cada acesso. Para as reações de digestão foram utilizadas 5U de cada uma das enzimas, 0,5 µL de 100X BSA (Bovine Serum Albumin), 5 µL de 10X OPA (One-Phor-All buffer PLUS). As reações foram realizadas em termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.) durante três horas a 37° C e 15 minutos a 70° C.

4.3.2. Ligação aos adaptadores

Ao término da digestão, os fragmentos foram ligados a adaptadores *EcoRI* e *MseI* complementares aos sítios de corte. Para estas reações foram utilizados 10 µL de cada amostra do passo anterior acrescentados de 6,7 µL de água MilliQ, 1 µL de adaptador *EcoRI*, 1 µL de adaptador *MseI*, 1 µL de 10X Buffer Ligase e 0,33 µL de enzima T4 DNA Ligase. As reações foram realizadas em termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.) durante três horas a 23° C.

4.3.3. Pré-amplificação

Os fragmentos ligados foram pré-amplificados com iniciadores contendo uma base seletiva, *EcoRI*-A/*MseI*-T com a seguinte reação: 2,5 µL de DNA digerido e ligado aos adaptadores, 1 µL de 10X Buffer B, 0,6 µL de MgCl₂ (25mM), 0,4 µL de Mix dNTPs, 0,3 µL de enzima *Taq* DNA polimerase (5 U/µL), 0,5µL iniciador *Eco RI* (25 ng/µL) + oligo seletivo A e 0,5 µL iniciador *MseI* (25 ng/µL) + oligo seletivo T acrescentados de 4,2 µL de água MilliQ para um volume final de 10 µL.

As reações de pré-amplificação foram realizadas em termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.) e seguiram as seguintes etapas: 2 minutos a 94°C, 26 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C, 1 minuto a 72°C e ao final dos ciclos uma etapa de extensão de 1 minuto a 72°C. O material resultante destas reações foi estocado a -20°C.

4.3.4. Amplificação seletiva

Os produtos de PCR da pré-amplificação foram utilizados como um modelo para a amplificação seletiva em que iniciadores com três nucleotídeos seletivos foram adicionados à extremidade 3' dos iniciadores. Várias combinações foram testadas e as três combinações que permitiram o maior número de bandas polimórficas detectadas foram utilizadas: *EcoRI* - AGA/*MseI*-TC, *EcoRI*-AAT/*MseI*-TC e *EcoRI*-AGT/*MseI*-TTC. A amplificação seletiva seguiu com a seguinte reação: 1,5 µL de DNA pré-amplificado, 10X Buffer B, 25 mM de MgCl₂; 2,5 mM de Mix dNTPs, 5 U/µL de enzima *Taq* DNA polimerase, 25 ng/µL de Iniciador *EcoRI* + três bases seletivas e 25ng/µL de Iniciador *MseI* + três bases seletivas com combinações acima citadas e acrescidos de água MilliQ para completar um volume final de 20µL.

As reações de amplificação seguiram as seguintes etapas: 2 minutos a 94° C, 12 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 65° C, 1 minuto a 72° C; 23 ciclos 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 56° C, 1 minuto a 72° C. Os produtos de amplificação foram estocados a -20° C.

Após a amplificação seletiva, foram adicionados 8 µl de tampão de carregamento (10 µL de formamida deionizada, 200 µL de 0,5 mM EDTA, pH 8,0; 10 mg de azul de bromofenol e 10 mg de cianol xileno) ao resultado de cada reação. Posteriormente, as amostras foram desnaturadas a 95° C por cinco minutos e imediatamente transferidas para o gelo. Os produtos de amplificação foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6% com tampão TBE - Tris-Borato-EDTA- 1X (Tris 0,89 M; ácido bórico 0,089 M; EDTA 0,02 M diluídos em um litro de água). A eletroforese foi realizada em voltagem constante de 80 W e temperatura máxima de 50° C por quatro horas. O gel foi corado com solução de nitrato de prata e revelado em carbonato de sódio segundo protocolo descrito por Creste et al. (2001). O tamanho das bandas foi determinado por um marcador de peso molecular 50-pb (Promega).

4.3.5. Análises estatísticas

Os dados binários obtidos a partir do AFLP foram utilizados para estimar as frequências alélicas, os quais foram submetidos a uma análise de variância que permite a decomposição da variância genética total em seus componentes entre e dentro de populações (AMOVA), possibilitando a avaliação da estruturação da variabilidade, conforme proposto por Excoffier et al. (1992). A análise descritiva da variabilidade total foi obtida pelo cálculo da porcentagem de *locus* polimórficos e o índice de diversidade de Nei (1978). O UPGMA foi usado para a análise de agrupamento e a avaliação da divergência genética entre as populações estudadas através das distâncias genéticas de Nei (1978). Os programas POPGENE (YEH et al., 1999), GENES (CRUZ, 2006) e TFPGA (MILLER, 1997) foram utilizados para estas análises.

4.4. Ensaios de amplificação dos marcadores SSR heterólogos

4.4.1. Populações de *S. adstringens* utilizadas no experimento de transferência de microssatélites de *Anadenanthera colubrina*

O DNA de quatro populações naturais de *S. adstringens* foi selecionado, dos municípios de Paranapanema e Cristais Paulista, (SP); Araxá, (MG); Campo Alegre (GO) (Tabela 5).

Tabela 5. Dados de passaporte dos acessos de *S. adstringens* utilizados no experimento de transferência de microssatélites de *Anadenanthera colubrina*.

Cidades	Cód.	LAT. (S)	LON. (W)	ALT.	Nº de indivíduos
Paranapanema - SP	(SPA)	23°24'54,0"	48°33'59,8"	701m	01
Campo Alegre - GO	(CA)	17°21'14,2"	47°47'21,4"	949m	01
Cristais Paulista - SP	(CP)	20°23'49,6"	47°25'47,9"	991m	02
Araxá - MG	(Ar)	19°35'30,5"	47°07'37,3"	982m	01
Total de indivíduos					05

4.4.2. Populações de *S. adstringens* utilizadas no experimento de transferência de microssatélites de *Hymenaea courbaril* e *Copaifera langsdorffii*

O DNA de cinco populações naturais de *S. adstringens* foi selecionado, dos municípios de Botucatu, (SP); Delfinópolis, Lagoa Formosa, (MG); Caldas Novas e Campo Alegre (GO) (Tabela 6).

Tabela 6. Dados de passaporte dos acessos de *S. adstringens* utilizadas no experimento de transferência de microssatélites de *Hymenaea courbaril* e *Copaifera langsdorffii*.

Cidades	Cód.	LAT. (S)	LON. (W)	ALT.	Nº de indivíduos
Botucatu – SP	(Bo)	22°55'12,4"	48°28'36,3"	860m	02
Delfinópolis – MG	(Del)	20°19'56,5"	46°48'55,5"	832m	02
Caldas Novas – GO	(CN)	17°43'14,8"	48°36'34,4"	697m	08
Campo Alegre – GO	(CA)	17°21'14,2"	47°47'21,4"	949m	02
Lagoa Formosa – MG	(LF)	18°51'12,7"	46°23'48,1"	901m	02
Total de indivíduos					16

Folhas jovens de *H. courbaril* e *C. langsdorffii*, coletadas na Coleção de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP, Ribeirão Preto, SP, Brasil), foram usadas para comprovar a eficiência dos iniciadores testados.

4.4.3. Iniciadores utilizados

Foram utilizados 20 pares de iniciadores microssatélites (Tabela 7) desenvolvidos para a espécie *Anadenanthera colubrina*, nove desenvolvidos para *Hymenaea courbaril* (Tabela 8) e oito desenvolvidos para *Copaifera langsdorffii* (Tabela 9). Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Conservação de Recursos Genéticos Florestais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os marcadores microssatélites foram

gentilmente cedidos pela Prof^a Dr^a Ana Lilia Alzate Marin do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP.

Tabela 7. Locus microssatélite, repetição, sequência de iniciadores, tamanho esperado do alelo e temperatura de anelamento dos iniciadores da espécie *Anadenanthera colubrina* testados para transferência em *S. adstringens* (Feres*, 2011).

Locus	Repetição	Sequência dos iniciadores (5'-3')	TEA	T° C
SSR				
Acol 01	(AT) ₆	F GGTGAGATAGCTGAAGTTCTG R GAATTTCAACTCCCCATG	181	50
Acol 02	(CTT) ₅	F TGGCTATCACTCTCGGACTTC R CATAATGCAAACCGATGACC	181	57
Acol 03	(AATT) ₄	F TTAAGACCCCGCACAAAC R CTATTCAAGTTCCTGCAAATTA	150	50
Acol 04	(AT) ₃ G(AT) ₂ T(AT) ₂	F GATGGTGGGCAAAGTGAG R GAAGCCGCATGTATAAGAGT	246	50
Acol 05	(GA) ₂ A(GA) ₇	F TGGACTTTTGCCTGGACAC R CCCACCCACCTAGAACTGTC	234	58
Acol 06	(AT) ₄ AG(AT) ₂	F TGGGAATGTGCATGAGAAAG R CTCGTGAATTTTCGGGTGT	166	58
Acol 07	(CA) ₄	F GCTTGCCTTATTATCACACCA R GGGGAACTTGGTAACATGG	166	57
Acol 08	(CA) ₄	F ATGTTAGTGTGATGGCC R CTGACTGAAAGGCTTAA	222	53
Acol 09	(CT) ₁₀ (AT) ₇	F CCAGGGTCCTCTCAGATTG R ATGCTCCTCTCAACACACC	160	58
Acol 10	(TG) ₃ C(GT) ₁₅ (GA) ₂₀	F CGTATGTAGGTGGACTTAATATGC R GCATGAAAGAAAGCTAATCACTC	190	54
Acol 11	(CA) ₉	F GGAAATGCAAGATCAGAGGCTC R GTTTGGTTGATTGAGGATGTCCT	200	60
Acol 12	(TA) ₉	F CCCCACATTTAGAACAGGAG R CCACCTTGGATGATGTTTC	118	58
Acol 13	(AG) ₁₅	F CTTATTGCCTACTCCCTAACC R GCATGGGGTCTTGATCC	139	58
Acol 14	(GA) ₁₁	F GCGATACCCCTTGATG R GGCGAATGACCATCTTATC	183	54

Acol 15	(GA) ₁₀	F CATATGTCCAATCAGGTTAGAC R CTCATTTGGTGACTGTAAGC	124	58
Acol 16	(TC) ₁₁ (CA) ₅ AA(CA) ₅	F AAGGTCCAAGGGTTATGC R GGACGTTCTCTTGTCATGC	220	58
Acol 17	(AG) ₉	F ACTCTCGACAACAAGTAATTCAAC R CAACAGCCAATGACAATGATG	182	58
Acol 18	(TG) ₁₀	F GTCAGGTATTCAATCTTCTACGT R CACCATACCTCCACCTCATC	160	52
Acol 19	(CT) ₅ (CCCTCT) ₄ (CT) ₁₆ (AC) ₇	F GACTGAAACCATTCTTTTATC R TGTGCGTATGTGGGTG	163	52
Acol 20	(GT) ₄ GGG(TG) ₆	F CAACCGCCACCATCAAAC R AGTATACCAGTAGATCACAAGGATG	136	56

TEA: Tamanho esperado do alelo.

* FERES, J.M. (Departamento de Genética - Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto/SP). Comunicação pessoal, 2011.

Tabela 8. Locus microssatélite, repetição, sequência de iniciadores, tamanho esperado do alelo e temperatura de anelamento dos iniciadores da espécie *Hymenaea courbaril* testados para transferência em *S. adstringens* (CIAMPI et al., 2008).

Locus SSR	Repetição	Sequência dos iniciadores (5'-3')	TEA	T ° C
Hc06	(CT) ₂₈	F AACCGAGTCTCCCTCCATCT R TGTCACAAGAATAGCAAGGGAG	54-124	60
Hc12	(TC) ₂₁	F TGTTCCAATTTATGTCCATGGTT R TGGATGGTTGTGAAGAAAAGG	146-214	60
Hc14	(TC) ₁₇	F CATTCTGCCATCGGTAGGTT R TCACCCAAACAGGAGTGAA	121-153	58
Hc17	(TC) ₁₃	F TGATTTTCATTCCCCTCTTGC R GGTCAAAGAAAATGCTGGCT	108-130	58
Hc25	(TC) ₂₆	F TGCAATTCGACTTCTTGGTT R AAACACCGATTGACATTGTTTT	110-192	58
Hc33	(AG) ₁₆	F GAACAAATCAACTTTCTTTGAAGC R TTGACGCTTATTTTGCACCA	108-160	58
Hc34	(TG) ₉ (AG) ₁₂	F CCAGCCCATGACGAAGT R GGTGTCGTGTTGTGTATGGC	186-220	58
Hc40	(AG) ₂₆	F CCTCTCTCCCAAATTCACGA R TGCAATAGAATTTCCGAGGC	155-209	60
Hc42	(CA) ₅ T(AG) ₁₉	F TGGCTAAAAGTTGGGAGGGT R TTCCCCCTTTTCATGTTGTC	115-171	60

TEA: Tamanho esperado do alelo.

Tabela 9. Locus microssatélite, repetição, sequência de iniciadores, tamanho esperado do alelo e temperatura de anelamento dos iniciadores da espécie *Copaifera langsdorffii* testados para transferência em *S. adstringens* (CIAMPI et al 2000).

Locus SSR	Repetição	Sequência dos iniciadores (5'-3')	TEA	T° C
CL01	(AG) ₂₄	F AGACTCCATTCTTCCACAGC R CTGTCTTCTCTCTGCAACCA	174-226	56
CL02	(TC) ₂₅	F CCTCGATCCTCCTTGTGTTC R TCAGTTCGGATAGCGATGC	183-331	56
CL06	(TC) ₁₄	F GAGCGTTGCAAGGAATTTCT R CGAAACTTGCATGCGGATA	130-174	54
CL20	(AG) ₂₁	F ACCAATCTCAATCATCGAGC R ACCAATCTCAATCATCGAGC	85-165	56
CL27	(TC) ₂₅	F GAATATAACAATGCACCGCAA R CTCCAAAAGCCATGCAAG	182-240	54
CL32	(AG) ₂₄	F GTGAGAGTATGGAATGTAAC R TAGTCATGAAAATAGGAGTG	150-222	50
CL34	(AG) ₃₃	F TGTGACATGACACTAATTA R ACAACCGACTTATTGGA	183-259	50
CL39	(TC) ₂₄	F GCAGCTGTTCTCTTGTGACT R CAAGAATCCGTGACTTCATC	102-156	56

TEA: Tamanho esperado do alelo

4.4.4. Amplificação dos *loci* microssatélites

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo PTC™ -100 (MJ Research Inc.). Em cada reação foram utilizados: 10 ng de DNA genômico; 1 µL de tampão de reação livre de MgCl₂ [75 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl e 20 mM (NH₄)₂SO₄]; 50 mM de MgCl₂; 0,25 µM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 2,5 µM de cada iniciador microssatélite e 1 U de *Taq* DNA polimerase. Um controle negativo foi utilizado em cada reação.

Com a finalidade de avaliar a temperatura ideal para transferência e aperfeiçoar as condições de amplificação para cada iniciador, foram realizadas diversas reações de PCR testes variando: as condições de temperatura de anelamento (46° C a 60° C); concentrações de DNA (10 a 25 ng), de MgCl₂ (12,5 a 15 µM), dos iniciadores (1,75 a 6 µM) e da enzima *Taq* DNA polimerase (0,1 a 0,24 U)

As sequências das condições de amplificação foram as seguintes:

- a) Para os *locus* Acol e Hc: 1 ciclo 94° C por 5 minutos, 30 a 35 ciclos 94° C por 1 minuto, 48-60° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto, 1 ciclo 72° C por 10 minutos, 20° C indefinidamente.
- b) Para os *locus* CL: 1 ciclo 96° C por 2 minutos, 28 ciclos 94° C por 1 minuto, 46-60° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto, 1 ciclo 72° C por 7 minutos, 22° C indefinidamente.

4.4.5. A eletroforese

O produto amplificado foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante a 10 % (20 mL): 1,4 mL de glicerol, 9,72 mL de água destilada, 6,7 mL de solução acrilamida/bis-acrilamida (29:1), 2,0 mL de TBE (10X), 15 µL de TEMED, 300 µL de solução de persulfato de amônio. Os géis polimerizados foram colocados em um sistema vertical de eletroforese Power Pac 3000 (BioRad) contendo tampão TBE 1X com uma fonte de voltagem constante ajustada à corrente de 100 Volts, 400 mA e 100 Watts por 1h e 30 minutos, tempo otimizado para uma boa separação dos fragmentos amplificados. Um marcador de peso molecular 100 pb (Promega) foi aplicado no gel para determinar o tamanho das bandas.

4.4.6. Coloração do gel com nitrato de prata e secagem

A coloração do gel foi feita de acordo com o protocolo adaptado de Sanguinetti et al. (1994). Após a retirada das placas de vidros e dos espaçadores, o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 200 mL de solução fixadora (160 mL de etanol (PA), 7,0 mL de ácido acético glacial (PA) e 833 mL de água), adicionados de 3,0 mL de solução de nitrato de prata (2 g de nitrato de prata, 10 mL de água destilada) e agitou-se por 5 minutos. A solução foi descartada e o gel lavado em água por cerca de dez segundos, agitando levemente e a água foi descartada.

Para a revelação do gel foram utilizados 200 mL de solução reveladora (22 g de NaOH, 1 litro de água), vertida cuidadosamente no recipiente contendo o gel juntamente com 1,5 mL de formaldeído, sendo submetido a agitação por alguns minutos até que as bandas se revelassem nitidamente. A solução reveladora foi descartada e a reação bloqueada com a lavagem direta do gel em 200 mL de solução fixadora. Os géis foram secos em papel celofane para análise e posterior armazenagem.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Marcador AFLP

As três combinações de iniciadores de marcadores AFLP utilizados produziram 255 bandas, das quais 92,94% foram polimórficas. O número mínimo e máximo de bandas por iniciador foi de 53 e 128 bandas, respectivamente (Tabela 10 e Figura 3).

Tabela 10. Combinações de iniciadores usados para obtenção de marcadores AFLP de *S. adstringens*.

Combinações de iniciadores	Bandas Polimórficas		
	Número total de bandas	Número de bandas polimórficas	%
E-AGA+M-TC	128	122	95,31
E-AAT+M-TC	74	70	94,59
E-AGT+M-TTC	53	45	84,90
Total	255	237	-
Média	85	79	92,94

A população de Cristalina apresentou maior porcentagem de *loci* polimórficos (87,35%), seguida da população Luislândia de (45,85%). A menor variabilidade foi encontrada em Caldas Novas (22,92%) e as demais ficaram na média (34,3%) (Tabela 11). A porcentagem de *loci* polimórficos entre as populações do estado de Goiás foi alta (92,09%) em

comparação com as populações dos estados de São Paulo e Minas Gerais (56,52% e 69,17%, respectivamente).

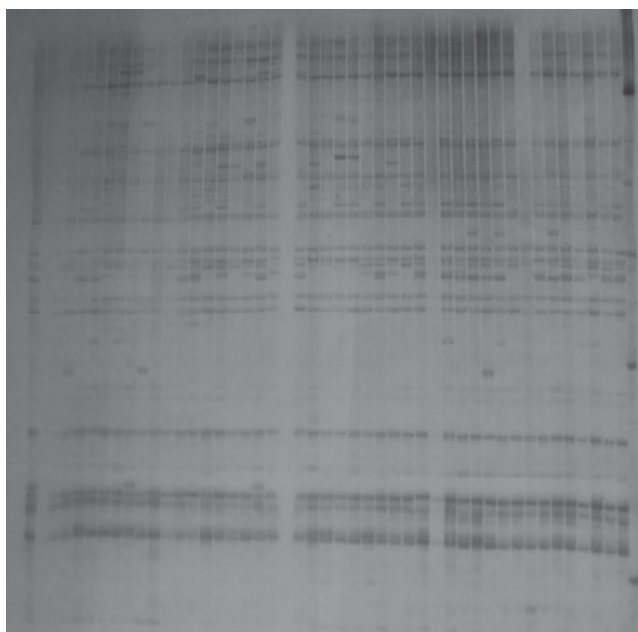


Figura 3. Gel de poliacrilamida a 6% para análise de AFLP pela combinação E+AGT/M+TTC.

As distâncias genéticas de Nei (h) variaram entre 0,0825 e 0,3189 e o índice de Shannon (I) entre 0,2417 e 0,4718. Independentemente do índice utilizado, os acessos de Caldas Novas apresentaram menor diversidade, enquanto que os de Cristalina maior variabilidade (Tabela 11). A correlação entre os dois índices foi 0,999.

A variabilidade dentro das populações foi bem maior (70,93%) do que entre as populações (29,06%), com um valor de $F_{st} = 0.2906$, que indica uma alta estruturação populacional (Tabela 12). Quando as populações foram separadas em três grupos, referentes aos estados onde ocorreram as coletas (GO, SP e MG), foi possível observar que as populações de São Paulo e Minas Gerais estão mais estruturadas do que as populações do estado de Goiás ($F_{st} = 0,2809$, $F_{st} = 0,2901$ e $F_{st} = 0,2383$, respectivamente). Os dados genéticos obtidos neste trabalho estão coerentes com as observações ambientais, uma vez que,

o bioma dos estados de São Paulo e Minas Gerais encontram-se mais fragmentados do que o de Goiás.

Tabela 11. Estatística descritiva básica de 12 populações de *S. adstringens* por marcadores AFLP.

Populações	$\bar{n}$	na	P	h	I
Araxá	18	1,3281	32,81	0,1061	0,1605
Botucatu	20	1,3597	35,97	0,1276	0,1893
Caldas Novas	08	1,2292	22,92	0,0825	0,1219
Campo Alegre	19	1,3518	35,18	0,1115	0,1694
Cristais Paulista	20	1,3399	33,99	0,1131	0,1687
Cristalina	20	1,8735	87,35	0,3189	0,4718
Delfinópolis	20	1,3202	32,02	0,1121	0,1663
Lagoa Formosa	19	1,3676	36,76	0,1092	0,1683
Luislândia	13	1,4585	45,85	0,1624	0,2417
Paranapanema	18	1,3597	35,97	0,1136	0,1717
Sacramento	18	1,3202	32,02	0,0956	0,1458
São João D'Aliança	20	1,3399	33,99	0,1073	0,1618
Total	213				

Tamanho médio da amostragem ($\bar{n}$) número de alelos observados (na) e porcentagem de *loci* polimórficos (P), diversidade genética de Nei (1978) (h) e índice de Shannon (I). Resultados obtidos pelo programa POPGENE (YEH et al., 1999).

Resultados semelhantes quanto á estruturação de populações foram descritos em outras espécies a exemplo de *Aspidosperma polyneuron* (DAMASCENO et al., 2011), de *Jatropha curcas* (PECINA-QUINTERO et al., 2011), *Sclerocarya birrea* (MOGANEDI et al., 2011) e de *Eremanthus erythropappus* (FREITAS et al., 2008).

Os dados obtidos com AFLP, realizados com barbatimão, corroboram com os trabalhos de Glasenapp (2007) desenvolvidos com marcadores bioquímicos do tipo isoenzimas e o de Branco et al (2010) que trabalharam com microssatélites os quais também encontraram índices altos de variabilidade dentro das populações.

Espécies tipicamente alógamas apresentam alta variação intrapopulacional e a divergência dentro das populações é inversamente proporcional ao fluxo gênico, ou seja, quanto maior o fluxo gênico, menor a divergência dentro das populações (LOVELESS; HAMDRICK, 1984).

O índice de fixação de alelo no presente trabalho ($F_{st} = 0,2906$) apresentou valor acima de 0,25 sendo superior ao limite proposto por Wright (1978), indicando um valor de estruturação populacional muito alto. Este dado é alarmante, pois populações estruturadas frequentemente são formadas por espécies em declínio, oriundas de ambientes degradados com regiões fragmentadas, que não permitem mais a troca de seus genes (SOLÉ-CAVA, 2001).

Segundo Frankham et al. (2007), valores de F_{st} maiores que 0,15 geralmente indicam fragmentação da população e quanto maior este valor, menor é a capacidade de dispersão, aumentando a probabilidade destas populações se tornarem endogâmicas. Os mesmos autores relatam que o endocruzamento e a perda da diversidade genética são inevitáveis em pequenas populações. Em curto prazo elas reduzem a reprodução bem como a sobrevivência e, em longo prazo, diminuem sua capacidade de evoluir em resposta às mudanças ambientais, aumentando o risco de extinção.

Outras espécies medicinais do Cerrado como *Anemopaegma arvense* ($F_{st} = 0,283$) (BATISTINI, 2006), *Eugenia dysenterica* ($F_{st} = 0,250$) (ZUCCHI et al., 2003) e *Calophyllum brasiliense* ($F_{st} = 0,26$) (CARNAVALE-BOTTINO, 2006) também apresentaram alta estruturação populacional, sendo um indicativo de regiões de biomas fragmentados.

Entretanto, outros trabalhos realizados com barbatimão, utilizando isoenzimas e SSR, mostraram um índice de fixação de alelo moderado, em níveis de 0,0578 e 0,070, respectivamente (GLASENAPP, 2007; BRANCO et al., 2010). Provavelmente, este resultado está relacionado ao fato destes acessos estarem localizados em ambientes menos antropizados e, conseqüentemente, menos fragmentados.

A determinação da estrutura genética de uma população depende de fatores ecológicos e da dispersão de seus genes. O processo reprodutivo é um dos responsáveis por manter um padrão genotípico para as subseqüentes gerações, enquanto a dispersão de pólen e sementes determinam os padrões de dispersão dos genes dentro e entre populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Portanto, vê-se a necessidade de trabalhos que correlacionem os dados genéticos com os fatores ecológicos para a elaboração de diagnósticos precisos dos impactos de fragmentação do Cerrado e, conseqüentemente, estabelecer estratégias de conservação das espécies de interesse.

Tabela 12. Análise Molecular de Variância (AMOVA) entre e dentro de uma amostragem das populações de *S.adstringens* baseada em marcadores AFLP.

Fonte de variação	G. L.	S. Q.	S. Q. M.	Componentes de variância	% do Total de variação	p	Estatística - PHI_{st}
Entre populações	11	1252,56	113,87	5,65	29,06	<0,001	0,2906
Dentro de populações	201	2775,19	13,80	13,80	70,94	-	-
Total	212	4027,75					

G. L., grau de liberdade. S. Q., soma dos quadrados. S. Q. M., soma dos quadrados médios. p, nível de significância da estimativa de variação genética, utilizando 1000 permutações. Estatística PHI_{st} , variação genética estimada para fonte de variação, análoga à estatística- F_{st} de Wright. Resultados obtidos pelo programa GENES, 2006.

A partir das estimativas de fluxo gênico encontrado em *S adstringens* ($N_m = 1,13$), pode-se inferir a ocorrência de deriva genética na espécie ($N_m < 1,0$ seguindo Wright 1940; 1943). Segundo Hartl e Clark (1997), para que haja uma homogenização de alelos entre populações, é necessário um número de migrantes acima de quatro, por geração, para que as mesmas funcionem como populações panmíticas.

Populações de outras espécies de árvores endêmicas das regiões de Cerrado que não se encontram em áreas fragmentadas como, por exemplo, *Caryocar brasiliense* e *Plathymentia reticulata* apresentam fluxo gênico elevado ($N_m = 5,16$ e $N_m = 3,5$ respectivamente) e baixa estruturação populacional ($F_{st} = 0,02$ e $F_{st} = 0,123$ respectivamente) (MELO-JÚNIOR et al., 2004; LACERDA et al., 2001).

Informações sobre a extensão do fluxo gênico entre as populações tem sua importância para determinar se a espécie necessita de programas de conservação para prevenir a endogamia e a perda da diversidade genética (FRANKHAM et al., 2008).

O Método da Média Aritmética não Ponderada (UPGMA) reuniu as populações de barbatimão em três grupos (Figura 4). O padrão espacial determinado pelo teste de Mantel com base em 1000 permutações foi de 0,33 ($P = 0,1899$), indicando não haver correlação significativa entre as distâncias geográficas e genéticas.

A distância mínima entre as populações foi de 49,51 km, porém nenhuma correlação foi encontrada entre as distâncias genéticas e geográficas. Este dado sugere que a estrutura das populações de *S. adstringens* pode seguir o modelo de ilhas proposto por Wright, em que a diferenciação entre as populações não depende da distância que as separam, podendo ter sido originadas de uma única população ou por outras ilhas, sem relação particular com sua posição espacial (SOLÉ-CAVA, 2001; SLATKIN, 1985).

Diferentes tipos de pressão de seleção e rara troca de genes entre populações geograficamente distintas podem ser uma das causas de falta de correlação genética e geográfica, isso foi constatado com a espécie *Populus cathayana* (CHEN; PENG, 2010).

Os resultados apresentados neste trabalho com *S. adstringens* sugerem que as populações estudadas estão se diferenciando por processos estocásticos, independentes da distância geográfica. Os efeitos da deriva genética podem ser devido à antropização e ao baixo fluxo gênico.

Segundo Primack e Rodrigues (2001), há pelo menos 14 fatores que podem predispor uma espécie a se tornar vulnerável ou extinta e o enquadramento em um ou mais destes fatores já representa um risco de extinção. Quanto ao barbatimão, o fato de a espécie estar localizada em área de ocorrência limitada (endêmica do Cerrado), de suas populações serem pequenas e estarem em declínio, de possuir potencial econômico de exploração (fornecimento de matéria prima para indústria farmacêutica) e, além disso, de apresentar baixa variabilidade genética entre suas populações é possível afirmar que se trata de uma espécie vulnerável à extinção, necessitando de medidas urgentes em relação à sua conservação.

Embora a fragmentação do Cerrado tenha se iniciado há apenas sessenta anos, o bioma tem sofrido com constantes pressões antrópicas tais como: queimadas, invasões para

sua ocupação com moradias de forma irregular e a agricultura, pecuária, retirada de lenha e de espécies medicinais, além da introdução de espécies exóticas (RIBEIRO et al., 2007; RIBEIRO, et al 2005). Esta fragmentação afeta o potencial de dispersão e a recolonização das espécies, bem como compromete a presença de polinizadores (FRANKHAM et al., 2008).

Baixo número de lóculos de sementes, em frutos colhidos na população de barbatimão localizada em Cristalina, ocorreu devido à redução de polinizadores, principalmente em função dos altos níveis de fragmentação desta região. Também foram observados frutos com muitas sementes estéreis, malformadas ou abortadas, sugerindo que as pressões ocorridas pelo habitat podem ter afetado a qualidade destas sementes (CORRÊA et al., 2011; CORRÊA, 2007).

Um primeiro banco de germoplasma *ex situ* de *S. adstringens*, localizado em Araxá, MG, na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN), chamado Ecocerrado-Brasil, foi organizado a partir de plantas produzidas por sementes coletadas nas doze populações relacionadas a este estudo, onde as populações situadas em Luislândia/MG e Campo Alegre/GO foram consideradas como fornecedoras de plantas elite para produção de taninos, por possuírem alto teor de fenóis (CORRÊA et al., 2011; CORRÊA, 2007).

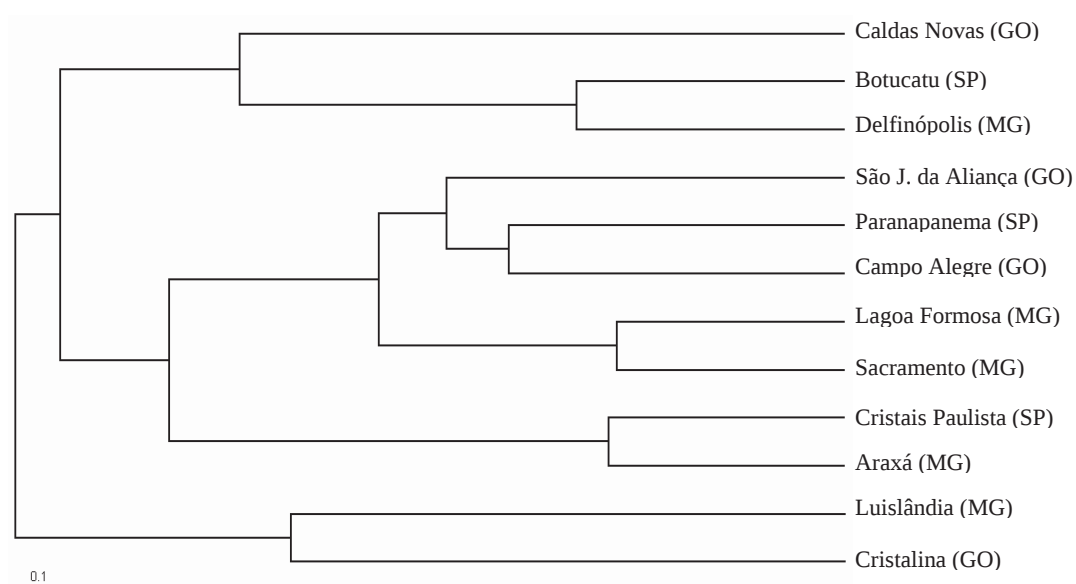


Figura 4. Dendrograma das populações de *S. adstringens*.

5.2. Ensaio de transferência dos iniciadores do tipo Microsatélite

5.2.1. Microsatélites Acol (Angico)

Entre os 20 iniciadores testados, apenas dez foram transferidos para o barbatimão e somente o iniciador Acol 11 apresentou polimorfismo em dois alelos, o que é um resultado insuficiente para realizar a genotipagem da espécie (Figura 5).

Resultado semelhante foi encontrado por Branco et al (2010), quando trabalharam com barbatimão, estes autores avaliaram a transferência de 98 iniciadores de microsatélites desenvolvidos para as espécies *Eucalyptus grandis*, *Eugenia dysenterica*, *Prunus avium*, *Annona cherimoya* e *Melaleuca alternifolia* e *Schizolobium parahyba* e obtiveram a transferência de 23 iniciadores, sendo que apenas dez foram polimórficos para *S. adstringens*.

5.2.2. Microsatélites Hc (jatobá) e CL (copaíba)

Não houve transferência em nenhum dos iniciadores Hc (jatobá) e CL (copaíba) testados.

Na Figura 6 pôde-se observar a amplificação dos iniciadores de *C. langsdorffii* em uma amostra da mesma espécie retirada da coleção da UNAERP, indicando que os procedimentos de PCR e eletroforese foram conduzidos corretamente.

A transferência de microsatélite é afetada por vários fatores como: tamanho, complexidade do genoma e se estes pertencerem ou não a regiões codificantes. Além disso, uma transferência bem sucedida também não depende somente da proximidade filogenética entre as espécies (BARBARÁ et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006)

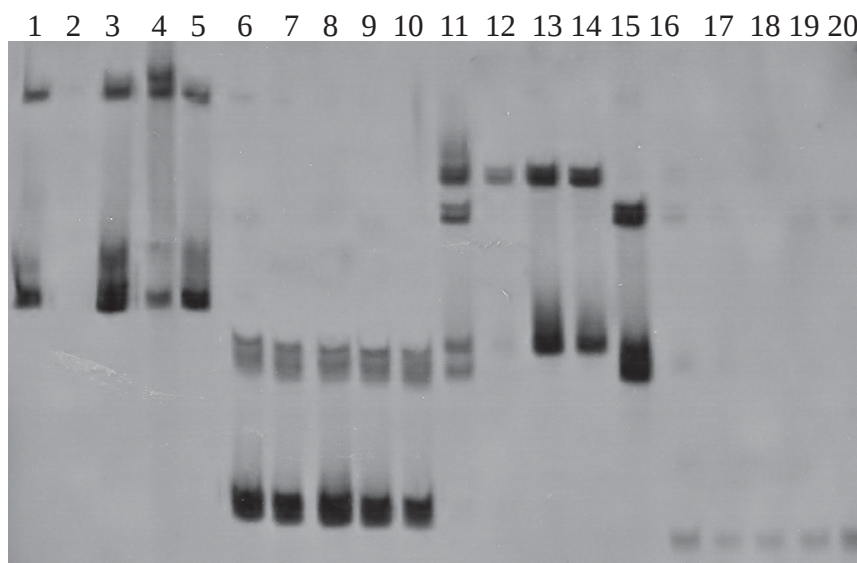


Figura 5. Gel de poliacrilamida com quatro dos 20 pares de iniciadores testados. 1 a 5 – Acol 5; 6 a 10 – Acol 10; 11 a 15 Acol 11; 16 a 20 – Acol 13. 1, 6, 11, 16: população Paranapanema/SP; 2,7,12,17: população Campo Alegre/GO; 3 ,8 , 13, 18: população Cristais Paulista/SP- 1; 4,9,14,19: população Cristais Paulista/SP- 2; 5, 10, 15, 20: população Araxá/MG.

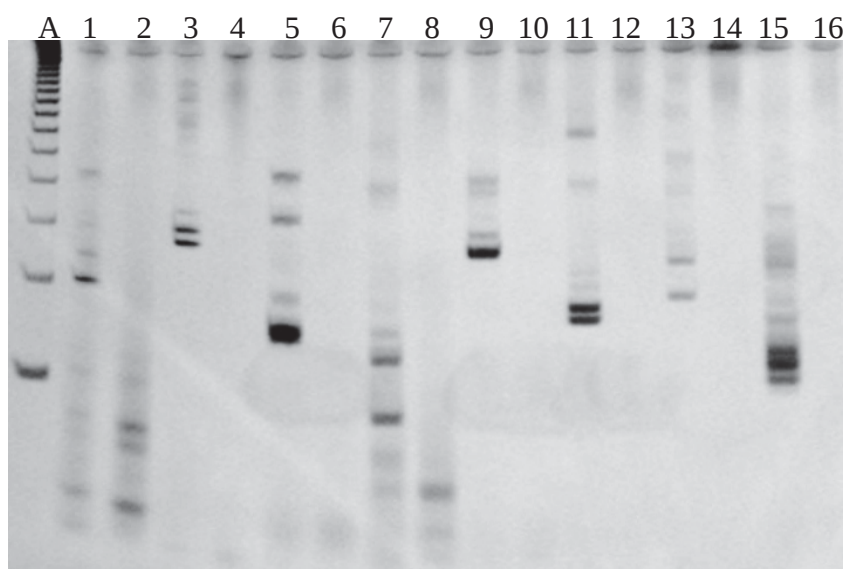


Figura 6. Gel de poliacrilamida com amplificações de iniciadores SSR de *C. langsdorffii*. Números ímpares correspondem às amplificações de DNA de *C. langsdorffii* (Cop) e números pares correspondem às amplificações de DNA de *S. adstringens* (Barb). A: marcador molecular; 1- CL01 Cop; 2- CL01 Barb; 3- CL02 Cop; 4- CL02 Barb; 5- CL06 Cop; 6- CL06 Barb; 7- CL20 Cop; 8- CL20 Barb; 9- CL27 Cop; 10- CL27 Barb; 11- CL32 Cop; 12- CL32 Barb; 13- CL34 Cop; 14- CL34 Barb; 15- CL39 Cop; 16- CL39 Barb.

6. CONCLUSÕES

A informação gerada por este trabalho mostra que o marcador AFLP é eficiente para determinar a variabilidade genética encontrada nas populações naturais de *Stryphnodendron adstringens*.

A variabilidade genética de barbatimão é maior dentro das populações do que entre as mesmas, apresentando-se estruturadas, muito provavelmente devido à fragmentação do bioma em que se encontram.

Os iniciadores de *Anadenanthera colubrina* que foram transferidos para *Stryphnodendron adstringens* não apresentaram polimorfismo suficiente para dar continuidade à investigação.

É necessário iniciar o desenvolvimento de marcadores microssatélites para a espécie *Stryphnodendron adstringens*.

Os dados gerados por este trabalho poderão ser utilizados no estabelecimento de estratégias de conservação dessa espécie medicinal do Cerrado.

7. REFERÊNCIAS

ACHERÉ, V. et al. Genomic organization of molecular differentiation in Norway spruce (*Picea abies*). **Molecular Ecology**, Oxford, v.14, p. 3191–3201, 2005.

AFONSO, E.; POTT, A. **Plantas no pantanal tóxicas para bovinos**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de corte, 2002 Disponível em: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/livros/plantastoxicas/index.html>>. Acesso em: 13 jul. 2011.

AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 18, n. 3. p. 472-508, Jul./Set. 2008.

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 110, p. 76–91, 2007.

ALMEIDA, A. C. et al. Acute toxicity of leaf hydroalcoholic extracts of *Lippia sidoides*, *Myracrodunon urundeuva*, *Stryphnodendron adstringens* and of *Caryocar brasiliense* administered by intraperitoneal route. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, Jan./Feb. 2010.

ALVES, R. R. N. et al. Use and trade of medicinal plants in Campina Grande, Paraíba, Brasil. **Revista Electronica de Farmácia**, Goiânia, v. IV, n. 2, p. 175-198, 2007.

APARAJITA, S.; ROUT, G. R. Molecular analysis of *Albizia* species using AFLP markers for conservation strategies. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 89, n. 1, Apr. 2010.

- ARAYA, E. et al. Relaciones genéticas en una colección de clones de *Gmelina arborea* (Roxb) reveladas con marcadores AFLP. **Kurú: Revista Forestal**, Carthage, v. 2, n. 6, p. 1-14, 2005.
- AZEVEDO, V. C. R. et al. Variabilidade no cpDNA em *Manilkara huberi*, espécie sob manejo sustentável na Amazônia brasileira. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n.7, p. 859-867, jul. 2008.
- BALDAUF, C. et al. Characterization of microsatellite loci in *Himatanthus drasticus* (Apocynaceae), a medicinal plant from the Brazilian Savana. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 0, p. e244–e246, 2011.
- BARBARÁ, T. et al. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 3759–3767, 2007.
- BARREIRO, A. P.; DELACHIAVE, M. E. A.; SOUZA, F. S. Efeito alelopático de extratos de parte aérea de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] na germinação e desenvolvimento da plântula de pepino. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 4-8, 2005.
- BATISTINI, A. P. **Diversidade morfológica, genética e química de populações naturais de *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf.** 2006. 83 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- BECERRA V. V.; PAREDES M. C. Use of biochemical and molecular markers in genetic diversity studies. **Agricultura Técnica**, Santiago, v. 60, n. 3, July 2000.
- BEJA-PEREIRA, A.; ALMEIDA, N. F. Métodos moleculares na análise da diversidade biológica. In: BEJA-PEREIRA, A.; ALMEIDA, N. F. **Genética, biotecnologia e agricultura**. Porto: Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005. p. 1-96.
- BERED, F.; BARBOSA-NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 513-520, 1997.
- BERTONI, B. W. et al. Genetic diversity in natural populations of *Jacaranda decurrens* Cham. determined using RAPD and AFLP markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, p. 532-538, July, 2010.
- BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Pollen movement within a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. **Conservation Genetics**, Amsterdam, v. 9, p. 855–868, 2008.

BORÉM, A. Considerações sobre fluxo gênico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 34, p. 86-90, jan./jun. 2005.

BRANCO, E. A. et al. Estrutura genética de populações de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.). **Instituto Florestal Série Registro**, São Paulo, n. 42, p. 29-35, jul. 2010.

BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no sul de Minas Gerais**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal / Manejo Ambiental) – Universidade federal de Lavras, Lavras, 2008.

BRASIL. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2007. 136 p.

BRASIL. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde**. Portaria n.º 971, de 3 de maio de 2006. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. **RDC n.º 10 de 10 de março de 2010**. Brasília, DF: Ministério da Saúde; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BRITO, M. F.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. Intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimosoideae) em bovinos. 2. Achados anátomo e histopatológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 61-71, abr./jun. 2001.

BRONDANI, R. P. V. et al. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E.urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 816–827, 1998.

BRONDANI, R. P. et al. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 6, n. 20, p. 1-16, 2006.

BUSO, G. S. C. et al. Marcadores microsatélites em espécies vegetais. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 30, p. 46-50, jan./jun, 2003.

CARDOSO, S. R. S. et al. High levels of genetic structuring as a result of population fragmentation in the tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 14, p. 1047–1057, 2005.

CARNAVALE-BOTTINO, M. **Análise de diversidade genética de populações de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) utilizando marcadores AFLP.** 2006. 101 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CARVALHO, A. C. M. et al. Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 599-606, out./dec. 2010.

CHASE, M.; KESSELI, R.; BAWA, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 83, p. 51-57, 1996.

CHEN, K.; PENG, Y. AFLP Analysis of genetic diversity in *Populus cathayana* Rehd originating from southeastern Qinghai-Tibetan Plateau of China. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 42, n. 1, p. 117-127, 2010.

CIAMPI, A. Y. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 8, p. 1074–1077, 2008.

CIAMPI, A.Y.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. **Otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco e desenvolvimento de marcadores microsatélites para *Copaifera langsdorffii* Desf. (Copaiba) Leguminosae-Caesalpinoideae.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 40 p.

CINTRA, P. et al. Toxicidade do barbatimão para as abelhas. **Mensagem Doce**, n. 66, 2002. Disponível em: <<http://apacame.org.br/mensagemdoce/66/arigol.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

COART, E. et al. Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 845-857, 2003.

COELHO, J. M. et al. Effects of silver sulfadiazine, ipê roxo (*Tabebuia avellanedae*) extract and barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) extract on cutaneous wound healing in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 45-51, 2010.

CORETTE-PASA, M. Abordagem etnobotânica na comunidade de Conceição-açu. Mato Grosso, Brasil. **Polibotânica**, Cidade do México, v. 169-197, p. 169-197. 2011.

CORRAL, J. M. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from apomictic *Hypericum perforatum* (Hypericaceae). **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 1, p. e167–e169, 2011.

CORRÊA, V. S. et al. Geographical variation and quality assessment of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville within Brazil. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 58, p. 1-8, 2011.

CORRÊA, V.S.C. **Conservação de *Stryphnodendron adstringens* (MART.) Coville em banco ativo de germoplasma e avaliação do potencial antifúngico frente ao dermatófito *Trithophyton rubrum***. 2007. p. 97. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2007.

COSTA, M. A. et al. Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMÃO) for use as a pharmacological agent. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v. 58, p. 330–335, 2010.

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

CRUZ, C. D. **Programa genes: biometria**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. 382p.

DAMASCENO, J. O. et al. Genetic differentiation in *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae) over a short geographic distance as assessed by AFLP markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 2, p. 1180-1187, 2011.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bulletin**, Irvine, v. 19, p. 11-15, 1987.

EURIDES, D. et al. Morphological and morphometrical studies on tissue repair of mice cutaneous wounds treated with barbatimam aqueous solution (*Stryphnodendron barbatimam* Martius). **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 2/3, n. 1, p. 30-40, 1995/1996.

EVARISTO, I.; TENREIRO, R.; COSTA, R. Caracterização Molecular de Genótipos Selecionados de Pinheiro Manso para o Controlo da Qualidade do Pinhão. **Silva Lusitana**, Oeiras, v. 15, n. 2, p. 139 - 170, 2007.

EXCOFFIER, L. WINAMOVA 1.04: Analysis of molecular variance. 1992. Disponível em: <http://www.tiem.utk.edu/~gross/WWW_pt2d.html>. Acesso em: 10 fev. 2005.

FELFILI J. M. et al. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado *sensu stricto* da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n.1, p. 1-14, abr. 1999.

FELIPE, A. M. M. et al. Antiviral Effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on Poliovirus and Bovine Herpesvirus. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, n. 6, p. 1092—1095, 2006.

FERES, J. M. et al. Microsatellite diversity and effective population size in a germplasm bank of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Leguminosae), an endangered tropical tree: recommendations for conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 56, p. 797–807, 2009.

FERREIRA JUNIOR, O. GPS TrackMaker® for Windows® v. 11.7. 2001. Disponível em: <<http://www.gpstm.com.br>>. Acesso em: 10 fev. 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. p.220.

FERREIRA-RAMOS, R. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. **Conservation Genetics**, Amsterdam, v. 9, p. 1281–1285, 2008.

FERRO, D. Aspectos clínicos da fitoterapia. In: PEREIRA, A. M. S. (Org.). **Implantação da fitoterapia no município de Jardinópolis** – SP. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2008. 155 p.

FIGUEIRA, G. M. et al. A set of microsatellite markers for *Arrabidaea chica* (Bignoniaceae), a medicinal liana from the Neotropics. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 1, p. e63–e64, 2010.

Stryphnodendron adstringens. In: FLORA BRASILIENSIS. v. 15, Part 2, p. 284-287, tab. 77. Disponível em: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=1965>. Acesso em: 18 jul. 2011.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRIOSCOE, D. A. **A iniciador conservation genetics**. Cambridge University Press, Cambridge, 2007. 220 p.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: Editora Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 280 p.

FRANZON, R. C.; CASTRO, C. M.; RASEIRA, M. C. B. Variabilidade genética em populações de pitangueiras oriundas de autopolinização e polinização livre, acessada por AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 240-250, mar. 2010.

FREIRE, J. M. et al. Genetic structure of *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (guapuruvu) populations by RAPD markers. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 74, p. 27-35, jun. 2007.

FREITAS, M. L. M. et al. Intrapopulational genetic variability of *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. per AFLP marker. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 68, p. 21-28, ago. 2005.

FREITAS, M. L. M. et al. Mating system of a population of *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão using the fAFLP molecular marker. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 3, p. 425-431, 2004.

FREITAS, V. L. O.; LEMOS-FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Contrasting genetic diversity and differentiation of populations of two successional stages in a neotropical pioneer tree (*Eremanthus erythropappus*, Asteraceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 2, p. 388-398, 2008.

GANDARA, F. B. **Diversidade genética de populações de Cedro (*Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)) no Centro-Sul do Brasil**. 2009. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GAUDEUL, M. et al. Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): comparison of AFLP and microsatellite markers. **Heredity**, London, v. 92, p. 508–518, 2004.

GLASENAPP, J. S. **Estrutura genética e fenóis totais de populações naturais de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*)**. 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

GONÇALVES, A. L. **Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais**. 2007. 209 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

GUIDUGLI, M. C. et al. Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. **Conservation Genetics**, Amsterdam, v. 10, p. 1001–1004, 2009.

GUIDUGLI, M. C. et al. Genetic characterization of 12 heterologous microsatellite markers for the giant tropical tree *Cariniana legalis* (Lecythidaceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 1, p. 131-134, 2010.

HAGEN, L. S. et al. Genetic diversity in apricot revealed by AFLP markers: species and cultivar comparisons. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, p. 298–305, 2002.

HARTL, D. L. **Princípios de genética de população**. 3. Ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2008. p. 217.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 3. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. p. 635.

HERNANDES, L. et al. Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 431-436, July/Sept. 2010.

HERZOG-SOARES, J. D. A. et al. Bioactivity of *Stryphnodendron adstringens*, *S. Polyphyllum*, *Caryocar brasiliense*, plants from brazilian's savannah on the *Trypanosoma cruzi* "in vivo". **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 3, p. 113-118, Sept./Dec. 2006.

HOLETZ, F. B. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n.4, p. 397-401, Jul. 2005.

ISHIDA, K. et al. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 58, p. 942–949, 2006.

KAGEYAMA, P. Y. et al. Genetic diversity in tropical tree species from different successional stage determined with genetic markers. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 64, p. 93-107, Dec. 2003.

KNOECHELMANN, C. M.; MORAIS, H. C. Visitas de formigas (Hymenoptera, Formicidae) a nectários extra-florais de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Cov. (Fabaceae, Mimosoideae) em uma área de cerrado frequentemente queimado. **Revista Brasileira de Zoociências**, Juiz de Fora, v. 10, n. 1, p. 35-40, abr. 2008.

LACERDA, D. R. et al. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymania reticulate* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 1143–1152, 2001.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SOUZA JR, P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. **Phytotherapy Research**, London, v. 12, p. 218–220, 1998.

LOPES, C. V. G. **O conhecimento etnobotânico da comunidade quilombola do Varzeão, Dr. Ulysses (PR):** no contexto do desenvolvimento rural sustentável. 2010.162 f. Tese (Doutorado em Agronomia / Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

LOPES, R. et al. Marcadores Moleculares Dominantes (Rapid e Aflp) - Aspectos técnicos e interpretação genética. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, n. 29, p. 56-60, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1992. v.1, p. 352.

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

LUIZE, P. S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 85-94, jan./mar. 2005.

LUZ, F. J. F. **Caracterizações morfológica e molecular de acesos de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.)**. 2007. 70 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Produção Vegetal)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal, UNESP, Jaboticabal, 2007.

MA, J. X. et al. Allopolyploid speciation and ongoing backcrossing between diploid progenitor and tetraploid progeny lineages in the *Achillea millefolium* species complex: analyses of single-copy nuclear genes and genomic AFLP. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 10, p. 100, 2010.

MANOEL, D. D. et al. Allelopathic activity of fresh and dry extracts of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville and *Bauhinia forficata* link leaves on the germination and initial development of tomato seedlings. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 63-70, jan./mar. 2009.

MARINHO, M. L. et al. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 3, p. 64-69, 2007.

MARTINEZ, M. L. L. **Aplicação de marcadores microssatélites na caracterização de recursos genéticos de *Tabebuia roseo-alba* conservados *ex situ* no Banco de germoplasma da Floresta da USP de Ribeirão Preto**. 2008. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências / Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

MARTINS, K. et al. Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinoideae) em fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 61-69, jan./mar. 2008.

MARTINS, P. S. et al. Comparison between phytotherapies on equine wound healing. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 1-7, 2003.

MAUNDER, M. et al. Genetic diversity and pedigree for *Sophora toromiro* (Leguminosae): a tree extinct in the wild. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 725-738, 1999.

MELO, J. C. Plantas em destaque: Barbatimão (Córtex Barbatimão). **Revista Racine**, São Paulo, v. 45, p. 67-69, set./Out. 1998.

MELO E SILVA, F.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Mycoses**, Berlin, v. 52, p. 511–517, 2009.

MELO, J. O. et al. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal models of nociception. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 465-469, jul./set. 2007.

MELO-JUNIOR, A. F. et al. Estrutura genética de populações naturais de pequi (Caryocar brasiliense Camb.). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 66, p. 56-65, 2004.

MILLER, M. P. TFGA 1.03: Tools for populations genetic analyses. 1997. Disponível em: <<http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>>. Acesso em: 22 fev. 2005.

MINATEL, D. G. et al. Clinical study for the validation of the efficacy of ointment containing barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville)* on healing of decubitus ulcers. **Revista Brasileira de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 67, n. 7, p.250-256, Jul. 2010.

MING, L. C. et al. Manejo e cultivo de plantas medicinais: algumas reflexões sobre as perspectivas e necessidades no Brasil. In: COELHO, M.F.B.; COSTA JUNIOR, P.; DOMBROSKI, J. L. D. (Org.). **Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais**: anais do I Seminário Mato-grossense de etnobiologia e etnoecologia e II Seminário Centro-Oeste de Plantas Medicinais. Cuiabá: Unicen, 2003. p. 250.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. - Taxonomy Browser. Saint Louis. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/> 13001565>. Acesso em: 17 July 2011.

MOGANEDI, K. et al. An assessment of genetic diversity among marula populations using the amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 6, n. 4, p. 790-797, Feb. 2011.

MOHANTY, S. et al. Genetic diversity of 28 wild species of fodder legume *Cassia* using RAPD, ISSR and SSR markers: a novel breeding strategy. **Journal of Biotech Research**, Edmond, v. 2, p. 44-55, 2010.

MOREIRA, D. L.; GUARIM-NETO, G. Usos múltiplos de plantas do Cerrado: um estudo etnobotânico na comunidade Sítio Pindura, Rosário Oeste, Mato Grosso, Brasil. **Polibotânica**, Cidade do México, n. 27, p. 159-190, 2009.

MORITA, C. M. **Diversidade genética por marcadores microssatélites de progênies de *Tabebuia heptaphylla* da região da Bacia do Médio Tietê**. 2008. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008.

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

NAZARENO, A. G.; ZUCCHI, M. I.; REIS, M. S. Microsatellite markers for *Butia eriospatha* (Arecaceae), a vulnerable palm species from the Atlantic Rainforest of Brasil. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 1, p. e198–e200, 2011.

NAZARENO, A. G. et al. Transferability and characterization of microsatellite markers in two Neotropical *Ficus* species. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.32, n. 3, p. 568-571, 2009.

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

OCCHIONI, E. M. L. Considerações taxonômicas no gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 4, n. 2, 153-158, 1990.

OLIVEIRA, A. L. S. ; ELIAS, S. R. E. M.; FIGUEIREDO, A. D. L; Anatomia foliar em plantas adultas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Mimosaceae) **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 321-323, jul. 2007.

OLIVEIRA, A. L. S.; FIGUEIREDO A. D. L. Prospecção Fitoquímica das Folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae) **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 384-386, jul. 2007.

OLIVEIRA, D. G. et al Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 2, p. 165-169, 2007.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29 n. 2, p.294-307, 2006.

OLIVEIRA, M. J. R.; SIMÕES, M. J. S.; SASSI, C.R.R. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 39-41, 2006.

OLIVEIRA, S. S.; VANZELER, M. L. A. Evaluation of effects of metabolic extract of *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville for gavagem in the ciclo estral of female rats. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 8, n. 1, p. 22-28, 2011.

ORLANDO, S. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão)**. 2005. 88 f. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca, Franca, 2005.

ORTIZ, P. F. et al. Pattern of flower and fruit production in *Stryphnodendron adstringens*, an andromonoecious legume tree of central Brazil. **Plant Biology**, Boston, v. 5, n. 6, p. 592–599, Nov. 2003.

PECINA-QUINTERO, V. et al. Molecular characterisation of *Jatropha curcas* L. genetic resources from Chiapas, México through AFLP markers. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 35, p. 1897-1905, 2011.

PEREIRA, A. M. S. et al. **Implantação da fitoterapia no município de Jardinópolis – SP**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2008. 155 p.

PEREIRA, C. A.; PESSOA, J. M.; SANTOS, H. L. Experimental intoxication by *Stryphnodendron barbatimao*, Mart. in cattle. I. Clinical signs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 41, n. 5, p. 389-403, Oct. 1989.

PEREIRA, E. M. R. et al. In vitro antimicrobial activity of brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. **Planta Medica**, New York, v. 77, p. 401–404, 2011.

PEREIRA, M. F. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Cabralea canjerana* (Meliaceae). **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 1, p. e10–e12, 2011.

PEREIRA, Z. V. et al. Medicinal plants used by Ponta Porã community, Mato Grosso do Sul State. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 293-299, 2009.

PIGATO, S. M. P. C.; LOPES, C. R. Silvicultural and botanical characterization and genetic variability by RAPD molecular marker in progeny trial of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 60, p. 135-148, dez. 2001.

PRIMACK, R. B.; KANG, H. Measuring fitness and natural selection in wild plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 20, p. 367-396, 1989.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Editora Planta, 2001. 328 p.

REBECCA, M. A. et al. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 83, p. 101- 104, 2002.

REBECCA, M. A. et al. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 143, p. 55-63, 2003.

RIBEIRO J. F. et al. Ocupação do bioma Cerrado e conservação da sua diversidade vegetal. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M. (Org.). **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 25-44.

RIBEIRO, M. L. et al. Influência da Predação de Sementes na Germinação de Leguminosas (Fabaceae) no Cerrado. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 279-281, jul. 2007.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, jan./fev. 2001.

SANCHES, A. C. C. et al. Estudo morfológico comparativo das cascas e folhas de *Stryphnodendron adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum* – Leguminosae. **Latin American Journal of Pharmacy**, La Plata, v. 26, n. 3, p. 362-368, 2007.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS, E. N.; SIMPSON, A. J. G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechnology**, New York, v.17, p. 914-921, 1994.

SANTORO, K. R. et al. Effect of *Stryphnodendron* SPP. tanino on *Apis mellifera* L. (Africanized Bees) longevity. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 53, p. 281-291, 2004.

SANTOS, R.V. et al. Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). **International Journal of Dentistry**, Recife, v. 8, n.1, p. 1-5, jan./mar. 2009.

SCHABERG, P. G. et al. Anthropogenic alterations of genetic diversity within tree populations: Implications for forest ecosystem resilience. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 256, p. 855–862, 2008.

SILVA JUNIOR, M. C. **100 Árvores do Cerrado**: guia de campo. Brasília, DF: Ed. Rede de Sementes do Cerrado, 2005. p. 220-221.

SILVA, S. M. M. **Estrutura populacional e genética de jatobá em florestas manejadas na Amazônia sul - ocidental**. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2010.

SILVA-DE-ANDRADE, L.; BARROS-DE-CASTRO, D.; CHEN-CHEN, L. Efeito modulador do extrato de *Stryphnodendron adstringens* Mart. (Barbatimão) contra danos induzidos pela Mitomicina C em camundongos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande, v. 1, n. 2, p. 127-130, 2006.

SIRELKHATEM, R.; GAALI, E. E. L. Phylogenic analysis in *Acacia senegal* using AFLP molecular markers across the Gum Arabic Belt in Sudan. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 19, p. 4817-4823, Oct. 2009.

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

SOARES, S. P. et al. Antibacterial activity of the crude hydroalcoholic extract of *Stryphnodendron adstringens* on dental caries microorganisms. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 23, n. 2, p. 141-144, 2008.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto Editora: **Holos Press**, 2001. p 172-192.

SOUSA, N. C. et al. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 41, p. 293–299, 2003.

SOUZA, M. D.; FERNANDES, R. R.; CORETTE-PASA, M. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de São Gonçalo Beira Rio, Cuiabá, MT. **Revista Biodiversidade**, Cuiabá, v. 9, n. 1, p.91-100, 2010.

SOUZA, M. I. F. **Análise de diversidade genética de populações de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze utilizando marcador AFLP**. 2006. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Genética) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SOUZA, T. F. et al. Toxic effects of methanolic and dichloromethane extracts of flowers and peduncles of *Stryphnodendron adstringens* (Leguminosae: Mimosoidae) on *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* workers. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 45, n. 3, p. 112-116, 2006.

SOUZA, T. M. et al. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v.17, n.1, p. 71-75, jan./mar. 2007.

SOUZA, T. M. et al. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, Araraquara, v. 28, n.2, p.221-226, 2007.

STEFENON, V. M.; NODARI, R.O.; REIS, M.S. Padronização de protocolo AFLP e sua capacidade informativa para análise da diversidade genética em *Araucária angustifolia*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 64, p. 163-171, dez. 2003.

STRIKIC, F. et al. Genetic variation within the olive (*Olea europaea* L.) cultivar Oblica detected using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n. 20, p. 2880-2883, May 2010.

SUN, Y.; FU, C.X.; QIU, Y. X. Development, characterization and transferability of markers for *Kirengeshoma palmata* (Hydrangeaceae). **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 1, p. e48–e51, 2010.

TARAZI, R. et al. Mendelian inheritance, linkage and linkage disequilibrium in microsatellite loci of *Copaifera langsdorffii* Desf. **Conservation Genetics Resources**, Berlin, v. 2, p. 201–204, 2010.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.17, p.6463-6471, 1989.

TNAH, L. H. et al. Microsatellite markers of an important medicinal plant, *Eurycoma longifolia* (Simaroubaceae), for DNA profiling. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 1, p. e130–e132, 2011.

VICENTE, R. A. et al. Double-blind, randomized, placebo-controlled trial of a cream containing the *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville bark extract for suppressing terminal hair growth. **European Academy of Dermatology and Venereology**, Amsterdam, v. 23, p. 410–414, 2009.

VIEGAS, M. P. **Diversidade genética em populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., sob diferentes tipos de perturbação antrópica**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Sistemas de Produção) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira da Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2009.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WANG, S. Z. et al. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Momordica charantia* (Cucurbitaceae). **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 1, p. e75–e78. 2010.

WICKERT, E. et al. Marcadores fAFLP na caracterização de três genótipos de umezeiro selecionados como porta-enxertos para pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária. Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 12, p. 1741-1746, dez. 2007.

WILLIAMS, J. G. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary iniciadors are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. London: Editora The University of Chicago Press, 1978. p. 613.

YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. POPGENE 1.32: Population Genetic Analysis. 1999. Disponível em:<<ftp://ftp.microsoft.com/Softlib/MSLFILES/HPGL.EXE>>. Acesso em: 2 fev. 2002.

ZHANG, Z. R. et al. A set of novel microsatellite markers developed for the traditional Tibetan medicinal plant *Halenia elliptica* (Gentianaceae). **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 1, p. e173–e175, 2011.

ZIDCO, A. **Coleópteros (Insecta) associados as estruturas reprodutivas de espécies florestais arbóreas nativas do estado de São Paulo**. 2002. 59 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2002.

ZUCCHI, M. I. et al. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p. 449-457, 2003.

ZUCCHI, M.I., **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002, 148f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) Escola Superior Luiz de Queiroz, ESALQ, Piracicaba, 2002.