



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SANDRA APARECIDA SAHYUN

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
ESPINHEIRA SANTA (MAYTENUS AQUIFOLIUM)
POR MARCADORES MOLECULARES**

Londrina
2007

SANDRA APARECIDA SAHYUN

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
ESPINHEIRA SANTA (MAYTENUS AQUIFOLIUM)
POR MARCADORES MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador(a): Prof. Dr. José Roberto Pinto de Souza.

Co-Orientador(a): Profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas.

Londrina
2007

SANDRA APARECIDA SAHYUN

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
ESPINHEIRA SANTA (*Maytenus aquifolium*)
POR MARCADORES MOLECULARES**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Prof. Dr. José Roberto Pinto de
Souza
UEL

Profa. Dra. Diva Souza Andrade
IAPAR

Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria
UEL

Aprovada em: 09/ 2 /2007.

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares pelo amor, compreensão,
apóio e estímulo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus ... e a Maria... pela presença constante em minha vida e por mais esta oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À minha família, especialmente aos meus pais (Michel e Suelly), pelos ensinamentos, por toda uma vida de cuidados e sacrifícios e de muito amor, que me insentivaram a vencer todas as etapas.

Aos meus irmãos Márcia, Michel e Nassib por toda compreensão, apóio e amor, que auxiliaram a estar hoje aqui.

Agradeço ao meu orientador professor Dr José Roberto Pinto de Souza pela confiança, atenção, perspicácia e humildade com que me orientou, a este amigo sou muito grata por aceitar o desafio de ser meu formador.

Sou muito grata aos grandes profissionais e sobretudo amigos, Farmacêutica Industrial e Bioquímica Loana A. P. S. Johansson, e o Técnico agrícola Luís Vicente Miranda, da Empresa Klabin do Paraná Produtos Florestais Ltda, por todo o carinho e atenção com que nos receberam e nos acolheram, por terem acreditado, insentivado este projeto e por terem provido todas as condições para que como equipe pudessemos desenvolver com liberdade e seriedade este projeto científico.

A todos os que nos acolheram na Empresa Klabin do Paraná Produtos Florestais Ltda, e que compartilharam conosco seu conhecimento e suas vidas.

À professora Dra. Diva Souza Andrade e ao professor Dr. Ricardo Tadeu de Faria por aceitarem o convite para esta banca de defesa e por contribuírem para o nosso crescimento profissional e pessoal e enriquecimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Rogério F. de Souza.

À professora Dra. Claudete de Fátima Ruas pela sua co-orientação e ao professor Dr. Paulo Maurício Ruas.

Ao doutorando Cristiano Medri.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina pelo empenho e preocupação em ministrar um ensino de qualidade de forma que pudessemos administrá-lo de forma científica e a respeitar o dom maior que é o da vida.

Sou agradecida a todos os colegas, amigos e professores dos Departamentos de Biologia geral, Biologia Animal e Vegetal e aos dos Departamento de Bioquímica, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Departamento de Estatística que com tanto carinho e profissionalismo que nos acolheram .

Gostaria de agradecer também a todos os amigos e colegas do cursos de Mestrado e Doutorado em Agronomia e Genética que tive o privilégio de compartilhar não só conhecimento mas também trocar experiências de vida.

A todos os técnicos, funcionários e bibliotecários da Universidade que com o seu trabalho essencial também tornaram possível a conclusão deste projeto.

Obrigada a Dr. Richard Ennos, The University of Queensland, Brisbane, Australia, ao Dr. Rémy J. Petit, Directeur de Recherches INRA, UMR Biodiversité, Gènes and Ecosystèmes Equipe de Génétique FRANCE, ao Dr. U.K. Posselt, University of Hohenheim State Plant Breeding Institute GERMANY, Ana Yamaguishi Ciampi Embrapa-Rec. Genéticos e Biotec. Laboratório de Genética Vegetal Norte -Brasília-DF, a Profa. Dra. Luciane Costa Campos, Universidade do Extremo Sul Catarinense - Criciúma-SC, ao Prof. Juan Segura, Fac. Farmacia Universidad de Valencia, Spain, a "Brian Charlesworth, Department of Genetics, Lund University, Sölvegatan, Sweden, ao Dr. Sergei Volis Life Sciences Department Ben-Gurion University of the Negev, ao Dr. Clifford W. Morden, University of Hawaii at Manoa Honolulu, Hawaii, a Dr. Janet Rachlow University of Idaho Moscow, ao Professor David Ward, University of KwaZulu-Natal-South Africa, ao Dr. C. Hui, University of Stellenbosch Marais South Africa, Xiaozhuo Hana, China University, Luciano Ribas, Eduardo Gusson, André Stella, por serem tão solícitos em me enviarem seus artigos, dissertações e teses que tanto nos auxiliaram na escrita.

SAHYUN, Sandra Aparecida. **Variabilidade genética de populações Espinheira - Santa (*Maytenus aquifolium*) por marcadores moleculares**. 2007. 85f.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

.*Maytenus aquifolium* é um arbusto restrito a América do Sul. A fragmentação das Florestas, nas últimas décadas, associada com a comprovação terapêutica em males gástricos e o uso em larga escala de populações naturais de *Maytenus aquifolium* têm resultando no estado de vulnerabilidade desta espécie no Rio Grande do Sul. Dentre as espécies medicinais prioritárias para a conservação genética, domesticação de germoplasma, manejo, melhoramento genético e estudo populacional, *M. aquifolium* é uma das espécies mais importantes da Bacia do Rio Tibagi. O objetivo deste trabalho foi detectar a variabilidade genética entre e dentro de três populações naturais da espécie *M. aquifolium* através de marcadores de RAPD. A diversidade genética total obtida foi 0,224 e a diferenciação genética dentro de populações obtida foi 0,197. Com relação a AMOVA, para *M. aquifolium*, a análise detectou diversidade genética molecular altamente significativa tanto dentro dos agrupamentos como entre os indivíduos. Do total da variância genética molecular encontrada para a espécie, 21,77% deve-se à divergência entre as populações e 78,23% é atribuída aos indivíduos dentro das populações. O índice de divergência genética obtido foi 0.21765, corroborou os dados de AMOVA. Os níveis moderados a altos de diversidade genética, para a espécie, poderiam justificar a conservação da variabilidade genética e a manutenção apenas das populações nativas de Mortandade e Trinita, o que não seria uma inferência correta, uma vez que os níveis de variabilidade genética entre as populações encontradas foram considerados altos. Assim, a perda de uma ou mais populações pode levar a perda de alelos raros exclusivos de determinada população.

Palavras-chave: Variação genética. Marcador RAPD. *Maytenus aquifolium*. Planta medicinal.

SAHYUN, Sandra Aparecida. **Gentic variation of populations of Espinheira-Santa (*Maytenus aquifolium*) for molecular marker**. 2007. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Maytenus aquifolium is a restricted shrub the South America. The fragmentation of the Forests, in the last decades, associated with the therapeutical evidence in illness gastric and the use in wide scale of natural populations of *Maytenus aquifolium* is resulting in the vulnerability of this species in the Rio Grande do Sul. Amongst the with priority medicinal species for the genetic conservation, domestication of germoplasm, handling, genetic improvement and population study, *M. aquifolium* is one of the species most important of the Basin of the River Tibagi. The objective of this work was to detect the genetic variability inside enters and of three natural populations of species *M. aquifolium* through RAPD markers. The gotten full genetic diversity was 0,224 and the genetic differentiation inside of populations gotten was 0,197. With regard to AMOVA, for *M. aquifolium*, the analysis in such a way detected highly significant molecular genetic diversity inside of the groupings as between the individuals. Of the full of the found molecular genetic variance for the species, 21.77% must it the divergence between the populations and 78.23% are attributed to the individuals inside of the populations. The index of genetic diversity gotten 0,21765, corroborated the AMOVA data. The moderate levels the high ones of genetic diversity, for the species, could justify the conservation of the genetic variability and the maintenance only of the native populations of Mortandade and Trinita, what it would not be a correct inference, a time that the levels of genetic variability between the joined populations had been considered high. Thus, the loss of one or more populations can take the loss of exclusive rare allele of determined population.

Keywords: Genetic diversity. Molecular marker. *Maytenus aquifolium*. Medicinal plan.

t.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 PLANTAS MEDICINAIS	11
2.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ESPINHEIRA-SANTA (<i>MAYTENUS AQUIFOLIUM</i> MARTIUS)	12
2.3 CONSERVAÇÃO GENÉTICA	15
2.4 VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES	18
2.5 FLUXO GÊNICO	20
2.6 FRAGMENTAÇÃO DAS POPULAÇÕES VEGETAIS	22
2.7 MARCADORES MOLECULARES	30
REFERÊNCIAS	37
3 ARTIGO: Variabilidade genética em populações naturais de <i>Maytenus aquifolium</i> de Florestas em Telêmaco Borba, Paraná, Brasil	64
RESUMO	64
ABSTRACT	65
INTRODUÇÃO	66
MATERIAIS E METODOS	68
RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
CONCLUSÃO	80
AGRADECIMENTO	80
REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas florestais tropicais detêm grande parte dos recursos genéticos do planeta. A variabilidade genética, destas espécies florestais, é dependente de fatores como amplitude de variabilidade genética e distribuição geográfica, taxonomia, ciclo de vida, sistema genético, modo de reprodução, forças evolutivas (deriva genética, seleção, mutação, migração, fluxo gênico), número de cromossomos e estágio sucessional. O estudo da estrutura genética de populações naturais, bem como sua distribuição espacial e variação genética entre e dentro de populações são importantes para delinear estratégias para conservação, conservação da variabilidade genética na natureza, manejo sustentável, melhoramento genético e entendimento dos processos evolutivos de populações de espécies florestais tropicais.

Os marcadores bioquímicos e moleculares têm sido utilizados para a obtenção de resultados cuja qualidade e repetibilidade têm sido comprovadas; fornecendo dados que possibilitam o estudo da diversidade genética em plantas, medicinais nativas. Através destas informações, podem ser estimados vários parâmetros populacionais como grau de endogamia produzido pela deriva genética, sistema reprodutivo predominante, variabilidade genética entre e dentro de populações, fluxo gênico entre outros.

A flora nativa do estado do Paraná é abundante em plantas medicinais com potencial farmacológico cientificamente comprovado. Entretanto há uma diversidade enorme de plantas, ainda não estudadas, que produzem compostos provenientes do metabolismo secundário, os quais podem ser responsáveis também por funções fisiológicas nas plantas e podem estar associados à defesa contra agentes externos como doenças, predadores, déficit hídrico, etc. Tais princípios ativos possuem funções ecológicas importantes para a sobrevivência da espécie, devido a seu caráter adaptativo. Como a produção, presença e concentração destes compostos são reguladas geneticamente, pode-se inferir que diferenças de variabilidade genética entre populações podem resultar em diferentes níveis de regulação e expressão dos genes responsáveis por tais produtos do metabolismo secundário.

O aumento da utilização de recursos florestais para satisfazer a crescente demanda por medicamentos populares e a perda gradual de variabilidade genética, devido à fragmentação florestal, enfatizam a importância de se realizar o estudo de populações de espécies com potencial medicinal.

O impacto das atividades antrópicas têm resultado em uma ação desequilibradora e desestabilizadora dos ecossistemas. Assim, a diversidade biológica está se deteriorando, principalmente com a crescente taxa de vulnerabilidade e extinção de espécies, perturbação da paisagem e conseqüente restrição das espécies naturais a populações pequenas e isoladas com pool genético modificado. Deste modo, a preservação e conservação de recursos genéticos *in-situ* ou *ex-situ*, têm se tornado, cada vez mais, uma necessidade.

A variabilidade genética organizada em um conjunto de materiais diferentes entre si é denominada germoplasma e constitui-se em uma forma de conservação *ex-situ* prioritária, pois cada unidade de germoplasma é constituída pelo material genético dos organismos vivos de interesse atual ou potencial. Por outro lado, o estabelecimento e manutenção de recursos naturais que contemplem a maior parte da variabilidade genética da espécie em questão constitui-se em um importante método de conservação *in-situ*.

Os estudos de população de espécies medicinais nativas são um tanto incipiente no Estado do Paraná em face do enorme potencial de diversidade genética encontrado e do grau de impactação que elas têm sofrido.

Dentre as espécies medicinais prioritárias para a conservação, manejo e melhoramento genético, a espécie *Maytenus aquifolium* é uma das arbóreas medicinais mais importantes da Bacia do Rio Tibagi, devido a sua importância ecológica, ao seu potencial farmacológico, econômico e também estado de vulnerabilidade no estado do Rio Grande do Sul. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi detectar a variabilidade genética entre e dentro de três populações naturais de *M. aquifolium* através de marcadores de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) .

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas têm sido pesquisadas com o objetivo de ampliar o conhecimento ecológico, genético e botânico, e para fins alimentícios, medicinais, cosméticos e industriais (ABADIE et al., 2005). Apesar do Brasil apresentar biodiversidade estimada em 50 mil espécies, apenas uma pequena parcela das plantas nativas com potencial farmacológico foi devidamente estudada (MOSSI, 2003). Embora a diversidade biológica represente enormes possibilidades científicas, econômicas e culturais, sabe-se que essas possibilidades dependem da disponibilidade de tecnologias de manejo e conservação dos recursos naturais.

Estima-se, que devido ao consumo indiscriminado das plantas medicinais em países em desenvolvimento e a intervenção da ação antrópica de forma a provocar devastação de ecossistemas, no máximo 5% destas plantas medicinais serão pesquisadas antes de serem extintas (MOSSI, 2003). De acordo com Silva (2003) não houve relato de conservação de plantas medicinais “*in situ*” até 1999.

As plantas com potenciais medicinais contribuem como fonte natural de fármacos e proporcionam grandes chances de obter-se uma molécula protótipo devido à diversidade de constituintes presentes nestas, sua utilização tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto a comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança (NOLDIN et al., 2003).

O Estado do Paraná constitui-se em uma região que contém uma riqueza enorme de recursos florestais genéticos, em levantamentos recentes Battistelli et al., (2001) registraram grande ocorrência natural de espécies de uso medicinal na região central do Paraná. Na região centro-leste do Estado do Paraná, bacia hidrográfica do rio Tibagi (BHT), os diferentes tipos de florestas ocorrem principalmente em função das diferenças de altitudes (TOREZAN e SILVEIRA 2002).

2.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ESPINHEIRA-SANTA (*MAYTENUS AQUIFOLIUM MARTIUS*)

O gênero *Maytenus* é o maior e mais diversificado da família Celastraceae e está inserido na subfamília Celastroideae, seção Oxphylla, que é restrita a América do Sul. Cerca de 80 espécies são reconhecidas e distribuídas por todo território brasileiro (CARVALHO-OKANO, 2005). Neste gênero os órgãos vegetativos são historicamente os principais caracteres utilizados na taxonomia por Handro (1968), Sebsebe (1985), Carvalho-Okano (1998), Pirani e Carvalho-Okano (1999) e Carvalho-Okano (2005).

Maytenus aquifolium Martius ou *Maytenus aquifolia* Martius pertence a família Celastraceae, seção Oxphylla bem como *Maytenus ilicifolia* são espécies muito utilizadas pela medicina popular como fitoterápico e muitas vezes confundidas, apresentando inclusive os mesmos nomes vulgares dependendo da região. Apesar de possuírem as folhas semelhantes estas são facilmente identificadas principalmente pela forma dos ramos, angulosos e carenados no caso de *M. ilicifolia* e cilindros e achatados quando se identifica *M. aquifolium* (CARVALHO e OKANO, 1992). Estudos relacionados às duas espécies têm apresentado composição química semelhante e as mesmas propriedades medicinais (MOSSI, 2003). Ambas são conhecidas vulgarmente como "Espinheira-Santa", "Cancorosa", "Cancerosa", "Salva-Vidas", "Sombra de Touro", "Espinho de Deus", entre outros (PENNA, 1946).

Popularmente, as espécies *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., *M. aquifolia* Mart., *Pachystroma illiscifolium* Müll. Arg., *Zollernia* sp. e *Sorocea bomplandii* são conhecidas como espinheira-santa e comercializadas com este nome (MONTANARI JR, 2002).

Maytenus aquifolium foi descrita por Carvalho-Okano (1992), como uma espécie arbórea que atinge 12 m de altura. Os ramos novos são glabros e cilíndricos-achatados. As folhas são cartáceas, glabras e com pecíolos medindo 0,5-19,0 cm de comprimento, estípulas incospícuas, limbo com 6,0-19,0 cm de comprimento e 2,0-6,0 cm de largura, nervura primária proeminente em ambas as faces e nervuras secundárias subsalientes. A forma elíptica ou oblongo-elíptica das folhas é a mais comum, apresentando base aguda obtusa, ápice agudo a obtuso com mucron e margem serrada com muitos espinhos (PERECIN, 2000).

Maytenus aquifolium é uma planta de inflorescência em fascículos multifloros com flores esbranquiçadas e pedicelos florais de 0,4-0,7 cm de comprimento, sépalas ovais com cerca de 0,4 cm de comprimento e 0,3 cm de largura e estames com filetes achatados na base. O estigma é séssil ou com estilete distinto e o ovário é saliente ou imerso totalmente no disco carnoso. O fruto possui cápsula bivalvar, orbicular com pericarpo maduro e de coloração castanho-amarelada (PERECIN, 2000).

As populações desta espécie distribuem-se pelo Chile, Uruguai, Paraguai e Bolívia (PERECIN, 2000). Carvalho-Okano (1992), identificaram a região sudeste como o centro primário de diversidade específica de *Maytenus* no Brasil.

A espécie *M. aquifolia* possui ampla distribuição, ocorrendo em toda a Região Sudeste, e Sul do Brasil predominando no sub-bosque das matas, entre 100 e 1.000 m de altitude (PERECIN, 2000), principalmente em florestas primárias e secundárias, nas florestas ombrófilas densas e nas florestas semidecíduas (PERECIN e KAGEYMA, 2002). Percin (2000), relatou que, de forma generalizada, foi observado para esta espécie a heterogeneidade botânica em diferentes formações florestais. Esta mesma autora, em 2000, relatou que *M. aquifolium* é mais amplamente distribuída que *M. ilicifolia*. Esta última espécie pode ser encontrada na região sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e metade do sul do Paraná), a sua ocorrência em São Paulo e Mato Grosso do Sul é menos freqüente, também ocorre no Uruguai, Bolívia, leste da Argentina e Paraguai; preferencialmente em sub-bosque de floresta de Araucária e a margem de rios, nos agrupamentos arbóreos (capões) e regiões de estepes.

Siqueira (1994) selecionou na literatura 63 levantamentos da Mata Atlântica e encontrou apenas 2 citações para *M. aquifolia* e nenhuma para *M. ilicifolia* demonstrando a baixa freqüência de ocorrência destas espécies. A baixa freqüência de ocorrência, o intenso uso como fitoterápico e a ação antrópica na região de ocorrência natural desta espécie tem levado a extinção de várias populações.

As populações *M. aquifolium* podem ser classificadas como climáticas, pois apresentam um domínio permanente do habitat, ou seja, uma série completa de indivíduos distribuídos em cada classe de diâmetro ou idade para cada espécie (DAUBENMIRE, 1968). Por outro lado, se as classes de diâmetros apresentarem interrompidas ou truncadas, significa que o ciclo de vida da espécie

não está se completando, logo a mesma não pode ser considerada clímax no hábitat (DAUBENMIRE, 1968).

As espécies climáticas são muito sensíveis a perturbações antrópicas, uma vez que este grupo ecológico surge sob o sombreamento do dossel, sendo, ainda, as primeiras a sofrerem perigo de extinção porque possuem crescimento lento e dependem da fauna dispersora (ZIMBACK et al, 2004).

M. aquifolium é uma espécie considerada vulnerável, com risco de extinção no Rio Grande do Sul, segundo o Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA, 2002). Estes fatores conferem a esta espécie cuidados especiais de preservação e conservação visando manter a variabilidade genética, além de adequado manejo para ser devidamente explorada.

Vários gêneros dentro da família Celastraceae, e um grande número de espécies de *Maytenus* têm sido estudados fitoquimicamente (GONÇALVES DE LIMA et al., 1969). Tais estudos evidenciaram a importância do conhecimento da espécie *M. aquifolium*, pois esta espécie acumula friedelan e quinonemetídeos triterpenóides em suas folhas e raízes, respectivamente, e há muitas outras propriedades químicas e genéticas que podem ser descobertas em relação à Espinheira-Santa. Este último princípio ativo tem demonstrado uma grande variedade de atividades biológicas como antibiótica (BHATAGAR et al., 1951; GONÇALVES DE LIMA et al., 1969), antitumoral (GONÇALVES DE LIMA et al., 1971, BHATNAGAR et al., 1979;), antimicrobiana (FERREIRA DE SANTANA et al., 1971), antimalarial (PAVANAND et al., 1989) e atividade espermicida (CORSINO et al., 2000).

No Brasil, esta espécie é principalmente usada no tratamento de úlceras do estômago e gastrites devido à ação dos triterpenos friedelan-3-ol e do friedelin, bem como compostos fenólicos (VILEGAS et al., 1994 e VILEGAS et al., 1995, CORDEIRO et al., 1999), também pode ser utilizada como antiespasmódico, contraceptivo, diurético, cicatrizante e analgésico (MOSSI, 2003). No Paraguai e Bolívia, são utilizados por indígenas e por populações rurais como agente regulador de fertilidade, devido ao alcalóide maitensine (BONTEMPO, 1992). Esta espécie apresenta em suas substâncias biotivas, compostos esteróides e triterpenóides (VILEGAS et al., 1998) e taninos (FRANÇA et al., 1999) de reconhecido valor medicinal (CORDEIRO et al., 1999). Experimentos com animais (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; OLIVEIRA et al., 1991) comprovam o efeito dos princípios

ativos desta espécie, efeito esse atribuído ao aumento do volume e pH do suco gástrico de cobaias em experimento laboratorial (OLIVEIRA et al., 1991).

2.3 CONSERVAÇÃO GENÉTICA

Na conservação genética há preocupação com as diferenças genéticas do material conservado enquanto a conservação da natureza ocorre proteção das áreas que representam habitats e comunidades que podem ser identificados (BITTENCOURT, 2000). Sob este ponto de vista são necessários segundo essa mesma autora estudos envolvendo biodiversidade, considerando aspectos genéticos e ecológicos, os quais consideram a variação genética das espécies e suas propriedades adaptativas com relação ao ambiente em que estão inseridas.

As populações naturais são importantes fontes de informações para obtenção de dados sobre nível e distribuição da variação genética de sistemas biológicos íntegros e os que têm sido restringidos pela destruição e fragmentação de habitats a populações pequenas e isoladas com crescente diminuição no número de espécies (FISHER e MATTHIES, 1998). Estes mesmos autores afirmaram que mesmo populações com habitats que permanecem intactos, enfrentam grande risco de extinção por causa da estocacidade ambiental, demográfica e genética.

Estes argumentos vêm imprimir às últimas e a geração atual a consciência de gerar estudos e metodologias que promovam o conhecimento das estruturas genéticas das florestas nativas a fim de conservar e preservar suas espécies e de utilizar seus recursos naturais de forma a trazerem benefícios sociais e econômicos, uma vez que a flora mundial e em especial a brasileira e a do estado do Paraná têm gerado pelo emprego de suas propriedades medicinais melhor qualidade de vida. Essa riqueza de diversidade não pode ser desprezada. No entanto, o desconhecimento dos valores reais dessa variabilidade genética tem constituído em obstáculo para o reconhecimento da necessidade da introdução de estratégias de conservação de recursos naturais e para a descoberta de seus potenciais genético e medicinal (PERECIN, 2000; SCHEFFER, 2001; CAVALLARI, 2004).

Aproximadamente 80% da população humana de países em desenvolvimento utilizam plantas medicinais, contudo poucos são os recursos para pesquisa e conservação das mesmas e grande é a ação antrópica com a destruição dos ecossistemas, estima-se neste contexto que no máximo 5% destas plantas serão pesquisadas antes de serem extintas (MOSSI, 2003).

A preservação e conhecimento da variação genética nas espécies medicinais são essenciais para o planejamento de programas para conservação, uma vez que a sobrevivência, a longo prazo das espécies, depende da manutenção da diversidade genética ideal dentro e entre as populações sujeitas às novas pressões de seleção causadas pelas mudanças ambientais (BARRETT e KOHN, 1991). A avaliação da variabilidade genética e a compreensão de como a diversidade é estruturada não se resumem apenas a pré-requisito para projetar estratégias apropriadas para a conservação (FALK e HOLSINGER, 1991; AVISE, 1995).

O interesse a respeito do conhecimento sobre civilizações que detêm plantas nativas e seus potenciais terapêuticos têm crescido, após a constatação de que a base empírica desenvolvida por elas tem comprovação científica, tais informações são importantes e auxiliam a disponibilizar à sociedade um produto de maior qualidade e industrializado. Além disso, cada vez mais se reconhece que a exploração dos ambientes naturais por povos tradicionais pode fornecer subsídios para estratégias de conservação e manejo e a exploração que seja sustentável a longo prazo (CAVALLARI, 2004).

O estudo, portanto, da estrutura genética de populações de planta (SLATKIN, 1987) ou de como a variabilidade genética está organizada em populações naturais de plantas tem permitido grandes avanços no conhecimento relativo aos processos microevolutivos e, conseqüentemente, nas estratégias de domesticação, manejo e conservação dessas espécies (CARTHEW, 1993; REIS, 1996).

Os estudos sobre a diversidade genética inter e intra populações naturais são relevantes por descreverem os níveis e a distribuição desta entre e dentro de populações. Neste sentido populações naturais são fontes importantes de informações para obtenção de dados sobre nível e distribuição de variação genética de sistemas biológicos e para o desenvolvimento de práticas de silvicultura sustentáveis (LEDIG, 1992). É preciso considerar também que o manejo impróprio

dos recursos naturais pode levar a mudanças no pool gênico local pela ação de mecanismos como seleção direcional, endocruzamento e deriva genética (BARNES, 1989; LEDIG, 1992) afetando, conseqüentemente, a variação genética das populações (BUCHERT, 1994).

Os estudos de genética de população auxiliam, também, na caracterização de germoplasmas, no monitoramento de bancos de germoplasmas (CRUZ e CARNEIRO, 2003) possibilitando a identificação de possíveis duplicatas e fornecendo informações úteis para o estabelecimento de programas de preservação de recursos naturais gerando informações úteis para preservação e uso dos acessos (TOQUICA et al., 2003). A conservação de germoplasma, consiste em preservar a matéria onde se encontra um princípio que pode crescer e se desenvolver (QUEROL, 1993). Segundo Santos (2003), conservar é somar todas as combinações de genes resultante da evolução de uma espécie.

As estratégias básicas para manutenção de recursos genéticos, variação genética, passam pela conservação *in-situ* e *ex-situ* (CGIAR, 1993).

A conservação *in-situ* refere-se à manutenção das espécies selecionadas no seu habitat natural em parques, reservas biológicas ou reservas ecológicas, estas populações em áreas naturais são consideradas reservas genéticas e nelas não ocorrem interrupção dos processos evolucionários das espécies, ficando as mesmas submissas a efeitos ambientais e à ação antrópica. Já, na conservação *ex situ* coleta-se sementes, estacas, órgãos subterrâneos, brotos em seus habitats ou lugar de disponibilidade, é devidamente identificada para representar a sua população de origem (VIEIRA, 1999). Na conservação *ex-situ* portanto ocorre conservação de espécies vegetais fora do seu ambiente natural, através de coleções de plantas no campo, de sementes em bancos de sementes ou de coleções de plântulas em bancos *in vitro* (VIEIRA, 1999).

A conservação de germoplasma como uma atividade científica foi proposta nos anos 70 para prevenção da erosão da diversidade genética em espécies de plantas nativas ou mesmo a sua total extinção (VILLALOBOS et al., 1991) e para o melhoramento da produtividade agrícola (IBPGR, 1993).

A conservação de germoplasma implica na manutenção de coleções, sendo empregadas para isto as estratégias *in situ* e *ex situ*, que são abordagens complementares e visam o enriquecimento e ou a manutenção da variabilidade genética das espécies em benefício do desenvolvimento sustentável

(TOWILL, 2000).

Os bancos de germoplasma visam evitar a perda de recursos genéticos, conservar fontes de genes para uso futuro e colecionar, identificar e caracterizar genótipos para uso no melhoramento (BARBIER, 1989 e 2003).

ALLARD (1971) argumentou que bancos de germoplasma seriam no futuro fundamentais na criação de reservatórios de genes disponíveis para a realização de melhoramento genético. Segundo Giacometti e colaboradores (1986), a conservação do germoplasma de espécies vegetais tem por objetivo manter indefinidamente a diversidade genética e garantir o maior número possível de genótipos para os programas de melhoramento genético.

Os estudos genéticos, nas populações de arbóreas medicinais, baseados em marcadores moleculares e aliados ao conhecimento de princípios ativos têm propiciado novas perspectivas de pesquisa científica, que têm beneficiado tanto ao equilíbrio na natureza quanto gerando novas alternativas de saúde e bem estar para o ser humano quer seja pela produção de fármacos ou por melhoramento genético dos recursos medicinais (BITTENCOURT, 2000 e MOSSI, 2003).

Entre as espécies medicinais nativas da flora do Estado do Paraná, *M. aquifolium* Mart é uma das plantas mais utilizadas na medicina popular. Em âmbito nacional, ela foi selecionada como prioritária para a realização de estudos de conservação e manejo de plantas medicinais (EMBRAPA/IBAMA, 2002). Estudos envolvendo a elucidação de aspectos do sistema reprodutivo, diversidade genética, dinâmica de populações e reprodução, bem como ações de coleta de germoplasma, foram considerados de maior prioridade (STEENBOCK, 2003).

A caracterização genética de *M. aquifolium* é importante não apenas para estabelecer práticas adequadas de manejo, mas também, para estabelecer reservas naturais que preservem a variabilidade genética, através de toda área de distribuição da espécie e possam, simultaneamente, fornecer material genético para conservação *ex-situ* e manejo sustentável (STEENBOCK, 2003).

2.4 VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES

A evolução nos seres vivos ocorre considerando a variação

individual dentro de uma população, a distribuição e a frequência dos indivíduos variantes nas diferentes populações dentro da espécie e a divergência ou especiação progressiva devido ao isolamento (STEBBINS, 1950). A diversidade existente nos indivíduos e populações nos quais atuam os processos evolutivos é importante para a caracterização da extensão e das possíveis causas da variabilidade genética (WEIR, 1996; TELLES, 2001).

Estudos relativos à organização da variabilidade ou estrutura genética das populações naturais de plantas têm permitido grandes avanços no conhecimento relativo aos processos microevolutivos e, conseqüentemente, nas estratégias de domesticação, manejo e conservação dessas espécies (CARTHEW, 1993; REIS, 1996).

O desenvolvimento e a manutenção da estrutura genética ocorrem devido às interações de um conjunto de fatores evolucionários, como variação no conjunto gênico, organização destas variações dentro de genótipos, distribuição espacial do genótipo, sistema de reprodução, dispersão das progênes, seleção, deriva, mutação, eventos casuais e processos de crescimento, mortalidade e reposição de indivíduos que darão origem a futuras populações (HAMRICK, 1983; LOVELESS e HAMRICK, 1984).

Os efeitos das alterações nas frequências alélicas são refletidos diretamente sobre indivíduos que formam a população assim sendo a diversidade genética entre e dentro de populações de uma espécie merece consideração espacial (SOBIERAJSKI, 2004).

Populações com pouca variação genética podem ser incapazes de responder às mudanças ambientais (SHARMA et al., 2000; TANSLEY e BROWN, 2000; SHARMA, 2001; JONES et al., 2001; MATOCQ e VILLABLANCA, 2001).

Acredita-se que a perda da variação genética resulta em baixo potencial evolutivo (HOLSINGER e GOTTLIEB, 1991), já que provoca a redução da adaptabilidade da população (SHARMA et al., 2000; BOUZANT, 2001; SHARMA, 2001) sendo, portanto, uma das principais ameaças à existência de uma espécie (JAGGI et al., 2000; TANSLEY e BROWN, 2000). Isto ocorre porque a variação genética é a condição fundamental para que haja evolução adaptativa, uma vez que a seleção natural atua sobre as variantes fenotípicas, e indiretamente sobre genótipos, que ocorrem dentro das populações (CLEGG, 1980).

A variabilidade genética de plantas medicinais está intimamente

relacionada com a variabilidade interespecífica (dentro de populações) e intraespecífica (entre populações), em especial nas espécies nativas (SCHEFFER et al., 1999), e é resultante da pressão ambiental nos diversos biomas produzindo características que são muito importantes nos estudos de recursos genéticos.

A variação genética das plantas medicinais segundo Scheffer et al., (1999), resulta na necessidade de se estabelecer diferentes estratégias de manejo e conservação. Ainda, a existência de diferentes tipos de compostos pode resultar em usos diferenciados e conseqüentes diferenças de estratégia (SCHEFFER et al., 1999).

Em programas de melhoramento a caracterização da diversidade genética, através de técnicas moleculares, pode fornecer dados úteis para a seleção de indivíduos, possibilitando cruzamentos de materiais divergentes, com a finalidade de recombinar complexos gênicos, reunindo-os em novas combinações favoráveis (GOMES et al., 2005). Os marcadores de RAPD permitem a localização de genes de interesse econômico (RAFALSKI et al., 1991) e análise da estrutura e variabilidade genética de populações de várias espécies (DAWSON et al., 1995).

A base para qualquer programa de melhoramento é, sem dúvida, a variabilidade genética. Portanto, conhecer a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações nativas de uma espécie é fundamental para o estabelecimento de estratégias adequadas de coleta dos recursos genéticos e direcionamento de cruzamentos. Para o melhoramento, informações sobre as diferenças genéticas entre indivíduos de uma população e o estabelecimento de relações genéticas entre diferentes acessos de uma coleção de germoplasma são fundamentais para auxiliar o melhorista na tomada de decisões (KAGEYAMA e DIAS, 1982).

2.5 FLUXO GÊNICO

A terminologia aplicada para o fluxo gênico em modelos populacionais não é potencialmente clara por causa dos muitos significados dos termos migração e dispersão, que não correspondem aos seus significados quando aplicados ao fluxo (ZUCCHI, 2002). Migração, em uma definição ampla, pode ser

qualquer movimento, incluindo movimentos cíclicos que podem regularmente retornar o organismo ao seu local de origem. Em contraste, o termo dispersão é mais precisamente restrito para movimentos a distância entre os organismos, gametas ou propágulos da fonte dispersora (NEIGEL, 1997).

Neste contexto, fluxo gênico pode ser definido como um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam no movimento de alelos de uma população (subpopulação) para outra (SLATKIN, 1985). Existe grande associação entre o fluxo gênico e a estrutura genética das populações das espécies arbóreas tropicais, de forma que a distância de vôo dos polinizadores e dispersores de sementes pode prever a variação genética das espécies em questão (KAGEYAMA e LEPSCH-CUNHA, 2001).

O fluxo gênico principalmente via pólen, ou o potencial de deslocamento dos alelos via animais polinizadores, tem sido pouco mensurado, considerando que a grande maioria das espécies arbóreas tropicais é polinizada por animais (BAWA, 1974 e BAWA et al., 1985).

O fluxo gênico ou a dispersão de pólen e sementes entre populações estabelecidas reduz a diferenciação genética entre elas, sendo um dos mecanismos responsáveis pela introdução da variação genética na população receptora (Wright, 1931). A taxa de fluxo gênico pode ser medida em termos do número equivalente de migrantes que se move de uma população a outra (SILVERTOWN e DOUST, 1993).

Estimativas de fluxo gênico podem ser feitas por métodos diretos ou indiretos, SLATKIN (1987) recomendou o uso desses dois métodos conjuntamente por produzirem informações diferentes e complementares. Os métodos diretos utilizam-se de estimativas das distâncias de dispersão e do sucesso no estabelecimento de imigrantes, enquanto que os métodos indiretos usam as frequências alélicas ou medidas de diferenças genéticas para estimar o fluxo gênico.

A análise da estrutura de populações naturais é baseada freqüentemente nos modelos de ilhas ou de alpondras, sendo que os coeficientes obtidos a partir de probabilidades de identidade por descendência, tais como F_{ST} , são estimados e comparados às expectativas sob um modelo de ilhas (ROUSSET, 1997).

Um dos métodos mais confiáveis para a estimativa indireta de fluxo gênico é a partir da obtenção de Nm através de F_{ST} (que é a medida de

diferenciação populacional usando frequências alélicas) (WRIGHT, 1951).

O tamanho efetivo de vizinhança, N_b , pode ser da mesma ordem de magnitude que N_m , dependendo das características da população (SLATKIN e BARTON, 1989).

O nível de fluxo gênico entre as populações de espécies vegetais é fundamental para estimar os efeitos da fragmentação. A fragmentação pode modificar imediatamente, a curto e a longo prazo a composição genética das espécies de plantas. Com altas taxas de fluxo gênico, pouca variabilidade genética será perdida nos fragmentos em níveis individuais e na espécie como um todo. Por outro lado, se as taxas de fluxo gênico são reduzidas abaixo dos níveis anteriores à fragmentação, então a estruturação genética entre fragmentos aumentará e a variabilidade nos fragmentos diminuirá (HAMRICK, 2004).

O fluxo gênico e a deriva genética são parâmetros evolutivos associados e atuam na natureza como forças evolutivas contrárias. O grau com que a deriva genética pode levar as populações de plantas ao isolamento, à homogeneização e conseqüente ao aumento da divergência entre elas, depende da força evolutiva contrária à deriva que é o fluxo gênico (PERECIN, 2000).

O fluxo gênico é, portanto, a principal força que atua de forma contrária ao efeito de deriva genética, promovendo o aumento da riqueza alélica e do número de heterozigotos em cada população. Segundo Wright (1951), quando um ou mais indivíduos migram por geração, a divergência entre populações por deriva é impedida. Ainda, segundo Perecin (2000), o fluxo gênico tem o importante efeito de uniformizar a composição genética das populações isoladas, de modo que, na ausência de seleção, se a população for grande o suficiente para que a deriva genética possa ser ignorada, o fluxo gênico irá homogeneizar as frequências alélicas em todas as populações.

2.6 FRAGMENTAÇÃO DAS POPULAÇÕES VEGETAIS

A estrutura genética de uma espécie pode ser definida como a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações, resultando da combinação entre mutação, migração, seleção e deriva genética. Em populações

naturais, a distribuição da variabilidade genética é influenciada pelo sistema de acasalamento, tamanho da população, distribuição geográfica, fluxo gênico e deriva genética (HAMRICK, 1982), além de ser estruturada no tempo e no espaço.

Para a maioria das espécies arbóreas, a maior parte da diversidade gênica é constituída pela variação genética dentro das populações (HAMRICK e GODT, 1989). Com relação a variabilidade genética inter populacional esta é refletida, ao menos em parte, a ação de processos genéticos em nível populacional, como seleção e deriva genética. Esses processos, ou seja, a seleção para microhabitats e deriva genética devido ao fluxo gênico restrito, têm sido citados como as possíveis causas da distribuição não aleatória de genótipos em populações naturais (LOVELESS e HAMRICK, 1984; SOKAL et al., 1989, EPPERSON, 1990).

A conservação genética de espécies de arbóreas tropicais é um dos tópicos mais prementes da atualidade, uma vez que as elevadas taxas de destruição das comunidades naturais e massiva extinção de espécies é eminente (ZUCCHI, 2002).

O Estado do Paraná, pela sua grande riqueza de ecossistemas terrestres e aquáticos, é também privilegiado por uma significativa biodiversidade (SEMA, 1995). Entretanto, é considerado como uma das áreas que vem sofrendo intensa pressão antrópica especialmente na bacia do rio Tibagi, cuja situação ambiental é bastante precária, tanto em relação às águas quanto à vegetação (DIAS et al, 1998). Essa pressão ocorreu principalmente pela expansão da fronteira agrícola, na qual extensas áreas contínuas de vegetação natural foram substituídas por monoculturas e pastagens. Em fragmentos que se restringem a áreas pequenas e isoladas, existe uma facilidade de haver o cruzamento entre indivíduos aparentados ou endogamia. As conseqüências da endogamia em espécies florestais tropicais não são bem conhecidas, porém existem alguns dados de perda de vigor, evidenciado em altura e produção de folhas (MOFFETT e NIXON, 1974). Quanto maior a ocorrência destes fenômenos, menor o número de heterozigotos observados e, conseqüentemente, maior o coeficiente de endogamia. Caso a população tenha um nível de endogamia estável, ao longo das gerações, como conseqüência de características do sistema reprodutivo da espécie, diz-se que a mesma está em equilíbrio de endogamia (WRIGHT, 1951).

O coeficiente de endogamia, (f) expressa a existência de autofecundação ou de cruzamentos entre aparentados na população, a ele está

associada a atuação de outra força microevolutiva, a deriva genética. Esta força não está condicionada diretamente apenas por características do sistema reprodutivo da espécie, mas sim por variações aleatórias da contribuição de cada indivíduo da população no processo reprodutivo. FUTUYMA (1992) definiu a deriva genética como uma flutuação aleatória das freqüências alélicas, que têm como consequência a perda e/ou a fixação de alelos. A deriva pode promover a perda de alelos da população e, a longo prazo, pode gerar um aumento da endogamia, em função da maior probabilidade de autofecundação e cruzamento entre indivíduos aparentados (KAGEYAMA et al., 1998). O aumento da endogamia pode afetar a conservação da diversidade genética da população segundo SEBBEN et al. (2000). Já CROW e KIMURA, 1970; ALLARD, 1971; METTLER e GREGG, 1973; GEBUREK, 1986; FALCONER e MACKAY, 1997 relataram que na endogamia pode haver a exposição de genes deletérios a homozigose, fato que pode promover redução da produtividade, fertilidade, viabilidade das sementes, vigor e adaptação. Por outro lado, algumas vezes os indivíduos heterozigotos podem apresentar vantagens adaptativas (“fitness”) e tendem a ser selecionado no processo de recrutamento, reduzindo o coeficiente de endogamia (f) (SEBBEN et al., 2001).

A seleção de heterozigotos entre indivíduos adultos, segundo revisões de Sebbenn et al., (2001), é um fenômeno importante para a conservação da variabilidade genética em populações naturais, e foi detectada em populações de várias espécies arbóreas.

Entre populações de uma mesma espécie (subpopulações), as forças micro-evolutivas podem atuar em diferentes intensidades, afetando de formas distintas os coeficientes de endogamia de cada uma. Quando isso ocorre, diz-se que há uma estruturação genética entre as populações, a qual pode ser avaliada por meio das estatísticas-F de Wright (WRIGHT, 1951 e 1965), bem como por meio de outros métodos, tais como a análise da diversidade em populações subdivididas (NEI, 1973) e os coeficientes de coancestralidade de Cockerham (COCKERHAM, 1969).

Vários são os métodos utilizados para detectar a distribuição espacial da variação genética em populações. Em uma população claramente fragmentada ou em populações contínuas onde se observam unidades fisionômicas, a distribuição da variação genética pode ser estudada entre os grupos existentes (LINHART et al., 1981). A análise da autocorrelação espacial (SOKAL e ODEN,

1978) é uma metodologia que permite a avaliação de padrões da variação genética em diversas escalas espaciais, podendo inclusive, determinar as causas evolucionárias do padrão espacial detectado (SLATKIN e ARTER, 1991; EPPERSON, 1990).

Estudos sobre a autocorrelação espacial em espécies arbóreas indicam tanto a completa ausência de estruturação (EPPERSON e ALLARD, 1989; GANDARA, 1996) como uma estrutura genética significativa em pequena escala conforme detectado em *Acer saccharum* (PERRY e KNOLES, 1991) e em *Pinus banksiana* e *Pinus contorta* (WAGNER et al., 1991).

O aumento da utilização dos recursos florestais, em face da perda gradual da sustentabilidade e do potencial das florestas (GALLO, 2002), enfatiza a importância do estudo da variação genética em florestas naturais; uma vez que as árvores, geralmente, são consideradas as espécies chave dos ecossistemas florestais e muitas associações da fauna e flora dependem do ambiente criado em decorrência de sua instalação (RAJORA e MOSSELER, 2001). Ainda a conservação e o manejo da biodiversidade mesmo em áreas protegidas, constituem-se em um desafio complexo que requer o conhecimento básico sobre a distribuição e abundância no número de espécies, sua biologia reprodutiva e a estrutura genética de suas populações (ZUCCHI, 2002).

A intensa fragmentação de paisagens e a sua ocupação desordenada, tanto para exploração agrícola como para a expansão de áreas urbanas e industriais têm acarretado preocupações com o uso dos recursos naturais para a sociedade como um todo (BARBOSA e MANTOVANI, 2000). Em função dos sucessivos ciclos de uso do solo, grande parte das regiões tropicais apresenta sua cobertura florestal nativa altamente fragmentada e/ou restrita a pequenas porções de terra onde a expansão agropecuária ou urbana não foi possível. Neste processo de degradação, não foram poupadas nem mesmo as áreas ciliares ou de preservação permanente, sendo que a agricultura sempre foi o principal fator causador de degradação desses ecossistemas (RODRIGUES et al., 2004).

A fragmentação florestal é definida como a substituição de amplas áreas de floresta nativa por outros ecossistemas, deixando uma série de manchas remanescentes ou fragmentos de mata entremeadas por uma matriz de vegetação diferenciada e/ou de usos diversos. Alteram-se assim os fluxos de vento, radiação e água ao longo da paisagem bem como a migração de alelos. Todos os

remanescentes de vegetação estão expostos a essas mudanças, em maior ou menor grau, mas seus efeitos são modificados pelo tamanho, forma e posição na paisagem de cada fragmento em particular (SAUNDERS et al., 1991).

Grande proporção dos ecossistemas florestais existentes encontra-se fragmentados, reduzidos a remanescentes florestais isolados ou fragmentos (WILLIAMS-LINERA, 1990).

A fragmentação florestal contribui para o declínio da riqueza de espécies e para o crescente de risco de extinção de espécies vegetais que é preocupante (HARRIS, 1980). Estima-se que, em 50 anos, aproximadamente 25% das espécies vasculares estarão extintas (KALA, 2000). Muitos fatores estão envolvidos com a extinção de espécies, e entre eles o mais visível é a destruição de habitats e conseqüente fragmentação das populações (MATOCQ e VILLABLANCA, 2001).

Nos últimos tempos, identificar os efeitos da fragmentação dos habitats sobre a biodiversidade e propor linhas de ação para minorar seus impactos tem sido um dos grandes desafios enfrentado pela ciência. Em função da alta riqueza de espécies arbóreas da maioria das florestas tropicais, frequentemente com 100 a 400 diferentes espécies por hectare, é importante que se defina quais espécies devem ser consideradas, tomando suas populações como referências. Se de fato se preconiza a sustentabilidade desses fragmentos, e o aspecto demográfico dessas espécies, deve se acrescentar também a genética de suas populações, já que nem sempre um número grande de indivíduos identifica uma população normal, ou geneticamente viável (KAGEYAMA e GANDARA, 1998).

A partir da última década, vem-se intensificando os estudos genéticos em populações de espécies arbóreas tropicais, com o uso de tecnologias genéticas adequadas para quantificar essa diversidade (KAGEYAMA e GANDARA, 1998). Para os últimos autores esse acúmulo de dados vem apontando algumas direções importantes para se tomar como referência para as ações de minimização dos impactos ambientais nesses ecossistemas. Uma vez que estudos genético-ecológicos em espécies representativas, tanto em florestas não perturbadas como em matas secundárias, vêm mostrando o efeito das ações antrópicas em suas populações, auxiliando na definição dos parâmetros genéticos mais adequados para orientar e monitorar as ações de conservação (KAGEYAMA e GANDARA, 1998).

A perda de espécies não se dá simplesmente por um efeito de

redução de área ou perda de heterogeneidade ambiental, algumas espécies não persistem em fragmentos devido às alterações das condições microclimáticas em relação à floresta contínua, resultantes do efeito de borda (LOVEJOY et al., 1983).

Outras espécie são extintas nos fragmentos devido a eventos genéticos ou demográficos (SHAFER, 1981), perda de variabilidade genética (LANDE, 1988) e declínio da reprodução devido a perda de polinizadores (AIZEN e FEINSINGER, 1994). Tal efeito se explica pela interação entre dois ecossistemas adjacentes, fragmento florestal e matriz, que se dá através de uma transição abrupta, a região da borda do fragmento, denominada “efeito de borda” (MURCIA, 1995). Nas bordas ocorrem alterações bióticas e abióticas. A distância da penetração de tais alterações em direção ao interior da mata varia com a idade, orientação, fisionomia, matriz e histórico do fragmento, da borda e da matriz (MURCIA, 1995).

A alteração da composição original pode ocorrer porque muitas espécies se beneficiam das condições do ambiente fragmentado (TABARELLI et al., 1999). Espécies associadas às atividades antrópicas e espécies com características de ambientes perturbados, como lianas e espécies dos estádios sucessionais iniciais, têm suas capacidades de colonização e expansão aumentadas (LAURANCE et. al.,1997). As espécies dispersas pelo vento (anemocóricas) também podem ser beneficiadas em paisagens fragmentadas. Em ambientes mais abertos (matriz), suas chances de atingirem longas distâncias são maiores (HOWE e SMALLWOOD, 1982), enquanto que para as espécies zoocóricas, a matriz, muitas vezes, constitui um obstáculo intransponível. A penetração e/ou aumento excessivo da abundância dessas espécies altera gradualmente a composição original das florestas fragmentadas, e também influencia a abundância e persistência de espécies da composição original (TERBORGH, 1992).

A fragmentação florestal gera conseqüências importantes como isolamento reprodutivo de indivíduos que contêm apenas uma pequena amostra do conjunto gênico da população original (gargalo genético), e ao mesmo tempo, perda de alelos devido à deriva genética, caso a população remanescente permaneça isolada por várias gerações (SOUZA, 1997).

Corry e Nassauer (2002) acreditavam que a fragmentação do habitat era inerente ao modelo contemporâneo de ocupação das terras e que fora das unidades de conservação as manchas de habitat remanescentes continuavam

sendo diminuídas e eliminadas. Tal realidade reforça a necessidade de estudos de pequenos fragmentos visando estratégias para a manutenção da conectividade (TOLEDO, 2005). Este esforço é prática recente no manejo da biodiversidade e na ecologia da restauração (TOLEDO, 2005), que se completam com o estudo da genética de populações, uma vez que a variação genética é a base da biodiversidade (ZUCCHI, 2002).

A fragmentação florestal criou um mosaico ao longo da paisagem e assim a variabilidade entre áreas remanescentes tendeu a ser maior (TOLEDO, 2005).

A heterogeneidade de ambientes segundo Linhart et al., 1981 pode afetar a distribuição da variabilidade genética dentro de uma população ou mesmo entre populações de uma mesma espécie. Nestes casos, diz-se que a variabilidade genética é estruturada no espaço, podendo ocorrer uma diferenciação genética a distâncias relativamente pequenas (LINHART et al., 1981).

Estudos genético-ecológicos em espécies representativas, tanto em florestas não perturbadas como em matas secundárias, vêm mostrando o efeito das ações antrópicas em suas populações, auxiliando na definição dos parâmetros genéticos mais adequados para orientar e monitorar as ações nesses ecossistemas (KAGEYAMA et al., 1998).

A fragmentação dos ecossistemas florestais provoca a diminuição do número de indivíduos de uma população de espécies encontradas nas matas nativas e impacta os ambientes que elas se encontram, o que tem favorecido a perda de variação genética. Assim, a população remanescente passa a ter tamanho menor que o mínimo adequado (N_e mínimo) para que possa ter sua continuidade normal. Nessa população menor pode ocorrer, a curto prazo, deriva genética, o que significa ter as frequências de seus genes afastadas daquelas da população original, inclusive chegando a perder alelos. A mais longo prazo, ainda pode haver um aumento da endogamia decorrente da maior probabilidade de autofecundação e acasalamento entre aparentados (KAGEYAMA et al.; 1998). A endogamia leva à homoziguidade, como já foi colocado e geralmente causa perda de adaptabilidade.

Os mecanismos que controlam a relação entre heteroziguidade e adaptabilidade têm sido objeto de intensiva pesquisa e ainda são muito discutidos. Muitas espécies animais e vegetais exibem heterose, na qual a maioria dos indivíduos heterozigotos tem melhor desempenho que os homozigotos (WADT,

2001).

Existem duas hipóteses principais que explicam a heterose: a sobredominância, quando o heterozigoto por si só explica esse fenômeno; e a dominância, que sugere que a maioria dos homozigotos endogâmicos expressa simplesmente uma alta proporção de alelos recessivos deletérios (GRIFFIN, 1990), sendo por isso eliminados.

Os poucos exemplos existentes de quantificação da perda da diversidade genética pela fragmentação se referem a espécies arbóreas e herbáceas de clima temperado, com poucos casos estudados de espécies arbóreas tropicais. A redução da variação genética foi observada na espécie arbórea *Eucalyptus albens* (YOUNG et al., 1996). HALL et al. (1996), observaram menores níveis de diversidade genética em populações menores de *Pithecelobium elegans*.

Os parâmetros mais utilizados para quantificar a variação genética são as proporções de locos polimórficos dentro de espécies (P_e) e dentro de populações (P_p) e a diversidade geral de espécie (H_e) e de populações (H_p) (HAMRICK, 1994). A distribuição dessa variação dentro e entre populações pode ser estimada pelas estatísticas F de Wright ou G_{st} de Nei. No entanto, a escala na qual a estrutura genética é considerada torna-se importante, pois diferentes padrões podem ser obtidos dependendo da importância relativa dos fatores que afetam a estrutura genética em determinada escala espacial. Modelos de autocorrelação espacial também podem ser usados para avaliar a estrutura genética de populações (SLATKIN, 1985; EPPERSON, 1995).

Espécies arbóreas da floresta tropical apresentam alta proporção de locos polimórficos e elevados níveis de diversidade genética dentro de espécies, sendo que, de maneira geral, a maior parte da variação genética é mantida dentro de populações e não entre elas (HAMRICK, 1994). Na literatura, confirma-se esta afirmação pelo trabalho de Hamrick (1994) que avaliou dez espécies arbóreas tropicais, verificando que a variação genética entre populações foi muito baixa ($G_{st} < 0,05$). Entretanto Lepsch-Cunha (2001) mostraram que a diversidade genética entre populações (G_{st}) é crescente dependendo dos agentes polinizadores das espécies em questão: morcegos ($G_{st}=0,021$), abelhas grandes ($G_{st}=0,035$), abelhas médias ($G_{st}=0,041$), abelhas pequenas ($G_{st}=0,062$) e vento ($G_{st}=0,065$). Hamrick e Loveless (1986) também detectaram diversidades genéticas crescentes entre populações de espécies arbóreas com dispersão de sementes na seguinte ordem:

morcegos ($Gst=0,028$), pássaros ($Gst=0,040$) e autopropulsão ($Gst=0,065$). Quanto maior o potencial de vôo do polinizador ou do dispersor das sementes menor será a divergência genética entre as populações envolvidas (LEPSCH-CUNHA, 2001).

2.7 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores genéticos são características qualitativas com herança Mendeliana, facilmente reconhecidas e cuja expressão não sofre influência ambiental (ROBINSON, 1998). Eles podem ser morfológicos, bioquímicos (isoenzimas) ou moleculares (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Estes mesmos autores definem marcadores moleculares como todo fenótipo molecular originário de um gene expresso como isoenzimas ou de um segmento específico de DNA.

Marcadores morfológicos são identificados em sua maioria, com a presença da planta inteira ou adulta e contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Caracteres morfológicos e agrônômicos, usados para mensurar diversidade genética em determinada população de indivíduos, possuem uma considerável dificuldade na identificação de grupos taxonômicos discretos. Esta limitação deve ao fato de que a grande maioria dos caracteres vegetais são influenciados por fatores ambientais, exibindo variação contínua e alto grau de plasticidade fenotípica (PAKER et al., 1998).

O desenvolvimento dos marcadores genéticos de natureza bioquímica e molecular, a partir da década de 60, e principalmente no decorrer dos anos 80 e 90, revolucionaram a pesquisa na área de genética de populações, ampliando a disponibilidade de marcadores genéticos para estudos populacionais, que até então era aplicável a poucas espécies, segundo COELHO (2002). Esses marcadores facilitaram a investigação da variabilidade genética e o desenvolvimento de estratégias para a conservação e restauração dos recursos genéticos florestais (RAJORA et.al., 1998, RAJORA, 1999 e 2000; GALLO, 2002).

Os marcadores proporcionam estimativas acuradas da diversidade genética em populações naturais visando monitoramento e a conservação da

variabilidade genética, a identificação de genótipos, a avaliação de germoplasma e o mapeamento genético (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). O sucesso de qualquer programa pré-melhoramento ou de conservação é dependente do conhecimento da quantidade de variação presente na espécie de interesse (ZUCCHI, 2002).

Uma ampla variedade de técnicas são empregadas para o estudo de variação genética em populações de plantas medicinais nativas. Estas incluem os marcadores isoenzimáticos (BERG e HAMRICK, 1994; CHUNG e EPPERSON, 2000; WADT et al., 2004), polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLPs) (WANG et al., 1994) e os métodos baseados na reação de polimerase em cadeia (PCR) (BARTHELSON et al., 2006).

Marcadores bioquímicos revelam variabilidade de proteínas (enzimas) que são os produtos gênicos. Estes marcadores são amplamente utilizados em estudos clássicos de genética de populações florestais, pois apresentam algumas características, como: a expressão co-dominante, que permite diferenciar os genótipos homocigotos de heterocigotos; a possibilidade de analisar várias enzimas e amostras simultaneamente; procedimentos simples, rápidos e relativamente de baixo custo e adaptação para diversas espécies (SHAPCOTT, 1995; SEBBENN et al., 1998; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; GIUDICE et al., 2000). Até a década de 80, estudos sobre a estrutura genética de populações eram conduzidos utilizando-se marcadores isoenzimáticos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Mesmo com a disponibilidade de técnicas mais modernas estudos com populações naturais utilizando os marcadores isoenzimáticos ainda são bastante frequentes, (ZUCCHI, 2002).

Os estudos com isoenzimas sobre a estrutura genética de espécies arbóreas tropicais têm mostrado que as mesmas apresentam níveis elevados de variabilidade genética e diferenciação inter-populacional (LOVELESS, 1992; LIENGSIRI et al., 1998; MORAES et al., 2002). Esta técnica apresenta baixo nível de polimorfismo detectável que é atribuído ao limite natural da variação isoenzimática, não permitindo que este procedimento de baixo nível de resolução seja adequado à investigação que requeira a cobertura mais ampla do genoma como no caso do mapeamento genético ou caracterização detalhada de germoplasma (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os avanços da biologia molecular abriram novas perspectivas para a

pesquisa em conservação de espécies e para estudo de biologia populacional como um todo. O emprego de marcadores moleculares, no estudo de populações naturais, tem possibilitado obter grandes avanços na quantificação dos eventos determinantes da estrutura genética, pois permitem a avaliação da diferenciação nas frequências dos alelos (MEDRI, 2002). Pela primeira vez, a variação genética encontrada em plantas e animais pode ser analisada ao nível de DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; HAIG, 1998).

Uma série de marcadores que detectam polimorfismo foram desenvolvidos nas últimas décadas. Os marcadores RFLPs baseiam-se no polimorfismo de tamanho de fragmento, por meio do uso de enzimas de restrição. O polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA, é evidenciado pela fragmentação do DNA através do uso de enzima de restrição e observado por hibridação destes fragmentos com sequências homólogas de DNA marcadas com radiatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). É uma técnica limitada pelo seu alto custo, por exigir elevada concentração de DNA com alto grau de pureza, sendo de difícil emprego e manipulação, uma vez que envolve a construção de sondas freqüentemente radioativas para a detecção de fragmentos gerados (GALLO, 2005). Esses marcadores apresentam uma forte limitação no nível de polimorfismo detectado o qual dependerá do número de sondas disponíveis para a espécie em estudo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O surgimento da técnica da reação polimerase em cadeia (PCR - Reação Polimerase em cadeia) permitiu a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA inovando as técnicas de biologia molecular e ao mesmo tempo otimizando e facilitando o trabalho em laboratório. A PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima taq polimerase, baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeo (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como indicadores ("primers") que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A PCR é uma técnica versátil, pois vários tipos de primers podem ser usados, dependendo do objetivo do estudo. Um ciclo de PCR envolve desnaturação da fita dupla de DNA, o anelamento do primer com sequências complementares da região alvo e a extensão da cadeia de DNA a partir de cada

terminal 3' do primer através da adição de nucleotídeos, realizado pela DNA polimerase. O ciclo é repetido várias vezes e após 20 ciclos são produzidas mais de um milhão de cópias, permitindo a visualização em gel de eletroforese através de corantes específicos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Um dos aspectos fundamentais da PCR foi a possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma, o que facilitou a detecção diretamente em gel de eletroforese através de corante específico (GALLO, 2002).

A facilidade, a rapidez e a sensibilidade da técnica de PCR possibilitaram o surgimento de uma nova geração de marcadores moleculares. Os diferentes tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism) (BROWN e KRESOVICH, 1996; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998; COSTA et al., 2000; ROLDAN-RUIZ et al., 2001) e microssatélites (SSR - Simple Sequence Repeats), diferenciam-se em função da metodologia empregada para revelar a variabilidade (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998).

Em 1990, dois grupos de pesquisadores desenvolveram uma técnica para detecção de polimorfismo que não requer informações prévias sobre a seqüência de DNA para o desenho dos primers específicos. Williams et al. (1990) patentearam a tecnologia como RAPD, nome mais comumente utilizado, e Welsh e McClelland (1990) a denominaram de APPCR (Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction).

A tecnologia RAPD baseia-se na amplificação de segmentos de DNA ao acaso, utilizando primers mais curtos, com dez pares de bases de extensão, cuja seqüência nucleotídica é arbitrária. A seqüência amplificada pode ser visualizada na forma de uma banda no gel de agarose. Cada primer arbitrário dirige a síntese de vários segmentos de DNA, simultaneamente, em diversos pontos do genoma (WAUGH, 1997; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). O polimorfismo é reconhecido pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência, deste mesmo fragmento, em outro genótipo (CRUZ, 1998).

Os marcadores RAPD são muito utilizados para análise da diversidade genética molecular em populações naturais de plantas (CAVALLARI, 2004), e embora de caráter dominante, têm sido utilizados para estimar parâmetros genéticos que definem a estrutura de populações (AYRES e RYAN, 1999; KELLER,

2000) e a taxa de cruzamento (GJURIC e SMITH JUNIOR, 1996; GAIOTTO et al., 1997).

Quando comparada a outras técnicas moleculares, a técnica RAPD apresenta como vantagens a simplicidade de execução e custos inferiores, a rápida obtenção de marcadores, a necessidade de pequenas quantidades de DNA e a possibilidade de gerar um número ilimitado de marcadores com alto nível de polimorfismo. As limitações dos marcadores RAPD consistem no baixo conteúdo de informação genética por loco, pois são marcadores genéticos dominantes, não sendo possível distinguir o genótipo heterozigoto do homozigoto dominante, e na alta sensibilidade da técnica, ocasionando baixa reprodutibilidade dos resultados (HALLDÉN et al., 1996; ZHIVOTOVSKY, 1999).

Apesar desses problemas, a técnica RAPD é, até o momento, a mais amplamente utilizada nos estudos de diversidade genética, auxiliando nos programas de melhoramento e conservação dos recursos genéticos (ZUCCHI, 2002).

Os marcadores RAPD, devido a sua simplicidade e rapidez, têm sido amplamente utilizados nas seguintes situações: identificação de origem parental, identificação e proteção de variedades e/ou clones patenteados, certificação de pureza genética de linhagens e híbridos, caracterização do germoplasma, construção de mapas genéticos, seleção assistida de caracteres de interesse agrônômico, estimativas de distâncias genéticas e em genética de populações (TIMMERMAN e MCCALLUM, 1993, FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998; SILVEIRA et al., 2003; HUFF, 1997; BOLARIC et al., 2005; ZIMBACK et al., 2004; WADT e KAGEYAMA, 2004).

Os marcadores AFLP têm como vantagens o grande número de marcadores analisados em um único gel, com alto poder de detecção de variabilidade genética; não requerem informação prévia de seqüência de DNA; há a possibilidade de diferentes combinações entre primers e enzimas de restrição; e possuem grande confiabilidade dos resultados. Entretanto, a principal limitação dos marcadores AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por loco, pois, são de natureza dominante. Além disso, a análise AFLP envolve um maior número de etapas, necessitando de maior quantidade de reagentes e equipamentos, aumentando o custo das análises (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; HOEZEL; GREEN, 1998; ZHIVOTOVSKY, 1999; COSTA et al., 2000).

Os marcadores microssatélites consistem de pequenas seqüências repetidas e adjacentes, distribuídas no genoma (SCHLÖTTERER, 1998; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; Salles et al., 2003). Estes marcadores possuem vantagens, como a expressão co-dominante e o multialelismo, que conferem a esses marcadores o mais alto polimorfismo, quando comparados aos demais marcadores moleculares, são abundantes e uniformemente dispersos no genoma, podendo ser eficientemente analisados empregando-se a reação de PCR, além de possibilitar a utilização de dois ou mais primers na mesma reação de PCR. Para o uso rotineiro dos microssatélites é necessário, primeiramente, amplificar uma região, posteriormente seqüenciá-la e, finalmente, sintetizar os iniciadores específicos para cada loco. A partir de então, o loco marcador pode ser utilizado indefinidamente naquela espécie. Sendo assim, há um custo elevado e trabalho intenso no início, mas subseqüentemente torna-se baixo e simples (BROWN e KRESOVICH, 1996; BRONDANI et al., 1998; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; SCHLÖTTERER, 1998; SALLES et al., 2003).

Segundo Excoffier et al. (1992) a introdução das estatísticas (ϕ), proporciona uma nova alternativa para o uso de marcadores dominantes. Uma análise de variância, denominada de AMOVA, que produz estimativas dos componentes de variância análogas às estatísticas F de Wright, sem a necessidade de conhecimento das freqüências alélicas. O método acomoda diversos tipos de matrizes de entrada fornecidas por diferentes marcadores moleculares, e diferentes pressuposições evolutivas, sem modificar a estrutura básica da análise. A significância dos componentes de variância e das estatísticas (ϕ), são testadas através do uso de permutações. A AMOVA é facilmente aplicável em diferentes situações e constitui uma estrutura coerente e flexível para a análise de dados moleculares (ZUCCHI, 2002).

Até o momento, poucos são os estudos de diversidade genética em *M. aquifolium*, Perecin (2001) avaliou índices de diversidade em cinco populações naturais de *M. aquifolia* e em uma população natural de *M. ilicifolia*. De acordo com os dados obtidos pela autora, *M. ilicifolia* compartilha com *M. aquifolia* grande parte dos alelos, sugerindo que estas espécies podem ser filogeneticamente muito próximas. Nas populações de *M. ilicifolia* avaliadas e estudadas por Perecin (2001), identificou grande diferença entre as heterozigosidades esperada e observada ($f=0,562$), e elevado número médio de alelos/loco ($A=2,1$), bem como elevada

diversidade genética ($HE=0,255$).

Em ambas as espécies de Espinheira-Santa, Perecin (2000), encontrou alta percentagem de locos polimórficos sendo $P=70,0\%$ para *M. ilicifolia* e entre 40 % e 70% para *M. aquifolia*.

Perecin (2000) analisando geneticamente os 246 indivíduos de *M. aquifolium* e os 31 indivíduos de *M. ilicifolia* encontrou respectivamente para cada espécie 32 alelos e 22 alelos.

Analisando a divergência genética entre populações de *M. aquifolium* com marcadores isoenzimáticos e RAPD, Kageyama et al. (2003) encontraram a maior parte da diversidade genética dentro das populações com valor acima de 85%. A alta divergência genética encontrada por esses autores 14,7%, estava associada a amplitude da amostra realizada, que compreendeu cinco populações com indivíduos adultos variando de 27 a 55 plantas.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, J.E.; KRUTOVSKI, K. V.; STRAUSS, S.H. RAPD and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas- fir. **Heredity**, Oxford, v.81, p.69-78,1998.
- ABADIE, T.; CORDEIRO, C. M.T.; FONSECA, J. R.; ALVES, R. B. N.; BURLE, M. L.; BRONDANI, C.; RANGEL, P. H. N.; CASTRO, E. M.; SILVA, H. T.; FREIRE, M S.; ZIMMERMANN, F. J. P.; MAGALHÃES, J. R. Constructing a rice core collection for Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 2, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100_204_X_2005_000_200_005_&lng=en&nrm=iso>.Acessado em: 14 Nov 2006.
- AVISE, J. C. Mitochondrial DNA Polymorphism and a Connection Between Genetics and Demography of Relevance to Conservation. **Conservation Biology**, v.9, n. 3, p. 686-690 Jun., 1995.
- AIZEN, M. A. and FEINSINGER, P., Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a chaco dry forest, Argentina. **Ecology**, v.75: 330-351. 1994.
- ALLARD, R. W. Principios do melhoramento genético de plantas. Rio de Janeiro: USADI. p. 331. 1971.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: Editora UFV, 1998.
- AQUADRO, C. F.; NOON, W. A.; BEGUN, D. J.; DANFORTH, B. N. RFLP analysis using heterologous probes. In: HOELZEL, A. R. (Ed.) **Molecular genetic analysis of populations: a practical approach**. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 1998. p. 151-200.
- AYRES, D.R and RYAN, F.J. Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi* (Asteraceae) using RAPD and allozyme techniques. **American Journal of Botany**, v. 86, p.344-353, 1999.
- BARBIER P, Genetic variation and ecotypic differentiation in the wild rice species *Oryza rufipogon*. I.Population differentiation in life-history traits and isozymic loci. **Japan Journal Genetic**, v. 64, p. 259–271, 1989.

BARBIERI, R.L. Conservação e uso de recursos genéticos vegetais. In: FREITAS, L.B. de; BERED, F. **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. p. 403-413.

BARBOSA, L. M and MANTOVANI, W. Degradação Ambiental: Conceituação e bases para repovoamento vegetal. In: **RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADAS DA SERRA DO MAR E FORMAÇÕES FLORESTAIS LITORANEAS**, São Paulo, 2000. p.33-40.

BARRETT, S.C.H., Kohn, J.R., Genetics and evolutionary consequences of small population size in plants: Implications for conservation. In Falk, D.A., Holsinger, K.E. (Eds.), **Genetics and Conservation of Rare Plants**. Oxford University Press, New York, USA, 1991., p. 3–30.

BARTHELSON, R A.; SUNDARESHAN, P.; GALBRAITH, D. W. and. WOOSLEY, R. L. Development of a comprehensive detection method for medicinal and toxic plant species . **American Journal of Botany**. 2006; n.93. 566-574.

BAWA, K.S. Breeding system of tree species of a lowland tropical community **Evolution**, v. 28, p. 85-92, 1974.

BAWA, K.S.; PERRY, D.R.; BEACH, J.H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanismic. **American Journal of Botany**, v. 72, p. 331-45, 1985.

BATTISTELLI, D.A.; PACHECO, C.V.; SILVA, D. W. da; STEENBOCK, W.; **Plantas da nossa gente – a sabedoria popular no uso de plantas medicinais**. Guarapuava, Fundação Rureco, 2001.

BEKESSY, S.A.; ENNOS, R.A.; BURGMAN, M.A.; NEWTON, A.C.; ADES, P.K. Neutral DNA markers fail to detect genetic divergence in an ecologically important trait. **Biological Conservation**, v.110, p.267-275, 2003.

BERG, E.E.; HAMRICK, J.L. Spatial and genetic structure of two sandhills oaks: *Quercus laevis* and *Quercus margaretta* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v.81, p.7-14, 1994.

BHATNAGAR, S.S., DIVEKAR, P.V., DUTTA, N.L.. , 1979. Chemical Abstracts 45, 5885d. In: CORSINO, J.; DE CARVALHO, P.R.F. ; KATO, MASSUO, J.;

RIBEIRO LATORRE L.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; ARAUJO, A.; BOLZANI, V; FRANCA, S. C.; PEREIRA, A.; Maria S.; FURLAN M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 741-748, 2000.

BITTENCOURT, J. V. M. **Variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD**. 2000. Dissertação Mestrado em agronomia/UFPR. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 58p.

BOLARIC, S.; BARTH, S.; MELCHINGER A. E. and POSSELT, U. K. Molecular characterization of genetic diversity in European germplasm of perennial ryegrass. **Euphytica**. v. 146, n.1-2 / November, 2005.

BOLARIC, S.; BARTH, S.; MELCHINGER; A.E.; POSSELT, U.K. Genetic diversity in European perennial ryegrass cultivars investigated with RAPD markers. **Plant Breeding** (in press). 2005.

BOUZAT, J.L. The population genetic structure of the greater Rhea (*Rhea americana*) in an agricultural landscape **Biological Conservation**. Essex, v.99 n.3, p.277-284, 2001.

BROWN, S. M.; KRESOVICH, S. Molecular characterization for plant genetic resources conservation. In: PATERSON, A. H. (Ed.). **Genome Mapping in Plants**. Austin, USA: Academic Press, California and R. G. Landes Company, 1996. p. 85-93.

BUCHERT, G. P. Genetics of white pine and implications for management and conservation. **The Forest Chronicle**, v.70, p. 427-434, 1994.

CARVALHO-OKANO, R.M. Novos sinônimos para espécies de *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae). **Bradea**, v.14, n.8, p. 73-76, 1998.

CARTHEW, S. M. Population genetic structure of *Banksia spinulosa*. **Heredity, Oxford**, v. 70, n. 6, p. 566-573, 1993.

CARVALHO-OKANO, R.M; LEITÃO FILHO, H.F. O gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) no Brasil extra-amazônico 2005. In: REIS, M.S.; SILVA S.R. **Conservação e uso sustentável de Espinheira Santa**, v.1, p. 11-51.

CAVALLARI, M. M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium (Bromeliaceae)* e implicações para sua conservação.** 2004. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ). Dissertação de Mestrado em Agronomia, Ago, 92p. Disponível em : <http://www.teses.usp.br/>. Acesso em: 24 nov 2006.

CECCHETTI; LEMOS, ELIANA GERTRUDES MACEDO; RUGGIERO, CARLOS. Avaliação de plantas matrizes de abacaxizeiro cultivar smooth cayenne utilizando marcadores RAPD e padrões isoenzimáticos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010029452001000300002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 24 Nov 2006.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química. Nova.** [online]. 1998, vol. 21, no. 1 [citado 2007-01-03], pp. 99-105. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040421998000100015&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0100-4042.

CGIAR. **CONSULTIVE GROUP ON INTERNATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH.** Sustainable agricultural production: final report of CGIAR Committee. 1993.

CIAMPI, A.Y. Desenvolvimento e utilização de marcadores microsátélites, AFLP e seqüenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado. Botucatu, 1999. 204p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CHUNG, M.G.; EPPERSON, B.K. Spatial structure of allozyme polymorphisms in a population of *Eurya japonica* (Theaceae). **Silvae Genetica**, v.49, p.1-4, 2000.

CLEGG, M. T. Measuring plant mating systems. **Bioscience**, v. 30, n. 12, p. 814-818, 1980.

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

COELHO, A.S.G. **Bood: Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap.** Goiânia,GO. Lab. de Genética Vegetal, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Goiás. 2000.

COELHO, A.S.G. **Abordagem Bayesiana na análise genética de populações utilizando dados de marcadores moleculares**, julho, 2002, Tese de Doutorado em Agronomia. ESALQ/USP, Piracicaba. 76 p. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/>. Acesso em: 24 nov 2006.

COMSEMA Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul - Site Desenvolvido pela PROCERGS **Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção do Rio Grande do Sul ANGIOSPERMAE**. 2002. Disponível em: <http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/pdf/especies-ameacadas.pdf> . Acessado :17 nov 2006.

CORDEIRO, P. J. M.; VILEGAS, J. H.Y.; LANCAS, F. M.. HRGC-MS analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("espinheira santa"). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 10, n. 6, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010350531999000600017 e lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 17 Nov 2006.

CORSINO, J.; ALÉCIO, A. C.; RIBEIRO, M. L.; FURLAN, M.; PEREIRA, A. M. S.; DUARTE, I. B.; FRANÇA, S. C. Quantitative determination of maytenin and 22b - hydroxymaytenin in callus of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.9, p.245-247, 1998.

CORSINO, J.; DE CARVALHO, P.R.F.; KATO, M.J.; LATORRE, L.R.; OLIVEIRA, O.M.M.F.; ARAÚJO, A.R.; BOLZANI, V. DA S.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, M.A.S.; FURLAN, M.; Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*, **Phytochemistry**, v. 55, p.741-748, 2000. Disponível em: <http://www2.iq.usp.br/docente/majokato/biosynthesis2000.pdf>. Acesso em :24 nov 2006.

CORRY, R.C; NASSAUER, J.I. Managing for small-patterns in human dominated landscapes:cultural factors and corn belt agriculture. In: TOLEDO, M.R. **Modelagem espacial do fluxo de sementes de Jatobá (*Hymenaea courbaril*), através de marcadores moleculares, na paisagem fragmentada do pontal do Paranapanema**, SP. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", SP. 2005. 73p.

COSTA, P.; POT, D.; DUBOS, C.; FRIGERIO, J. M.; PIONNEAU, C.; BODENES, C.; BERTOCCHI, E.; CERVERA, M.-T.; RMINGTON, D. L.; PLOMION, C. A genetic map of Maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 39-48, 2000.

CRAWFORD D. J. T. F. STUESSY M. SILVA O. Allozyme variation in *Chenopodium sanctae-clarae*, an endemic species of the Juan Fernandez Islands, **Biochemical Systematics and Ecology**, v.16, p. 279-284, 1988.

CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. 2nd ed. New York, The New York Botanical Garden. 1988.

CROW, J.F. ;KIMURA, M. **An introduction to population genetics theory**. Harper; Row, New York. 1970.

CRUZ, C. D. **Genes versão 98.2.0**: Programa para análise e processamento de dados baseado em modelos de genética e estatística experimental. Viçosa, MG: UFV, 1998.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. Viçosa: UFV, v.2, 585 p. 2003.

DAUBENMIRE, R. **Plant communities: A textbook of plant synecology**. New York: , 1968.

DAWSON, I. K. ; SIMONS, A. J.; WAUGH,R.; POWELL, W. Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays. **Heredity**, Oxford, v. 74, p. 10-18, 1995.

DIAS, M. C., VIEIRA, A. O. S. e PAIVA, M. R. C. Florística e fitossociologia das espécies arbóreas das florestas da bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, E. M. BIANCHINI, E. SHIBATTA, O. A. ; PIMENTA, J. A **Bacia do Rio Tibagi**. Edição dos autores, Londrina, 2002, p. 109-124.

DIAS, M.C. **Plantas medicinais utilizadas no Distrito de Juquiratiba Município de Conchas - SP**. Dissertação de Mestrado em Agronomia - área de concentração Horticultura. Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Campus de Botucatu, 82p. 1999.

DIAS M. C. ; VIEIRA A.O. S. ; NAKAJIMA J. N. ; PIMENTA J. A. ; LOBO P. C. Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares do rio Iapó, na bacia do rio Tibagi, Tibagi, PR. **Revista Brasileira Botânica**. [periódico en la Internet]. 1998 Ago [citado 2006 nov 18]; 21(2): 183-195. Disponível en: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010084041998000200011&lng=es&nrm=iso.>

DOYLE J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p.13-15, 1988.

EGUIARTE, L.E., PEREZ-NASSER, L.; PIÑERO, D. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. **Heredity**, v. 69, p.217-228, 1992.

EMBRAPA/IBAMA. **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas**. Resultados da 1ª reunião técnica. EMBRAPA/IBAMA, Brasília, 2002.

EPPERSON, B.K.; ALLARD, R.W. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. **Genetics**, Bethesda, v. 121, p. 369 -377, 1989.

EPPERSON, B.K. Spatial autocorrelation of genotypes under directional selection. **Genetics**, Bethesda , v.124, p.757-771, 1990.

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

EPPERSON, B. K. Spatial distribution of genotypes under isolation by distance. **Genetics**, Bethesda, v. 140, p. 1431-1440, 1995.

EPPERSON, B. K. Spatial distribution of two-locus genotypes under isolation by distance. **Genetics**, Bethesda, v. 140, p. 365-375, 1995.

EPPERSON, B. K. Gene dispersal and spatial genetic structure. **Evolution**, Lawrence, v. 51, n. 3, p. 672-681, 1997.

FALK, D. A .; HOLSINGER K. E, **Genetics and conservation of rare plants**, Oxford University, Press. 1991

FAIRBANKS, D.J. et al. Efficient characterization of biological diversity using field DNA extraction and random amplified polymorphic DNA markers. **Revista Brasileira de Genética**, Campinas, v.16, n.1, p.11-22, 1993. In: GOTTARDI, MARIA VITÓRIA

FALCONER, D.S; MACKAY, T.F. **Introduction to quantitative genetics**. London: Longman, 1996. 464p.

FERREIRA DE SANTANA, C., CORTIAS, C.T., PINTO, K. DE V., SATIRO, M.W., SATIRO, A.L., LACERDA, A.L., MOREIRA, I.C. Primeiras observações sobre o emprego da maitenina em pacientes cancerosos. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.11, p.37-49,1971.

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

FINKELDEY, R. **An Introduction to Tropical Forest Genetics**. Lecture Notes. Georg-August University Göttingen, Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, 1998. 241 p.

FISHER, M., MATTHIES, D. RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). **American Journal of Botany**, v. 85, p. 811–819, 1998.

FRANÇA, S.C., DUARTE, I.B., PEREIRA, A.M.S., CARVALHO, D. AND QUEIROZ, M.E.C. 1999. TRITERPENES AND PHENOLICS IN CALLUS OF *Maytenus aquifolium* MART. **Acta Horticulturae**.

FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética,1992. 631p.

GAIOTTO, F.A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.842-849, 1997.

GIACOMETTI, D.C.; GOES, M. DE. Conservação de germoplasma de espécies frutíferas pelo uso da biotecnologia. **REVISTA BRASILEIRA DE FRUTICULTURA**, Cruz das Almas, BA, v.8, n.3, p.39-46, 1986.

GALLO, M.C.C. **Tolerância ao alagamento e caracterização da variação de genética em populações de *Luherea divaricata* Mart (Tilliaceae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina. Pr. 2002. 164p.

GANDARA, F.B. **Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae).** Campinas, 1996. 83p. (Dissertação de Mestrado - IB/UNICAMP)

GEBUREK, T. Some results of inbreeding depression in serbian spruce (*Picea omorica* (Panc) Purk). **Silvae Genética**, v.35, n.4, p.169-172, 1986.

GIUDICE NETO, J. D and KAGEYAMA, P. Y. Spatial genetic structure within natural populations of *Machaerium villosum* Vog. (Leguminosae) at Moji-Guaçu region, SP, Brazil. **Revista Brasileira. Botânica**, v.23, n.2, p.207-215, June, 2000.

GJURIC, R.; SMITH JUNIOR, S.R. Identification of cross-pollinated and self-pollinated progeny in alfalfa through RAPD nulliplex loci analysis. **Crop Science**, v.36, p.389-393, 1996.

GONÇALVES DE LIMA, O., D'ALBUQUERQUE, I.L., DE BARROS COELHO, J.S., MARTINS, D.G., LACERDA, A.L., MACIEL, G.M., Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XXXI. Maitenina, novo antimicrobiano com ação antineoplástica, isolado de Celastraceae de Pernambuco. **Revista do Instituto de Antibióticos**. v.9, p.17-21. 1969.

GONÇALVES DE LIMA, O., D'ALBUQUERQUE, I.L., DE BARROS COELHO, J.S., MARTINS, D.G., LACERDA, A.L., MACIEL, G.M., Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação o XXXVI. Sobre a presença de maitenina e pristimerina na parte cortical das raízes de *Maytenus ilicifolia*, procedente do Brasil Meridional. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.11, p. 35-38. 1971.

GRIFFIN, A.R. Effects of inbreeding on growth of forest trees and implications for management of seed supplies for plantation programmes. In: BAWA, K.S. and HADLEY, M. (Eds.) **Reproductive ecology of tropical forest plants**. Paris: UNESCO, p.355-374, 1990.

HALLDÉN, C. ; HANSEN, M.; NILSSON, N.-O; HJERDIN, A and SÄLL, T. Competition as a source of errors in RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 93, n.8, dec, 1996.

HAIG, S.M. Molecular Contributions to Conservation. **Ecology**, v.79, No. 2, Mar., p. 413-425, 1998.

HALL, P.; WALKER, S.; BAWA, K.S. Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in tropical tree *Pithecellobium elegans*. **Conservation Biology**, v.10, n. 3, p. 757-768, 1996.

HAMANN, O. 1991. The Joint IUCN-WWF Plants conservation programme and its interest in medicinal plants. Pp. 13-22. In: O. Akerek; V. Heywood and H. Synge (eds.). **The Conservation of Medicinal Plants**. Cambridge University Press, Cambridge.

HAMRICK, J.L. Distribution of genetic within and among natural forest population. In: CHAMBERS, S.M.; MACBIDE, B.; THOMAS, W.L. (Eds.) **Shonewald-Cox**. 1982.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. H.; MacBYDE, B.; THOMAS, L. (Ed.). **Genetics and Conservation**. Menlo Park: Benjamin Cummings, 1983. p. 335-348.

HAMRICK, J. L.; NASON, J. D. Consequences of dispersal in plants. In: RHODES, O. E.; CHESSER, R. K.; SMITH, M. H. (Ed.). **Population dynamics in ecological space and time**. Chicago: University of Chicago Press, 1996. p. 203-206.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. Allozyme diversity in plants. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L., WEIR, B. S. (Ed.). **Population genetics, breeding and germplasm resources in crop improvement**. Sunderland: Sinauer Press, v. 1 p. 43-63. 1989.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; SHERMAN-BROYLES. Factors influencing levels of genetic in woody plant species. **New Forest**, v. 6, p. 95-124, 1992.

HAMRICK, J. L.; LINHART, Y. B.; MITTON, J. B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 10, p. 173-200, 1979.

HAMRICK, J.L. Distribution of genetic diversity in tropical tree populations: implications for the conservation of genetic resources. In: LAMBETH, C.C. and DVORAK, W. (Eds.) **Resolving tropical forest resource concerns through tree improvement, gene conservation and domestication of new species**. N.C. State Univ. Press, p.74-82, 1994a.

HAMRICK, J.L. Genetic diversity and conservation in tropical forest. In: DRYSDALE, M.; JOHN, S; YAPA, A.C. (eds) Proc. Int. Symposy. Genetic Conservation Production

of Tropical Forest Tree Seed. **Forest Tree Seed Center**, Asean-Canada. p.1-9, 1994b.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Genetic diversity and population size in four rare southern appalachian plant species. **Conservation Biology**, v. 10, n. 3, p. 796-805, 1996.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D. CLEGG, M.T. KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. eds. **Plant population genetics, breeding and germplasm resources**. 1989. Sinauer Associates, Sunderland, p.43-63.

HAMRICK, D.L. Response of tree to global environmental changes. **Forest ecology and management** , v.194, p.323-335, 2004.

HANDRO, O. Plantas novas da flora do Brasil II. Celastraceae. **Loefgrenia**, v.27 n. 1, 1968.

HARTL, D. L. **Genetics**. 3. ed. London: Jones and Bartlett Publishers, 1994. 584 p.

HARLT, D. L ; CLARCK, A.G. **Principles of population genetics**. 2 ed. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. 1989.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. 1997.

HARRIS, A.R. **Population studies of Xiphinema pachtaicum and X. americanum in a vineyard in north-eastern Victoria**. Victoria : Mildura Horticultural Research Station, Department of Agriculture, 1980. 8p.

HOLSINGER, K.E.; GOTTLIEB, L.D. Conservation of rare and endangered plant: principles and prospects. In: Cavallari, M. M. **Estrutura genética de populações de Encholirium (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), ago, 2004 . 92p.

HOWE, H F.; SMALLWOOD, J. Ecology of Seed Dispersal. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.13, p.201-228 nov, 1982,

HUFF, D.R., RAPD characterization of heterogenous perennial ryegrass cultivars. **Crop Science**, v. 17, p.557–564, 1997.

INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES (Roma, Italia). **People and plants: the development agenda-The CGIAR programme on plant genetic resources**. Rome, 1993. 13p.

JAGGI, C.; WIRTH, T.; BAUR, B. Genetic variability in subpopulations of the asp viper (*Vipera aspis*) in the Swiss Jura Mounthains: implocations for a conservation strategy. **Biological Conservation**, v. 94, p. 69-77, 2000.

JONES, B.; GLIDDON, C.; GOOD, J.E. G. The conservation of variation in the geographically peripheral population: *Lloydia serotina* (Liliaceae) in Britain. **Biological Conservation**, v. 101, p. 147-156, 2001.

KALLA, C.P. Status and conservation of rare and endangered medicinal plants in the Indian trans-Himalaya **Biological Conservation**, v.93, n. 3, p. 371-379, 2000.

KAGEYAMA, P.Y. Conservação "in situ" de recursos genéticos de plantas. Serie Técnica IPEF, v. 35, p.7-37. 1987.

KAGEYAMA, P.Y.; DIAS, I.S. Aplicação da genética em espécies florestais nativas. **Silvicultura**, São Paulo, v.16, n.2, p.782-791, 1982.

KAGEYAMA, P. ; LEPSCH-CUNHA, N. M. Singularidade da biodiversidade nos trópicos. In: GARAY, I.; DIAS, B. orgs. **Conservação da biodiversidade nos trópicos**. Petrópolis, Vozes. p.199-214, 2001.

KAGEYAMA, P.Y., SEBBENN, A.M., RIBAS, L.A., GANDARA, F.B. CASTELLEN, M., PERECIM, M.B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, v.64, p. 93-107, 2003.

KAGEYAMA, P.Y., CUNHA, G.C., BARRETO, K.D., GANDARA, F.B., CAMARGO, F.R.A.; SEBBENN, A.M. Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Scientia Forestalis**, v.64, p.108-119, 2003.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**. v. 12, n. 32, p. 65-70, dez. 1998. <http://www.ipef.br/publicacoes/stecnica/nr32/cap05.pdf>. Acesso 18/10/2005.

KELLER, B.E.M. Genetic variation among and within populations of *Phragmetis australis* in the Charles River watershed. **Aquatic Botany**, v.66, p.195-208, 2000.

LACERDA, C. M. B. **Diversidade genética por isoenzimas em populações naturais de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* M. Allemão) Anacardiaceae no semi-árido**. Dissertação Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1997. 96 .

LACERDA, C.M.B.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética espacial de duas populações nativas de *Myracrodruon urundeuva* M. Alemão na região semi-árida, Brasil. **Revista Árvore**, v.27, n.2, p.145-150, 2003. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010067622003000200004&lng=en&nrm=iso.

LAURANCE, W. F., 1997, Hyper-disturbed parks: edge effects and the ecology of isolated rainforest reserves in tropical Australia. In: LAURANCE W. F., ; BIERREGAARD, R. O. (eds.), **Tropical forest remnants: ecology, management and conservation of fragmented communities**, University of Chicago Press, Chicago, pp. 71-83.

LAURANCE, W. F., BIERREGAARD, R. O., GASCON, C., DIDHAM, R. K., SMITH, A. P., LYNAM, A. J., VIANA, V. M., LOVEJOY, T. E., SIEVING, K. E., SITES, J. W., ANDERSEN, M., TOCHER, M. D., KRAMER, E. A., RESTREPO, C. ; MORITZ, C., 1997, Tropical forest fragmentation: synthesis of a diverse and dynamic discipline. In: LAURANCE W. F., ; BIERREGAARD, R. O. (eds.), **Tropical forest remnants: ecology, management and conservation of fragmented communities**, University of Chicago Press, Chicago, p. 502-525.

LANDE, R. Genetics and demography in biological conservation. **Science**, v.241, p 1455-1461. 1988.

LIENGSIRI, C.; BOYLE, T. J. B.; YEH, F. C. Mating system in *Pterocarpus macrocarpus* Kuzs in Thailand. **Journal of Heredity**, Cary, v. 89, p. 216-221, 1998.

LIMA, O. G. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores - Sobre a presença de maitenina e pristimerina na parte cortical das raízes de *Maytenus ilicifolia*,

procedente do Brasil Meridional. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.1, n.11, p.35-38, 1971.

LINHART, Y.B. et al. Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. **Heredity**, Oxford, v.46, p.407-426, 1981.

LEDIG, F. T. Human impacts on genetic diversity in forests trees. **Oikos** 63: 87-108. 1992.

LEPSCH-CUNHA, N.M. **Estrutura genética e fenologia de espécies raras de *Couratari* spp. (Lecythidaceae) na Amazônia Central**. Piracicaba. Dissertação de Mestrado -ESALQ/USP, 1996. 147p

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.

LOVELESS, M.D. Isozyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization. **New Forests**, v.6, n,1-4, p.67-94. 1992. Acesso em: <<http://www.springerlink.com/content/r2235t684r87uxw1/>>. Em: 24 nov, 2006.

LOVEJOY, T. E. et al. Ecological dynamics of tropical forest fragments. In: SUTTON, S. L.; WHITMORE, T. C.; CHADWICK, A. C. **Tropical Rain Forest: Ecology and Management**. (Eds.) Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1983. p. 377-384.

MALTEZ, H. M. **Estrutura genética de *Aspidopermapolyneuron* Muell. Arg. - Apocynaceae (Peroba Rosa) em uma floresta estacional semidecídua no Estado de São Paulo**. Dissertação Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997. 132 f.

MARIOT, A. **Distribuição da diversidade genética e aspecto da fenologia e dispersão de sementes da pariparoba (*Piper cernnun*)**. 2000. 110p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MATOCQ MD and VILLABLANCA FX. Low genetic diversity in an endangered species: recent or historic pattern? **Biological Conservation** , v.98, p.61–68, 2001.

MEDRI, C. **Efeitos do manejo na variabilidade genética de uma população de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O Kuntze**. Londrina. Pr. Dissertação Mestrado. Universidade Estadual de Londrina. 2002. 54p.

MELTTLER, L.E e GREGG, T.G,A. **Genética de populações e evolução**. São Paulo: Pligono/ EDUSP, 1973.262p.

MILACH, S. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. (Ed.) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

MING, L.C. (Coord.); SCHEFFER, M.C.; CORRÊA JR.; BARROS, I. B.I.; MATTOS, F.J.A. **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**, v. I e II, 1998.

MOFFETT, A.A.; NIXON, K.M. The effects of self-fertilization on green wattle (*Acacia decurrens*) and black wattle (*Acacia mearnsii*). **Wattle Res. Inst. Rep.** v.1973/1974, p.66-84. 1974. In: WADT, L. H. de O.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic structure and mating system of Piper hispidinervum. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v. 39, n. 2, 2004. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100204X2004000200008&lng=en&nrm=iso>. Access on: 24 nov 2006.

MONTANARI JÚNIOR, I. **Exploração econômica de plantas medicinais da Mata Atlântica**. In: Projeto “Inventário dos recursos florestais da Mata Atlântica, a exploração e utilização dos recursos, seus impactos atuais e Campinas: UNICAMP, 2001, 21p.

MONTANARI, I. **Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas**. CPQBA-UNICAMP, C.P. 6171, CEP: 13.081-970. Campinas–SP–BRASIL, 16-ago-2002. <http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/artigos/producao.htm>.

MONTANARI Jr., I. Exploração econômica de plantas medicinais da mata atlântica. In: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. (org). **Sustentável mata atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo, Ed. SENAC São Paulo, 2002, p. 35-54.

MOSSI, A. J. **Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi-voláteis de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss**. Tese de doutorado em Ciência,. São Carlos, SP. 2003. Disponível em:< http://www.btdtd.ufscar.br/tde_arquivos/2/TDE-2004-05-08T08:35:41Z-41/Publico/TeseAJM.pdf>. Acesso em: 24 nov 2006.

MORAES, P. L. R. **Estrutura genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees & Martius ex Nees (Lauraceae)**. Tese Doutorado - Universidade Estadual de Paulista, Rio Claro, 1997. 197 f.

MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R. Taxas de cruzamento em um população natural de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). **Biota Neotropica**, v. 2, n. 2, 2002. Disponível: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v2n2/pt/abstract?article+BN01102022002>> Acesso em: 18 jan 2005.

MORAES, M. L. T. de; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.. Diversity and spatial genetic structure in two populations of *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. under different antropic conditions. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 2, 2005. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01006762200500020011&lng=en&nrm=iso>. Access on: 16 Nov 2005.

MURCIA, C. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v.10, n.1, p.58-62. 1995.

NASON, J.L.; ALDRICH, P.R.; HAMRICK, J.L. Dispersal and the dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations. In: LAURANCE, W.F. (Ed.). **Tropical forest Remnants**. In press, 1996. p.304-320.

NEIGEL, J.E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.28, p.105-128, 1997.

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

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

NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, v.29, p.1-10, 1975.

NOLDIN, V. F. ; Cechinel, V. Filho¹; Monache, F. D.; Benassi, J.C.; Christmann, I.L.; Pedrosa, R. C.; Yunes, R. A.. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova.**, São Paulo, v. 26, n. 3, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422003000300008&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 03 Jan 2007.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, p.1143-1155. 2004.

PARKER, P. G., SNOW, A.A.,SCHUG M. D.,BOOTON, G. C FUERST, P. A. What Molecules Can Tell Us about Populations:Choosing and Using a Molecular Marker. **Ecology**, v. 79, n. 2, p. 361-382, Mar, 1998.

OLIVEIRA, M.G.M.; MONTEIRO, M.G; MACAUBAS, C. Pharmacology and toxicology effects of two *Maytenus species* in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n1,p. 29-41,1991.

OLIVEIRA, D. E. P.R.; CRISTOFANI.; MACHADO, M. A. Marcadores RAPD para mapeamento genético e seleção de híbridos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n.3, 2001.

PARKER, N.J.; SNOW, A.A.; SCHUG,M.D.; BOOTON, G.C.; FUERST, P.A. What Molecules Can Tell Us about Populations: Choosing and Using a Molecular Marker. **Ecology**. v.79, n.2, p.361-382, 1998.

PAVANAND, K., WEBSTER, H.K., YONGVANITCHIT, K., KUN-ANAKE, A., DECHATIWONGSE, T., NUTAKUL, W., BANSIDDHI, J.,. Schizontocidal activity of *Celastrus-paniculatus* wild against *Plasmodium falciparum* in vitro. **Phytotherapy Research** , v.3, p.136-139.1989.

PENNA, M. **Dicionário Brasileiro de Plantas Mediciniais**; 3. ed. Kosmos; São Paulo, 1946.

PERECIN, M.B. **Diversidade genética em populações naturais de espécies de Espinheira-Santa, *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss.** Piracicaba: Departamento de Genética, ESALQ/USP. Tese Doutorado em Agronomia, 2000. 134p

PERECIN,M.B.; KAGEYAMA,P.Y. Variabilidade enzimática em populações naturais de espinheira – santa *Maytenus aquifolia* Mart e *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reiss e suas implicações para o manejo da conservação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.4 n2, p.80 – 90, 2002.

PERRY, D.J.; KNOWLES, P. Spatial genetic structure within three sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) stands. **Heredity**. v.66, p.137-142, 1991.

PIRANI, J.R.; CARVALHO-OKANO, R.M. *Maytenus rupestris* (Celastraceae), a New Species from Minas Gerais, Southeastern Brazil. **Novon**, v. 9, n.1, p. 95-97. 1999.

PITCHER, J. Os Recursos de genes de *A. angustifolia* (B.) Kuntze no Brasil. **Brasil Florestal**, v.26, p. 3-12 , 1976.

QUEROL, D. **Recursos genéticos, nosso tesouro esquecido**: abordagem técnica e sócio-econômica. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1993. 206 p.

RAFALSKI, J.A.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; VOGEL, J. M.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* utilizando dados de marcaores RAPD e SSR**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP/ESALQ, Brasil. 2002. p.130.

RAJORA O. P.; DEVERNO, L.; MOSSELER, A.; INNES, D. Genetic diversity and population structure of disjunct Newfoundland and central Ontario populations eastern white pine (*Pinus strobes* L.) **Canadian Journal of Botany**, v.76, p.500-508. 1998.

RAJORA, O.P. Genetic biodiversity impacts of silvicultural practices and phenotypic selection in white spruce. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.954-961, 1999.

RAJORA, O.P.; MOSSELER, A.; MAJOR, J. E. Indicators of populations viability in red spruce.II. Genetic diversity, population structurem and mating behavior. **Canadian Journal of Botany**, v.78, p.941-956, 2000.

RAJORA O. P.; MOSSELER, A. Challenges and opportunities for conservation of forest genetic resources. **Journal Euphytica**, v.118, n.2, p. 197-212. 2001.

REIS, M. S. Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais de plantas. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 4, p. 37-47, 1996.

ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p. 329-368.

RODRIGUES, R. R.; MARTINS, S. V.; BARROS, L. C. Tropical rain Forest regeneretion in area degraded by mining in Mato Grosso State, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v.190, p. 323-333, 2004.

ROLDAN-RUIZ, I., F.A. VAN EEUWIJK, T.J. GILLILAND, P. DUBREUIL, C. DILLMANN, J.; LOOSE, M.; BARIL, C.P. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties., **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.103. p.1138–1150. 2001.

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

SANTOS, A.M. Cultivares. In: SANTOS, A.M.; MEDEIROS, A.R.M. (Ed.) Morango: produção. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**; Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2003. p. 24-30. (Frutas do Brasil, 40).

SALLES, G.; BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. de C.; AMARAL, Z. P. de S. **Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2003. 11 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 20).

SHAPCOTT, A.. The spatial genetic structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). **Heredity**, Oxford, v.74, p.28-38. 1995.

SHAFFER, M. Minimum populations sizes for species conservation. **Bioscience**, v.31, p.131-134, 1981.

SHAFFER, M. **Minimum viable populations: coping with uncertainty. SOULÉ, M.E. Viable populations for conservation. Cambridge: Cambridge University Press**,. 1990, p.69-86.

SHRESTHA, MK; GOLAN-GOLDHIRSH, A.; WARD D. Population genetic structure and the conservation of isolated populations of *Acacia raddiana* in the Negev Desert. **Biological Conservation**, v.108, p. 119–127. 2002.

SAUNDERS, D. A., HOBBS, R. J.; MARGULES, C. R., Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. **Conservation Biological**, v.5, p.18-532. 1991. Disponível em : <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1523-1739.1991.tb00384.x>. Acesso em: 18 abril 2005.

SANTOS, E.M.G. **Ecologia de polinização, fluxo de pólen e taxa de cruzamento em *Bauhinia forficata* Link. (Caesalpinaceae)**. Piracicaba, Dissertação de Mestrado - ESALQ/USP. 1994. 78p.

SEBBENN, A. M. **Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) a partir de isoenzimas.** Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais. 1997. 107 p.

SEBBENN, A.M., KAGEYAMA, P.Y.; VENCOVSKY, R. Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética espacial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. **Scientia Forestalis**, v. 53, p.15-30. 1998.

SEBBEN, A.M.; SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; VENKOVSKY, R. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). **Scientia forestalis**, n. 58, p.127-143, dez 2000.

SEBBEN, A.M.; SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; LACERDA, C.M.B. Estrutura genética em populações de *Tabebuia cassinoides*: implicações para o manejo florestal e a conservação genética. **REVISTA DO INSTITUTO FLORESTAL**, São Paulo, v. 13, n.2, p.99-113, 2001.

SEBSEBE, D. The genus *Maytenus* (Celastraceae) in Neotropical Africa and tropical Arabia. **Symbolae Botanicae Upsaliensis**, v.25. p.1-101. 1985.

SCHLÖTTERER, C. Microsatellites. In: HOELZEL, A. R. (Ed.) **Molecular genetic analysis of population: a practical approach.** Oxford:University of Durham, 1998. p. 237-261.

SCHOEMBERG, M. M.; DINOUTTI, L. A. Ontogênese do fruto de *Ilex paraguariensis* St. Hil.- morfologia externa e interna da flor. **Estudos de Biologia**: Curitiba, v. 22, p. 5-35, 1989.

SEMA/GTZ – SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE / DEUTSCHE GESSELLSCHAFT FÜR TECHNISCHE ZUSAMMENARBEIT. **Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no Estado do Paraná.** Curitiba, SEMA/GTZ, 1995. 139 p.

SEOANE, C.E.S. **Efeitos da fragmentação florestal sobre a estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl.** - guarantã - um exemplo de espécie arbórea tropical climática de distribuição agregada. Campinas, Dissertação Mestrado - Universidade Estadual de Campinas. 1998. 80p.

SHAPCOTT, A. The spatial genetic structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). **Heredity**, Oxford, v.74, p.28-38. 1995.

SHARMA, R. R., CHOUDHURY, B. Studies on some quantitative characters in watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb. Mansf.). I. Inheritance of earliness and fruit weight. **Indian Journal Horticulture**, v. 45, n. 1-2, p. 79-84, 1988.

SHARMA, R. R., CHOUDHURY, B. Studies on some quantitative characters in watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb. Mansf.). II. Inheritance of total soluble solids and rind thickness. **Indian Journal Horticulture**, v. 45, n. 3-4, p. 283-287, 1988b.

SHARMA, I. K.; CLEMENTS, M.A.; JONES, D.L. Observations of high genetic variability in the endangered australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa* R. Br. (Orchidaceae) **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 651-663, 2000.

SHARMA, I. K. Understanding clonal diversity patterns through allozymes polymorphism in as endangered and geographically restricted Australian shrub, *Zieria baeuerlirni*, and implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 681-695, 2001.

SHEFFER, M.C.; MING, L. C.; ARAUJO, A.J. de. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDESERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para nordeste brasileiro** (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE. Embrapa Semi-Arido. Brasília-DF. Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia. 1999. Disponível em: <http://www.capta.embrapa.br>. Acesso em :24 maio 2005.

SILVA, M. A. S. **Variabilidade genética e fitoquímica de *Casearia sylvestris* em populações do cerrado e Mata Atlântica do Estado de São Paulo**. 2003. 128 f. Tese (Doutorado em Agronomia / Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003. Disponível em: <http://www.biblioteca.unesp.br/bibliotecadigital/document/?did=2260>. Acesso 18 out 2005.

SILVEIRA, S. R.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; SERA, T.; CARVALHO, V. P.; COELHO, A. S. G. Assessment of genetic variability within and among coffee progenies and cultivars using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 3, p. 329-336, 2003.

SILVERTOWN, J.W. and DOUST, J.L. **Introduction to plant population biology**. Oxford: Blackwell Sci. 1993. 210p.

SIQUEIRA, M. **Análise florística e ordenação de espécies arbóreas da mata atlântica através de dados binários**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP. Campinas. 1994.

SOBIERAJSKI, R.G. **Estrutura Genética em Populações de Bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) por Marcador Isoenzimático e Caracteres Quantitativos.**

Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, USP. Piracicaba, SP. 2004 .

SOKAL, R.R. ; ODEN, N.L. Spatial autocorrelation in biology. 1. Methodology.

Biological Journal of the Linnean Society, v. 10, p.199-228., 1978. Disponível em :< <http://www.blackwellpublishing.com/journal.asp?ref=0024-4066&site=1>>. Acesso em: 23 nov 2006.

SOKAL, R.R.; ODEN, N.L. Spatial autocorrelation in biology. 2. Some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest. **Biological**

Journal of the Linnean Society , v.10, p.229-249. 1978b. Disponível em :< <http://www.blackwellpublishing.com/journal.asp?ref=0024-4066&site=1>>. Acesso em: 23nov 2006.

SOKAL, R. R.; SMOUSE, P. E. and NEEL, J. V. The genetic structure of a tribal

population, the Yanomama Indians: XV. Patterns inferred by autocorrelation analysis. **Genetics**, v. 114, p. 259-287, 1986.

SOKAL, R. R., JACQUEZ, G. M. AND WOOTEN, M. C. Spatial autocorrelation analysis of migration and selection. **Genetics**, v.121, p.845–855. 1989.

SOUSA, V. A. **Population genetic studies in *Araucaria angustifolia* (BERT.) O.**

KTZE. Doctoral Dissertation, Faculty of Forest Sciences and Forest Ecology. Georg August University of Göttingen. Cuvillier Verlag, Göttingen, 2001. p.160.

SOUZA-FORMIGONI, M. L. O.; OLIVEIRA,M.G.M; MONTEIRO, M.G.G.

Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratorial animals. **Journal of Ethnopharmacolgy**, v.34, n.1, p21-27.1991 .

SOUZA, L.M.F.I. **Estrutura genética de populações naturais de *Chorisia speciosa* St. Hill (Bombacaceae) em fragmentos florestais na região de Bauru (SP) - Brasil.**

Piracicaba, Tese Mestrado Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. 1997. 76p.

SLATKIN, M. Rare alleles as indicators of gene flow in nature population. **Genetic**, v. 99, p. 53-65.1985.

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

SLATKIN, M.; BARTON, N.H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, v.43, p.1349-1368, 1989.

SLATKIN, M.; MADDISON, W.P. Detecting isolation by distance using phylogenies of genes. **Genetics**, v. 123, p.:603-613, 1990.

SLATKIN, M.; ARTER, H.E. Spatial autocorrelation methods in population genetics. **The American Naturalist**, v. 138, n.2, p.499-517, 1991.

SLATKIN, M. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. **Evolution**, v.47, n.1, p.264-279. 1993.

SOUZA, L.M.I. **Estrutura genética de populações naturais de *Chorisia speciosa* St. Hill. (Bombacaceae) em fragmentos florestais na região de Bauru (SP) - Brasil.** Piracicaba, Dissertação de Mestrado-ESALQ/USP, 1997. 76p.

STEBBINS, G.L. **Variation and Evolution in Plants.** Columbia University, 1950, Press, New York.

STEENBOCK, W. **Fundamentos para o manejo de populações naturais de Espinheira-Santa, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.** (Celastraceae). FLORIANÓPOLIS Estado de Santa Catarina – Brasil. Dissertação de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais. Fevereiro, 2003.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. and PERES, C. A. Effects of habitat fragmentation on plant guild structure in the montane Atlantic forest of southeastern Brazil. **Biological Conservation**, v. 91, p.119-127. 1999.

TANSLEY, S.A.; BROWN, C.R. RAPD variation in the rare and endangered *Leocadendrom elmense* (Proteaceae); implication for their conservation. **Biological Conservation**, v. 95. p.39-48, 2000. Disponível em : www.elsevier.com/locate/biocon. Acesso em: 23 nov 2006.

TELLES, M.P.C., DINIZ FILHO, J.A., COELHO, A.S.G; HAVES, L.J. Autocorrelação espacial das frequências alélicas em subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC., Myrtaceae) no sudeste de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.2, p.145-154. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010084042001000200003&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 23 Nov 2006.

TERBORGH, J., Maintenance of diversity in tropical forests. **Biotropica**, v. 24, n.2, p. 283-292, 1992.

TIMMERMAN, G. M.; McCALLUM, J. A. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in plant biology. **International Grassland Congress**, v. 17, p. 1025-1031, 1993.

TOQUICA, S.P.; RODRÍGUEZ, F.; MARTINEZ, E.; DUQUE, M.C.; TOHME, J. Molecular characterization by AFLPs of Capsicum germplasm from the Amazon department in Colombia. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.50, n.6, p.639-647, 2003.

TOLEDO, M.R. **Modelagem espacial do fluxo de sementes de Jatobá (*Hymenaea courbaril*), através de marcadores moleculares, na paisagem fragmentada do pontal do Paranapanema, SP**. Dissertação de Mestrado em Ciências. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", SP. 2005, 73p.

TOREZAN, J.M.D. ; M. SILVEIRA. 2002. Fatores ambientais, diversidade e similaridade em florestas da bacia do rio Tibagi, p. 125-134. *In*: M.E. MEDRI; E. BIANCHINI; O.A. SHIBATA; J.A. PIMENTA (Eds). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina, Edição dos editores, 595p.

TOWILL, L. E. Germplasm preservation. *In*: R. N. TRIGIANO; D. J. GRAY. **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. (Ed.) 2nd. Edition. CRC Press, Boca Raton, p. 337-353. 2000.

VILLALOBOS, V.M.; FERREIRA, P; MORA, A. The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm. **Biotechnolgy Advances**, v.9, p. 197-215, 1991.

VIEIRA, R.C. Anatomia da Folha de *Bauhinia radiata Vell.* em diferentes ambientes. **Arquivo de Biologia e Tecnologia** , v.38, n.1, p.63-107. 1995.

VIEIRA, R.F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. **Journal Janick**. New Crops and New Uses: Biodiversity and Agricultural Sustainability. p. 152-159ASHS Press, Alexandria, VA. 1999.

VIEIRA, R.F. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas brasileiras: um desafio para o futuro. **Acta Horticulturae**, 569:61-68. 2002. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/569/569_9.htm>. Acesso em: nov 2006.

VILLALABOS, V.M. ; ENGELMANN, F. Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v 11, n 4, p.375-382, July, 1995. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/n7183g4837674087/>. Acesso em: 23 nov 2006.

VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M.; CERVI, A.C. High resolution gas chromatography analysis of espinheira santa' (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*): analysis of crude drug adulterations. **Phytotherapy Research**, v.8, n 4, p. 241-244, 1994.

VILEGAS, J.H.Y.; Lanças, F.M.; Antoniosi Filho, N.R. High temperature capillary GC analysis of phytopreparations of "espinheira santa" (*Maytenus ilicifolia* M. and *Maytenus aquifolium* M. — Celastraceae), a Brazilian antiulcer plant **Chromatographia**, v.40, n. 5-6 / p341-344, 1995. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/6vn3npm516u57g75/>. Acesso em: 23 nov 2006.

VILLEGAS, V.; MARTINEZ, J .C. ; AVILES, F. X.; SERRANO L. Structure of the transition state in the folding process of human procarboxypeptidase A2 activation domain. **Jounal Molecular Biology**. v.283, n.5, p.1027-36, nov 13, 1998. Disponível em : <http://www.ingentaconnect.com/content/ap/mb>. Acesso em 23 nov 2006.

WANG, G. L .; MACKILL, D. J.; BONMAN, J. M.; MCCOUCH, M. C. CHAMPOUX, S. R and NELSON, R. J. RFLP Mapping of Genes Conferring Complete and Partial Resistance to Blast in a Durably Resistant Rice Cultivar. **Genetics**, v.136, p.1421-1434, 1994.

WAGNER, D.B.; SUN, Z.; GOVINDARAJU, D.R. and DANCİK, B.P. Spatial patterns of chloroplast DNA and cone morphology variation within populations of a *Pinusbanksiana-Pinus contorta* sympatric region. **American Nature**, v.138, p.156-170, 1991.

WADT, L. H. O. **Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.), visando seu uso e conservação**. Tese Doutorado em Agronomia. Piracicaba: ESALQ. 2001. 95p. Disponibilidade em: <http://www.cpfac.embrapa.br/pdf/tese_dsc_lhow.pdf>. Acesso em 23 nov 2006.

WADT, L. H. de O.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic structure and mating system of *Piper hispidinervum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 2, 2004. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2004000200008&lng=en&nrm=iso>. Access on: 19 nov 2006.

WAUGH, R. **RAPD Analysis: use for genome characterization tagging traits and mapping**. In: CLARK, M. S. (Ed.). *Plant molecular biology: a laboratory manual*. Germany: Springer-Verlag, 1997. p. 305-333.

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

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data**. North Carolina State University, Sinauer Ass. Inc. Pub., Massachusetts, 1996. 445 p.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II**. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445p.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS-LIMERA, G. Vegetative structure and environmental conditions of forest edges in Panama. **Journal of Ecology**, v.78, p.356-373. 1990. Disponível em : <http://www.blackwellpublishing.com/journal.asp?ref=0022-0477>. Acessado em: 23 nov 2006.

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

WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16: 97-157. 1931. In: SOSA-GOMEZ, DANIEL R. et al . Genetic differentiation among Brazilian populations of *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) based on RAPD analysis. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 2, 2004. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519566X2004000200009&lng=en&nrm=iso>. Access on: 17 Nov 2006.

WRIGHT, S. The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. **Evolution**, v. 19, n. 3 p. 395-420, 1965.

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

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetics consequences of habitat fragmentation for plants Tree. **Trends in ecology and evolution**. v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.

ZHIVOTOVSKY, L. A. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. **Molecular Ecology**.v. 8, p. 907 - June 1999. Disponível em: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-294x.1999.00620.x>

ZIMBACK, L.; MORI, E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; VEIGA, R. F. A.; MELLO JUNIOR, J. R. S. Genetic structure of *Trichilla pallida* Swartz (Meliaceae) populations by RAPD markers. **Scientia Forestalis** , v. 65, p. 114-119, 2004. Disponível em : <http://www.ipef.br/publicacoes/scientia/>.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugeniadysenterica* DC. utilizando marcadores de RAPD e SSR.** Tese Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba. 2002. 130p. Disponível em : <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-17032003-144316/>

3 ARTIGO: Variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus aquifolium* de Florestas em Telêmaco Borba, Paraná, Brasil.

RESUMO

A *M. aquifolium* é uma espécie medicinal de ocorrência natural da Floresta Ombrófila Mista do Estado do Paraná. A comprovação terapêutica em males gástricos e o uso em larga escala tem causado a devastação de populações naturais desta espécie com perdas do complexo genético. O objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade genética entre e dentro de populações nativas de *M. aquifolium* por meio da análise do polimorfismo de DNA utilizando marcadores (RAPD). Avaliou-se três populações naturais (Mortandade, Vila Preta e Trinita) da Fazenda Monte Alegre, Telêmaco Borba, Paraná, Brasil. Com treze primers foram obtidos 283 marcadores de RAPD. A espécie apresentou alta proporção de locos polimórficos e elevados níveis de diversidade genética dentro da espécie. A diversidade genética total (Ht) obtida foi de 0,224 e a diferenciação genética dentro de populações (Hs) obtido foi de 0,197. Do total da variância genética molecular encontrada para a espécie, 21,77% deveu-se à divergência entre as populações, enquanto que 78,23% foi atribuída aos indivíduos dentro das populações. O índice de variação genética obtido entre as populações foi de 0.21765. Os níveis moderados a altos de diversidade genética para a espécie justifica a conservação da variabilidade genética e a manutenção apenas das populações de Mortandade e Trinita porém os níveis de variabilidade genética entre as populações encontradas foram considerados altos, a perda de uma ou mais populações pode levar a perda de alelos raros exclusivos de determinada população.

Termos para indexação: Espinheira Santa, marcadores RAPD, diversidade genética, planta medicinal.

ABSTRACT: Genetic variability of natural populations of *Maytenus aquifolium* from Forests in Telêmaco Borba, Paraná, Brazil

The *M. aquifolium* is a medicinal species of natural occurrence of the Mixing Ombrófila Forest of the State of the Paraná. The therapeutical evidence in males gastric and the use in wide scale have caused the devastation of natural populations of this species with losses of the genetic complex. The objective of this study was to evaluate the genetic variability inside enters and of native populations of *M. aquifolium* by means of the analysis of the polimorfism of DNA using marking (RAPD). It was evaluated three natural populations *M. Aquifolium* (Mortandade, Vila Preta and Trinita) of the Farm Monte Alegre, Telemaco Borba, Paraná, Brazil. It had been selected thirteen primers and it had gotten 283 markers of RAPD. The species inside presented high ratio of Polymorphic loci and raised levels of genetic diversity of the species. The full genetic diversity (Ht) was of 0,224 and the genetic differentiation inside of populations (Hs) was of 0,197. Of the full of the found molecular genetic variance for the species, 21.77% had it the divergence between the populations, while that 78.23% were attributed to the individuals inside of the populations. The index of genetic diversity was of 0.21765. The moderate levels the high ones of genetic diversity for the species justify the conservation of the genetic variability and the maintenance only of the populations of Mortandade and Trinita however the levels of genetic variability between the joined populations had been considered high, the loss of one or more populations can take the loss of exclusive rare alleles of determined population.

Index terms: Espinheira Santa, RAPD marker, genetic diversity, medicinal plant.

1. Introdução

Espinheira Santa (*M. aquifolium* Mart) está entre as espécies medicinais nativas da floresta ombrófila mista do Estado do Paraná mais utilizadas na medicina popular devido principalmente a sua comprovação científica no tratamento de úlceras do estômago e gastrites (VILEGAS et al., 1994; VILEGAS et al., 1995; CORDEIRO et al., 1998) e pela grande variedade de atividades biológicas que seus princípios ativos têm (BHATAGAR et al., 1951; GONÇALVES DE LIMA et al., 1969, GONÇALVES DE LIMA et al., 1971, BHATNAGAR et al., 1979, PAVANAND et al., 1989, CORSINO et al., 2000, MOSSI, 2003). Em âmbito nacional foi selecionada entre pesquisadores de plantas medicinais como espécie prioritária para a realização de estudos de conservação e manejo e estudos envolvendo a elucidação de aspectos do sistema reprodutivo, diversidade genética, dinâmica de populações e reprodução, bem como ações de coleta de germoplasma (EMBRAPA/IBAMA, 2002).

A caracterização da diversidade genética em *M. aquifolium* tem sido feita com base em marcadores isoenzimáticos (PERECIN, 2000) e com marcadores genéticos (KAGEYAMA et al., 2003).

Perecin e Kageyama, 2002 analisaram variabilidade genética utilizando marcadores isoenzimáticos para 194 indivíduos de *M. aquifolia* encontraram 31 alelos e uma porcentagem de locos polimórficos bastante alta (40% a 70%), quando comparados aos encontrados para plantas superiores em geral, com polimorfismo em aproximadamente 34% de seus locos ou mesmo para o conjunto de populações de uma espécie, que apresentam em média 50% de seus locos polimórficos.

A análises sobre diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessinais por marcadores genéticos constatou entre as espécies estudadas que a porcentagem de locos polimórficos foi alta (70%) para algumas populações de *M. aquifolia* e baixa (40%) para outras populações desta mesma espécie, sugerindo que nestas últimas existem em muitos locos alelos fixados (KAGEYAMA et al., 2003). Por outro lado, quando as populações foram analisadas por isoenzimas foi observado que o maior número médio de alelos por loco (variação de 2,5 a 3,4) expressa o seu grande potencial para gerar novas

combinações genotípicas e ampliar a base genética das populações (KAGEYAMA et al., 2003).

Nesse sentido, o conhecimento da diversidade, baseado em informações geradas pelos marcadores moleculares permite otimizar procedimentos para a conservação de recursos genéticos e avaliar a base genética disponível (DIAS, 1998).

A manutenção da variabilidade genética justifica-se por aspectos econômicos, genéticos, ecológicos, sociais e culturais que envolvem desde a regularização de mananciais hídricos a conservação da biodiversidade envolvendo a possibilidade de manejo e o melhoramento genético dos recursos florestais múltiplos (plantas medicinais, frutos, madeira, mel, óleos essenciais, etc.) (REIS, 1996 a,b; MARIOT, 2000). Segundo Freitas et al. (2005), a sustentabilidade das florestas combina com a conservação da biovariabilidade e a variação genética com interesses econômicos e fins sociais.

Dentro da classe de marcadores moleculares, baseados na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), destaca-se o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), em virtude do baixo custo e de não ser necessário conhecimento genético prévio da espécie (Milach, 1998). Por meio da técnica de RAPD pode-se avaliar a estrutura e a diversidade genética em populações naturais e selecionadas de plantas (LAMEGO et al., 2006), níveis de similaridade entre e dentro das mesmas permitindo inferir sobre o relacionamento entre populações naturais e as mantidas em instituições como fonte de germoplasma (GUNTER et al., 1996). Por serem altamente variáveis (HALLDÉN et al., 1996; WU et al., 1999), os marcadores RAPD são apropriados para estudos de populações nativas e podem fornecer informações que permitem o estudo da diversidade genética conforme Nei (1973), e a porcentagem de loci polimórficos pode ser usada como índice de diversidade para caracterizar e comparar os níveis de variação genética nas populações naturais.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi detectar a variabilidade genética entre e dentro de três populações naturais de *M. aquifolium* de Floresta Ombrófila Mista, em Telêmaco Borba, Paraná, Brasil, por meio da análise de polimorfismo de DNA utilizando marcadores de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

2. Material e Métodos

As três populações naturais distribuídas na Fazenda Monte Alegre, no município de Telêmaco Borba, Paraná, foram selecionadas e georefêrenciadas, a população de Mortandade localizada a altitude de 827 m, latitude de 24 14' 901 "S, longitude de 50 ° 32'920" W, a população Vila Preta localizada a altitude 808 m, latitude de 24 ° 06' 981 "S, longitude de 50 ° 22' 037" W e a população de Trinita localizada a altitude 797 m, latitude 24 ° 17'245 "S, longitude 50 ° 31' 058" W.

A menor distância entre as populações de *M. aquifolium* foi 6,6 Km entre as de Mortandade e Trinita e a maior 24,7 Km entre populações de Trinita e Vila Preta (Figura 1).

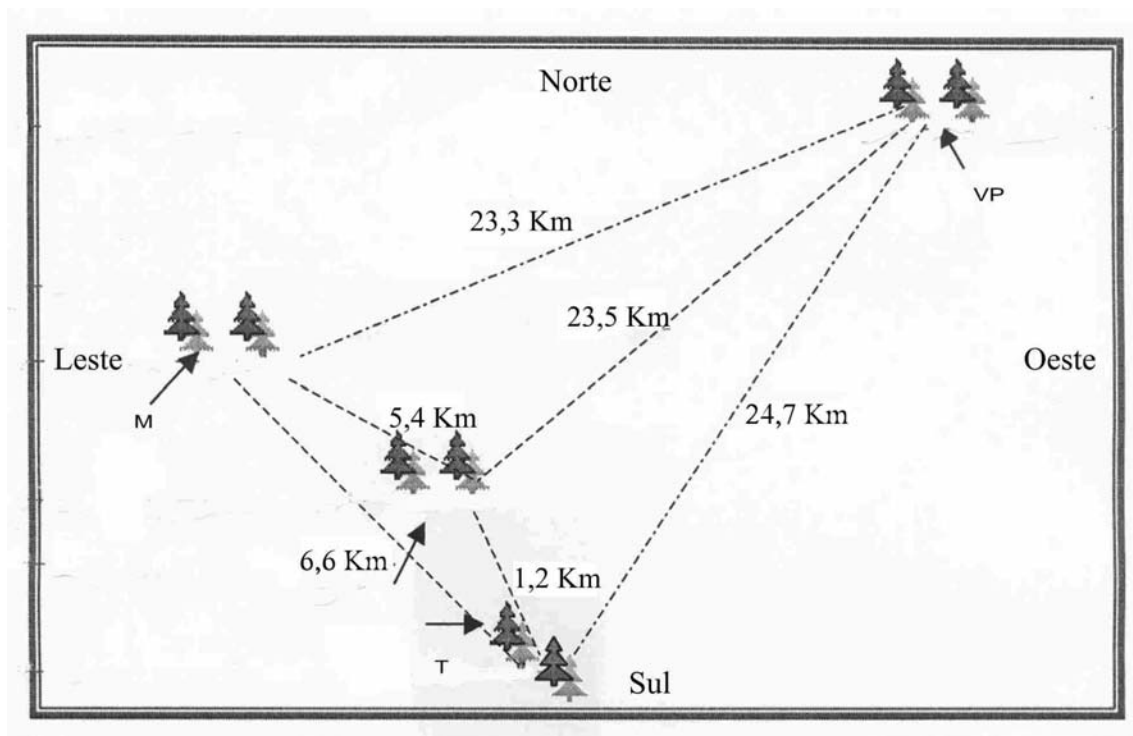


FIGURA 1: Distâncias geográficas entre as três populações de *M. aquifolium* [Mortandade (M), Vila Preta (VP), Trinita (T)] da Fazenda Monte Alegre, Telêmaco Borba, Paraná, Brasil.

Para o estudo de variabilidade genética foram utilizadas as plantas das três populações de Espinheira Santa (*M. aquifolium*) de uma floresta ombrófila mista. A planta de Espinheira Santa tem os seus registros no herbário da Klabin do Paraná Produtos Florestais Ltda sob o número 214 coletado em 16 de Abril de 2004 e pertencente à família Celastraceae.

De cada população de áreas de aproximadamente 8.000 m² (KLABIN, 2007) foram amostrados 30 indivíduos, de cada indivíduo coletou-se 10 folhas jovens e expandidas que foram acondicionadas em sacos plásticos identificados com sílica gel e transportados até o laboratório.

Considerou-se para a coleta das folhas uma distância de 5,0 a 6,0 m entre um indivíduo e outro dentro da mesma população. Outro critério adotado foi a realização da amostragem de indivíduos separados por barreira física dentro de cada população como também evitar as coletas de indivíduos nas bordas.

O DNA foi extraído por DNeasy Plant mini Kit Quiagen, metodologia descrita originalmente por Doyle e Doyle (1987). Foi realizado o DNA total em gel de agarose 1% corado com 5 µL com brometo de etídeo (10 mg. L⁻¹) e diluído em 100 mL TAE 1X tampão.

A concentração de DNA foi estimada através de um Fluorômetro DyNA Quant 200 da Hoefer-Pharmacia segundo as instruções do fabricante. Cada amostra foi diluída para 10 ng µL⁻¹ após a quantificação.

Noventa (90) amostras foram testadas com o objetivo de verificar a eficiência das mesmas. Posteriormente, foi realizada a seleção com os “primers” Operon Technology das séries OPN e OPAF visando verificar quais possuíam melhor padrão de amplificação e maior número de bandas. Para a determinação da variabilidade genética dentro de cada população e entre as mesmas foram utilizadas 30 amostras de cada área.

As reações de amplificação apresentaram volume de 15,6 µL. As amostras foram amplificadas em um ciclador térmico PTC 100 da MJ Research com 96 poços durante 48 ciclos de RAPD. As condições de amplificação envolveram uma etapa inicial de 3 minutos a 94°C para a desnaturação inicial do DNA e em seguida por 47 ciclos de RAPD de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto e 45 segundos a 38°C (anelamento) e 2 minutos a 72°C (polimerização), seguido por um ciclo final de 7 minutos a 72°C (extensão). Após o término dos 48 ciclos, a temperatura caiu a 4°C, e assim permaneceu até o produto do RAPD ser submetido à eletroforese.

Os fragmentos de RAPD foram fracionados em gel de agarose 1,4% em tampão TAE (0,04 M Tris-acetato; 0,01 MEDTA, pH 8,0) a uma voltagem de 110V por cerca de 2 horas, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (UV 302 nm).

As fotografias foram armazenadas em um disco rígido do computador para posterior análise.

Os marcadores moleculares obtidos (RAPD) foram avaliados pela presença (1) e ausência (0) de bandas de DNA homólogas entre os indivíduos de cada população estudada. Apenas os fragmentos bem amplificados foram considerados.

Os dados gerados foram analisados utilizando-se os programas POPGENE 1.3.1 (Yeh et al., 1996) e NTSYS 2.1 (Rohlf, 2000). A identidade genética e a distância genética entre as populações foram estimadas de acordo com Nei (1978). As frequências dos marcadores utilizadas para calcular a diversidade gênica dentro de populações (H_s) e a diversidade gênica total (H_t) estão de acordo com a fórmula de Nei (1987), e a diversidade gênica de cada população por Nei (1973) está fundamentada na distribuição da heterozigosidade do conjunto das subpopulações - H_t e dentro (H_s) das mesmas. Utilizando-se o software Arlequin 1.1 (Schneider et al., 1997), a análise de variância para os dados moleculares (AMOVA) (Excofferier et al., 1992) foi realizada com a obtenção do F_{st} e da variabilidade dentro e entre populações. O procedimento de AMOVA é baseado na análise de variância que utiliza valores de distância entre fenótipos RAPD dois a dois, as estimativas produzidas são análogas as das estatísticas-F.

1. Resultados e Discussão

Entre os primers utilizados os selecionados foram: OPN-02, OPN-03, OPN-05, OPN-09, OPN-11, OPN-12, OPN-18, OPN-19, OPAF-02, OPAF-04, OPAF-06, OPAF-09, OPAF-10. Estes geraram um total de 283 marcadores de boa amplificação e alta taxa de polimorfismo. Não foram observadas bandas monomórficas em nenhum dos géis analisados.

Esses marcadores foram submetidos a um bootstrap para o número de marcadores resultando em um coeficiente de variação (CV) menor que 0,07.

Um alto grau de polimorfismo dentro das populações em estudo foi detectado pelo grande número de fragmentos polimórficos que variaram de 17 a 31.

Para a população de Mortandade foi obtido o maior número de locos polimórficos (240), 84,81% dos locos polimórficos da população. Em Vila Preta, o valor foi um pouco menor (228), 80,57 % de locos polimórficos nesta população. Já em Trinita, o número de locos polimórficos foi bem menor (204), 72,8 % dos locos polimórficos desta população.

Este alto polimorfismo detectado através de marcadores RAPD em três populações naturais de *M. aquifolium* também foi observado por Perecin (2000), que trabalhou com a mesma espécie com o uso de marcadores isoenzimáticos encontrou aproximadamente 60% de locos polimórficos para 246 indivíduos distribuídos em cinco populações naturais. Segundo Perecin (2000), as populações de *M. aquifolium* por ela estudada com o uso de marcadores isoenzimáticos apresentaram polimorfismo com índices bastante expressivos de riqueza alélica e diversidade genética encontrados.

A diversidade gênica total obtida mostrou que essas populações encontram-se com moderados níveis de variabilidade genética total ($H_t=0,224$). Segundo Anthony et al. (2000), um índice de diversidade total pode ser considerado alto se seu valor estiver acima de 0,25. Ainda segundo esse mesmo autor, a diversidade gênica dentro de grupos H_s é considerada alta caso o seu valor esteja acima de 0,36, portanto $H_s=0,197$ aqui encontrado não pode ser considerada alta para a Espinheira Santa. Para tanto, os níveis de diversidade genética dentro deste grupo são considerados moderados.

A análise de variância dos dados moleculares de 283 locos polimórficos mostrou que 21,77 % da variabilidade genética está entre as populações e 78,23 % da diversidade genética está dentro das populações, e que o nível de divergência entre as três populações de *M. aquifolium* foi estimado em 0,21765 (Fst) (Tabela 1). A maior parte da variabilidade genética encontrada para *M. aquifolium* está realmente dentro de cada população o que concorda com dados que ocorrem em diversas espécies arbóreas tropicais na literatura de acordo com Zucchi et al. (2005).

Segundo Harlt (1994), o Fst obtido de 0,21765 mostrou níveis que se enquadram como altos. O Fst não pode quantificar os níveis de variabilidade genética entre populações pois este índice forneceu dados qualitativos de diferenciação genética. Desta maneira, o valor de Fst = 0,21765 indicou apenas que as populações estudadas foram diferenciadas geneticamente em torno de 21,765%.

Tabela 1 – Análise de variância para dados moleculares (AMOVA) para as três populações de *M. aquifolium* (Mortandade, Vila Preta e Trinita) baseada no método Fst. Telêmaco Borba, Paraná, Brasil.

Fonte de Variação	G.L.	Componentes da variação	Porcentagem de variação
Entre populações	2	9,42913	21,77*
Dentro das populações	87	33,89272	78,23
Total	89	43,32185	
Índice de Fixação	Fst	0,21765	

*P < 0,05 (teste de significância dado por 1023 permutações)

Observou-se índices de divergências genética (Fst) bem distintos com menor divergência genética entre Mortandade e Vila Preta (0,16077), bem

como a maior divergência genética entre Mortandade e Trinita (0,29387), valor praticamente dobrado (Tabela 2).

TABELA 2 - Estimativa de F_{st} analisada par a par obtida para três populações de *M. aquifolium* (Mortandade, Vila preta e Trinita) Telêmaco Borba, Paraná, Brasil.

Populações	Populações		
	Mortandade	Vila Preta	Trinita
Mortandade	0,00000		
Vila Preta	0,16077	0,00000	
Trinita	0,29387	0,19187	0,00000

As distâncias genéticas de Nei (1973) forneceram distância genética de 0.0683 entre Mortandade e Trinita como sendo as mais distantes e mais estruturas (Tabela 3). Esta estruturação é visualizada também na Figura 3. Segundo Perecin (2000), *Maytenus* sp apresentou alta diversidade alélica nas populações com pouca heterozigosidade devido possivelmente a estruturação produzida pela baixa capacidade de dispersão dos gametas que levaram a fixação de alelos.

Os valores de F_{st} indicaram que a variabilidade genética foi alta de acordo com Wright (1951), este autor considera valores de F_{st} entre 0,05 e 0,15 como indicativo de variabilidade genética alta entre populações (Tabela 1 e 2). O F_{st} aqui estimado é alto e corrobora com os valores de distância genética representada na tabela 4 e figura 3.

Tabela 3 - Identidade genética das três populações de *M. aquifolium* em Mortandade, Vila Preta e Trinita, segundo Nei (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) [Nei (1973) Genetics 89:583-590].

Populações	Populações		
	Mortandade	Vila Preta	Trinita
Mortandade	*****	0,9658	0,9340
Vila Preta	0,0348	*****	0,9614
Trinita	0,0683	0,0394	*****

Os resultados obtidos tornaram-se ainda mais sólidos quando comparados com os outros estudos como o de Perecin (2000) que encontrou diversidade gênica média ou heterozigosidade esperada média para *M. aquifolium* de $H_t=0,259$, o que evidência um nível médio e satisfatório de diversidade gênica total ($H_t= 0,224$) para as três populações naturais da mesma espécie aqui estudadas.

A análise de agrupamentos através do algoritmo UPGMA (Figura 2) permitiu separar as 90 plantas analisadas em três grupos correspondentes a três populações avaliadas, com exceção de uma planta de Vila Preta (1VP) que agrupou com a população de Mortandade e uma planta de Mortandade (21M) que agrupou com a população de Vila Preta, indicando que as populações não estão inteiramente isoladas geneticamente.

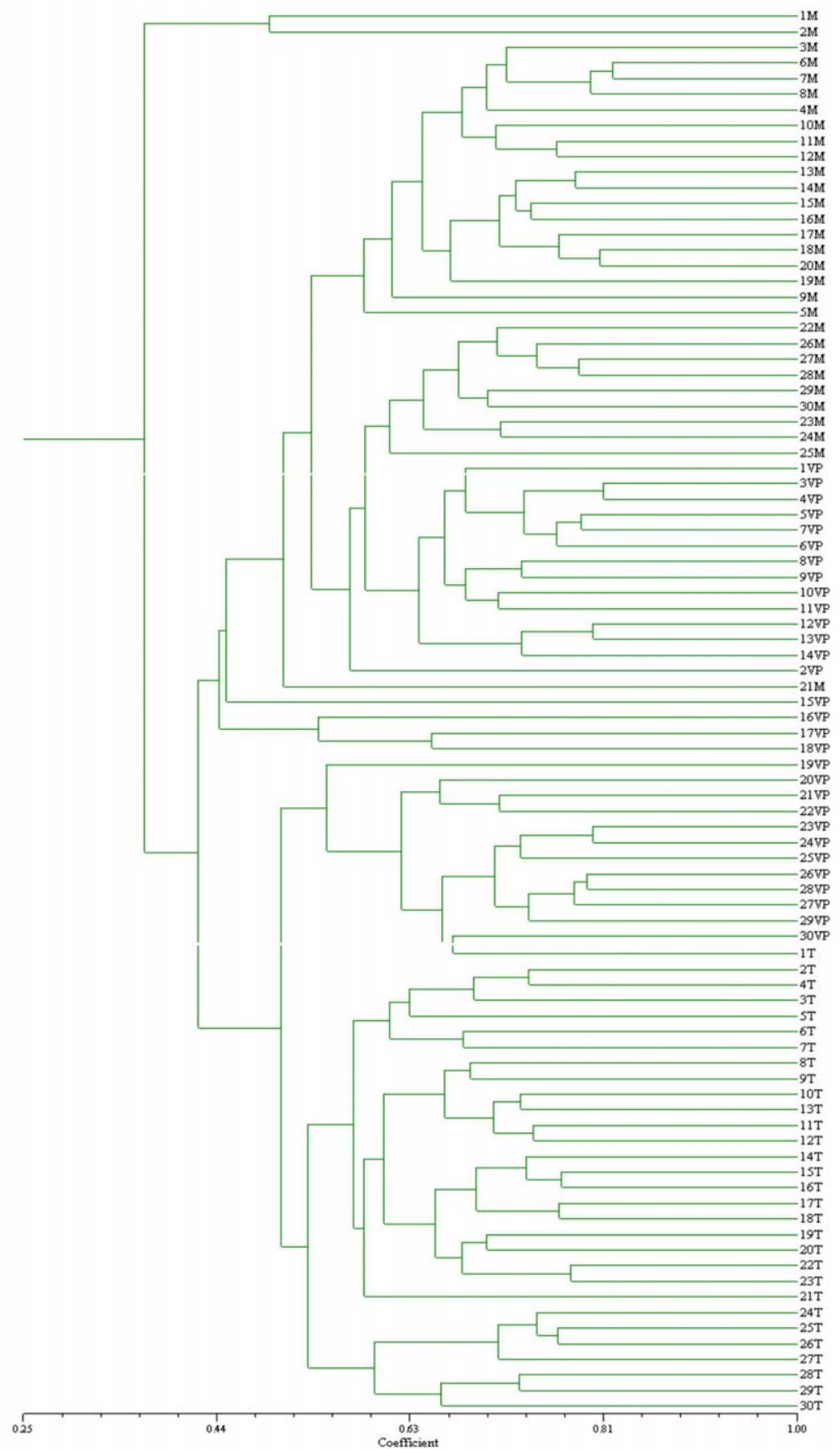


FIGURA 2 - Dendrograma da similaridade genética obtida pelo cálculo do coeficiente de Dice entre as três populações de *M. aquifolium* [Mortandade (M), Vila Preta (VP), Trinita (T)] da Fazenda Monte Alegre, Telêmaco Borba, Brasil, agrupamento UPMG.

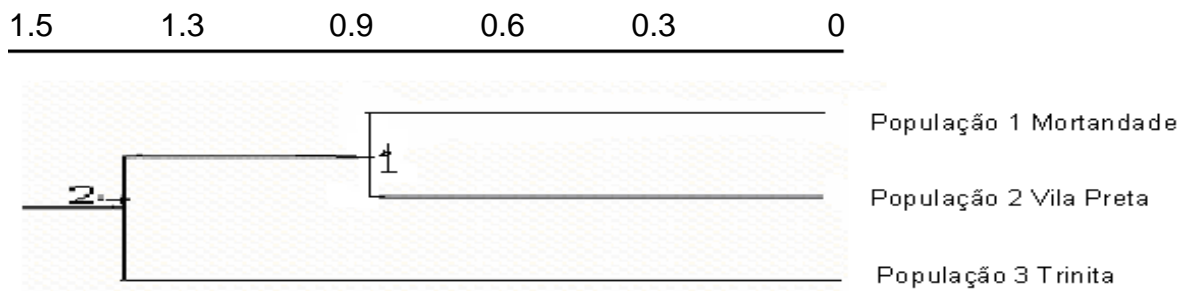


FIGURA 3: Dendrograma baseado na distância genética estimada por Nei (1973) das três populações de *M. aquifolium* (Mortandade, Vila Preta e Trinita) Telêmaco Borba, Paraná, Brasil.

No dendrograma das distâncias genética entre populações (Figura 3) formaram-se dois grupos distintos, o primeiro agrupou Mortandade e Vila Preta e o segundo foi constituído por Trinita. Verificou-se que populações próximas geograficamente são as mais distantes geneticamente, sugerindo a ausência de associação entre a distância geográfica (Figura 1) e a distância genética (Tabela 3).

Esses valores corroboraram com o dados obtidos nas comparações com F_{st} (Tabela 2).

A relação entre indivíduos e populações foram sumarizada pela coordenada principal (Figura 4). As populações aparecem bem separadas entre si com poucas sobreposições entre populações de Mortandade e Vila Preta corroborando com os dendrogramas (Figuras 2 e 3). Verificou-se pela coordenada principal que ocorreram também poucas sobreposições de indivíduos da mesma população indicando que esses indivíduos são diferentes (Figura 4).

A distribuição dos indivíduos nas populações representadas na coordenada principal usando distâncias euclidianas corroboram com a representação do dendrograma que mostrou a distribuição baseada no coeficiente

de similaridade de Dice (Figura 2). Associando estas informações aos dados da figura 1, observou-se que as populações não se separaram de acordo com a distância geográfica, mas que estas populações se agruparam devido às condições ambientais as quais estiveram expostas. Evidenciou-se, portanto, que os grupos que se formaram estão arrançados de acordo com as características geológicas e com as classes de solos em que os indivíduos se encontram.

A distância genética entre as populações demonstrou que a divergência genética entre as populações de Vila Preta e Mortandade foi de 0.0348, entre Trinita e Vila Preta foi de 0.0394 e entre Mortandade e Trinita foi de 0.0394 indicando que as populações são diferentes (tabela 3).

Os níveis moderados a altos de diversidade genética para a espécie podem justificar a conservação da variabilidade genética e a manutenção apenas das populações de Mortandade e Trinita, o que não seria uma inferência correta, uma vez que os níveis de variabilidade genética entre as populações encontradas foram considerados altos. Assim, a perda de uma ou mais populações pode levar a perda de alelos raros exclusivos de determinada população. Cabe ressaltar, que quaisquer medidas a serem tomadas no sentido da preservação de germoplasma *ex situ*, não descartam a necessidade de conservação *in situ*.

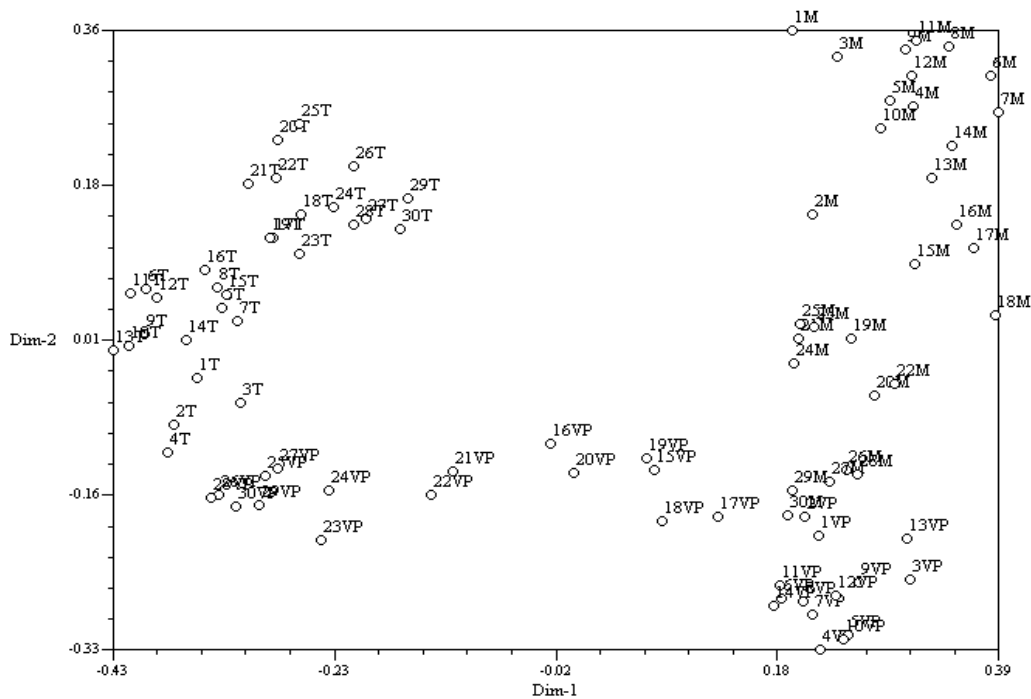


Figura 4 – Representação bidimensional da análise da coordenada principal de 90 indivíduos amostrados nas populações de [Mortandade (M), Vila Preta (VP), Trinita (T)] da Fazenda Monte Alegre, Telêmaco Borba, Brasil.

Em 1963, aconteceu o grande incêndio florestal que atingiu a região central do Estado do Paraná, entre os meses de agosto e setembro. Em Monte Alegre, o fogo chegou no final de agosto e atingiu cerca de 85% do patrimônio da Klabin. Após o ocorrido, a companhia redobrou seus cuidados com a proteção às florestas, iniciando a implantação de um programa específico de proteção florestal com o objetivo de proteger as suas extensas áreas florestadas e reflorestadas (Klabin, 2007).

Segundo informações cedidas pela da Empresa Klabin do Paraná Produtos Florestais Ltda, apenas a população de Mortandade não foi afetada pelo incêndio. É importante ressaltar que mesmo com esse fato marcante essa espécie medicinal *M. aquifolium* aqui estuda são de populações nativas e apresentaram níveis moderados a altos de diversidade genética (Klabin, 2006).

As informações obtidas neste estudo para essas arbóreas medicinais climáticas indicaram que as estratégias para a conservação de *M. aquifolium* devem ser estruturadas de acordo com os parâmetros ecogeográficos

locais realizando se a coleta em cada um dos compartimentos ambientais em que os indivíduos se encontram.

O F_{st} , índice de divergência genética, caracteriza as populações nativas aqui estudadas com alta diferenciação genética qualitativa (tabelas 1 e 2).

As populações nativas de *M. aquifolium* das regiões de Mortandade, Vila Preta e Trinita aqui estudadas têm grande potencial genético portanto elas são indicadas para a realização de futuros programas domesticação, estudos fitoquímicos e melhoramento genético para a espécie.

4. Conclusões

A metodologia de RAPD detectou a variação genética entre e dentro de populações naturais de *M. aquifolium*.

Foram obtidos 283 marcadores de RAPD analisados que detectaram nenhuma banda monomórfica.

A análise molecular indicou maior variabilidade genética dentro das populações que entre elas.

Os níveis de diversidade genética encontrados foram de moderados a altos.

As populações de Mortandade, Vila Preta e Trinita se agruparam devido às condições ambientais as quais estiveram expostas.

As populações de Mortandade e de Trinita estão próximas geograficamente e ao mesmo tempo são as que se apresentam mais distantes geneticamente.

5. Agradecimentos

KLABIN do Paraná Produtos Florestais Ltda.

Universidade Estadual de Londrina - Centro de Ciências Biológicas (Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Genética Molecular e Citogenética de plantas e Centro de Ciências Agrárias (Departamento de Agronomia, Laboratório de Fitotecnia).

6. REFERÊNCIAS

ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O.; WILCHIES, A.; LASHERMES, P.; BERTHAUUD, J.; CHARRIER, A., Genetic diversity of wild Coffe (*Coffea Arabica* L) using molecular markers. **Euphytica** v.118, p.53-65. 2001.

BHATNAGAR, S.S., DIVEKAR, P.V., DUTTA, N.L., 1979. Chemical Abstracts 45, 588.5d. In: CORSINO, J.; DE CARVALHO, P.R.F.; KATO, MASSUO, J.; RIBEIRO LATORRE L.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; ARAUJO, A.; BOLZANI, V.; FRANCA, S. C.; PEREIRA, A.; Maria S.; FURLAN M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 741-748, 2000.

BUCHERT, G. P., RAJORA, O. P., HOOD, J. V.; DANCİK, B. P. Effects of Harvesting on Genetic Diversity in Old-Growth Eastern White Pine in Ontario, Canada. **Conservation Biology**. v.11, n. 3, 747-758. 1997.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. Viçosa: UFV, v.2, 585 p. 2003.

COMSEMA Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul - Site Desenvolvido pela PROCERGS **Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção do Rio Grande do Sul ANGIOSPERMAE**. 2002. Disponível em: <http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/pdf/especies-ameacadas.pdf>. Acessado :17 nov 2006.

CORDEIRO, P. J. M.; VILEGAS, J. H.Y.; LANCAS, F. M. HRGC-MS analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("espinheira santa"). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 10, n. 6, 1999. Disponível em : <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010350531999000600017 e http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010350531999000600017>. Acessado em: 17 Nov 2006.

CORSINO, J.; ALÉCIO, A. C.; RIBEIRO, M. L.; FURLAN, M.; PEREIRA, A. M. S.; DUARTE, I. B.; FRANÇA, S. C. Quantitative determination of maytenin and 22b - hydroxymaytenin in callus of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.9, p.245-247, 1998.

DIAS, L.A. dos S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. p.405-475.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human

mitochondrial DNA data. **Genetics**, Bethesda, v. 131, p. 479-491, 1992.

EMBRAPA/IBAMA. **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas**. Resultados da 1ª reunião técnica. EMBRAPA/IBAMA, Brasília, 2002.

FERREIRA DE SANTANA, C., CORTIAS, C.T., PINTO, K. DE V., SATIRO, M.W., SATIRO, A.L., LACERDA, A.L., MOREIRA, I.C., Primeiras observações sobre o emprego da maitenina em pacientes cancerosos. **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife, v.11, p.37-49,1971.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: CENARGEN/EMBRAPA, . 1998. 220p.

FREITAS, M. L. M.; ANA AUKAR, P. DE A.; SEBBENN, A. M.; MORAES, M. L.T. DE; LEMOS, E. G. M. . Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. por marcador AFLP. **Revista Scientia Forestalis**, Piracicaba - Edição Nº 68 Agosto, 2005.

FISHER, M., MATTHIES, D., 1998. RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). **American Journal of Botany**. V.85, p.811–819.

GONÇALVES DE LIMA, O., D'ALBUQUERQUE, I.L., DE BARROS COELHO, J.S., MARTINS, D.G., LACERDA, A.L., MACIEL, G.M. Substâncias antimicrobiana de plantas superiores. Comunicação XXXI. Maitenina, novo antimicrobiano com ação antineoplástica, isolado de Celastraceae de Pernambuco. **Revista do Instituto de Antibióticos** , Recife, v.9, p.17-21. 1969.

GONÇALVES DE LIMA, O., D'ALBUQUERQUE, I.L., DE BARROS COELHO, J.S., MARTINS, D.G., LACERDA, A.L., MACIEL, G.M. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação o XXXVI. Sobre a presença de maitenina e pristimerina na parte cortical das raízes de *Maytenus ilicifolia*, procedente do Brasil Meridional. **Revista do Instituto de Antibióticos** , Recife, v.11, p. 35-38. 1971.

GUNTER, L.E., TUSKAN, G.A. WULLSCHLEGER, S.D. Diversity among populations of switchgrass based on RAPD markers. **Crop Science**. 36:1017–1022. 1996.

HALLDÉN, C. ; HANSEN, M.; NILSSON, N.–O; HJERDIN, A and SÄLL, T. Competition as a source of errors in RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 93, n.8, dec, 1996.

HARTL, D. L. **Genetics**. 3. ed. London: Jones and Bartlett Publishers, 1994. 584 p.

KLABIN[mensagem pessoal. Mensagem recebida por <jose@uel.br> 10 oct 2006.

KLABIN. **Projeto de Expansão Monte alegre.** Disponível em: [http://www.klabin.com.br/MA1100/\(S\(roulr0rp4v4vgd4555cwq345\)\)/ptbr/historia.aspx](http://www.klabin.com.br/MA1100/(S(roulr0rp4v4vgd4555cwq345))/ptbr/historia.aspx). Acessado em: 22/02/2007.

KAGEYAMA, P. Y; SEBEEN, M.A.; RIBAS,A.L.; GANDARA, F.B.; CASTELLEN,M.; PERECIN,M.B; VENCOVISKY, R. Diversidade genética em arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Florestalis**. N.64. P. 93- 107. Dez. 2003.

LEDIG, F. T. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems OIKOS v.63 p.87-108. 1992. Disponível em: <http://www.treesearch.fs.fed.us/pubs/24338>. Acessado em :12/10/2006.

MARIOT, A. **Distribuição da diversidade genética e aspecto na fenologia e dispersão de sementes de pariparoba (*Piper cernuum*).** Dissertação de Mestrado. 2000. 110p.

LAMEGO, F. P. RESENDE L.V; SILVA, P. R; VIDAL, A. R; NUNES , A. L. Genetic and geographic distance among beggar-ticks accesses susceptible and resistant to acetolactate sintase herbicide inhibitors. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 6, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100204X2006000600010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 22 Feb 2007. Pré-publicação. doi: 10.1590/S0100-204X2006000600010

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas.** Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141p.

MOSSI, A. J. **Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi-voláteis de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss.** Tese de doutorado em Ciência,. 2003. São Carlos, SP. Disponível em:< http://www.bdt.d.ufscar.br/tde_arquivos/2/TDE-2004-05-08T08:35:41Z-41/Publico/TeseAJM.pdf>. Acesso em: 24 nov 2006.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.70, p.3321–3323. 1973.

PAIVA, J.R. **Melhoramento genético de espécies agroindustriais na Amazônia: estratégias e novas abordagens.** Brasília: EMBRAPA-SPI; Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1998. 135 p.(Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PAVANAND, K., WEBSTER, H.K., YONGVANITCHIT, K., KUN-ANAKE, A., DECHATIWONGSE, T., NUTAKUL, W., BANSIDDHI, J.,. Schizontocidal activity of *Celastrus-paniculatus* wild against *Plasmodium falciparum* in vitro. **Phytotherapy Research** , v.3, p.136-139.1989.

PERECIN, M. B. **Diversidade genética em populações naturais de espécies de Espinheira-Santa, *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss.** Piracicaba: Departamento de Genética, ESALQ/USP, Tese Doutorado em Agronomia. 2000. 134p..

PERECIN, M.B.; KAGEYAMA, P.Y. Variabilidade enzimática em populações naturais de espinheira – santa *Maytenus aquifolia* Mart e *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reiss e suas implicações para o manejo da conservação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.4 n2, p.80 – 90, 2002.

RAJORA, O.P. Molecular biology in sustainable forest management. In: ESPINEL, S., RITTER, E. (Ed.). **Proceedings of application of biotechnology to forest genetics: BIOFOR 99**. Madrid: Vitoria-Gasteiz, 1999. p.29-39

REIS MS, 1996. **Manejo sustentado de plantas medicinais em ecossistemas tropicais**. In: **Plantas Mediciniais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar (Di Stasi LC, ed). São Paulo: EDUNESP; 199–215.

REIS, M. Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para a conservação e manejo de populações naturais em plantas. **Revista Brasileira de Genética**, v. 19, n. 4, p. 37-47, 1996.

ROHLF, F.J.. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1 manual. **Applied Biostatistics**, New York. 2000.

SCHNEIDER, S.; KUEFFER, J. M.; ROESSLI, D.; EXCOFFIRER, L. **Arlequin Ver.1.1: a software for population genetic data analysis**. Genetics and analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. 1997.

SEOANE, C.E.S., KAGEYAMA, P.Y. & SEBBENN, A.M. .Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Inglaterra (Guarantã). **Scientific Forest**, v.57, p.123-139. 2000. (<http://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr57/cap09.pdf>)

TORIBIO, M.; CELESTINO, C. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. **Investigación Agraria**, Madrid, v.2, p.249-60, 2000.

TOQUICA, S.P.; RODRÍGUEZ, F.; MARTINEZ, E.; DUQUE, M.C.; TOHME, J. **Molecular characterization by AFLPs of Capsicum germplasm from the Amazon department in Colombia**. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v.50, n.6, p.639-647, 2003.

ZUCCHI, M. I., PINHEIRO, J. B., CHAVES, L. J., COELHO, A.G.S., COUTO, M.A, MORAIS, L.K., VENCOVSKY, R. **Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations**. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília, [online]. 2005, v.. 40, n. 10 [cited 2007-01-09], pp. 975-980. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-

204X2005001000005&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0100-204X. doi: 10.1590/S0100-204X2005001000005.

VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M.; CERVI, A.C. High resolution gas chromatography analysis of espinheira santa' (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*): analysis of crude drug adulterations. **Phytotherapy research**, v.8, n 4, p. 241-244, 1994.

VILEGAS, J.H.Y.; Lanças, F.M.; Antoniosi Filho, N.R. High temperature capillary GC analysis of phytopreparations of "espinheira santa" (*Maytenus ilicifolia* M. and *Maytenus aquifolium* M. — Celastraceae), a Brazilian antiulcer plant **Chromatographia**, v.40, n. 5-6 / p341-344., mar, 1995. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/6vn3npm516u57g75/>. Acesso em: 23 nov 2006.

VILLEGAS, V.; MARTINEZ, J .C. ; AVILES, F. X.; SERRANO L. Structure of the transition state in the folding process of human procarboxypeptidase A2 activation domain. **Jounal Molecular Biology**. v.283, n.5, p.1027-36, nov 13, 1998. Disponível em : <http://www.ingentaconnect.com/content/ap/mb>. Acesso em 23 nov 2006.

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

WU, J., KRUTOVSKII, K. V. AND STRAUSS, S. H. Nuclear DNA diversity, population differentiation, and phylogenetic relationships in the California closed-cone pines based on RAPD and allozyme markers. **Genome**. v. 42. p. 893-908. 1999.