



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI  
PRÓ – REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
CAMPUS PARNAÍBA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBiotec**

**CLEITON BARROSO BITTENCOURT**

**ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE  
*Pilocarpus* spp. DA REGIÃO NORDESTE SETENTRIONAL POR MEIO DE  
MARCADORES ISSR e RAPD**

**PARNAÍBA – PI  
2019**

**CLEITON BARROSO BITTENCOURT**

**ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE  
*Pilocarpus* spp. DA REGIÃO NORDESTE SETENTRIONAL POR MEIO DE  
MARCADORES ISSR e RAPD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biologia Molecular

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanilza Moreira de Andrade

PARNAÍBA – PI  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba  
Serviço de Processamento Técnico

B624e Bittencourt, Cleiton Barroso.

Estudo de diversidade genética em populações naturais de *Pilocarpus* spp. da região nordeste setentrional por meio de marcadores ISSR e RAPD [recurso eletrônico] / Cleiton Barroso Bittencourt. – 2019.

1 CD-ROM ; 1 Arquivo em PDF

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2019.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanilza Moreira de Andrade.

1. Biotecnologia. 2. Jaborandi. 3. Diversidade. I. Título.

CDD: 660.6

CLEITON BARROSO BITTENCOURT

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Pilocarpus* spp. DA  
REGIÃO NORDESTE SETENTRIONAL POR MEIO DE MARCADORES ISSR e  
RAPD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biologia Molecular

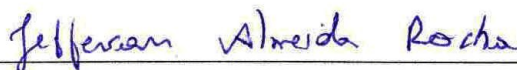
Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanilza Moreira de Andrade

Aprovada em: 24/06/19

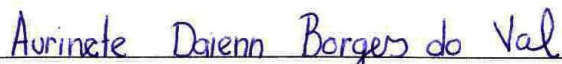
**BANCA EXAMINADORA**



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanilza Moreira de Andrade  
Universidade Federal do Piauí – UFPI  
Presidente



Prof. Dr. Jefferson Almeida Rocha  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aurinete Daicim Borges do Val  
Universidade Estadual do Piauí – UESPI

## AGRADECIMENTOS

À CAPES e ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec – UFPI) pela bolsa de estudos e auxílio financeiro que possibilitou a dedicação integral ao programa de pós-graduação e à operacionalização do estudo.

Aos meus queridos pais, **Francisco da Chagas** e **Eliana Lima**, por todo o incentivo, dedicação e por sempre acreditarem no meu futuro profissional. Aos meus amados irmãos: **Clécio Bittencourt** e **Clicia Bittencourt**, por me apoiarem incansavelmente ao longo dessa jornada. Amo vocês!

À minha namorada **Inês Marques**, por ser um ponto de equilíbrio e por ter estado sempre ao meu lado e a quem eu direciono uma incrível admiração. Amo-te!

À minha avó **Rita Barroso**, por ser um exemplo de superação, que me motiva a transpor todos os obstáculos que encontro pela frente.

À minha excelente e competente orientadora, **Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup> Ivanilza Moreira de Andrade**, por toda paciência e dedicação ao me ensinar.

Aos companheiros de laboratório: **Jéssica Cristina, Abrahão Lincoln, Juelina Santos, Jocélia Pinto, Renata Brito, Jéssica Maria, Agustin Gonzales, Davi Santos**, e aos demais, pela companhia em viagens de coleta, pelo apoio, pela ajuda nas tarefas diárias do laboratório e pelo ótimo convívio.

Aos professores do Mestrado em Biotecnologia que, ao longo desse curto período de tempo, ensinaram-me não somente a teoria e prática do nosso campo de estudo, como também, a amar a profissão na qual eu escolhi para viver.

A todos os meus familiares e amigos que contribuíram de alguma forma para que esse sonho se tornasse realidade.

A Deus por tudo, sempre.

Aos meus familiares,  
com todo o amor,  
dedico.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	VII
<b>ABSTRACT</b> .....	VIII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XI
<b>LISTA ABREVIATURAS</b> .....	XII
1. <b>APRESENTAÇÃO</b> .....	14
2. <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1 Família Rutaceae.....	15
2.2 <i>Pilocarpus</i> spp.....	18
2.2.1 <i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardlew.....	22
2.2.2 <i>Pilocarpus jaborandi</i> Holmes.....	23
2.2.3 <i>Pilocarpus demerarae</i> A.St.-Hil.....	25
2.3 Conservação de Espécies Nativas.....	26
2.4 Marcadores moleculares.....	28
2.4.1 Marcador Molecular RAPD.....	31
2.4.2 Marcador Molecular ISSR.....	32
3. <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33
4. MANUSCRITO: ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DE JABORANDI ( <i>PILOCARPUS</i> spp.) EM POPULAÇÕES NATURAIS DA REGIÃO NORDESTE SETENTRIONAL USANDO MARCADOR MOLECULAR ISSR E RAPD.....	43
4.1 <b>INTRODUÇÃO</b> .....	44
4.2 <b>METODOLOGIA</b> .....	47
4.3 <b>RESULTADOS</b> .....	50
4.4 <b>DISCUSSÃO</b> .....	54
4.5 <b>CONCLUSÃO</b> .....	58
4.6 <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	58
5 <b>APÊNDICES</b> .....	63
6 <b>ANEXOS</b> .....	69

## RESUMO

*Pilocarpus* Vahl, conhecido popularmente como jaborandi, é um gênero neotropical com distribuição na América Central e do Sul tendo, como seu centro de diversidade, a região Norte e Nordeste do Brasil. O grupo sofreu intenso extrativismo para obtenção de pilocarpina, alcaloide utilizado para o tratamento de glaucoma primário. Como a redução populacional coloca em risco espécies importantes economicamente, a avaliação da diversidade genética é primordial para criação de estratégias de conservação mais eficazes. Objetivou-se avaliar a diversidade genética em populações naturais de *Pilocarpus* spp. localizadas na Região Nordeste Setentrional mediante marcadores moleculares ISSR e RAPD. Foram amostradas sete populações de jaborandi dos estados do Ceará, Maranhão e Piauí das seguintes espécies: *Pilocarpus demerarae* Sandwith, *Pilocarpus jaborandi* Holmes e *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm. Utilizou-se 10 *primers* ISSR e quatro *primers* RAPD e, com os dados gerados, foram estimados os índices de diversidade intra, interpopulacional e de agrupamentos. Os polimorfismos apresentados pelos marcadores tiveram uma média de 63,90% (ISSR) e 59,75% (RAPD). Os resultados de PIC (0,210), MI (2,23) e RP (4,78) para os marcadores combinados indicaram que são informativos para estudo em *Pilocarpus* spp. A taxa de polimorfismo dentro das populações variou de 21,90% a 36,19%, com valores médios do Índice de Diversidade de Shannon (*I*) e Heterozigozidade Esperada (*He*) baixos (0,129 e 0,080). As populações com os menores valores foram Centro de Ramos e Mata Fresca, enquanto o maior foi Cutias, todas representadas pela espécie *P. microphyllus*. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) evidenciou 63% da variabilidade interpopulacional e 37% intrapopulacional. O valor de PhiPT (PhiPT = 0,631) indicou uma grande estruturação das populações e o dendrograma gerado pela UPGMA e de estruturação mostraram a formação de grupos distintos. Os marcadores moleculares utilizados mostraram-se eficazes para o estudo de diversidade em *Pilocarpus* spp e evidenciou-se uma diferenciação entre os genótipos de *P. microphyllus*, *P. jaborandi* e *P. demerarae*. Todas as populações apresentaram baixa diversidade genética, possivelmente resultado de pressões antrópicas nas últimas décadas. Dado o grande valor econômico do grupo são necessários projetos que visem à conservação das áreas onde se encontram as populações estudadas, aumento do fluxo gênico e a criação de bancos de germoplasma para a recuperação e manutenção da diversidade em *Pilocarpus* spp.

**Palavras-chave:** Jaborandi; Biotecnologia; Diversidade.



## ABSTRACT

*Pilocarpus* Vahl, popularly known as jaborandi, is a neotropical genus with distribution in Central and South America, having as its center of diversity the northern and northeastern region of Brazil. The group suffered intense extraction to obtain pilocarpine, alkaloid used for the treatment of primary glaucoma. Because population reduction endangers economically important species, assessing genetic diversity is paramount to creating more effective conservation strategies. The objective was to evaluate genetic diversity in natural populations of *Pilocarpus* spp. located in the Northeast Region by molecular markers ISSR and RAPD. Seven populations of jaborandi were sampled from the states of Ceará, Maranhão and Piauí of the following species: *Pilocarpus demerarae* Sandwith, *Pilocarpus jaborandi* Holmes e *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm. 10 ISSR primers and four RAPD primers were used, and with the data generated the intra, interpopulation and cluster diversity indices were estimated. The polymorphisms presented by the markers had an average of 63.90% (ISSR) and 59.75% (RAPD). The PIC (0.210), MI (2.23) and RP (4.78) results for the combined markers indicated that they are informative for study in *Pilocarpus* spp. The polymorphism rate within populations ranged from 21.90% to 36.19%, with average values of Shannon Diversity Index (I) and Expected Heterozygosity (He) low (0.129 and 0.080). The populations with the lowest values were Centro de Ramos and Mata Fresca, while the largest was Cutias, all represented by *P. microphyllus*. Molecular Variance Analysis (AMOVA) showed 63% of interpopulation and 37% intrapopulation variability. The PhiPT value (PhiPT = 0.631) indicated a large population structure and the dendrogram generated by UPGMA and structuring showed the formation of distinct groups. The molecular markers used were effective for the study of diversity in *Pilocarpus* spp and showed a differentiation between *P. microphyllus*, *P. jaborandi* and *P. demerarae* genotypes. All populations showed low genetic diversity, possibly resulting from anthropogenic pressures in recent decades. Given the great economic value of the group, projects are needed to conserve the areas where the populations studied are located, increase gene flow and create germplasm banks for the recovery and maintenance of diversity in *Pilocarpus* spp.

**Keywords:** Jaborandi; Biotechnology; Diversity

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1.	Estrutura molecular da <i>Pilocarpina</i> .....	18
Figura 2.	Distribuição de <i>Pilocarpus</i> spp na América Central e América do Sul.....	19
Figura 3.	<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardlew. A – Ramo com inflorescência. B – detalhe da folha. C – zona de mata fechada no município de Luzilândia.....	23
Figura 4.	<i>Pilocarpus jaborandi</i> Holmes. A – ramo com inflorescência; B – indivíduo em ambiente de mata fechada em Barra do Corda – Maranhão.....	24
Figura 5.	<i>Pilocarpus demerarae</i> Lem. A – ramo com inflorescência; B – ambiente de mata fechada em Barra do Corda/Maranhão.....	26

### MANUSCRITO – I

Figura 1.	Localização das populações de <i>Pilocarpus</i> spp estudadas nos estados do Ceará, Maranhão e Piauí.....	69
Figura 2.	Dendrograma obtido pelo método de análise de agrupamento UPGMA com base na distância de Nei (1978) das populações de <i>Pilocarpus</i> spp. com marcadores RAPD usando PAST version 2.17c (HAMMER et al., 2001). (PMM: Mata Fresca, PMC: Centro de Ramos, PDB: Barra do Corda, PMS; Sumauma da Mata, PJJ: Juá de Vieira e PJS: Saco).....	69
Figura 3.	Dendrograma obtido pelo método de análise de agrupamento UPGMA com base na distância de Nei (1978) das populações de <i>Pilocarpus</i> spp. com marcadores ISSR usando PAST version 2.17c (HAMMER et al., 2001). (PMM: Mata Fresca, PMC: Centro de Ramos, PDB: Barra do Corda, PMS; Sumauma da Mata, PJJ: Juá de Vieira e PJS: Saco).....	70
Figura 4.	Análise de variância molecular (AMOVA) baseada no parâmetro PhiPT, mostrando variância genética dentro e entre as sete populações de <i>Pilocarpus</i> utilizando Computed with GenAlEx 6.502 (PEAKALL; SMOUSE 2012).....	70
Figura 5.	Dendrograma obtido pelo método de análise de agrupamento UPGMA com base na distância de Nei (1978) das populações de <i>Pilocarpus</i> spp. com marcadores ISSR e RAPD usando PAST version 2.17c (HAMMER et al., 2001).. (PMM: Mata Fresca, PMC: Centro de Ramos, PDB: Barra do Corda, PMS; Sumauma da Mata, PJJ: Juá de Vieira e PJS: Saco).....	71
Figura 6.	Ordenação de uma Análise de Coordenadas Principais, mostrando as sete populações do espaço dos eixos 1 (48,11% variância) e 2 (26.80%	

	variância) usando PAST version 2.17c (HAMMER et al., 2001).. A linha representa a árvore de expansão mínima (MST) entre as populações PDB (Baixão do Murici); PJS (Saco); PJJ (Juá de Vieira); PMC (Centro de Ramos); PML (Cutias); PMM (Mata Fresca); PMS (Sumauma da Mata).....	71
Figura 7.	Ordenação de uma Análise de Coordenadas Principais, mostrando as sete populações do espaço dos eixos 2 (26,80% variância) e 3 (15,05% variância) usando PAST version 2.17c (HAMMER et al., 2001). A linha representa a árvore de expansão mínima (MST) entre as populações PDB (Baixão do Murici); PJS (Saco); PJJ (Juá de Vieira); PMC (Centro de Ramos); PML (Cutias); PMM (Mata Fresca); PMS (Sumauma da Mata).....	72
Figura 8.	Análise de coordenadas principais (PCoA) usando a distância genética GD entre todos os indivíduos de sete populações de <i>Pilocarpus</i> , calculada usando Genalex 6.502 (PEAKALL; SMOUSE 2012).....	72
Figura 9.	Valores de L(K) - Likelihood para o agrupamento de todas as populações de <i>Pilocarpus spp</i> utilizando o programa Structure 2.3.4.....	73
Figura 10.	Dados de agrupamento mostrando todas as populações de <i>Pilocarpus spp.</i> com K=5. Gerados pelo programa Structure 2.3.4.....	73

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1.	Classificação da família Rutaceae.....	16
-----------	--	----

### MANUSCRITO I

Tabela 1.	Populações, espécies e locais de coleta de <i>Pilocarpus</i> spp para as análises RAPD e ISSR.....	63
Tabela 2.	Resumo da amplificação de 10 <i>primers</i> ISSR e 4 <i>primers</i> RAPD usados para as análises de diversidade genéticas em genótipos do gênero <i>Pilocarpus</i> .....	64
Tabela 3.	Resumo de vários parâmetros para diferentes marcadores (RAPD e ISSR) utilizados no estudo.....	66
Tabela 4.	Diversidade genética estimada para as sete populações de <i>Pilocarpus</i> usando o programa Genalexv para os marcadores ISSR e RAPD. N – Tamanho da amostra, Na – Número de diferentes alelos, Ne – Número de alelos efetivos, I – Índice de Shannon, He – Heterozigosidade Esperada, uHe – Heterozigosidade Esperada imparcial, %P – Porcentagem de locos polimórficos.....	66
Tabela 5.	Valores do índice de fixação PhiPT, entre pares de populações de <i>Pilocarpus</i> Vahl. com marcadores ISSR e RAPD. PDB (Baixão do Murici); PJS (Saco); PJJ (Juá de Vieira); PMC (Centro de Ramos); PML (Cutias); PMM (Mata Fresca); PMS (Sumauma da Mata).....	67
Tabela 6.	Estimativas de identidade (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei (1978) entre as populações <i>Pilocarpus</i> Vahl. com marcadores ISSR e RAPD. PDB (Baixão do Murici); PJS (Saco); PJJ (Juá de Vieira); PMC (Centro de Ramos); PML (Cutias); PMM (Mata Fresca); PMS (Sumauma da Mata).....	67
Tabela 7.	Autovalores da análise de coordenadas principais (PCoA) de variâncias populacionais utilizando a distância de Nei (1978) em sete populações de <i>Pilocarpus</i> . Computado usando o PAST versão 2.17c (Hammer et al. 2001).....	68
Tabela 8.	Análise da variância molecular (AMOVA) de sete populações de <i>Pilocarpus</i> com marcadores moleculares ISSR e RAPD. O valor P ** foi calculado por um teste de permutação (999 replicações) em todo o conjunto de dados e significa a probabilidade de obter por acaso um valor maior ou igual ao valor observado de PhiPt*. Computações feitas usando o GenAlEx 6.502 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMOVA	Analysis of Molecular Variance – análise da variância molecular
ATCC	American Type Culture Collection
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	EthyleneDiamine Tetraacetic Acid
FC	Fragmentos Comuns
FE	Fragmentos Estáveis
FF	Fragmentos Frequentes
<i>fp</i>	Frequência de fragmentos polimórficos
FP	Fragmentos Polimórficos
FR	Fragmentos Raros
FU	Fragmentos Únicos
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
MI	Index – Índice do marcador
MIC	Minimal Inhibition Concentration
NFC	Número de Fragmentos comuns
NFE	Número de Fragmentos Estáveis
NFF	Número de Fragmentos Frequentes
NFP	Número de Fragmentos Polimórficos
NFR	Número de Fragmentos Raros
NFU	Número de Fragmentos Únicos
NTF	Número Total de Fragmentos
<i>p</i>	Probabilidade
PIC	<i>Polymorphism Information Content</i> - conteúdo da informação de polimorfismo
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
<i>r</i>	Coefficiente de <i>Pearson</i>
RNA	RiboNucleic Acid – Ácido ribonucleico
RP	<i>Resolution Power</i> – Poder de resolução
rpm	Rotações por minuto

STS	Sequence Tagged Site
Ta	Temperatura de anelamento
Taq	<i>Thermis aquaticus</i>
TE	Tris EDTA buffer – tampão Tris EDTA
UBC	University of British Columbia – Universidade da Columbia Britânica
UFPI	Universidade Federal do Piauí

## 1. APRESENTAÇÃO

O Brasil é o país que possui a maior diversidade biológica vegetal no mundo, contabilizando 46.715 mil espécies de plantas, das quais 33.280 são Angiospermas e 10 mil são exclusivas (endêmicas) do território nacional (Flora do Brasil 2020 em Construção, 2019a). Dentre as famílias de Angiospermas, Rutaceae é uma das famílias mais representativas, compreendendo aproximadamente 161 gêneros e 2070 espécies em todo o mundo (ZEQUIN, 2018). No Brasil o grupo está representado por 32 gêneros, 194 espécies, 17 subespécies bem distribuídas em todo território nacional (PIRANI; GROppo, 2015).

*Pilocarpus* Vahl é um gênero de arbustos e arvoresitas incluídas na família Rutaceae com 17 espécies catalogadas (CALDEIRA et al., 2017). No Brasil, centro de diversidade do grupo, estão representados 15 espécies, das quais 11 são endêmicas e designadas popularmente como jaborandi, bem distribuídas em todas as formações vegetais (SKORUPA, 2000; OLIVEIRA, 2007; PIRANI; GROppo, 2015; CALDEIRA et al., 2017).

O gênero se tornou conhecido por ser fonte natural da droga pilocarpina, um alcaloide parassimpaticomimético extraído das folhas e utilizado na oftalmologia para contração da pupila e tratamento de glaucoma primário (FILHO et al., 2003; LIMA et al., 2015). Na década de 1970 os medicamentos à base de pilocarpina representaram cerca de 70% no mercado mundial e, atualmente, a pilocarpina está entre os compostos do gênero mais estudados devido a sua atividade sobre o sistema nervoso (FILHO et al., 2003; SILVA, 2015; SILVA, 2016).

O interesse pelas propriedades medicinais e produção de medicamentos levou ao extrativismo intenso de folhas de *Pilocarpus* spp nos estados do Ceará, Maranhão e Piauí, ocasionando a redução de populações naturais (PINHEIRO, 2002; HOMMA; MENEZES, 2014; COSTA, 2016). O extrativismo associado a outros fatores antrópicos levaram *Pilocarpus alatus* C.J. Joseph ex Skorupa, *Pilocarpus jaborandi* Holmes *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm, e *Pilocarpus trachylophus* Holmes a serem incluídas na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas de Extinção (CNCFLORA, 2016) e, bem como outros grupos importantes para a indústria farmacêutica, requerem esforços para a manutenção de suas populações naturais em zonas que estão sendo intensamente degradadas (AGUIAR et al., 2015; GOIS; FERREIRA; MANN, 2018).

Para a definição de estratégias de conservação e uso sustentável de recursos vegetais tem sido de fundamental importância o conhecimento dos padrões de diversidade genética

intra e entre populações (RIBEIRO et al., 2016; GOIS; FERREIRA; MANN, 2018). Assim, com a necessidade de geração de dados para o manejo adequado de populações que sofreram perda da riqueza genética, os marcadores moleculares baseados em análise direta do DNA têm sido ferramentas biotecnológicas importantes para os estudos genéticos atuais (ROCHA, 2013; BARUAH et al., 2017).

Dentre os marcadores moleculares hoje disponíveis, os ISSRs (*Inter-Simple Sequence Repeat*) são bastante utilizados pelo fato de promoverem a rápida diferenciação entre indivíduos aparentados, elevado grau de polimorfismo e baixo custo (ZIETKIEWICZ et al., 1994; BORBA et al., 2005; BANDEIRA; DEIMLING; KRAEMER, 2010). Outro marcador utilizado com a mesma finalidade, mesmo com a disponibilidade de técnicas mais avançadas, são os RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) que, combinados com ISSR, tem sido os mais utilizados e tem fornecido uma confiabilidade maior aos estudos de diversidade de muitas espécies (KULHARI et al., 2015; COSTA et al., 2016).

Em virtude da importância e do histórico de utilização do gênero *Pilocarpus* pela indústria farmacêutica, a qual tem levado a crítica redução de populações naturais no país e a necessidade de dados que promovam projetos de conservação eficazes para o grupo, objetivou-se com este estudo avaliar a diversidade genética de *Pilocarpus* spp. em populações naturais do nordeste setentrional, Ceará, Maranhão e Piauí, com o uso dos marcadores moleculares ISSR e RAPD.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Família Rutaceae Juss.**

Rutaceae Juss. compreende 161 gêneros e 2070 espécies distribuídas por todo o mundo, especialmente em regiões temperadas e tropicais quentes (ZEQUIN, 2018) onde os maiores centros de diversidade são encontrados no sudeste da África e Austrália (BAYER et al., 2009). Para o Brasil estão registrados 32 gêneros, 194 espécies, e 17 subespécies (Flora do Brasil 2020 em Construção, 2019b), ocorrendo na Floresta Amazônica, na Caatinga e na Mata Atlântica, incluindo sua porção subtropical deste bioma, desenvolvendo-se, assim, em condições ecológicas diversas (SKORUPA, 2000; SAWAYA et al., 2011).

Rutaceae é uma família de plantas, principalmente de árvores e arbustos que possuem como sinapomorfia a presença de glândulas translúcidas em suas folhas, a qual se caracteriza por serem cavidades secretoras multicelulares que produzem óleos essenciais aromáticos



(JUDD et al., 2009). Esta família pertence à ordem Sapindales – “malvids”, ”rosids”, “core eudicots” e está dividida em sete subfamílias, cinco tribos e 25 subtribos (Tabela 1) (CHASE et al., 2016). A subfamília mais conhecida, a Aurantioideae, inclui todas as espécies de *Citrus* e outros gêneros de interesse econômico dentro do grupo, tais como *Boronia* Sm, *Choisya* Kunth, *Poncirus* Raf, *Skimmia* Thunb e *Pilocarpus* Vahl. (FERRERES et al., 2010).

Tabela 1: Classificação da família Rutaceae.

Subfamília	Tribo	Subtribo
Rutoideae	Zanthoxyleae	Euodiinae, Lunasiinae, Decatropidinae, Pitaviinae, Choisyinae
	Ruteae	Rutinae, Dictamninae
	Boroniaeae	Boroniinae, Correinae, Eristemoninae, Nepatolepidinae, Diplolaeninae
	Diosmeae	Empleurinae, Diosminae e Calodendrinae
	Cuspariaeae	Cuspariinae, Pilocarpinae
Dictyolomatoideae		
Flindersioideae		
Spathelioideae		
Toddalioideae		Phellodendrinae, Sohnreyiinae, Pteleinae, Oriciinae, Toddaliinae, Amyridinae
Aurantioideae		Hesperathusinae, Citrinae
Rhabdodendroideae		

Fonte: STEVENS (2012).

As Rutáceas são caracterizadas por apresentar folhas alternas ou menos frequentemente opostas, compostas ou raramente simples, margem inteira ou serrada, presença de glândulas pontuadas pelúcidas nas folhas. São monoicas ou dioicas, as inflorescências basicamente cimosas, raramente racemosas, podem até ser reduzidas a uma única flor. Estas geralmente são actinomorfas e diclamídeas, com prefloração valvar ou imbricada. A ocorrência de estaminódio não é raro nessa família. Os estames apresentam número igual ou duplo ao das pétalas ou frequentemente menos numerosos, raramente em números inferiores, geralmente livres entre si e anteras rimosas. O gineceu é gamocarpelar ou dialicarpelar com placentação axial ou pêndula, ovário súpero e lóculos uni- ou pluriovulados. O fruto é do tipo drupa, baga, cápsula ou folículo (PIRANI, 2002).

Rutaceae têm um papel importante na ecologia da vegetação da região amazônica pelo fato de suas espécies estarem presentes dentro dos mais variados tipos de habitats, como: matas primária e secundária de terra firme, campinas, campiranas, savanas várzeas, igapós, margens de isgos e igarapés, encostas de elevações, pastos secos, margens de estradas e em clareiras de agricultura (ALBUQUERQUE, 1976; SILVA; PAOLI, 2006; NETO et al., 2009). Seus representantes estão presentes ainda nas matas ciliares, uma estrutura florestal considerada de grande valor ecológico, pois garante proteção a mananciais, controlam a chega de nutrientes, sedimentos e erosão das margens dos riachos (AMARAL et al., 2012).

A importância marcante no setor madeireiro evidencia-se pelo uso de algumas espécies, tais como *Euxyphora paraensis* Huber. ("pau-amarelo") para trabalhos de assoalhos, construção civil pesada interna, embarcações (quilha, convés, costado), ponte, construções marítimas (acima d'água) e torneamento (MARGALHO et al., 2014). *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. ("tamanqueira da terra firme") é de grande importância para a indústria madeireira pelo fato de sua madeira fornecer um rendimento em celulose da ordem de 45% e é usada para a produção de papel. É também uma árvore ornamental em virtude de sua forma e densidade da copa, empregada no paisagismo, principalmente para a arborização (COSTA et al., 2014).

No campo alimentício, o gênero *Citrus* é representado na maioria por laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limões (*Citrus limon*), limas ácidas como o Tahiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*Citrus aurantiifolia*), e doces como a lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja-azeda (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis*) (MATTOS et al., 2005). *Citrus* está distribuído por todo o país, situando o Brasil como um dos maiores produtores e exportadores de frutas cítricas no mundo (MAPA, 2014) e responsável por 60% da produção mundial de suco de laranja, o que coloca o país como o campeão de exportação do produto (DERETTI et al., 2015).

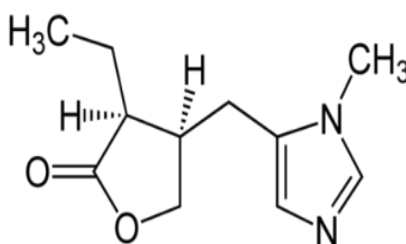
Outra área marcante de uso desta família se dá na produção de óleos essenciais, visto que o Brasil entre 2005 e 2008 exportou 287.759 toneladas de óleos de frutas cítricas, 86% de laranja, 8% de limão, 3% de lima e 3% de outros cítricos (BIZZO et al., 2009). Os óleos essenciais de Rutaceae têm diferentes aplicações incluindo perfumaria, farmacêutica, materiais de limpeza, alimentos e bebidas (BAKKALI et al., 2008). Além disso, essas substâncias voláteis há tempos vêm sendo utilizadas como base para a aplicação em diversas

áreas da medicina e são crescentes as pesquisas que buscam atividades terapêuticas de origem natural (NASCIMENTO et al., 2007)

Um grande número de espécies da família são conhecidas por suas atividades farmacológicas (VILLALBA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2015; LIMA et al., 2015 ) que incluem o tratamento de distúrbios gastrointestinais, dor abdominal, regurgitação ácida, náusea, diarreia, hérnia, entre outras (GUIMARÃES et al., 2015; LIMA et al., 2015). Essa ampla gama de atividades biológicas é atribuída à presença de metabólitos secundários produzidos por diferentes espécies dessa família, como alcaloides, dihydrochalcones, cumarinas, flavonoides, terpenos e outros (BENIDDIR et al., 2014). *Spiranthera odoratíssima* ST. Hil, por exemplo, cujas raízes na forma de chá, são utilizadas no tratamento do reumatismo, além de ter efeitos positivos contra dores de estômago, dores de cabeça, musculares, disfunções hepáticas e estimular o apetite (MATOS et al., 2014).

Dentre os compostos encontrados em Rutaceae com propriedades medicinais destacam-se os metabólitos secundários (LIMA et al., 2015). O alcaloide pilocarpina (Figura 1), por exemplo, é extraído exclusivamente das folhas de espécies de *Pilocarpus* Vahl, que serve de base para a produção de mióticos que visam à cura e o tratamento de glaucoma primário (PINHEIRO, 2002; SANTOS; MORENO, 2014; LIMA et al., 2015). Ainda por conta da sua atividade ativadora do sistema nervoso parassimpático, essa biomolécula tem possibilitado a redução dos sintomas de xerostomia além de ser fonte de muitos estudos de aplicação médica (ALMEIDA; KOWALSKI, 2010; BITTENCOURT et al., 2018).

Figura 1: Estrutura molecular da Pilocarpina.



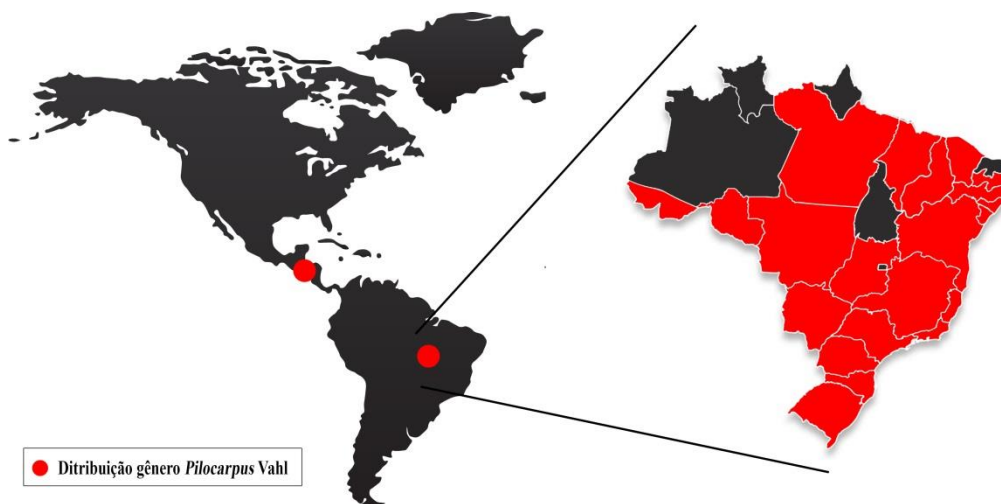
Fonte: autor (2019).

## 2.2. *Pilocarpus* Vahl. (Jaborandi)

Jaborandi é o nome popular que designa diversas espécies de *Pilocarpus* Vahl (PINHEIRO, 2002; CALDEIRA et al., 2017). No mundo, existem 17 espécies descritas para

este gênero, distribuídas na América Central e América do Sul (Figura 2) (OLIVEIRA, 2007; CALDEIRA et al., 2017). Para o Brasil foram descritas 15 espécies das quais 11 ocorrem exclusivamente em território nacional (PIRANI; GROppo, 2015). A maior concentração de espécies é observada nas porções Norte-Nordeste do país, com destaque para o estado do Maranhão onde já foram descritas oito espécies (CALDEIRA et al., 2017; SPECIESLINKS, 2019).

Figura 2: Distribuição de *Pilocarpus* spp na América Central e América do Sul (TROPICOS, 2019; Flora Do Brasil Em Construção 2020, 2019c).



Fonte: autor (2019).

O gênero pertence ao subtribo Pilocarpinae, tribo Cusparieae, subfamília Rutoideae, sendo um dos 161 gêneros que compõem a família Rutaceae, (OLIVEIRA, 2007). Os seus representantes são geralmente arbustos ou pequenas árvores com longos racemos e pequenas flores actinomorfas, 4-5-meras, as quais possuem um gineceu com carpelos fundidos apenas na base, resultando em mericarpos. A inflorescência é racemosa ou espiciforme, podendo ser terminal (SKORUPA, 2000; PINHEIRO, 2002; SKORUPA; PIRANI, 2004).

Suas folhas eram utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de doenças que acometia os índios da Amazônia, onde ainda eram empregadas em rituais xamânicos para tratamento da febre, estomatite e como antídoto para venenos e toxinas (HOLMSTEDT et al., 1979). Por conta dessas propriedades, o gênero se tornou bastante conhecido e seu uso foi transmitido por gerações até ser levado pela primeira vez para realização de aulas práticas de farmacológica na Europa (CALDEIRA et al., 2017). Foi a partir do estudo aprofundado de

compostos em suas folhas que foram extraídos e identificados os primeiros alcaloides imidazólicos, incluindo a pilocarpina, a qual tornou o grupo popularizado no meio científico (HOLMSTEDT; WASSÉN SCHULTES, 1979; ROCHA, 2013; LIMA et al., 2015).

Como única fonte natural da droga pilocarpina, metabólito secundário com ação colinérgica direta, o grupo passou a ser extensamente utilizado na oftalmologia para a fabricação de mióticos para o tratamento de glaucoma primário ou mesmo em cirurgia (SKORUPA; PIRANI, 2004; PINHEIRO, 2002; LIMA et al., 2015). Na década de 1990, além de já servir de base para a produção de mióticos comercializados mundialmente, a agência que regula a liberação de medicamentos nos Estados Unidos aprovou o uso da pilocarpina para o tratamento da xerostomia pós-irradiação em pacientes com câncer (MOURA, 2003; SANTOS; MORENO 2004; MIURA, 2009).

Além da pilocarpina, já foram identificados em espécies de *Pilocarpus*, outros alcalóides como: isopilocarpina (um isômero da pilocarpina), pilosina, isopilosina (isômero da pilosina), pilocarpidina, jaborandina e epiisopiloturina, dentre outros (LEWIS; EDWIN-LEWIS, 1977; MIURA, 2009). Estes alcaloides são encontrados na maioria dos representantes do gênero e, embora alguns apresentem semelhança estrutural com a pilocarpina, apenas esta última possui atividade colinérgica, atuando no SNC como estimulante do sistema nervoso parassimpático (PINHEIRO, 1997; TAVEIRA et al., 2003; CALDEIRA et al., 2017).

*P. microphyllus* é o representante mais estudado quanto à caracterização dos seus compostos químicos (SAWAYA et.al., 2011; VÉRAS et al., 2013) e, além da pilocarpina, outros alcaloides imidazólicos já foram descritos com possível potencial farmacológico, biotecnológico e/ou como protótipos na obtenção de moléculas bioativas a exemplo da macaubina, isopilocarpina, epiisopilosina, epiisopiloturina, isopilosina, pilosina e seus isômeros em concentrações variáveis (LUCIO et al., 2000; LORENZI et al., 2002; SANTOS; MORENO, 2004; BENTO et al., 2010; SAWAYA et.al., 2011; VERAS et al., 2012). Esta espécie também é a que possui o maior número de tecnologias patenteadas que envolvem, principalmente, aplicações no tratamento do glaucoma e xerostomia e a química dos alcaloides (LIMA et al., 2015). Por conta do grande valor agregado à espécie, projetos de manejo foram realizados com objetivo reduzir a mortalidade que afeta as populações naturais devido à coleta intensiva de folhas (PINHEIRO, 2002; CALIL et al., 2008; LIMA et al., 2017) e estudo de variabilidade nos estados do Maranhão, Pará e Piauí promoveram dados

importantes sobre os padrões de diversidade na Região Nordeste Setentrional de grande valia para projetos de conservação (ROCHA, 2013).

*P. jaborandi*, outra espécie com histórico de comercialização de folhas para a produção de pilocarpina (COSTA, 2016), também apresenta expressivo número de pesquisas (SCOPUS, 2019), sendo já isolado de suas folhas a isopilocarpine, pilocarpidine isopilosine e outros metabólitos secundários como cumarinas, flavonoides, terpenos, esteroides entre outros (SANTOS; MORENO, 2004). Apesar de ser uma das primeiras espécies do grupo a ser utilizada pela medicina tradicional, apresenta ainda poucas coletas botânicas, o que contribui para a dificuldade de se estabelecer estratégias de conservação eficiente e busca de dados ecológicos da espécie (SCHEFFER; MING; ARAUJO, 1999; SANTOS; MORENO, 2004; OLIVEIRA, 2010).

Seguindo o mesmo interesse de pesquisas relacionadas à atividade biológica do gênero, *P. spicatus*, ocorrente exclusivamente em território nacional nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia, apresenta pesquisas de caracterização e atividade biológica de seus componentes químicos (SANTOS; MORENO, 2004; OLIVEIRA et al., 2010; MADEIRO et al., 2016). Estudos fitoquímicos desse representante demonstraram a presença de cumarina chalepina, que desempenha papel tripanomicidade entre outros metabólitos secundário, e a atividade de extrato bruto do caule de *P. spicatus* e sua fracção apresentaram resultados superiores a 80% de inibição contra *T. cruzi* (MAFEZOLI et al., 2000).

Para *Pilocarpus penatifolius* não é reportado a presença de pilocarpina. No entanto, dados mostram que extratos dessa espécie possuem promissora atividade antimicrobiana e antifúngica, e que podem ser fonte alternativa para o tratamento de doenças causadas por bactérias (CARMO et al., 2018), com exceção de *P. microphyllus*, *P. jaborandi*, *P. spicatus* e *P. penatifolius*. Poucas espécies do gênero tiveram pesquisas relacionadas à busca de compostos com atividade biológica e, mesmo estando bem distribuídos em todas as regiões do país, os dados sobre o estado de conservação das espécies são escassos ou quase inexistentes (CALDEIRA et al., 2017)

O extrativismo intenso da jaborandi desde 1969 fez com que o estoque natural de folhas diminuísse gradativamente e um estudo sobre a domesticação da espécie começou a ser feito, com princípios básicos de prospecção, coleta e avaliação de material (PINHEIRO, 2002; LIMA et al., 2015). Porém, mesmo com os esforços para reduzir os impactos sobre populações naturais, algumas espécies de jaborandi foram incluídas em lista de espécies

ameaçadas de extinção (CNCFLORA, 2016) e nas últimas décadas, os estados do Ceará, Maranhão, Piauí e Pará continuam sendo o centro de extrativismo das folhas para a produção de pilocarpina ou para uso na medicina tradicional (PINHEIRO, 2002; COSTA, 2016; HOMMA; MENEZES 2014; LIMA et al., 2015).

As plantas medicinais que apresentam grande valor econômico, a exemplo do jaborandi, tem prioridade em programas de conservação (SILVA; FREIRE 2010). Em virtude da redução populacional devido ao extrativismo intenso de folhas de jaborandi, a empresa alemã Merck iniciou estudos de domesticação de jaborandi no estado do Maranhão (PINHEIRO, 2002; LIMA et al., 2015). Em 1992, foi estabelecido um banco de germoplasma de *P. microphyllus* na Embrapa Amazônia Oriental em Belém, Pará, visando sua conservação ou utilização em programas de melhoramento genético (SKORUPA, 2000; PINHEIRO, 2002; LIMA, 2015). Mais recentemente, um grupo que envolveu a mineradora Vale SA e instituições como os órgãos ambientais IBAMA e ICMBio iniciou uma série de atividades conservacionistas e sociais na região de colta. Floresta Nacional e comunidades vizinhas. Em relação às atividades de *P. microphyllus*, foi incluído: o estabelecimento de um banco de germoplasma e acessos de resgate; o mapeamento das populações presentes dentro da Reserva Nacional de Carajá; e ajuda aos coletores na organização de uma cooperativa a fim de realizar o manejo sustentável de *P. microphyllus* (CALDEIRA et al., 2017).

### **2.2.1. *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew**

De acordo com Kaastra (1982), as populações de *P. microphyllus* nativa do Piauí, Maranhão e Pará são reconhecidas como arbusto, variando entre 1 a 1,5 m (Figura 3). Caule canalículado, pubescente, alado; folhas alternas, 4,5 - 12,5 x 3,5 - 6,5 cm, opostas ou subverticiladas, verde oliva, cartácea, imparipenadas, raras paripenadas, raque alada, pubescente, arqueadas formando canalículo; pecíolo cilíndrico, canaliculado, alado ou não, 3-11 cm e 1.5-3 mm, asas 0.1-0.2 mm larg., densamente piloso 0.3-0.6mm comp, ou glabros; folíolos 1,2 - 4,2 x 1 - 1,7 cm, variando de 3-9 (-11), coloração verde escuro na face adaxial e verde claro na face abaxial, sésseis, opostos, cartácea, glabra, elíptica a estreitamente ovada, ápice emarginado, base assimétrica, ráquila pubescente, margem inteira; venação braquidódroma, nervura central proeminente na face adaxial, plana ou levemente proeminente na abaxial, nervuras secundárias 4-9; folíolo terminal ovado, elíptica, ápice 21mm emarginado, base atenuada; estípula interpeciolar pubescente, 1-2 mm, e presença de

glândulas pontuadas pelúcidas nos folíolos; flores amarelo-esverdeadas, pequenas e arranjadas em racemos (cachos) compactos; frutos dispostos em cachos brancos, cápsulas deiscentes de córtex acinzentado e liso geralmente floresce de março a julho (em algumas regiões até setembro).

Figura 3: *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew. A – Ramo com inflorescência. B – detalhe da folha. C – zona de mata fechada no município de Luzilândia.



Fonte: autor (2018).

*P. microphyllus* Stapf ex Wardlew é uma espécie não endêmica do Brasil, ocorrendo nos estados do Pará, Maranhão e Piauí, no bioma da Floresta Amazônica e de Floresta de Terra Firme Pluvial a Estacional (CNCFLORA, 2019).

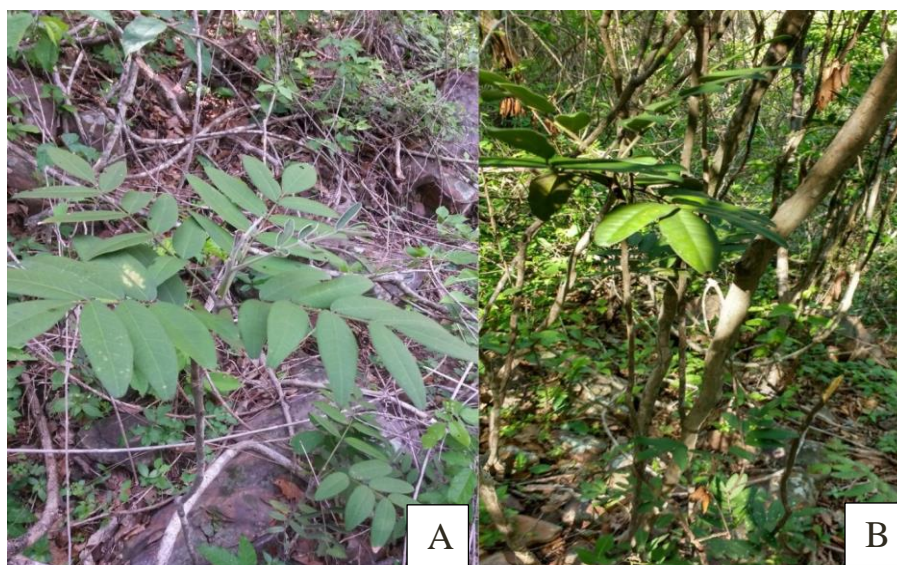
Considerado “jaborandi do Maranhão”, é uma das mais destacadas espécies medicinais brasileiras. Por conta do alto nível de pilocarpina em suas folhas, comparado aos outros representantes, é a mais comercializada para a obtenção deste metabólito secundário (LIMA et al., 2015). É fonte de várias pesquisas que vão desde estudo de diversidade genética que visam conservação do grupo (BANDEIRA; DEIMLING; KRAEMER, 2010), aplicação de metabólitos secundários com promissora atividade contra *Schistosoma mansoni* (VERAS et al., 2012), até atividade anti helmíntica e citotóxicas de alguns alcaloides imidazólicos (ROCHA, et al., 2017).



### 2.2.2 *Pilocarpus jaborandi* Holmes.

De acordo com Kaastra (1982) as populações dessa espécie, nativa do Bahia, Ceará e Pernambuco são reconhecidas como arbusto ou árvore com leve cheiro de queimadura (Figura 4), pouco glabro- exceto para os botões- ou peludo com mais ou menos pelos alourados retos um tanto maçantes; ramos 3-10 mm, grossos, cinzas, marrom-avermelhadas quando jovens, brilhantes, longitudinalmente enrugadas e rachadas, densamente pilosas, com pelos aloirados claros até 0,6 mm de compr. tornando-se glabros, pelos de botões terminais densamente pilosos; Folhas alternadas, imparipinadas, 2-5 jugadas, com os folhetos (espreitadelas) frequentemente atenuados, até 35x25cm, passando gradualmente de folhas simples a de 3-foliolado em folhas simples na porção proximal do cacho, estreitamente elíptico ou estreitamente ovalado, (4.5-) 6-13 x 1.5-5.5 (-6.5) cm arredondado na base (o folheto terminal também), ocasionalmente alguns folhetos atenuam a base, folíolos laterais fortemente desiguais na base e no folheto terminal mais ou menos igual, obtuso ou arredondado no ápice, a própria ponta emarginado, marginado, margem subulado, verde fosco, um pouco mais amarelado abaixo, glabro em ambos os lados, ou esparsamente piloso acima com pelo de 0,2-0,6 mm compr. na nervura média e perto da margem e mais ou menos densamente hirtellious abaixo com pelos 0.4-0.6 mm, nervura brochidodromo - comptodromo, proeminente em ambos os lados, nervura plano acima e enrugado ou não.

Figura 4: *Pilocarpus jaborandi* Holmes. A – ramo com inflorescência; B – indivíduo em ambiente de mata fechada em Barra do Corda – Maranhão.



Fonte: autor (2018)

*Pilocarpus jaborandi* é uma espécie endêmica do Brasil e restrita aos Estados do Ceará, Pernambuco e Bahia, tendo como biomas de dispersão em floresta da Caatinga e Mata Atlântica (CNCFLORA, 2019). Conhecida popularmente como Jaborandi de Pernambuco, foi uma das primeiras espécies do grupo a ser utilizada como medicinal e, mesmo com menor teor de pilocarpina em suas folhas, tem concorrido com *P. microphyllus* como fonte de pilocarpina para a produção de mióticos (SOUZA; MOURÃO; SOUZA et al., 2005). Além da pilocarpina de suas folhas também foram registradas a presença de isopilocarpine, pilocarpidine isopilosine e outros metabólitos secundários como cumarinas, flavonoides, terpenos, esteroides entre outros (SANTOS; MORENO, 2004). Em contrapartida, a importância já comprovada dos compostos secundários de suas folhas, a espécie é a mais rara e com menos coletas botânicas, suscetível às modificações do habitat e sem projetos de manejos implementados no país (CNCFLORA, 2019).

### **2.2.3 *Pilocarpus demerarae* A.St.-Hil**

De acordo com Kaastra (1982) a espécie descrita como árvore medindo ca. 9 m alt.; tronco 7,5-10 cm larg.; ramos de 5-8 mm larg., marrom acinzentado (Figura 5) e um pouco brilhante quando jovem, puberoso com pelos de 0,05 mm espalhados; Folhas alternadas, imparipinadas, mas ocasionalmente sem o folheto terminal, (1-) 2-4- julgadas (frequentemente um de um par deslocado) com folhetos soldados, variável no esboço, de 14-70 x 18-27 cm; pecíolos 2-5 mm compr., laterais inseridos a 60-80° da lâmina foliar; folíolos (estreitamente) elípticos a (estreitamente) oblongados, ou ovais, 8-24 x 3,8-7,5 cm, estreitamente cuneados a (muito longos) atenuados e desiguais na base (folíolos laterais fortemente desiguais), acuminado ou raramente arredondado no ápice, o ápice emarginado ou retuso de 0,5-1 cm compr., Racemos 1-2 por ramo vegetativo, terminal ou lateral, ereto, 35-85 cm compr., raque 1 mm compr. Aumentando rapidamente após a antese a 4 mm larg., brácteas deprimidamente ovadas, a 0,4 x 0,5-1 mm, glabras; pedicelos com 1-2mm de compr. em brotamento, 3-4x0,5 mm pósfloralmente e 10-15 x 1mm em frutos; bractéolas 2, opostas, transversalmente ou obliquamente inseridos logo abaixo das flores. Flores 8 mm larg, totalmente glabro; cálice 5 dentes, 0,8-1,0 mm de compr.; dentes depressivamente triangulares, 0,2-0,5x0,7-1,2mm, arredondados em ápice coriácea; Mericarpos obovado-elíptico, 15-17 x 13-14 mm, arredondado dorso- apicalmente, o ápice obtuso, mas ocasionalmente grande, com glândulas escuras a 0,8 mm larg., glabras, deiscentes até 2/3 abaixo da ponta.

Figura. 5. *Pilocarpus demerarae* Lem. A – ramo com inflorescência; B – ambiente de mata fechada em Barra do Corda/Maranhão.



Fonte: autor (2018)

### 2.3 Conservação de espécies nativas

No Brasil é encontrada uma das maiores diversidades florísticas do mundo, são 46742 espécies, sendo 4756 de algas, 33303 de Angiospermas, 1574 de Briófitas, 29 de Gimnospermas e 1361 de Samambaias e Licófitas (Flora do Brasil 2020, 2019). E dentre os biomas presentes no território, dois deles - Cerrado e a Mata Atlântica – são considerados *hotspots* de biodiversidade, ou seja, áreas de alta biodiversidade prioritária para a conservação (BRENTAN; FOLLMANN; FOLETO, 2015).

Em contrapartida, o grande acervo vegetal do país é um fator que impulsiona a economia, visto que, a prática agrícola requer a existência de grandes extensões de terras para o cultivo organizado de espécies úteis a comercialização (HEINZMANN; BARROS, 2007). O manejo adequado de áreas em decorrência da importância das florestas ou formação vegetal possibilitaram o surgimento e utilização de práticas agrícolas e/ou manejo sustentável para a produção de diversas espécies úteis no Brasil (EUCLIDES et al., 2015). Por exemplo: da prática sustentável da coleta da jaborandi que levam em consideração as características de cada região e das populações, altura dos arbutos, utilização de porta semente e materiais de trabalho apropriados, bem como a preservação da área de extrativismo (ISA, 2019).

Estudo sobre o sistema de manejo da floresta tropical dos índios caiapós foi realizado por Posey (1994) em que os índios usam a vegetação em geral como alimentos, medicamentos, materiais para a vida diária, lenha e itens cerimoniais e que para a manutenção

das diversas ecozonas eles utilizaram estratégias que foram adotadas para o melhor aproveitamento dos recursos, o uso de técnicas como as associações planta-solo-animais, além do estudo e reconhecimento da semelhança entre as unidades ecológicas. De acordo com Percin et al. (2004), o contato entre comunidades inteiras de populações de plantas com as comunidades nativas é necessário para manter as interações ecológicas de que necessitam para continuar os processos evolutivos naturais, adaptando-se às mudanças climáticas em curso, aos estresses e às pressões a que são submetidas.

O Brasil possui diversidade vegetal que proporciona posição de destaque em relação à diversidade de espécies nativas com potencial medicinal (RIBEIRO et al., 2010). Porém, apenas 8% das espécies vegetais presentes no território foram estudadas em busca de compostos bioativos e por volta de 1.100 espécies vegetais foram avaliadas quanto as suas propriedades medicinais (HEINZMANN; BARROS, 2007; BENINI et al., 2011). A exploração de plantas em populações naturais sem critérios de manejo adequados pode acabar promovendo redução demográfica drástica das mesmas, bem como perda significativa de diversidade genética e, possivelmente, a extinção de espécies com importância medicinal (PERCIN; STEENBOCK; REIS, 2004; ALMEIDA et al., 2017).

A partir da última década vêm-se intensificando os estudos genéticos em populações de espécies arbóreas de florestas tropicais, com amostragens adequadas tanto entre populações, como dentro das mesmas, além do uso de tecnologias genéticas adequadas para quantificar essa diversidade (KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998). Esse acúmulo de dados vem apontando algumas direções importantes para as ações de minimização dos impactos ambientais nesses ecossistemas (RABBANI; SILVA-MANN; FERREIRA, 2012).

A geração de dados sobre a diversidade de populações naturais a fim de nortear projetos de conservação pode ser realizada com a utilização de descritores bioquímicos, morfológicos e moleculares (FALEIRO, 2007). Os dois primeiros apresentam limitações em relação a influência do meio ambiente e ao número limitado de descritores fenotípicos (FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, 1998; ALMEIDA et al., 2009), já os marcadores moleculares produzem resultados mais relevantes pois revelam a variabilidade a nível de DNA (BORNET; BRANCHARD, 2001; MITTELL; NAKAGAWA; HADFIELD, 2015).

O estudo Ribeiro et al. (2010) evidenciou que marcadores moleculares auxiliam na composição de bancos de germoplasmas, na forma de sementes e coleções vivas, possibilitando selecionar acessos que apresentem menor similaridade e maior número de alelos possíveis mantendo, assim, a variabilidade de espécies de populações naturais

ameaçadas. E, no sentido de contribuir com os estudos de caracterização e preservação da diversidade alguns bancos de germoplasmas estão sendo criados, como o caso da preservação da diversidade genética de espinheira-santa, onde foi criado um Banco Ativo de Germoplasma com acessos oriundos de vários locais do Rio Grande do Sul (RIBEIRO et al., 2010).

Para programas de conservação é fundamental avaliar se a espécie apresenta uma distribuição contínua ou se está subdividida, pois, no primeiro caso, qualquer área de sua distribuição é representativa da espécie, enquanto que, havendo estruturação, a representatividade de cada subpopulação terá que ser preservada (CARDOSO et al., 2018). São os distintos marcadores moleculares as ferramentas que tem mostrado mais potentes distinções das relações espaciais dos indivíduos dentro das populações e dentro das espécies (FALEIRO, 2007).

#### **2.4 Marcadores moleculares**

É considerado marcador molecular qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA que corresponde a regiões expressas ou não do genoma (FERREIRA; GRATAPLAGIA, 1998; SCHNEIDER et al., 2018). Os marcadores morfológicos genéticos foram os primeiros utilizados seguidos dos marcadores genéticos bioquímicos, que envolviam o uso de metabólitos secundários tais como antocianinas e compostos fenólicos (TURCHETTO-ZOLET, 2017). Por conta do baixo grau de polimorfismo, estes marcadores passaram a ser substituídos por marcadores de DNA capazes de detectar uma maior variabilidade entre os indivíduos e sem influência ambiental nos resultados (NG et al., 2015; TURCHETTO-ZOLET, 2017)

Com os avanços na área da genética e biologia molecular foram desenvolvidas várias técnicas para obtenção de marcadores genéticos úteis na identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos vegetais (FALEIRO, 2007). Assim, o emprego de marcadores moleculares para estudos de diversidade genética tem sido crescente, e a facilidade de uso e reprodutibilidade são dois importantes parâmetros sugeridos ao escolher marcadores moleculares de DNA para estudos populacionais (BORNET; BRANCHARD, 2001).

Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA e assim, variam quanto a

habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, o custo de obtenção, facilidade de uso, consistência e receptibilidade (FALEIRO, 2007). Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA (TOPPA; JADOSKI, 2013).

Dentre os marcadores moleculares que seguem a metodologia da hibridização temos o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que são fragmentos de DNA obtidos de enzimas de restrição, separados por eletroforese, e visualizados por meio de hibridizações com sondas de sequências homólogas marcadas com radioatividade ou fluorescência (POWELL et al., 1996; GUIMARÃES, 2009). Apesar de apresentar a codominância dos marcadores e alta reprodutibilidade, é uma técnica trabalhosa, cara e demorada (BOTSTEIN et al., 1980).

Os minissatélites também conhecidos por VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) são unidades de 10 a 100pb repetidas em *tandem*, flanqueadas por sítios conservados de endonucleases de restrição. São obtidas pela extração e digestão do DNA, seguido da hibridização dos fragmentos e visualização dos polimorfismos, normalmente, por autorradiografia (SOUZA et al., 2014). Possui alta reprodutibilidade das marcas e a geração de muitas bandas informativas, a desvantagem se deve a dominância dos marcadores, sendo uma técnica cara e demorada (TOPPA; JADOSKI, 2013).

Os marcadores moleculares baseados na amplificação de DNA utilizam a técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), onde os fragmentos são amplificados, separados e visualizados em eletroforese, normalmente, em gel de agarose corado com brometo de etídio (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; FALEIRO, 2007). Dentre eles podem ser citados os marcadores moleculares RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) que são fragmentos de DNA amplificados utilizando *primers* curtos de sequência aleatórios (DESAI et al., 2018). Sua vantagem se deve à facilidade e a rapidez de obtenção com necessidade de pequena quantidade de DNA, porém, a dominância desse marcador é a principal desvantagem, pois não diferenciam locos de heterozigose e de homozigose (WILLIAMS et al., 1990; AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008).

Os marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) são fragmentos de DNA (80 a 500 pb) obtidos com a digestão do DNA com enzimas de restrição, seguidos da ligação de oligonucleotódeos adaptadores e amplificação seletiva dos fragmentos via PCR. As principais vantagens dos AFLPs são a geração de grande número de polimorfismos por reação e o fato de não haver necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA. As

desvantagens se devem à dominância dos marcadores, ao alto custo e às várias etapas e reagentes necessários à obtenção dos marcadores (VOS et al., 1995; DESAI et al., 2018).

Os microssatélites também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*) são unidades muito curtas (2 a 5 pb) repetidas em *tandem*. A obtenção dos marcadores envolve a amplificação dos microssatélites via PCR, utilizando-se *primers* específicos (geralmente de 20 a 25 pb) (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008). As principais vantagens são a codominância dos marcadores, o alto nível de polimorfismo que pode ser detectado, a alta reprodutibilidade das marcas e a possibilidade de detecção de vários microssatélites. As principais desvantagens são o alto custo requerido no desenvolvimento de *primers* específicos e o fato de bandas inespecíficas ou géis de baixa resolução vir a dificultar avaliação dos polimorfismos (LITT; LUTTY, 1989).

Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), por sua vez, são largamente utilizados por ser uma técnica simples, rápida, eficiente, possui alta reprodutibilidade e gera altos índices de polimorfismo (REDDY et al., 2002). É facilmente detectado usando poucos equipamentos e fornece grande número de dados por um custo razoável para o pesquisador (SOUZA, 2005). Em contrapartida, possuem a desvantagem de serem marcadores dominantes (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). Essa técnica é eficaz nas análises de diversidade genética, em estudos de impressão digital do DNA, seleção assistida por marcadores, filogenia e mapeamento genético (SUN; WEN; HUANG, 2010).

Enquanto que marcadores de RFLP têm sido utilizados em estudos de mapeamento comparativo por causa da consistência dos resultados obtidos, estes tendem a ser mais caros e mais difíceis de implementar (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008). Por outro lado, marcadores identificados por amplificação, especialmente RAPDs e ISSR, são mais fáceis de manipular e de custo menor, embora sejam de resultados menos consistentes. (ROCHA, 2013 et al., 2016; ALTAMEME, 2019). Os estudos de variabilidade com o uso de marcadores ISSR e RAPD mostram alto percentual polimórfico, indicando alto nível de diversidade genética e, visto o alto custo de obtenção de AFLP e a necessidade de conhecimento de sequência flanqueada para desenvolver espécies de *primers* específicos de SSR, os marcadores ISSR e RAPD são os mais indicados para estudos populacionais de espécies importantes com baixo custo (REDDY, 2002; GAJERA et al., 2010; BISHOYI et al., 2016).

### 2.4.1 Marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

A análise RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), derivada do processo de PCR, envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos do genoma utilizando iniciadores decâmeros de sequência arbitrária (NANDANI et al., 2014). Esta técnica foi primeiramente utilizada para aplicações de mapeamento gênomico e “fingerprinting”, sendo amplamente utilizada em razão da possibilidade de se obter um grande número de marcadores genéticos sem o conhecimento prévio do genoma da espécie estudada (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; LACERDA et al., 2002).

O polimorfismo observado a partir de dados de marcadores moleculares, incluindo os RAPD, se deve a vários processos que envolvem desde a substituição de nucleotídeos que produzem ou apagam sítios de homologia com os *primers*, inserção, deleção até a inversão dos sítios de ligação ou entre os sítios de ligação (WILLIAMS et al., 1990; NANDANI et al., 2014). Esse polimorfismo é facilmente identificável através da presença ou ausência pela técnica de eletroforese em gel e, assim, convertido a dados estatísticos para diversas análises de caracterização, mapeamento ou de estudos de diversidade e variabilidade genética (BINNECK; NEDEL; DELLAGOSTIN, 2002; KUMAR et al., 2016).

Aliada às características dos marcadores RAPD, o baixo custo, rapidez, simplicidade e velocidade, esta técnica se tornou amplamente utilizada por pesquisadores, sendo juntamente com os marcadores ISSR e SSR, os mais utilizados em estudo de melhoramento genético, caracterização e diversidade genética (LACERDA et al., 2002; AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008; BISHOYI et al., 2016). Porém, mesmo com a simplicidade da técnica, tem se encontrado dificuldade para dar confiabilidade e significado aos produtos gerados. Existem sérias limitações em relação à reprodutibilidade dos resultados dentro e entre laboratórios. Essa complexidade de explicar a interação durante o processo de anelamento *primer* e a posterior amplificação torna difícil a explicação da informação gerada pelos marcadores RAPD (CAETANO et al., 1991; BINNECK; NEDEL; DELLAGOSTIN, 2002; SAWASATO et al., 2008).

Visando a facilidade de aplicação, é inegável o valor dos dados de diversidade disponíveis hoje sobre populações naturais com marcadores moleculares RAPD (KUMAR et al., 2016) que, mesmo sendo mais simples, podem revelar marcas relativamente específicas de populações, raças ou espécies, sendo estas características importante em estudos que visam à promoção de projetos de conservação (PEAKALL et al., 1998; VALLE et al., 2013;



RAMESHKUMAR et al., 2019). Esses marcadores foram utilizados em *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) A.C. Smith), *Myracrodruon urundeuva* M. Allem. e *Schinopsis brasiliensis* Engl., espécies ameaçadas de extinção do bioma da Caatinga com histórico de exploração predatória para uso madeireiro e medicinal, onde Santos et al. (2007) sugeriram a criação de um maior número de áreas de preservação devido a desuniformidade da variabilidade encontrada.

#### **2.4.2 Marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)**

A técnica *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) envolve a amplificação de segmento de DNA presente a uma distância amplificável entre duas regiões de repetição de microssatélites idênticos orientada na direção oposta (WU et al., 2010; GAJERA et al., 2010). A técnica utiliza microssatélites, geralmente 16-25 pb de comprimento, como iniciadores numa única reação de PCR tendo como alvo múltiplos *loci* genômico para amplificar principalmente as sequências SRRs de diferentes tamanhos (FERREIRA GRATTAPAGLIA, 1998; REDDY, 2002; TURCHETTO, 2017). As repetições microssatélites utilizadas como iniciadores podem ser di-nucleótido, trinucleótido, trinucleótido ou penta-nucleótido ou mais, geralmente ancorada em 3 'ou 5' com um a quatro bases degeneradas estendidas nas sequências que flanqueiam. (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994; ALMEIDA 2009; BISHOYI et al., 2016).

Esse método combina a maior parte dos benefícios de AFLP e análise de microssatélites com a universalidade de RAPD. ISSRs tem alta reprodutibilidade possivelmente devido à utilização de iniciadores mais longos (16-25 meros), em comparação com os iniciadores RAPD (10- meros), e isso permite a utilização de temperatura de anelamento subsequente elevada (45- 60 °C) levando a um maior rigor (REDDY, 2002; TURCHETTO, 2017). Desta forma, os *primers* ISSR são mais robustos que os RAPD, pois apresentam maior superfície de ancoragem e possuem maiores temperaturas de anelamento, aumentando a reprodutibilidade dos produtos (TSUMURA et al., 1996; FALEIRO, 2007).

Os marcadores moleculares ISSR são uma alternativa para pesquisa de baixo custo, principalmente em países como o Brasil, que possuem um grande acervo vegetal de valor inestimável, porém com pouca iniciativa para estudos de diversidade que visem promover programas de conservação (BORBA et al., 2005; ROCHA, 2013). Por conta disso, os marcadores moleculares ISSR se destacam em estudo que vão desde a caracterização de

genótipos de *Malpighia emarginata* D. C., espécie comercialmente importante para a região Nordeste do Brasil (LIMA et al., 2015), até estudo de diversidade de espécie medicinais como *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & JFB Pastore (SILVA et al., 2017), *Arbutus unedo* L. (LOPES et al., 2010), *Erythrina velutina* Willd. (GONÇALVES et al., 2014).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, Milee; SHRIVASTAVA, Neeta; PADH, Harish. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant cell reports**, v. 27, n. 4, p. 617-631, 2008.

AGUIAR, Roberto Valmorbida et al. Variabilidade genética de *Eugenia uniflora* L. em remanescentes florestais em diferentes estádios sucessionais. **Ceres**, v. 60, n. 2, 2015.

ALBUQUERQUE, Byron W. P. Revisão taxonômica das Rutaceae do Estado do Amazonas. **Acta amazônica**, v. 6, n. 3, p. 5-67, 1976.

ALMEIDA, Cristina Guilherme; MATIAS, Camila. Abordagem etnobotânica acerca da extração e riscos de extinção de *Stryphnodendron adstringens* (MART.) Coville em um bairro do município de Campo Mourão, Paraná, Brasil. **Revista Iniciare**, v. 2, n. 1, 2017.

ALMEIDA, Clébia Maria Alves de et al. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência agrotécnica.,(Impr.)**, v.33, n.spe, p.1771-1776, 2009.

ALMEIDA, Juliana Pereira; KOWALSKI, Luiz Paulo. Pilocarpine used to treat xerostomia in patients submitted to radioactive iodine therapy: a pilot study. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 76, n. 5, p. 659-662, 2010.

ALTAMEME, H. J. M. RAPD and ISSR analysis of the genetic relationship among some species in Rutaceae in and Apiceae in Iraq. **Iraqi Journal of Agricultural Science**, v. 50, n. 2, p. 608-616, 2019.

AMARAL, D. D. et al. The status of conservation of urban forests in eastern Amazonia. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 2, p. 257-265, 2012.

BANDEIRA, Ana Júlia; DEIMLING, Luis Irineu; KRAEMER, Janaína Endres Georg. Variabilidade genética do jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius* Lemaire; Rutaceae) em populações naturais da região noroeste do Rio Grande do Sul. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, n. 8, 2010.

BAKKALI, Fadil et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BAYER, Randall J. et al. A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 3, p. 668-685, 2009.

- BARUAH, J. et al. Genetic diversity study amongst *Cymbopogon* species from NE-India using RAPD and ISSR markers. **Industrial crops and products**, v. 95, p. 235-243, 2017.
- BENINI, Emanoelli Bassani et al. Valorização da flora nativa quanto ao potencial fitoterápico. **Revista destaques acadêmicos**, v. 2, n. 3, 2011.
- BENIDDIR, Mehdi A. et al. Acridone alkaloids from *Glycosmis chlorosperma* as DYRK1A inhibitors. **Journal of natural products**, v. 77, n. 5, p. 1117-1122, 2014.
- BENTO, Ricardo Rodrigue de França et al. Comparative vibrational spectra of pilosine and epiisopilosine crystals. **Brazilian Journal of Physics**, v. 40, n. 2, p. 217-223, 2010.
- BINNECK, Eliseu; NEDEL, Jorge Luiz; DELLAGOSTIN, O. A. Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 183-196, 2002.
- BITTENCOURT et al., Prospecção tecnológica e científica do uso da pilocarpina no tratamento do glaucoma. **Revista interdisciplinar de ciências médica**. Anais - Teresina-PI. 2018.
- BISHOYI, Ashok Kumar et al. Varietal discrimination and genetic variability analysis of *Cymbopogon* using RAPD and ISSR markers analysis. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 179, n. 4, p. 659-670, 2016.
- BIZZO, Humberto R.; HOVELL, Ana Maria C.; REZENDE, Claudia M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BORBA, Regina da Silva et al. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 565-569, 2005.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, n.3, p.209-215, Setembro, 2001.
- BOTSTEIN, David et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314, 1980.
- BRENTANO, Bruna; FOLLMANN, Fernanda Maria; FOLETO, Eliane. Contextualização das Unidades de Conservação no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 3, p. 536-554, 2015.
- CAETANO-ANOLLES, Gustavo et al. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio Technology*, New York, v.9, n.6, p.553-557, 1991.
- CALDEIRA, Cecilio Frois et al. Sustainability of Jaborandi in the eastern Brazilian Amazon. Perspectives in ecology and conservation, v. 15, n. 3, p. 161-171, 2017.

CALIL, Anaise Costa et al. Viabilidade de sementes armazenadas de frutos imaturos de jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius* Lem–RUTACEAE). **Pesqui. Agropecuária Gaúcha**, v. 14, p. 63-66, 2008.

CARDOSO, Ariane Santos et al. Análises preliminares de diversidade genética de populações naturais de buritizeiro (*Mauritia flexuosa*) utilizando marcadores moleculares SSR. **Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes-SEMPESq**, n. 18, 2018.

CARMO, Gabriele do et al. Phytochemical and antimicrobial study of *Pilocarpus pennatifolius* Lemaire. **Fitoterapia**, v. 131, p. 1-8, 2018.

CHASE, Mark W. et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.

CHIES, Tatiana Teixeira de Souza et al. O estudo da biodiversidade e evolução vegetal através de marcadores de DNA e citogenética: exemplos em Iridaceae e Poaceae. **Ciência e Natura**, v. 36, p. 279-293, 2014.

CNCFlora. *Pilocarpus jaborandi* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2016.1 **Centro Nacional de Conservação da Flora**. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/arquivos/arquivos/pdfs/LivroVermelho.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2019.

COSTA, Cátia Coelho et al. Conhecendo espécies de planta da Amazônia: Tamanqueira (*Zanthoxylum rhoifolium* Lam.-Rutaceae). **Embrapa Amazônia Oriental-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2014.

COSTA, Fabiano Gumier. **Os folheiros do jaborandi: organização, parcerias e seu lugar no extrativismo amazônico**. Paco Editorial, 2016.

DERETTI, Alexia Roberta; DEMARCH, Marcela Beatriz Machado; GESSER, Kiliano. A Caracterização do Comércio Exterior Brasileiro de Frutas e a Exportação de Suco de Laranja. **Caderno Científico Ceciesa-Gestão**, v. 1, n. 1, 2015.

DESAI, Shikha et al. Assessment of genetic variability among various genotypes of critically endangered and medicinally important species: *Chlorophytum borivillianum* using RAPD markers. **Assessment**, v. 6, n. 6, 2018.

EUCLIDES, Valéria Pacheco Batista et al. Manejo do pastejo de cultivares de *Brachiaria brizantha* (Hochst) Stapf e de *Panicum maximum* Jacq. **Ceres**, v. 61, n. 7, 2015.

FALEIRO, Fábio Gelape. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007.

FERRERES, Federico et al. Comparing the phenolic profile of *Pilocarpus pennatifolius* Lem. by HPLC–DAD–ESI/MSn with respect to authentication and enzyme inhibition potential. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 391-401, 2015.

FERREIRA, Márcio Elias; GRATTAPAGLIA, Darío. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **EMBRAPA, Brasília**, v. 3, 1998.

- FILHO, João Pessoa de Souza et al. A evolução do mercado farmacêutico brasileiro no tratamento do glaucoma nos últimos 30 anos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 2003.
- Flora do Brasil 2020 em construção. **Flora do Brasil**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em 04 Jul. 2019a.
- Flora do Brasil 2020 em construção. **Rutaceae A.Juss.** Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB212>. Acesso em: 18 Jul. 2019b.
- Flora do Brasil 2020 em construção. **Distribuição de *Pilocarpus spp.*** Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB866>. Acesso em: 18 jul. 2019c.
- GAJERA, Bhavesh B. et al. Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 491-498, 2010.
- GOIS, Itamara Bomfim; FERREIRA, Robério Anastácio; MANN, Renata Silva. Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Cassia grandis* L. f. **Floresta e Ambiente**, v. 25, n. 4, p. e20160309, 2018.
- GUIMARÃES, Claudia Teixeira et al. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2009.
- GUIMARÃES, Maria A. et al. Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 27, mar. 2015.
- GONÇALVES, Luciana Oliveira et al. Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) em áreas de baixa ocorrência. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 2, p. 290-298, 2014.
- HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C DE. Potencial das Plantas Nativas Brasileiras para o Desenvolvimento de Fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (MILL.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Saúde**, Santa Maria, v.33, n.1, p.43-48, 2007.
- HOLMSTEDT, Bo; WASSÉN, S. Henry; SCHULTES, Richard Evans. Jaborandi: an interdisciplinary appraisal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 1, n. 1, p. 3-21, 1979.
- HOMMA, Alfredo Kingo Oyama; MENEZES, A. J. E. A. Extrativismo de folhas de jaborandi no município de Parauapebas, estado do Pará. **Embrapa Amazônia Oriental-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2014.
- ISA. **Manejo Sustentável do Jaborandi**. Disponível em: <https://terrasindigena.org.br/noticia/63448>. Acesso em: 04 abr. 2019
- JUDD, Walter S. et al. **Sistemática Vegetal:- Um Enfoque Filogenético**. Artmed Editora, 2009.
- KAASTRA, Roel C. Pilocarpinae (Rutaceae). **Flora Neotropica**, p. 1-197, 1982.

KAGEYAMA, Paulo Y.; GANDARA, Flávio Bertin; SOUZA, LMI de. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.v. 12, n. 32, p. 65-70, dez. 1998.

KULHARI, Alpana et al. Assessment of genetic variability through ISSR and RAPD markers in *Commiphora wightii* (Arn.) Bhandari. **Acta physiologiae plantarum**, v. 37, n. 6, p. 113, 2015.

KUMAR, Hemant et al. RAPD and ISSR marker-based comparative evaluation of genetic diversity among Indian germplasms of *Euryale ferox*: an aquatic food plant. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 180, n. 7, p. 1345-1360, 2016.

LACERDA, Daniela R. et al. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, v. 3, n. 2, p. 87-92, 2002.

LEWIS, Walter H.; ELVIN-LEWIS, Memory PF. **Medical botany: plants affecting human health**. John Wiley & Sons, 2003.

LIMA, David Fernandes et al. Prospecção tecnológica do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*): espécie economicamente importante no norte e nordeste do Brasil. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 1, p. 1626-1638, 2015.

LITT, Michael; LUTY, Jeffrey A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American journal of human genetics**, v. 44, n. 3, p. 397, 1989.

LORENZI, Harri, and FRANCISCO J. Matos. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas. Instituto Plantarum, **Nova Odessa**, São Paulo, 2002.

LOPES, Lucas et al. Estudo da diversidade genética de *Arbutus unedo* L. utilizando marcadores ISSR e RAPD. In: **56º Congresso Brasileiro de Genética**. 2010.

LUCIO, E. M. R de A. et al. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epiisopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9, n. 1, p. 23-35, 2000.

MADEIRO, Sara AL et al. Brazoxide A, a New Tirucallane Triterpene from *Pilocarpus spicatus* subsp. Aracatensis Kaastra. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 196-203, 2016.

MAFEZOLI, J. et al. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p. 335–340, 2000.

MAPA, 2014a. **Citrus**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>. Acesso em: 7 jun. 2018.

MARGALHO, Luciano Ferreira et al. Conhecendo espécies de plantas da Amazônia: pau-amarelo (*Euxylophora paraensis* Huber-Rutaceae). **Embrapa Amazônia Oriental- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2014.

- MATOS, L. G. et al. Pharmacognostic study of the leaves and roots of *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil.(Rutaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 574-584, 2014.
- MATTOS J. D.; NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O.; POMPEU JÚNIOR, J. **Citros: principais informações e recomendações de cultivo**. Boletim Técnico do IAC 200. 2005. Disponível em: [http://www.iac.sp.gov.br/imagem\\_informacoestecnologicas/43.pdf](http://www.iac.sp.gov.br/imagem_informacoestecnologicas/43.pdf). Acesso em: 05 mar. 2018.
- MITTERMEIER, Russel A et al. Megadiversity: Earth's biologically wealthiest nations. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 3, n. 3, p. 537-537, 1999.
- MITTELL, Elizabeth A.; NAKAGAWA, Shinichi; HADFIELD, Jarrod D. Are molecular markers useful predictors of adaptive potential?. **Ecology letters**, v. 18, n. 8, p. 772-778, 2015.
- MIURA, Leiz Maria Costa Veras; **Isolamento do Alcalóide Epiisopiloturina a partir da Biomassa do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e Avaliação de suas Atividades Antibacteriana, Antileishmania, Antiviral, Antiesquistosoma e Sialagoga**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2009.
- MOURA, Elisa Ferreira. **Divergência genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*)**. 2003. 85 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Lavras, Lavras – Minas Gerais. 2003.
- NANDANI, Kumari et al. Randomly amplified polymorphic DNA-a brief review. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 9, n. 1, p. 6-13, 2014.
- NASCIMENTO, Paula F C et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 1, p. 108-13, 2007.
- NETO, Olavo Custódio Dias et al. Estrutura fitossociológica e grupos ecológicos em fragmento de floresta estacional semidecidual, Uberaba, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 1087-1100, 2009.
- NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. **ASM Sci J**, v. 9, n. 1, p. 30-39, 2015.
- OLIVEIRA, Adriana P. et al. Chemical and Biological Investigations of *Pilocarpus spicatus* essential oils. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 9, n. 3, p. 206-211, 2010.
- OLIVEIRA, Luciana Santos et al. Plantas medicinais como recurso terapêutico em comunidade do entorno da reserva biológica do tinguá, RJ, Brasil—metabólitos secundários e aspectos farmacológicos. **InterSciencePlace**, v. 1, n. 17, 2015.
- OLIVEIRA, Pedro Dias. **Filogenética de Pilocarpinae (Rutaceae)**. 2007. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2007.

PEAKALL, Rod et al. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. **Molecular biology and evolution**, v. 15, n. 10, p. 1275-1287, 1998.

PINHEIRO, C. U. B. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.16, p.141-150, 2002.

PINHEIRO, Claudio Urbano. Jaborandi (*Pilocarpus* sp., rutaceae): a wild species. **Economic Botany**, v. 51, n. 1, p. 49-58, 1997.

PIRANI, José Rubens. **Rutacea** (online). In: Wanderley, M, Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Giuliatti, A.M., Melhem, T.S., Bittrich, V., Kameyama, C. (eds.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 2, p.281-308, 2002.

PIRANI, J.R.; GROppo, M. *Rutaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/florado-brasil/FB212>. Acesso em 04 jul. 2019.

PERECIN, M. B.; STEENBOCK, W.; REISS, M. S. Genética de populações de espinheira-santa. **REIS, MS; SILVA, SR (Organiz.). Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: Maytenus spp., espinheira-santa. Brasília: IBAMA**, p. 115-144, 2004

POSEY, Darrell A. A preliminary report on diversified management of tropical forest by the Kayapo Indians of the Brazilian Amazon. **Advances in Economic Botany**, v. 1, n. 112, p. 26, 1994.

POWELL, Wayne et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular breeding**, v. 2, n. 3, p. 225-238, 1996.

RABBANI, Allívia Rouse Carregosa; SILVA-MANN, Renata; FERREIRA, Robério Anastácio. Genetic variability of *Genipa americana* L. belonging to the lower course of São Francisco river. **Revista Árvore**, v. 36, n. 3, p. 401-409, 2012.

RAMESHKUMAR, Ramakrishnan et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship of *Nilgirianthus ciliatus* populations using ISSR and RAPD markers: Implications for conservation of an endemic and vulnerable medicinal plant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 101072, 2019.

REDDY, M. Pradeep; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002.

RIBEIRO, M. V. et al. Diversidade genética entre acessos de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reis.) coletados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 443-451, 2010.

RIBEIRO, Nathalia Pereira et al. Biodiversidade e conservação de recursos genéticos de espécies arbóreas. **Multitemas**, v. 21, n. 50, 2016.



ROCHA, Jeferson A. **Variabilidade genética e avaliação anti-schistosoma dos alcalóides pilosina, epiisopilosina, isopilosina e macaubina de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew.)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2013.

ROCHA, Jefferson A. et al. Anthelmintic, antibacterial and cytotoxicity activity of imidazole alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* leaves. **Phytotherapy research**, v. 31, n. 4, p. 624-630, 2017.

RODRIGUES, Denise de Fátima et al. Comparação de morfina, cetoprofeno e Arnica montana 6x e 30x por via transmucosa oral ou subcutânea para control e de dor pós-operatória em gatas submetidas à histerectomia e ooforectomia bilateral. **Ciencia Rural**, p. 330-335, 2016.

SANTOS, C. A. F. et al. Variabilidade genética, com base em marcadores RAPD, de três espécies arbóreas ameaçadas de extinção no semi-árido brasileiro. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2007.

SANTOS, Ana Paula; MORENO, Paulo Roberto Hrihorowitsch. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 116-137, 2004.

SAWAYA, Alexandra Christine Helena Frankland et al. Screening species of *Pilocarpus* (Rutaceae) as sources of pilocarpine and other imidazole alkaloids. **Genetic resources and crop evolution**, v. 58, n. 3, p. 471-480, 2011.

SAWASATO, Joaquim Taizo et al. Utilização de microssatélites e RAPD na caracterização molecular de acessos de *Paspalum urvillei* Steudel. **Revista brasileira de zootecnia= Brazilian journal of animal science. Viçosa, MG. Vol. 37, n. 8 (ago. 2008), p. 1366-1374**, 2008.

SCHEFFER, Marianne Christina; MING, Lin Chau; ARAUJO, A J de. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. **QUEIRÓZ, MA de; GOEDERT, CO; RAMOS, S. RR, ed. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste brasileiro. (on line). Versão**, v. 1, 1999.

SCHNEIDER, Theodoro et al. Biologia molecular aplicada à ciência das plantas daninhas. **Embrapa Trigo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2018.

SCOPUS. *Pilocarpus jaborandi* in SCOPUS. Disponível em: <https://www-scopus.ez1.periodicos.capes.gov.br/search/form.uri?display=basic>. Acesso em 15 jun. 2019.

SILVA, T. S.; FREIRE, E. M. X. Abordagem etnobotânica sobre plantas medicinais citadas por populações do entorno de uma unidade de conservação da caatinga do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 4, p. 427-435, 2010.

SILVA, Linda Lacerda da; PAOLI, Adelita Aparecida Sartori. Morfologia e anatomia da semente de *Esenbeckia grandiflora* MART. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, p. 1-6, 2006.

SILVA, Ariádne Elisa Belo. **Padronização do modelo de epilepsia do lobo temporal (ELT) por administração sistêmica de pilocarpina (Relatório de Pesquisa)**. 2016. Disponível em: <http://riu.ufam.edu.br/handle/prefix/5062>. Acesso em: 06 fev. 2019.

SILVA, Raquel Araujo do Val da; LEITE, João Pereira. **Efeitos do canabidiol no comportamento das crises epiléticas, na atividade motora exploratória e na neuropatologia em ratos submetidos à microinjeção de pilocarpina intra-hipocampal**. 2015. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

SILVA, Dennis Crystian et al. Análise molecular via ISSR de uma população nativa de *Eplingiella fruticosa*. In: **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. Revista RG News, Brasília, DF, v. 3, n. 2, 2017.

SKORUPA, Ladislau Araújo. Espécies de *Pilocarpus* Vahl (RUTACEAE) da Amazônia Brasileira. **Acta Amazônica**, v.30, n.1, p.59-70, 2000.

SPECIESLINKS. *Pilocarpus* spp. Disponível em: <http://www.splink.org.br/index?lang=pt>. Acesso em: 10 abr. 2019.

SKORUPA, L. A. Espécies de *Pilocarpus* Vahl (RUTACEAE) da Amazônia Brasileira. **Acta Amazônica**, v. 30, n. 1, p. 59-70, 2000.

SKORUPA, Ladislau Araújo; PIRANI, José Rubens. A new species of *Pilocarpus* (Rutaceae) from northern Brazil. **Brittonia**, v. 56, n. 2, p. 147-150, 2004.

SOUZA, D. C. L. Molecular techniques for characterization and conservation of medicinal and aromatic plants: a review. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 495-503, 2015.

SOUZA, Andreza de; MOURÃO, Káthia S. Mathias; SOUZA, Luiz Antonio de. Morphology and anatomy of the fruit and seed in development of *Pilocarpus pennatifolius* Lem.(Rutaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 28, n. 4, p. 745-754, 2005.

STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since]. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em 19 mai. 2019.

SUN, Ye; WEN, Xiangying; HUANG, Hongwen. Population genetic differentiation of *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera* as revealed by ISSR analysis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, n. 3, p. 257-263, 2010.

TURCHETTO-ZOLET, Andreia Carina et al. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. **Editora SBG Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP**, v. 181, 2017.

TAVEIRA, Francisca SN et al. Seasonal variation in the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 1, p. 27-31, 2003.

TOPPA, Eder Victor Braganti; JADOSKI, Cléber Junior. O uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2013.

TROPICOS. **Mapa de distribuição de *Pilocarpus* spp.** Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/40008825?tab=maps>. acesso em 12 abr. 2019.

VILLALBA, Milcíades A. et al. Atividades farmacológicas dos extratos de *Zanthoxylum chiloperone* (Rutaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 236-41, 2007.

VALLE, J. S. et al. Diversidade genética de populações naturais de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] por RAPD. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 47-53, 2013.

VÉRAS, Leiz Maria Costa et al. Industrial scale isolation, structural and spectroscopic characterization of epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf leaves: A promising alkaloid against schistosomiasis. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66702, 2013.

VERAS, Leiz Maria Costa et al. Activity of epiisopiloturine Against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2051-58, 2012.

VOS, Pieter et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic acids research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WILLIAMS, John GK et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WU, Y-G. et al. Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.38, n.1, p. 63-72, 2010.

ZEQUIN, Marina Cristina. **Estudo químico das flores de *Hortia oreadica* (Rutaceae)**. 2018. Dissertação. (Mestrado em química). Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). 2018.

ZIETKIEWICZ, Ewa; RAFALSKI, Antoni; LABUDA, Damian. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.

TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, S. H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theoretical and applied genetics**, v. 92, n. 1, p. 40-45, 1996.

**MANUSCRITO**

ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Pilocarpus* spp DA REGIÃO NORDESTE SETENTRIONAL POR MEIO DE MARCADORES ISSR e RAPD

## Estudo de diversidade genética em populações naturais de *Pilocarpus* spp da região Nordeste Setentrional por meio de marcadores RAPD e ISSR

Cleiton Barroso Bittencourt<sup>1</sup>; Ivanilza Moreira de Andrade<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mestrando (a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Parnaíba/PI – Brasil;

<sup>2</sup>Professora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Parnaíba/PI – Brasil

[cleiton\\_court@hotmail.com](mailto:cleiton_court@hotmail.com); [ivanilzaandrade@hotmail.com](mailto:ivanilzaandrade@hotmail.com)

### Resumo:

*Pilocarpus* Vahl é um gênero neotropical com distribuição na América Central e do Sul. No Brasil, o grupo tem histórico marcante de uso pela indústria farmacêutica por ser fonte exclusiva de pilocarpina, alcaloide imidazólico utilizado no tratamento do glaucoma. Objetivou-se avaliar a diversidade genética em populações naturais de *Pilocarpus* spp utilizando marcadores moleculares RAPD e ISSR. Utilizou-se 10 *primers* ISSR e quatro *primers* RAPD para estimar a diversidade intra e interpopulacional e de agrupamentos em sete populações naturais. A taxa de polimorfismo dentro das populações variou de 21,90% a 36,19%, com valores médios do Índice de Diversidade de Shannon (*I*) e Heterozigotidade Esperada (*He*) baixos (0,129 e 0,080). As populações com os menores valores foram representadas pela espécie *Pilocarpus microphyllus* dos estados do Maranhão e Piauí. A Análise de Variância Molecular e os dados de estruturação e cordenadas principais (PCoA) mostraram a formação de grupos distintos. A baixa diversidade e a falta de fluxo gênico entre as populações sugerem a necessidade de projetos de conservação que visem o aumento da diversidade dentro e entre as populações estudadas.

**Palavras-chave:** Jaborandi; *Pilocarpus demerarae*; *Pilocarpus microphyllus*; *Pilocarpus jaborandi*.

### Introdução

*Pilocarpus* Vahl é um gênero de arvoretas e arbustos pertencente à família Rutaceae, com representantes amplamente distribuídos na América Latina, ocorrendo do Sul da América Central (México) ao Sul da América do Sul (PINHEIRO, 1997; PINHEIRO, 2002; LIMA et al., 2017). Para o mundo foram descritas 17 espécies que apresentam sua maior representação nas porções norte e noroeste da América do Sul, especialmente no Brasil que abriga 15 espécies, com 11 delas endêmicas (FLORA DO BRASIL 2020, 2019). Suas espécies são popularmente conhecidas no Brasil como jaborandi, um termo derivado da língua indígena tupi-guarani (ya-mbor-endi) que significa "a planta que faz babar" (HOLMSTEDT; WASSÉN; SCHULTES, 1979; SKORUPA; PIRANI, 2004; LIMA et al., 2015).

O grupo apresenta um histórico de utilização pela medicina tradicional tendo os primeiros registros com os índios brasileiros da Amazônia que usavam as folhas para induzir sudorese e salivação que são devido a sua atividade colinérgica (VALDEZ et al., 1993; PINHEIRO, 1997; LIMA et al., 2017) e, além disso, suas folhas também eram empregadas no tratamento da asma e malária e o conhecimento dessas propriedades resultou no amplo uso dessas plantas pelas pessoas que vieram de lá após o século XVI (HOLMSTEDT; WASSÉN; SCHULTES, 1979; CALDEIRA et al., 2017).

Em 1873 o gênero foi apresentado à comunidade médica Europeia e suas folhas foram primeiramente utilizadas em práticas laboratoriais como um sialagogo, e foi essa propriedade que despertou interesse da indústria farmacêutica francesa (SARAYA et al., 2008). Assim, a partir de pesquisas a origem do efeito estimulante dos extratos de folhas de jaborandi foi elucidada com o isolamento do alcaloide imidazólico pilocarpina e o reconhecimento de sua atividade como agente parassimpatomimético colinérgico que estimula secreções nas glândulas sudoríparas, lacrimais e salivares (SIDHU, 2014; LIN; FANG; DU, 2018).

Por conta da sua atuação ativadora do sistema nervoso parassimpático, a pilocarpina constitui a base de uma gama de medicamentos que visam, principalmente, o tratamento do glaucoma, disfunção caracterizada pelo aumento progressivo da pressão ocular (LIMA et al., 2017). Assim, a única fonte viável e exclusivamente natural da pilocarpina para o tratamento do glaucoma são folhas das espécies do gênero *Pilocarpus* o que elevou o grupo como um dos mais bem sucedidos quanto à exploração do seu potencial farmacológico (LIMA et al., 2015). No início dos anos 2000 a pilocarpina também passou a ser usada para reduzir a xerostomia induzida pela radioterapia de cabeça e pescoço e para o tratamento da síndrome de Sjögren (boca seca) (GORNITSKY et al., 2004; SIDHU, 2014).

O grande valor comercial das folhas de jaborandi acarretou em uma exploração sem controle durante a última metade do século passado e o método de coleta excessiva e frequente de folhas do mesmo indivíduo que não permite o desenvolvimento completo de novas folhas levou a uma alta taxa de mortalidade em populações naturais (PINHEIRO, 2002; CALDEIRA et al, 2017). Com isso, dados sobre a distribuição do grupo apontaram uma redução gradativa das populações naturais o que levou a inclusão de *Pilocarpus alatus* C.J. Joseph ex Skorupa, *Pilocarpus jaborandi* Holmes., *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm. na lista de espécies ameaçadas de extinção (MARTINELE; MORAES, 2013). Frente ao grande valor comercial das espécies e da possibilidade de descobertas de novos compostos

importantes para medicina, programas de manejo foram instaurados em aglomerados de jaborandi com grande atividade extrativista (VEGEFLORA, 2010), porém, os estudos de distribuição e o atual estado de conservação da maioria dos representantes do grupo são escassos (PINHEIRO, 2002; MOURA et al., 2005; BANDEIRA; DEIMLING; KRAEMER, 2010; ROCHA et al, 2014; CALDEIRA et al., 2017).

Espécies vegetais, como as pertencentes ao gênero *Pilocarpus*, que apresentam uma infinidade de componentes químicos que podem ser utilizados no tratamento de inúmeras patologias (ROCHA et al., 2017; LIMA, 2017; NICOLAU et al., 2017) tem prioridade em projetos de manejo e conservação para a manutenção das suas populações naturais (VEGEFLORA, 2010). Logo, as iniciativas que pretendem manter a continuidade das regiões habitadas por espécies vegetais importantes utilizam atualmente o conhecimento dos padrões de diversidade para a definição de estratégias de conservação (RIBEIRO et al., 2010; BANDEIRA; DEIMLING; KRAEMER, 2010). Nesse contexto, os marcadores moleculares, que são sequências de DNA que revelam polimorfismo entre os indivíduos, são as ferramentas biotecnológicas de maior destaque nos estudos de diversidade genética (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; FALEIRO, 2007; LIMA et al., 2015).

Os marcadores moleculares RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) surgiram como uma ferramenta promissora para detecção de diversidade genética em populações vegetais e tem sido empregado com sucesso (MOURA et al., 2005; KRISHNAN et al., 2017; DESAI; 2018). Outro marcador, ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), supera algumas das limitações dos marcadores RAPD como, por exemplo, a utilização de uma maior temperatura de anelamento e comprimento dos *primers* o que eleva o grau de fidelidade dos resultados (ALVES et al., 2016). Assim, muitos estudos tem empregado a utilização dos dois tipos de marcadores com a finalidade de gerar dados mais confiáveis quanto a estimativa de diversidade genética (MOULIN et al., 2012; DIAS et al., 2015).

Nesse contexto, objetivou-se com este estudo explorar os níveis de diversidade genética dentro das populações, identificar os níveis de diferenciação genética entre as populações e fornecer informações de base para o estabelecimento de estratégias de conservação do gênero *Pilocarpus*.

## Metodologia

### Área de Coleta e Material Vegetal

Foram coletadas aleatoriamente amostras de sete populações de três espécies de *Pilocarpus* Vahl localizadas no estado do Ceará (*Pilocarpus jaborandi*), Maranhão (*Pilocarpus microphyllus* e *Pilocarpus demerarae*) e Piauí (*Pilocarpus microphyllus*) (Figura 1).

No Estado do Ceará as coletas foram realizadas no município de Viçosa (Tabela 1) dentro da região da Chapada da Ibiapaba onde o clima é Am (tropical chuvoso de monção), segundo classificação de Köppen. A temperatura média anual da região é de 22,9 °C e a precipitação anual média de 1350 mm, com período chuvoso concentrando-se entre os meses de janeiro a maio e o período seco geralmente estendendo-se de julho a novembro.

No Piauí, as localidades de coletas foram o município de Luzilândia e Matias Olimpo, a região de estudo caracteriza-se como clima Aw, com temperatura média de 27,2 °C e 1440 mm o valor de pluviosidade média anual, tendo os meses de janeiro a maio com os de maiores índices pluviométricos. No estado do Maranhão, cidade de Barra do Corda, as amostras foram coletadas em região de clima tropical quente e sub-úmido (Classificação aw) com estação chuvosa se estendendo de janeiro a julho e precipitação média de 1144 mm, a temperatura média anual é 26,9° e o mês mais quente é maio (KOTTEK et al., 2006). O material foi tombado no Herbário HDELTA da Universidade Federal do Piauí – UFPI, Parnaíba - Piauí.

### Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído usando o método descrito por Doyle & Doyle (1987) com algumas modificações para obter uma ótima qualidade do DNA. Aproximadamente 20 mg de folhas jovens foram macerados com tampão de extração de 800µ de CTAB 2X e 4 µ de Mercaptoetanol [CTAB 2%, Tris-HCl 0,1 mM (pH 8,0)], EDTA 20 mM (pH 8,0), NaCl 1,4 M e β-mercaptoetanol 2%] previamente aquecido em banho-maria a 60°C por 10 min. Tampão de extração foi então adicionado e a mistura aquecida por 20 min a 60 °C. Após resfriamento, 800µl de uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) foram adicionados às amostras, homogeneizados num agitador durante 1 hora e centrifugados durante 10 min a 13.000 rpm. Parte do sobrenadante resultante (~400 µl) foi transferido para



um novo tubo, ao qual foram adicionados dois terços do seu volume de isopropanol (~300 µl), depois cuidadosamente misturados por inversão e armazenados durante à noite num congelador. Após o período *overnight* o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos para precipitação do DNA que, em seguida, foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 13.000 rpm, repetindo-se esse procedimento por três vezes e posteriormente deixado à temperatura ambiente *overnight* para secagem. O DNA foi ressuscitado em 100 µl de solução de TE [Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) e EDTA 0,1 mM] durante 24 horas na bancada de laboratório, ou até a homogeneização do pellet na solução.

As amostras de DNA foram quantificadas usando um espectrofotômetro BioSpec-nano e o DNA foi diluído para uma concentração de 25 ng/µL. Para confirmar sua qualidade, algumas amostras foram quantificadas usando o método de visualização em bandas por eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5%, preparadas com tampão TBE 1x (Tris-Borato-EDTA) e coradas com GelRed-Biotium® em 1x. Utilizou-se DNA de fago lambda ( $\lambda$ ) a uma concentração de 100 ng/mL para comparação.

### **Reação em cadeia da polimerase (PCR) RAPD e ISSR**

Foram utilizados 10 *primers* ISSR (UBC807, UBC810, UBC812, UBC813, UBC821, UBC24, UBC825, UBC853, UBC856 e UBC873) e quatro *primers* RAPD (OPAP1, OPAP6, OPAP7 e OPAO8) que apresentaram bons resultados em estudo de seleção realizados por Rocha (2013) e Moura (2005) com o gênero *Pilocarpus* e que apresentaram boa resolução para os 210 indivíduos das diferentes populações amostradas no presente estudo.

A reação de PCR foi realizada com o kit TopTaq MasterMix (Qiagen). A mistura foi preparada com um volume total de 10 µL de acordo com as seguintes proporções: 4 µL de polimerase TopTaq, 4,7 µL de RNase livre de H<sub>2</sub>O, 0,8 µL de CoralLoad e 0,5 µL de iniciador. Para a reação de PCR foram utilizados 9 µL da mistura e 1 µL de DNA genômico (25 ng / µL). As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador Thermal Cyclers Tprofessional (Biometria®) com capacidade de 96 amostras utilizando os seguintes parâmetros: uma desnaturação inicial a 94°C por 1,5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 s, anelamento por 45 s na temperatura necessária para o *primer* utilizado, uma extensão a 72°C por 1,5 min e um estágio final de extensão a 72°C por 10 min. O protocolo descrito foi o mesmo para RAPD e ISSR, exceto para a temperatura de

anelamento, que foi de 36°C para todos os *primers* RAPD (ROCHA, 2013; MENESES et al., 2008 ).

Os produtos de PCR foram então executados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X, a uma corrente constante de 100 V. Para os ensaios de eletroforese, 10 µL de produto de PCR foram utilizados com 3 µL de AZUL e 2 µL de GelRed-Biotium® em 1x. As mesmas quantidades foram usadas para o grupo controle. Em todos os géis, um marcador com peso molecular conhecido foi adicionado para comparação; 5 mL de (Ladder) 100 pb (Invitrogen) foi adicionado ao cana de cada gel. Os géis foram então visualizados em um transluminador UV (Loccus Biotecnologia) e foto-documentadas.

### **Análise de dados**

Os fragmentos produzidos pela amplificação do DNA genômico de cada amostra foram utilizados como dados para este estudo. Após cuidadosa interpretação dos padrões eletroforéticos por inspeção direta, apenas fragmentos robustos e inequívocos foram considerados, enquanto aqueles com baixa intensidade ou baixa definição não foram incluídos na análise. Os padrões de bandas obtidos de RAPD e ISSR foram designados como presentes (1) ou ausentes (0) e, com isso, foi criada uma matriz binária para as análises estatísticas.

O software GenAlex 6.502 (PEAKALL; SMOUSE, 2015) foi utilizado pra calcular vários parâmetros como a porcentagem de bandas polimórficas por população (%P), índice de informação de Shannon ( $I$ ), diversidade gênica de Nei ( $H$ ), heterozigotidade esperada ( $He$ ) baseado em Nei (1978) entre populações e entre indivíduos dentro da população. A matriz de similaridade foi submetida à análise de agrupamento pelo método do grupo de pares não ponderados para a média aritmética (UPGMA), e um dendrograma foi gerado.

O poder discriminatório dos *primers* foi determinado por meio de três parâmetros: (1) PIC (Polymorphism Information Content); (2) MI (Marker Index); e (3) RP (Resolving Power). O valor do PIC para o *primer* de ISSR foi calculado como  $PIC_i = 2 f_i (1 - f_i)$ , sendo  $PIC_i$  o PIC individual do marcador  $i$ ,  $f_i$  a frequência de fragmentos presentes do marcador por acesso e  $1 - f_i$  a frequência de fragmentos ausentes de acordo com Roldán-Ruiz et al. (2000). Posteriormente foram obtidas médias entre os valores de PIC dos fragmentos de cada *primer*. O MI foi obtido a partir da seguinte fórmula:  $MI = PIC \times n \times n_p / (n_p + n_m)$  de acordo com Varshney et al. (2007), sendo  $n$  o número médio fragmentos por *primer*,  $n_p$  o número de fragmentos polimórficos e  $n_m$  o número de fragmentos monomórficos. O RP de cada *primer*

foi calculado como representado a seguir:  $RP = \sum I_b$ , sendo  $I_b$  o nível de informação de cada fragmento. O  $I_b$  pode ser representado em uma escala de 0-1 pela seguinte fórmula:  $I_b = 1 - (2 \times |0,5 - fi|)$  de acordo com Prevost e Wilkinson (1999).

A estimação das proporções de variabilidade genética dentro e entre populações foi feita usando análise de variância molecular, como implementado em GenAlEx 6.502 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). Neste software, o cálculo é baseado no parâmetro PhiPT (um análogo de Fst), que é adequado para a realização de AMOVA usando marcadores dominantes. Múltiplas comparações dos valores de PhiPT foram calculadas em GenAlEx para todos os pares de populações usando um teste de permutação (999 replicações) para calcular seus valores de P.

A divergência genética entre populações foi investigada usando a distância genética sem viés e as medidas de identidade de Nei (1978). Estes cálculos foram realizados usando GenAlEx 6.502 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). O software PAST 2.17c (HAMMER et al., 2001) foi usado para construir um dendrograma UPGMA (método de grupo de par não ponderado com média aritmética) baseado na distância genética Nei entre populações (Nei 1978), e para calcular a correlação entre interpopulações distâncias genéticas e geográficas usando o teste de Mantel.

Diferentes visões de semelhanças interpopulacionais foram obtidas usando a análise de coordenadas principais (PCoA). As matrizes de distância genética foram calculadas usando GenAlEx versão 6.502 (PEAKALL; SMOUSE 2006). Para a análise de todos os indivíduos, utilizou-se uma matriz de distâncias interindividuais (GD), definida para dados binários por Peakall e Smouse (2015). As distâncias genéticas interpopulacionais foram calculadas usando distâncias genéticas de Nei entre populações. Ordenações e árvores mínimas foram calculadas na versão 2.17c do PAST (HAMMER et al. 2001).

## **Resultados**

### **Análises RAPD-PCR**

Os *primers* RAPD produziram um total de 43 fragmentos de DNA com média de 10,75 fragmentos por iniciador, dos quais 26 (60,46%) foram polimórficos e 17 (36,54%) monomórficos (Tabela 2). O número de fragmentos de DNA produzidos por *primer* variou de nove em OPAP1 a 13 em OPAP7, enquanto o tamanho dos produtos amplificados variaram

de 200-1050 pb. Houve pequena variação quanto à porcentagem de polimorfismo produzida pelos marcadores RAPD, observando-se uma menor porcentagem (55,55%) em OPAO8.

Os valores de PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica), analisados para caracterizar a capacidade de cada marcador de RAPD de apresentar locos polimórficos, variaram de 0,16 (OPAO8) a 0,24 (OPAP7) (Tabela 2). O valor médio do PIC para todos os locos avaliados foi de 0,22. O Rp (poder de resolução) foi maior para o *primer* OPAP7 (5,23) e menor para OPAP1 (4,36). O índice do marcador (MI) calculado para os *primers* de RAPD mostrou uma média de 2,19, variando entre 1,76 (OPAP8) e 2,63 (OPAP7).

A análise de agrupamento foi realizada com base nas distâncias genéticas de Nei e o dendrograma baseado na análise de UPGMA para os *primers* RAPD foi gerado (Figura 2). As populações foram agrupadas em três grupos, um representado pelas populações do Centro de Ramos (PMC), Mata Fresca (PMM), Cutias (PML) e Sumauma da Mata (PMS), outro grupo formado pelas populações do Saco (PJS) e Juá de Vieira (PJJ), enquanto que a população Baixão do Murici (PDB), mostrando menor semelhança entre todas, foi agrupada de forma isolada. O agrupamento 1 foi dividido em 2 subagrupamentos com as populações *Pilocarpus jaborandi* (Jua dos Vieiras e Saco), já o agrupamento 2 foi dividido em 4 subagrupamentos com as populações da espécie *Pilocarpus microphyllus* (Centro de Ramos, Cutias, Mata Fresca e Sumauma da Mata). O grau de similaridade baseado na identidade genética de Nei (1978) varia de 0,962, entre as populações Cutias e Mata Fresca e 0,823 entre as populações Juá dos Vieiras e Sumauma da Mata. Os dados sobre a identidade genética apontam uma maior proximidade entre genótipos da mesma espécie, no entanto, para a espécie *P. demerarae* os valores de identidade genética mostraram uma maior proximidade com os genótipos de *P. microphyllus* (Cutias e Mata Fresca), 0,941 e 0,951, respectivamente.

### **Análises ISSR-PCR**

Os *primers* ISSR produziram um total de 110 fragmentos de DNA com uma média de 11 fragmentos por iniciador, dos quais 76 (69,09%) foram polimórficos e 34 (30,91%) monomórficos (Tabela 2). O número de fragmentos de DNA produzidos por *primer* variou de 7 em UBC821 a 13 em UBC813, enquanto o tamanho dos produtos amplificados variaram de 200-1050 pb. A variação entre a % de polimorfismo produzido por cada marcador foi de 41% (UBC824) a 100% (UBC856), visto que, sete marcadores (70%) apresentaram polimorfismo acima de 75%.

Os valores de PIC (Conteúdo de informação polimórfica), analisados para caracterizar a capacidade de cada marcador de ISSR de apresentar locos polimórficos, variaram de 0,12 (UBC873) a 0,28 (UBC812) (Tabela 2). O valor médio do PIC para todos os locos avaliados foi de 0,22. Os valores de PIC entre 0,01 e 0,5 são esperados em ambos os marcadores RAPD e ISSR, uma vez que são classificados como dominantes e valores mais altos de PIC indicam mais conteúdo informativo (GHISLAIN et al., 1999).

Rp (poder de resolução) foi maior para o *primer* UBC812 (6,16) e menor para UBC873 (2,54) com média de 4,88. O índice do marcador (MI) calculado para os *primers* de ISSR mostrou uma média de 2,23, variando entre 1,36 (UBC873) e 3,08 (UBC812).

A análise de agrupamento foi realizada com base nas distâncias genéticas de Nei e o dendrograma baseado na análise de UPGMA para os *primers* ISSR foi gerado (Figura 3). As populações foram agrupadas em dois grupos, um representado pelas populações do Centro de Ramos, Mata Fresca, Cutias e Sumauma da Mata e outro por populações localizadas em Juá de Vieira, Saco e Baixão do Murici. O agrupamento 1 foi dividido em 2 subagrupamentos com as populações de *P. demerarae* (Baixão do Murici) formando um grupo isolado das populações de *P. jaborandi* (Juá dos Vieiras e Sumauma da Mata). O agrupamento 2 foi dividido em 2 subagrupamentos formados por *P. microphyllus* (Centro de Ramos e Mata Fresca). O grau de similaridade baseados na identidade genética de Nei (1978) variam de 0,938, entre as populações de Cutias (*P. microphyllus*) e Mata Fresca (*P. microphyllus*) e 0,808 entre as populações Baixão do Murici (*P. demerarae*) e Mata Fresca (*P. microphyllus*). Os genótipos das espécies de *P. microphyllus* e *P. jaborandi*, segundo os dados de identidade, apresentaram-se distantes, já a espécie *Pilocarpus demerarae* mostrou-se mais próxima de *P. jaborandi* (Saco e Juá dos Vieiras).

### **Análise de dados combinados de RAPD e ISSR**

Os estudos de variação genética realizados com base em dados combinados de RAPD e ISSR são apresentados na Tabela 3. Como esperado, todos os parâmetros são mais ou menos iguais à média dos dois dados de cada marcador. Os valores de número médio de bandas polimórficas por ensaio, PIC, Rp e MI são ligeiramente maiores para ISSR (7,6, 0,22 e 2,21) do que para os marcadores RAPD (6,5, 0,2, e 2,73). O Poder de Resolução (RP) e polimorfismo (%P) dos fragmentos também foram maiores para os marcadores ISSR (4,88 e 69,75%) do que pra RAPD (4,69 e 59,75%).

*Diversidade genética dentro das populações com marcadores RAPD e ISSR combinados*

As porcentagens de locos polimórficos (% P) observados na Tabela 4. mostram que os maiores valores foram encontrados nas populações PDB (Barra do Corda) e PML (Cutias) com 32,38 e 36,19%, respectivamente. Com 21,90%, 24,29% e 27,62 as populações de Centro de Ramos (PMC), Juá dos Vieiras (PJJ) e Saco (PJS) apresentaram os menores valores de polimorfismo entre todas. As populações de Mata Fresca (29,05%) e Sumauma da Mata (29,52%) apresentaram valores intermediários com porcentagens aproximadas.

Os valores sobre as taxas de polimorfismo (%P) condizem com os valores obtidos a partir dos índices de diversidade genética de Shanon ( $I$ ) e heterozigosidade esperada ( $He$ ) (Tabela 4), que foram maiores para as populações de Sumauma da Mata, Baixão do Murici e Cutias com valores, respectivamente de: 0,131 ( $He$ ), 0,085 ( $I$ ), 0,132 ( $He$ ), 0,085 ( $I$ ) e 0,146 ( $He$ ) e 0,095 ( $I$ ). As populações de Mata Fresca e Centro de Ramos apresentaram os menores valores: 0,1080 ( $I$ ), 0,074 ( $He$ ) e 0,112 ( $I$ ), 0,073 ( $He$ ), respectivamente, e as populações de Juá de Vieira, com 0,115 ( $I$ )  $He$  e 0,075 ( $He$ ), e Saco, com ( $I$ ) 0,125 e 0,081 ( $He$ ), apresentaram valores intermediários.

*Diversidade genética entre as populações com marcadores RAPD e ISSR combinados*

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) (Figura 4) mostraram que a variabilidade genética foi maior entre as populações (63%) do que dentro (37%). O valor do índice de fixação de PhiPT ( $\Phi_{PT} = 0,631$ ,  $P \geq 0,001$ ) mostrou que existem diferenças significativas entre as populações (Tabela 8) e nas comparações múltiplas dos valores de PhiPT (Tabela 6), todos os pares populacionais foram significativamente diferentes ( $P \geq 0,001$ ).

O dendrograma gerado pela UPGMA obtido da análise de agrupamento de dados combinados de RAPD e ISSR apresentou padrão de agrupamento parcialmente similar (Figura 5) como obtido individualmente. As sete populações foram agrupadas em dois grupos principais, no primeiro agrupamento a população Baixão do Murici formou um grupo separado do subagrupamento das populações Juá de Vieira e Saco. No segundo agrupamento foi possível se obter dois subagrupamentos formados pelas populações de Mata Fresca e Cutias e pelas populações Sumauma da Mata e Centro de Ramos.

A partir dos dados de similaridade genética de Nei (1978) as populações de Cutias e Mata Fresca apresentaram-se mais próximas genotipicamente (0,943) (Tabela 6). O menor valor de similaridade (0,824) foi observado entre as populações de Saco e Sumauma da Mata. A distância genética de Nei (Nei 1978) variou de 0,059 a 0,193, com menor valor encontrado entre Cutias e Mata Fresca e maior entre Saco e Sumauma da Mata.

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi realizada com a matriz de distância de Nei (1978) e está representada na figura 6 e 7. Na primeira ordenação o primeiro eixo representa 48,11% e o segundo 26,80% da variância total do conjunto de dados e, por tanto, podem ser considerados os padrões mais importantes. O eixo 1 mostrou que as populações Juá de Vieira e Saco são mais divergentes das demais. E eixo 2 evidencia uma distância maior entre a população Baixão do Murici e Mata Fresca. Na árvore geradora mínima (MST) os pontos são ligados aos seus vizinhos mais próximos na matriz de distância Nei e, assim, compensa a visão mais distorcida das relações inevitáveis em uma ordenação bidimensional. No eixo 1 o MST liga as populações Juá de Vieira e Saco as populações Mata Fresca, Sumauma da Mata e Cutias.

As simulações feitas com o programa Structure 2.3.4. com abordagem Bayesiana, o número K (grupos genéticos) foi definido como 5, pois este foi o valor de  $\Delta K$  determinado (Figura 9). É evidenciado uma estruturação das populações de Jua dos Vieiras e Saco, representadas pelo genótipo de *P. jaborandi*. Centro de Ramos e Suamuma da Mata também formaram um grupo distinto, representadas por *P. microphyllus*, as demais populações, do Baixão do Murici (*P. demerarae*), Cutias e Mata Fresca (*P. microphyllus*), formaram grupos separados (Figura 10). Os dados corroboram com o agrupamento obtido pela UPGMA.

## Discussão

A porcentagem de locos polimórficos é um parâmetro utilizado para estimar o grau de eficiência de cada marcador ao se avaliar a diversidade genética de populações (GRATIVOL et al., 2011; SILVA et al., 2016) e os marcadores ISSR e RAPD, utilizados no presente estudo, apresentaram altos níveis de polimorfismo por iniciador, com média de 63,90% a 60,17%, respectivamente. Os níveis de polimorfismo observados dentro das populações com os dois marcadores combinados foram baixos (21,90 % a 36,19), em contrapartida, Rocha (2013) em estudo de diversidade, utilizando marcadores ISSR, relatou valores de polimorfismo dentro das populações mais elevado, variando de 47,78% a 80,00%. A média observada em populações de *Pilocarpus pennatifolius* do Rio Grande do Sul foi alta, com

média de 77% dos locus polimórficos para as cinco populações estudadas (BANDEIRA; DEIMLING; KRAEMER, 2010).

Os valores médios do índice de diversidade de Shannon (I) e de heterozigosidade esperada (He) foram maiores na população de Cutias (I=0,146 e He=0,095) e menores na população de Centro de Ramos (I=0,108 e He=0,073), os dados corroboram com os níveis de polimorfismo para as duas populações (36,19% e 21,90%). O índice de Shannon (I) é um identificador de diversidade, que varia entre 0 e 1, quanto mais próximo for de 1, mais diversa será a espécie, já a heterozigosidade esperada (He) indica a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto em um locus de acordo com suas frequências alélicas (COSTA et al., 2015). Em condições naturais é previsto que o índice de heterozigosidade esperada (He) seja sempre diferente de zero, pois a possibilidade de os genótipos incorporarem novos alelos fonte de cruzamentos ou de ocorrer perdas em populações pequenas ou fragmentadas por deriva genética é maior (BARREIRA et al., 2006; COSTA et al., 2011).

Os valores do índice de Shannon (I) e de heterozigosidade esperada (He) evidenciam uma menor diversidade dentro das populações de *P. microphyllus* ocorrentes no Maranhão (Barra do Corda) e Piauí (Matias Olimpo). O valor de He (0,258) e I (I=0,378) encontrados por Rocha (2013) em populações de *P. microphyllus* da região Nordeste Setentrional foram maiores que no presente estudo, porém, menor que os valores encontrados em populações de *P. pennatifolius* Lemaire. (I=0,944) do Rio Grande do Sul, ambos utilizando marcadores ISSR (BANDEIRA; DEIMLING; KRAEMER, 2010). Com marcadores RAPD, Moura (2005) observou valores de Shannon (I) de 0,230 a 0,321 em banco de germoplasma de jaborandi (*P. microphyllus*) da Embrapa Amazônia Oriental. Os dados sugerem que existe uma maior diversidade em espécies de *Pilocarpus* presentes em regiões que sofrem menos com a pressão antrópica. Os bancos de germoplasma mostram uma maior diversidade o que pode ser influenciado pelos diferentes acessos de locais de coletas diferentes, como observado por Costa et al. (2011) em *Hancornia speciosa* Gomes com valores de He e I de 0,17 e 0,25, respectivamente.

Os valores observados indicam baixa diversidade dentro das áreas coletadas e podem ser atribuídos à fragmentação das áreas em que foram obtidos, com forte pressão de seleção antrópica (COSTA; SILVA; LEDO, 2011). A população de Cutias (*Pilocarpus microphyllus*), mesmo com forte extrativismo na região, mostrou valores de diversidade acima das demais. Em estudo de população antes e após sofrerem processo de exploração, Barreira et al. (2006) reportaram uma maior diversidade em área que sofreram exploração, pois em áreas de



extrativismo a redução da densidade vegetal pode aumentar o tamanho reprodutivo da população resultando em uma maior diversidade genética.

Bem distribuídas no Estado do Maranhão, as populações de *P. microphyllus* (Centro de Ramos e Sumauma da Mata) vêm sofrendo intenso extrativismo desde a segunda metade do século passado, o que contribuiu para redução populacional sendo, possivelmente, o fator primordial para os baixos valores de diversidade apresentados. As populações de *P. jaborandi* (Juá dos Vieiras e Saco), apesar dos dados de extrativismo serem escassos, estão situadas em regiões de crescimento da agricultura, o que influencia na dinâmica das formações vegetais contribuindo para o isolamento das populações e baixos índices de diversidade (COSTA; SILVA; LEDO, 2011). Os mesmos valores foram discutidos no estudo de Moura (2003), onde o autor apontou um grande histórico de extração de folha de jaborandi principalmente no estado do Maranhão que foram as regiões que apresentaram menores índices de diversidade.

Os dados de similaridade genética de Nei (1978) (Tabela 6) evidenciam uma maior proximidade em genótipos da mesma espécie, onde *P. microphyllus* nas duas populações coletadas no estado do Piauí (Cutias e Mata Fresca) tiveram maiores valores (0,943) que as demais. As populações de *P. jaborandi* (Saco) e *P. microphyllus* (Sumauma da Mata) apresentaram-se com menores valores de similaridade (0,824). Os dados de distância genética de Nei (1978) mostram valores menores (0,059) para as populações de *P. microphyllus* de Cutias e Mata Fresca e maiores valores (0,193) para Saco (*P. jaborandi*) e Sumauma da Mata (*P. microphyllus*). Bandeira et al. (2010) observou uma variação de similaridade genética de Nei (1978) de 0,37 a 0,73, estando as progênies de uma mesma população mais próxima do que entre progênies de populações diferentes.

A maior variação molecular encontrada (AMOVA) foi entre as populações (63%) dos cinco grupos definidos, mostrando que existe significativa diferenciação genética, e com a variação dentro das populações de 37% (Tabela 5), atingindo valor para PhiPT de 0,631 (Figura 8). Os valores apresentados de PhiPT (0,631) indicam uma grande estruturação das populações e uma falta de fluxo gênico entre elas. Assim, esses dados confirmam os padrões filogenéticos das espécies estudadas a partir da evidência de diferenciação utilizando os marcadores moleculares ISSR e RAPD, o que corrobora a forte tendência de estruturação populacional, o que significa que não existe fluxo gênico entre as populações ou, mesmo, que pode haver *locis* específicos para cada população/espécies.

Uma variável importante que influencia a estruturação genética de populações é a permanente fragmentação florestal que ocasionada perdas significativas do número de

indivíduos (BANDEIRA; DEIMLING; KRAEMER, 2010). Alguns estudos mostraram dados alarmantes sobre a grande perda florestal na região Nordeste do Brasil, em especial do estado do Maranhão (REIS, 2010). Esse fator vem interferindo principalmente em espécies, na qual seus agentes polinizadores são animais e insetos, como é o caso das espécies de *Pilocarpus* (SOUZA et al., 2003; MOURA, 2005). As plantas alogamas que praticam, preferencialmente, fecundação cruzada como os representantes de *Pilocarpus* spp., têm uma forte tendência a apresentar uma maior variabilidade dentro das populações, porém, estudos mostram que mesmo espécies alogamas pode-se esperar níveis de diversidade entre populações elevados, fator relacionado ao aumento da autofecundação (FERREIRA et al., 2012).

A árvore de análise UPGMA, gerada pelo programa Past, utilizando a matriz de distância de Nei (1978) dividiu as populações em sete subagrupamentos. É possível observar que os marcadores ISSR e RAPD foram efetivos na separação dos grupos de genótipos das mesmas espécies, sendo que populações de *P. jaborandi* formaram dois subagrupamentos mais próximos e com a maior distância entre todos os outros indivíduos. O terceiro grupo é formado por subagrupamentos das espécies de *P. microphyllus*, localizadas no Centro de Ramos, Sumauma da Mata, Cutias e Mata Fresca. É importante destacar que as populações também ficaram agrupadas segundo os estados da Região Nordeste Setentrional, com as populações de Centro de Ramos e Sumauma da Mata do Maranhão e Cutias e Mata Fresca do Piauí. As linhas da Figura 12 e 13 indica a árvore de expansão mínima (MST) que liga cada ponto ao que é mais próximo de acordo com a matriz de distância de Nei (1978) usado para a PCoA. As linhas reforçam a divergência existente entre os genótipos das populações de *P. demerarae*, *P. jaborandi* e *P. microphyllus*. Adicionalmente, os dados gerados mostram pouco fluxo gênico mesmo em populações de regiões próximas, como das populações de Sumauma da Mata e Centro de Ramos (*P. microphyllus*).

A partir dos dados de estruturação pode se definir genótipos distintos de *Pilocarpus* dos estados do Ceará, Piauí e Maranhão e os dados de diversidade mostram que são necessárias medidas urgentes de recuperação da diversidade nestas áreas. Pode-se considerar estratégias de conservação *ex situ* e *in situ* nas populações de *Pilocarpus* spp., pois é provável que haja alelos exclusivos entre as populações da mesma espécie e por conta dos baixos índices de diversidade dentro das espécies. Estes índices foram baixos, mesmo em populações que sofreram uma menor pressão extrativista, como é o caso de *P. jaborandi*, apresentaram baixa diversidade genética e o fluxo gênico é bastante reduzido.

Bancos de Germoplasma podem ser considerados com realização de coletas em diferentes áreas onde se encontram as populações ou mesmo em outras populações presentes

nos estados do Ceará, Maranhão, Piauí. Para *Pilocarpus* já são distribuídos no Brasil bancos de germoplasma que asseguram a manutenção do acervo genético, no entanto, se reduzem a poucas espécies e grande parte delas não possuem estudos *in situ* e os dados de distribuição das mesmas são quase inexistentes (CALDEIRA et al 2017). Para a conservação *in situ* a restauração ambiental é primordial visando à criação de sistema semelhantes às formações vegetais originais, de modo a proporcionar condições de autossustentabilidade, pela regeneração natural, manutenção das populações regeneradas artificialmente e garantia de diversidade genética, que possibilite a continuidade evolutiva das espécies (NUNES et al., 2015).

## Conclusão

O presente estudo mostrou a utilidade de marcadores ISSR e RAPD para discriminar genótipos e avaliar a diversidade em populações de *Pilocarpus* spp., grupo com um histórico marcante de uso pela indústria farmacêutica. Os marcadores ISSR demonstraram ser levemente mais reproduzíveis e mais capazes de demonstrar polimorfismo em comparação com os *primers* arbitrários RAPDs para as espécies estudadas.

Os dados apontam que existe baixa diversidade intrapopulacional em todas as populações estudadas. Os menores valores foram encontrados em populações de *P. microphyllus* dos estados do Piauí e Maranhão. Foi observada uma similaridade maior entre genótipos da mesma espécie e maior distância entre espécies distintas. O grande valor econômico da espécie em conjunto aos dados apresentados sugere que são necessários projetos de conservação que visem o aumento da diversidade dentro das populações estudadas, aumento do fluxo gênico entre elas e a criação de bancos de germoplasma para a conservação *ex situ*.

## Referências Bibliográficas

ALVES, Mercia Freitas et al. Analysis of genetic diversity of a native population of *Myrcia lundiana* Kiaersk. plants using ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n.4, 2016.

BANDEIRA, A. J.; DEIMLING, L. I.; KRAEMER, J. E. G. Variabilidade genética do jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius* Lemaire; Rutaceae) em populações naturais da região noroeste do Rio Grande do Sul. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA - 2009/2010**, n.8, 2010.

BARREIRA, S.; SEBBENN, A.M.; SCOLFORO, J.R.S.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade genética e sistema de reprodução em população nativa de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish sob exploração. **Scientia Forestalis**, v.71, p.119-130, 2006.

CALDEIRA, Cecilio Frois et al. Sustainability of Jaborandi in the eastern Brazilian Amazon. **Perspectives in ecology and conservation**, v. 15, n. 3, p. 161-171, 2017.

COSTA, D. F. et al. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015.

COSTA, Tatiana Santos et al. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 5, p. 499-508, 2011.

DESAI, Shikha et al. Assessment of genetic variability among various genotypes of critically endangered and medicinally important species: *Chlorophytum borivillianum* using RAPD markers. **Assessment**, v. 6, n. 6, 2018.

DIAS, Francisco Tiago Cunha et al. Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 3, p. 563-572, 2015.

DOYLE J. J.; DOYLE J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genéticos moleculares aplicados a programas de conservação e o uso de recursos genéticos**. In: GAMA, L. C. (Org.). Artigos publicados na mídia: coletânea 2007. [Planaltina, DF: s.n.], 2007.

FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª Ed. Embrapa – Cenargen, p.220, 1998.

FERREIRA, Crystianne Bentes Barbosa et al. Diversidade genética molecular de progênies de dendezeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 3, p. 378-384, 2012.

Flora do Brasil. *Pilocarpus* spp distribuição. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB866>. Acesso em 14 de abr. 2019.

GHISLAIN, M.; ZHANG, D.;FAJARDO, D.; HUAMAN, Z.; HIJMANS, R.J. Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.46, p.547-555. 1999.

GORNITSKY, Mervyn et al. Double-blind randomized, placebo-controlled study of pilocarpine to salvage salivary gland function during radiotherapy of patients with head and neck cancer. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 98, n. 1, p. 45-52, 2004.

GRATIVOL, C.; MEDEIROS, C. F. L.; HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P. C. G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 4245-4256, 2011.

HAMMER, Oyvind; HARPER, David AT; RYAN, Paul D. Palaeontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 2001.

HOLMSTEDT, Bo; WASSÉN, S. Henry; SCHULTES, Richard Evans. Jaborandi: an interdisciplinary appraisal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 1, n. 1, p. 3-21, 1979.

LIMA, David Fernandes et al. Prospecção tecnológica do jaborandi (*Pilocarpus Microphyllus*): espécie economicamente importante no norte e nordeste do Brasil. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 1, p. 1626-1638, 2015.

LIMA, David Fernandes et al. Seasonal change in main alkaloids of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), an economically important species from the Brazilian flora. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0170281, 2017.

LIMA, Eveline Nogueira et al. Diversidade genética de clones de aceroleira avaliada por meio de marcadores moleculares ISSR. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 2, p. 174-180, 2015.

LIN, Yi-Huang; FANG, Lian-Hua; DU, Guan-Hua. Pilocarpine. In: **Natural Small Molecule Drugs from Plants**. Springer, Singapore, 2018. p. 309-312.

KAASTRA, R. C. Pilocarpinae (Rutaceae). Flora Neotropica; Monograph n. 33, **The New York Botanical Garden**, New York, 1982.

KOTTEK, Markus et al. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 15, n. 3, p. 259-263, 2006.

KRISHNAN, A. G. et al. Estimation of genetic diversity in nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) selections using RAPD markers. **International Journal of Plant Sciences (Muzaffarnagar)**, v. 12, n. 2, p. 102-107, 2017.

MARTINELLI, Gustavo; MORAES, Miguel Avila. **Livro vermelho da flora do Brasil. 2013**. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/arquivos/arquivos/pdfs/LivroVermelho.pdf>. Acesso em 10 jun. 2019.

MENEZES, Ivandilson Pessoa Pinto de et al. Distância genética entre linhagens avançadas de germoplasma de algodão com uso de marcadores de RAPD e microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 10, p. 1339-1347, 2008.

MOULIN, Monique Moreira et al. A comparison of RAPD and ISSR markers reveals genetic diversity among sweet potato landraces (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, n. 2, p. 139-147, 2012.

MOURA, E.F. et al. Genetic diversity in a jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf.) germplasm bank assessed by RAPD markers. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.7, n.3, p.1-8, 2005.

MOURA, E. F. et al. Diversidade genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) por meio de marcadores RAPD. In: **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO

DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. Melhoramento da qualidade de vida:[anais]. Porto Seguro: SBMP, 2003., 2003.

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

NICOLAU, Lucas AD et al. Epiisopiloturine hydrochloride, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus* leaves, protects against naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 188-195, 2017.

NUNES, Yule Roberta Ferreira et al. Sobrevivência e crescimento de sete espécies arbóreas nativas em uma área degradada de floresta estacional decidual, norte de minas gerais. **Revista Árvore**, v. 39, n. 5, p. 801-810, 2015.

PEAKALL R, SMOUSE PE. 2015. **GenAIEx 6.502 Download and Documentation [Sep 10, 2015]; Appendix 1 – Methods and Statistics in GenAIEx 6.5**. Disponível online em: <https://biology.assets.anu.edu.au/GenAIEx/Download.html>. Acesso em 5 mar. 2019.

PEAKALL, R. O. D.; SMOUSE, Peter E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular ecology notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.

PINHEIRO, Claudio Urbano. Extrativismo, cultivo e privatização do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 2, p. 141-150, 2002.

PINHEIRO, Claudio Urbano. Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): a wild species. **Economic Botany**, v. 51, n. 1, p. 49-58, 1997.

PIRANI, J.R. 2015. ***Pilocarpus* in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB866>. Acesso em 10 jun. 2019.

PREVOST, A.; WILKINSON, M. J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and applied Genetics**, v. 98, n. 1, p. 107-112, 1999.

PRITCHARD JK, WEN X, FALUSH D. 2010. **Documentation for *structure* software: Version 2.3, 2 February 2010**. Disponível em: [https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure\\_software/release\\_versions/v2.3.4/html/structure.html](https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure_software/release_versions/v2.3.4/html/structure.html). Acesso em 19 Fev. 2019.

REIS, C. S.; CONCEIÇÃO, G. M.; Aspectos florísticos de um Fragmento de Vegetação, localizado no Município de Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v.6, n.2, 2010.

RIBEIRO, M.V.; BIANCHI, V.J.; RODRIGUES, I.C.S.; MARIOT, M.P.; BARBIERI, R.L.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Diversidade genética entre acessos de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reis.) coletados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.12, n.4, p.443-451, 2010.

ROCHA, Jefferson A. et al. Anthelmintic, antibacterial and cytotoxicity activity of imidazole alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* leaves. **Phytotherapy research**, v. 31, n. 4, p. 624-630, 2017.

ROCHA, Jefferson A. et al. ISSR primer selection for genetic variability analyses with jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew., Rutaceae). **Forest Research: Open Access**, v. 3, n. 4, 2014.

ROCHA, Jeferson A. **Variabilidade genética e avaliação anti-schistosoma dos alcalóides pilosina, epiisopilosina, isopilosina e macaubina de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew.)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2013.

ROLDÁN-RUIZ, I. et al. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, v.6, p. 125-134, 2000.

SARAYA, A. C. H. F.; ABREU, I. N.; ANDREAZZA, N. L.; EBERLIN, M. N.; MAZZAFERA, P.; Pilocarpina e alcaloides relacionados em *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae). **Moléculas**, v. 13, n. 7, p. 1518-1529, julho. 2008.

SIDHU, Preena. Endangered jaborandi. **British dental journal**, v. 217, n. 1, p. 2, 2014.

SILVA, Bruna Mezzalira da et al. Diversidade genética estimada com marcadores entre sequências simples repetidas em cultivos comerciais de Cupuaçuzeiro. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 108-113, 2016.

SOUZA, LUIZ A. et al. Morfologia e anatomia da flor de *Pilocarpus pennatifolius* Lem.(Rutaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 175-184, 2003.

SKORUPA, L.A.; PIRANI, J.R. A new species of *Pilocarpus* (Rutaceae) from northern Brazil. **Brittonia**, v.56, p. 147–150, 2004.

VALDEZ, Ingrid H. et al. Use of pilocarpine during head and neck radiation therapy to reduce xerostomia and salivary dysfunction. **Cancer**, v. 71, n. 5, p. 1848-1851, 1993.

VARSHNEY, R. K. et al. Identification and validation of a core set of informative genic SSR and SNP markers for assaying functional diversity in barley. **Molecular Breeding**, v. 22, n. 1, p. 1-13, 2007.

VEGEFLORA, Plano de manejo florestal comunitário: *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardi. Parnaíba, **Vegeflora**, 2010. 71 p.

## APÊNDICE – Lista de Tabelas

Tabela 1. Populações, espécies e locais de coleta de *Pilocarpus* spp para as análises RAPD e ISSR.

<b>Espécies</b>	<b>Código</b>	<b>Amostras</b>	<b>Longitude (E)</b>	<b>Latitude (N)</b>	<b>Local</b>	<b>Voucher</b>
<i>Pilocarpus jaborandi</i>	PJS	30	03°35'03.4''	41°19'03.2''	Saco – Viçosa	5798
<i>Pilocarpus jaborandi</i>	PJJ	30	03°31'22.8''	41°16'58.1''	Juá dos Vieiras – Viçosa	5795
<i>Pilocarpus microphyllus</i>	PMC	30	05°17'40.7''	45°11'31.5''	Centro de Ramos – Barra do Corda	5138
<i>Pilocarpus microphyllus</i>	PMS	30	05°08'52,2''	45°08'40.9''	Sumauma da Mata – Barra do Corda	5137
<i>Pilocarpus microphyllus</i>	PML	30	03°41'18.8"	42°28'43,9"	Cutias – Luzilândia	5797
<i>Pilocarpus microphyllus</i>	PMM	30	03°42'52.9''	42°32'19.8''	Mata Fresca – Matias Olimpo	5796
<i>Pilocarpus demerarae</i>	PDB	30	05°07'41.5''	45°09'51.6''	Baixão do Murici – Barra do Corda	5139



Tabela 2. Resumo da amplificação de 10 *primers* ISSR e 4 *primers* RAPD usados para as análises de diversidade genéticas em genótipos do gênero *Pilocarpus*.

S. no.	Iniciadores ISSR	Sequência (5' > 3')	Número total de locus	Número de locus monomórficos	Número de locus polimórficos	% de polimorfismo	Tamanho fragmentos (bp)	PIC	RP	MI
1.	UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	12	3	9	75,00	300-1050	0,24	4,71	2,64
2.	UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	12	3	9	75,00	200-1000	0,25	5,84	2,73
3.	UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	12	3	9	75,00	200-1000	0,28	6,16	3,08
4.	UBC 813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	13	3	10	76,92	200-1050	0,27	5,98	3,07
5.	UBC 821	GT GT GT GT GT GT GT GT TT	7	2	5	71,42	300-800	0,14	3,49	1,57
6.	UBC 824	TCT TCT TCT TCT TCT CG	12	7	5	41,66	200-1050	0,18	5,13	2,05
7.	UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	11	4	7	63,63	250-900	0,25	5,98	2,70
8.	UBC 853	TCT CTC TCT CTC TCT CTR	11	4	7	63,63	300-1050	0,18	3,51	2,01
9.	UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA <sup>a</sup>	10	0	10	100,00	200-1000	0,25	5,53	2,77
10.	UBC 873	GAC AGA CAG ACA GACA	10	5	5	50,00	250-1050	0,12	2,54	1,36
-	Média	-	11	3,4	7,6	63,90	200-1050	0,21	4,88	2,23
-	Total	-	110	34	76	-	-	-	-	-
S. no.	Iniciadores	Sequência (5' > 3')	Número	Número de	Número de	% de	Tamanho dos	PIC	Rp	(MI)

RAPD			total de locus	locus monomórficos	locus polimórficos	polimorfismo	fragmentos (bp)			
11.	OPAP-1	AACTGGCCCC	10	4	6	60,00	300-900	0,19	4,36	2,09
12.	OPAP-6	GTCACGTCTC	11	4	7	63,63	250-1000	0,21	4,73	2,29
13.	OPAP-7	ACCACCCGCT	13	5	8	61,53	200-1050	0,24	5,23	2,63
14.	OPAO-8	ACTGGCTCTC	9	4	5	55,55	350-1000	0,16	4,47	1,76
-	Média	-	11,5	4,25	6,5	60,17	200-1050	0,2	2,19	4,7
-	Total	-	46	17	26	-	-	-	-	-

Tabela 3. Resumo de vários parâmetros para diferentes marcadores (RAPD e ISSR) utilizados no estudo.

S. no.	Detalhes de amplificação	RAPD	ISSR	RAPD+ISSR
1.	<i>Primers</i> (no.)	4	10	14
2.	Total de bandas (no.)	43	110	153
3.	Total de bandas por <i>primer</i> (no.)	10,75	11	10,92
4.	Bandas polimórficas (no.)	26	76	102
5.	Bandas polimórficas por <i>primer</i> (no.)	6,5	7,6	7,28
6.	Bandas monomórfica (no.)	17	34	51
7.	Bandas monomórficas por <i>primer</i> (no.)	4,25	3,4	3,64
8.	Polimorfismo	59,75%	63,90%	62,71%
9.	Conteúdo de informação polimórfica (PIC)	0,2	0,22	0,21
11.	Poder de resolução (RP)	4,69	4,88	4,78
12.	Índice do marcador (MI)	2,19	2,23	2,21
13.	Tamanho dos produtos amplificados (pb)	300-1050	250-1050	250-1050

Tabela 4: Diversidade genética estimada para as sete populações de *Pilocarpus* usando o programa GenAlEx 6.502 para os marcadores ISSR e RAPD. N – Tamanho da amostra, Na – Número de diferentes alelos, Ne – Número de alelos efetivos, I – Índice de Shannon, He – Heterozigosidade Esperada, uHe – Heterozigosidade Esperada imparcial, %P – Porcentagem de locos polimórficos. (PMC: Centro de Ramos, PMS; Sumauma da Mata, PML: Cutias, PMM: Mata Fresca, PDB: Baixão do Murici, PJS: Saco e Juá de Vieira).

População	N	Ne	I	He	%P
<b>PDB</b>	30	1,136	0,132	0,085	32,38
<b>PJJ</b>	30	1,126	0,115	0,075	24,29
<b>PJS</b>	30	1,132	0,125	0,081	27,62
<b>PMC</b>	30	1,127	0,108	0,073	21,90
<b>PML</b>	30	1,160	0,146	0,095	36,19
<b>PMM</b>	30	1,119	0,112	0,072	29,05
<b>PMS</b>	30	1,143	0,131	0,085	29,52
Total	-	1,134	0,129	0,080	28,70

Tabela 5. Valores do índice de fixação PhiPT, entre pares de populações de *Pilocarpus* Vahl. com marcadores ISSR e RAPD. PDB (Baixão do Murici); PJS (Saco); PJJ (Juá de Vieira); PMC (Centro de Ramos); PML (Cotias); PMM (Mata Fresca); PMS (Sumauma da Mata).

	PJJ	PJS	PMC	PDB	PMS	PML	PMM
PJJ	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
PJS	0,575	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
PMC	0,686	0,686	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001
PDB	0,640	0,639	0,622	0,000	0,001	0,001	0,001
PMS	0,701	0,682	0,580	0,560	0,000	0,001	0,001
PML	0,671	0,623	0,592	0,567	0,511	0,000	0,001
PMM	0,693	0,657	0,657	0,673	0,645	0,446	0,000

Tabela 6. Estimativas de identidade (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei (1978) entre as populações *Pilocarpus* Vahl. com marcadores ISSR e RAPD. PDB (Baixão do Murici); PJS (Saco); PJJ (Juá de Vieira); PMC (Centro de Ramos); PML (Cutias); PMM (Mata Fresca); PMS (Sumauma da Mata).

	PJJ	PJS	PMC	PDB	PMS	PML	PMM
PJJ	0,000	0,907	0,859	0,872	0,830	0,847	0,856
PJS	0,097	0,000	0,837	0,864	0,824	0,869	0,866
PMC	0,152	0,178	0,000	0,874	0,902	0,896	0,880
PDB	0,136	0,146	0,135	0,000	0,884	0,884	0,845
PMS	0,187	0,193	0,103	0,123	0,000	0,909	0,871
PML	0,166	0,140	0,109	0,124	0,095	0,000	0,943
PMM	0,155	0,144	0,128	0,168	0,139	0,059	0,000

Tabela 7. Autovalores da análise de coordenadas principais (PCoA) de variância populacionais utilizando a distância de Nei (1978) em sete populações de *Pilocarpus*. Computado usando o PAST versão 2.17c (HAMMER et al., 2001).

Axis	Eigenvalue	% variance	Cumulative % variance
1	0.029179	48.11	48.11
2	0.016257	26.80	26.80
3	0.009128	15.05	15.05
4	0.002809	4,63	4.63
5	0.002651	3.79	4.37
6	-2.0137E-19	1.52	98.96

Tabela 8. Análise da variância molecular (AMOVA) de sete populações de *Pilocarpus* com marcadores moleculares ISSR e RAPD. O valor P \*\* foi calculado por um teste de permutação (999 replicações) em todo o conjunto de dados e significa a probabilidade de obter por acaso um valor maior ou igual ao valor observado de PhiPt \*. Computações feitas usando o GenAlEx 6.502 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

Fontes de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Variância (%)
Entre as populações	6	2830,248	471,708	15,42
Dentro das populações	203	1831.467	9,022	9,02

Índice de fixação PhiPT: 0,631 (P≥0,001)

## APÊNDICE – Lista de Figuras

Figura 1. Localização das populações de *Pilocarpus* spp estudadas nos estados do Ceará, Maranhão e Piauí.

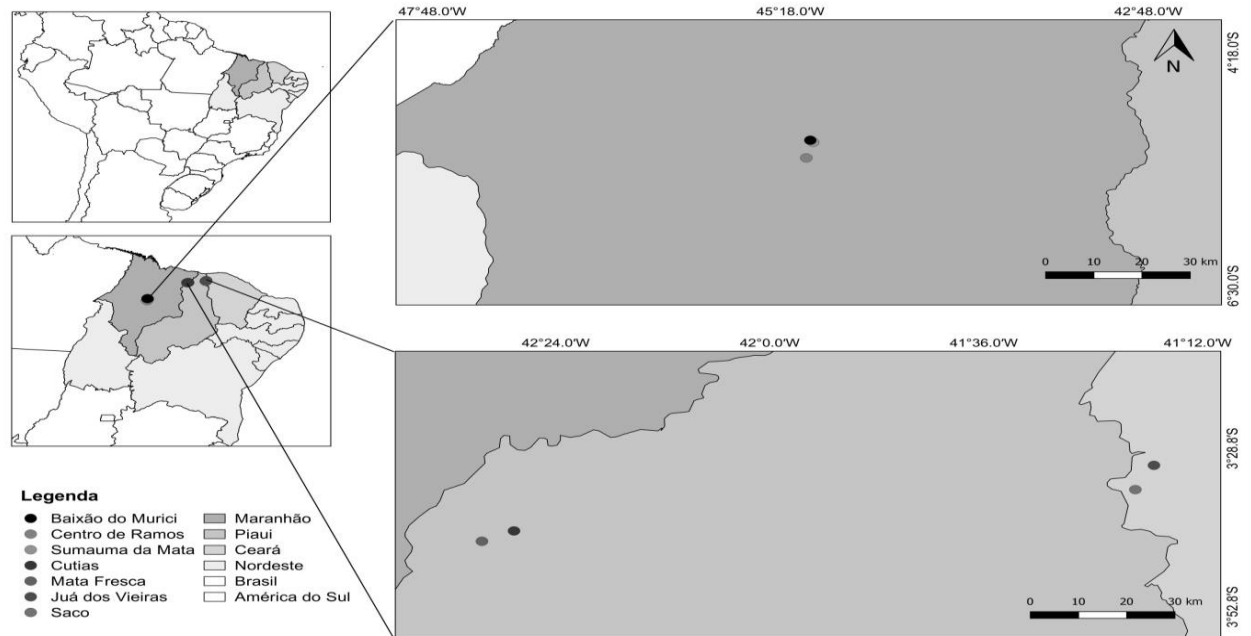


Figura 2. Dendrograma obtido pelo método de análise de agrupamento UPGMA com base na distância de Nei (1978) das populações de *Pilocarpus* spp. com marcadores RAPD usando PAST version 2.17c (HAMMER et al., 2001). (PMC: Centro de Ramos, PMS; Sumauma da Mata, PML: Cutias, PMM: Mata Fresca, PDB: Baixão do Murici, PJS: Saco e Juá de Vieira).

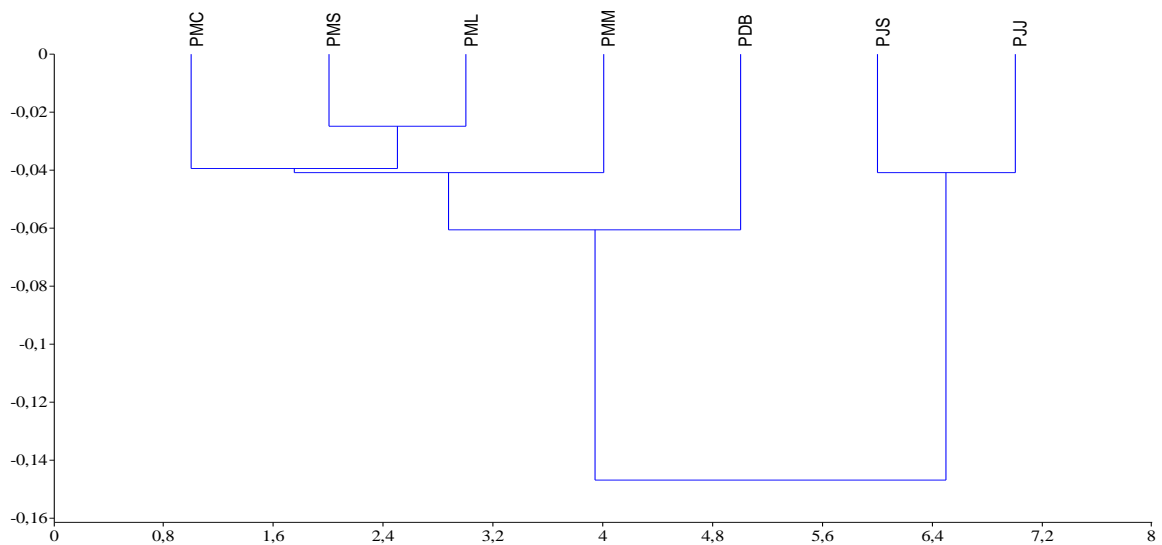


Figura 3. Dendrograma obtido pelo método de análise de agrupamento UPGMA com base na distância de Nei (1978) das populações de *Pilocarpus* spp. com marcadores ISSR usando PAST version 2.17c (HAMMER et al., 2001). (PMC: Centro de Ramos, PMS; Sumauma da Mata, PML: Cutias, PMM: Mata Fresca, PDB: Baixão do Murici, PJS: Saco e Juá de Vieira).

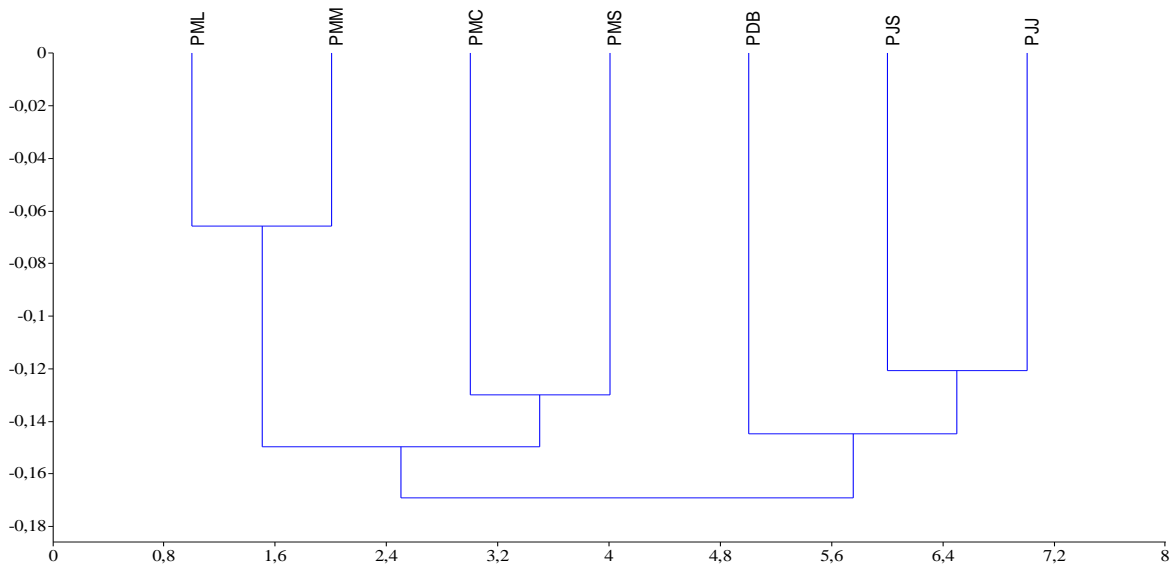


Figura 4. Análise de variância molecular (AMOVA) baseada no parâmetro PhiPT, mostrando variância genética dentro e entre as sete populações de *Pilocarpus* computados com programa GenAlEx 6.502 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

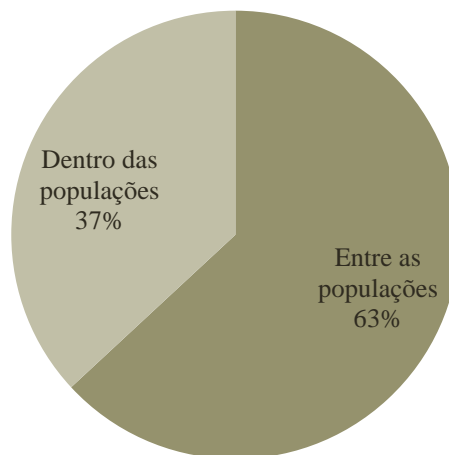


Figura 5. Dendrograma obtido pelo método de análise de agrupamento UPGMA com base na distância de Nei (1978) das populações de *Pilocarpus* spp. com marcadores ISSR e ISSR usando PAST version 2.17c (HAMMER et al., 2001). (PMC: Centro de Ramos, PMS; Sumauma da Mata, PML: Cutias, PMM: Mata Fresca, PDB: Baixão do Murici, PJS: Saco e Juá de Vieira).

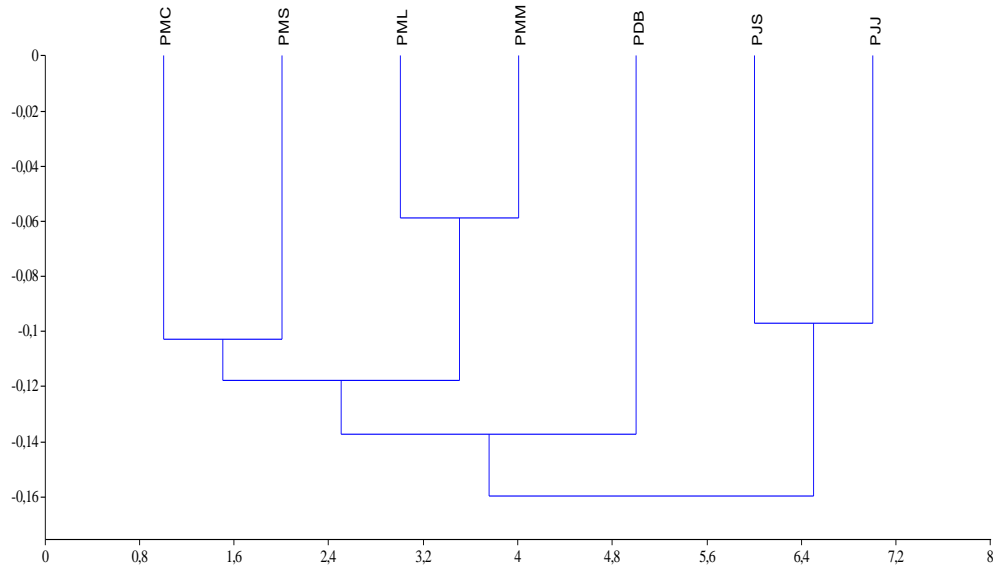


Figura 6. Ordenação de uma Análise de Coordenadas Principais, mostrando as sete populações do espaço dos eixos 1 (48,11% variância) e 2 (26,80% variância) usando PAST version 2.17c (HAMMER et al., 2001). A linha representa a árvore de expansão mínima (MST) entre as populações PDB (Baixão do Murici); PJS (Saco); PJJ (Juá de Vieira); PMC (Centro de Ramos); PML (Cutias); PMM (Mata Fresca); PMS (Sumauma da Mata).

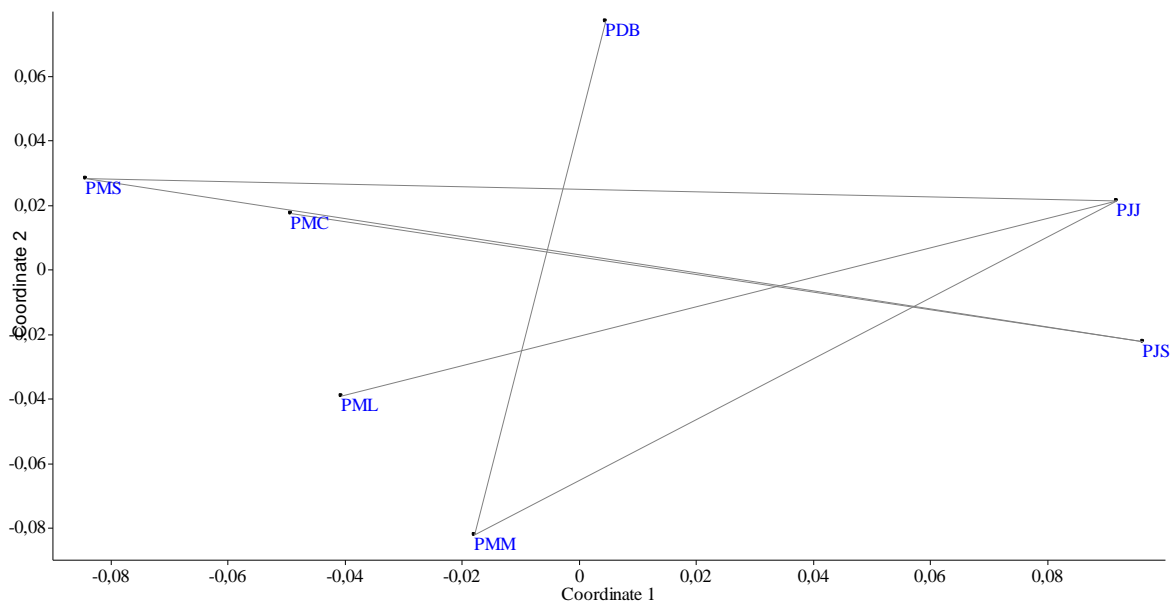




Figura 7. Ordenação de uma Análise de Coordenadas Principais, mostrando as sete populações do espaço dos eixos 2 (26,80% variância) e 3 (15,05% variância) usando PAST version 2.17c (HAMMER et al., 2001). A linha representa a árvore de expansão mínima (MST) entre as populações PDB (Baixão do Murici); PJS (Saco); PJJ (Juá de Vieira); PMC (Centro de Ramos); PML (Cutias); PMM (Mata Fresca); PMS (Sumauma da Mata).

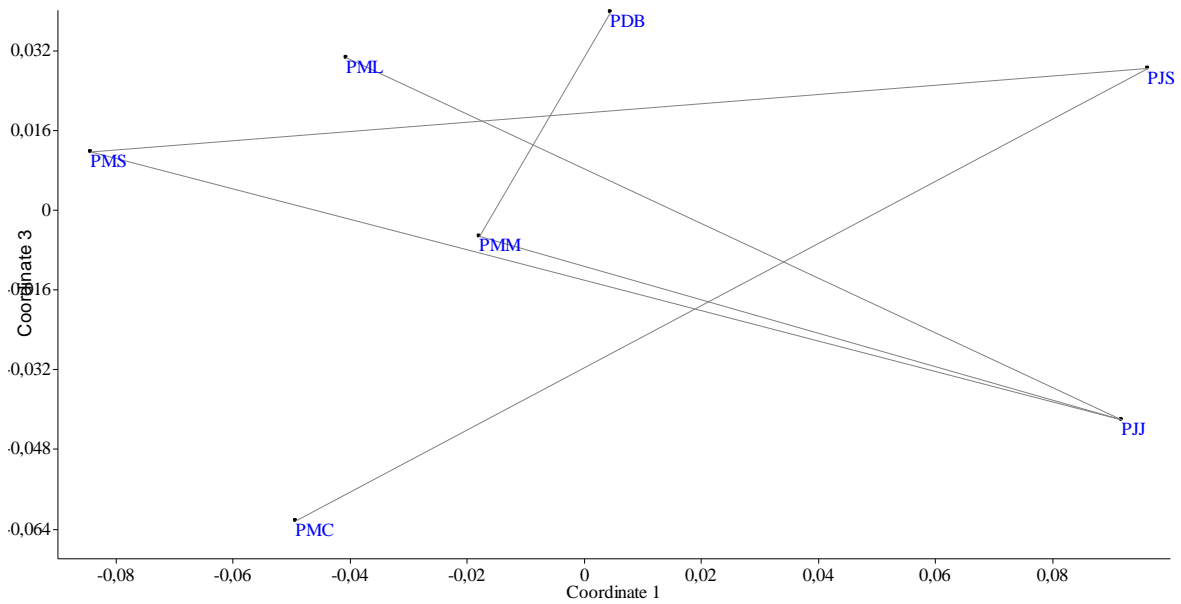


Figura 8. Análise de coordenadas principais (PCoA) usando a distância genética GD entre todos os indivíduos de sete populações de *Pilocarpus*, calculada usando Genalex 6.502 (PEAKALL; SMOUSE; 2012).

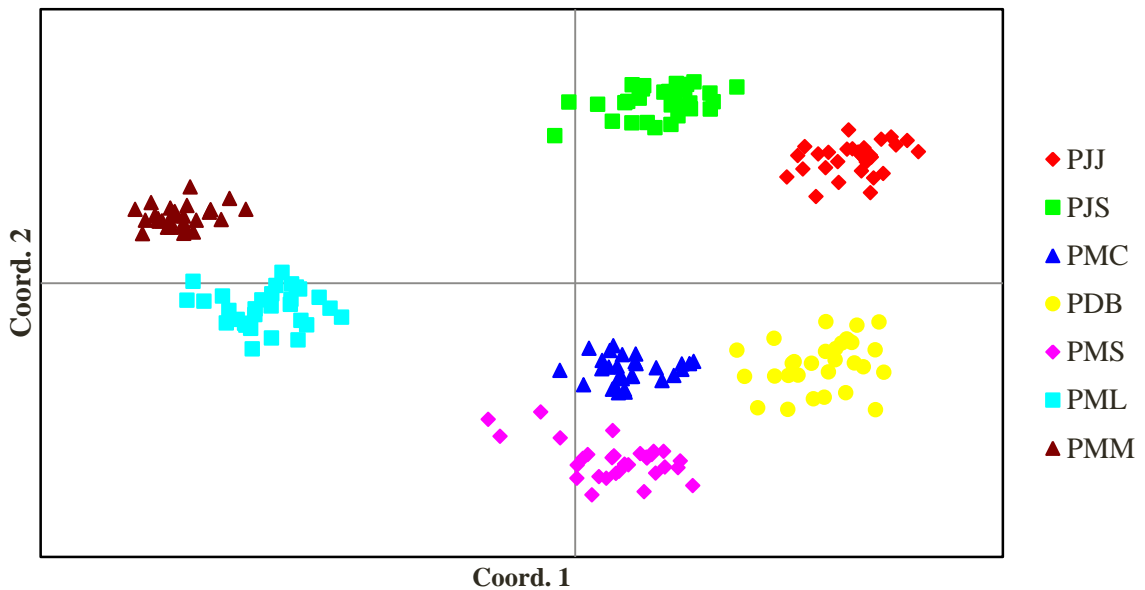


Figura 9. Valores de  $L(K)$  - Determinação do número ótimo de agrupamentos genéticos ( $K=5$ ) populações de *Pilocarpus* spp. por análise Bayesiana com Structure (PRITCHARD et al., 2000) e então utilizando ESTRUTURE HARVESTER para calcular o critério de otimalidade Delta K (EARL; VONHOLDT, 2012) . O valor K correspondente aos maiores valores do Delta K representa o número ideal de grupos.

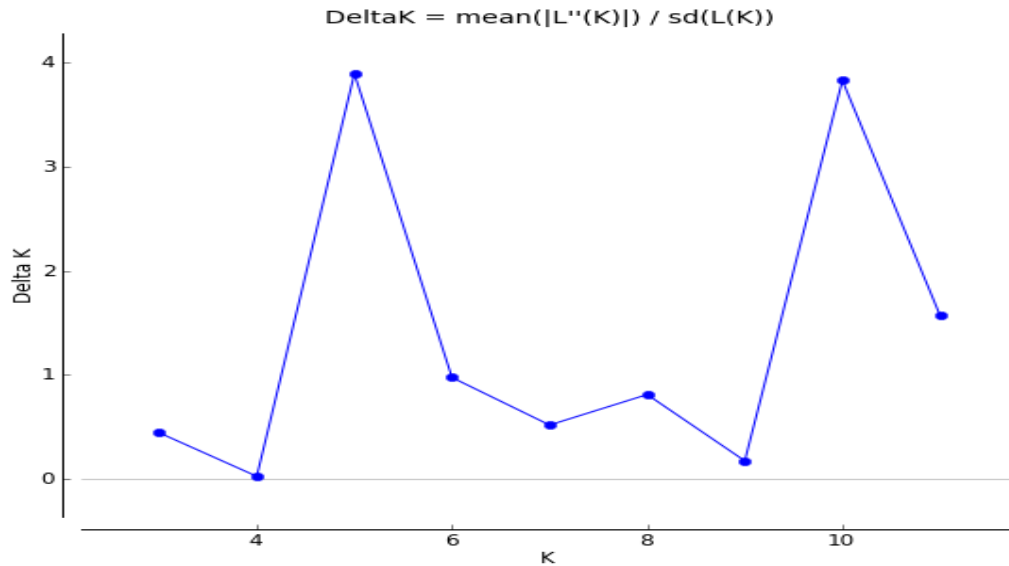
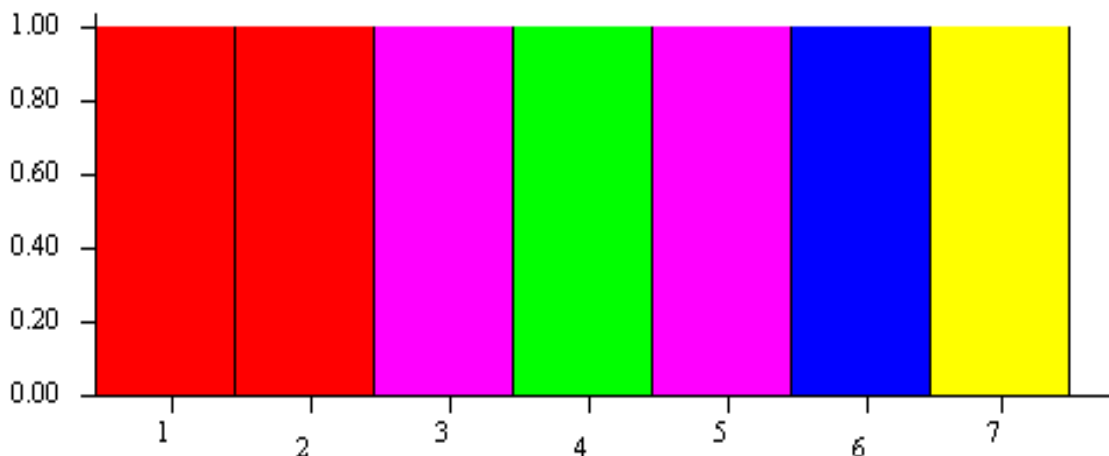


Figura 10. Estrutura genética ótima ( $K = 5$  agregados genéticos) de sete populações de *Pilocarpus* spp. obtidas por análise bayesiana. Cada agrupamento representado por uma cor diferente. As bordas negras dos retângulos marcam os limites das populações. Populações de Jua dos Vieiras (1) e Saco em Viçosa representadas pela cor Vermelha. Populações de Centro de Ramos (3) e Sumauma da Mata (5) em Barra do Corda representadas na cor Rosa. População de Baixão do Murici (4) em Barra do Corda representada pela cor Verde. População de Cutias em Luzilândia representada pela cor Azul (6). População de Mata Fresca (7) de Matias Olimpo representada pela cor Amarela. O comprimento de cada cor em uma barra individual, conforme medido no eixo y, é proporcional à sua probabilidade de pertencer ao grupo genético indicado por essa cor. Computado com o software STRUCTURE (PRITCHARD et al. 2000).



## ANEXO I – Formatação da Revista



### Purpose and General Standards

The Brazilian Journal of Biology® is a scientific journal devoted to publishing original articles in all fields of the Biological Sciences, i.e., General Biology, Cell Biology, Evolution, Biological Oceanography, Taxonomy, Geographic Distribution, Limnology, Aquatic Biology, Botany, Zoology, Genetics, and Ecology. Priority is given to papers presenting results of research in the Neotropical region. Material published includes research papers, review papers (upon approval of the Editorial Board), notes, book reviews, and comments.

Papers should comply with the instructions listed below.

(Otherwise they will be sent back to the authors for reformulation.) After being checked for presentation and style, they will then be evaluated by the advisors, i.e., specialists analyzing for originality, scientific quality, and relevance. Approved papers are sent to outside referees. The Editorial Board decides for acceptance or rejection on the basis of critiques submitted by the referees. The Brazilian Journal of Biology® strives to publish the papers within 6-8 months after acceptance, so that prompt return of proofs by the authors and revised papers by the referees is urged.

Rejected originals will not be returned to the authors.

Articles accepted for publication become property of the journal.

### Preparation of Manuscripts

Three copies of the manuscript should be submitted. They should be typewritten, neat, and free of errors or with clear handwritten corrections. They should be double-spaced, source: Time New Roman, size 12 with a margin of 3 cm and 2 cm left to right, justified alignment and typed on one side of A4 paper (white and of good quality).

The contents of the manuscript should be organized in the following sequence on the front page: Title, Name(s) of author(s), Institution with address, Number of figures, and Running title. The second page must contain: Abstract with Keywords (maximum, 5) and the Resumo in Portuguese with Palavras-chave (5). The items on subsequent pages are: Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, and Acknowledgments. References should be listed, starting on a separate page, after the conclusion of the manuscript. The paper should be as free as possible of footnotes.

**ALL AUTHORS SHOULD REPORT THE ORCID, INCLUDE THEM IN THE ARCHIVE FILE.**

The following information should accompany all species cited in the article:

- for zoology, the author's name and the publication date of the original description should be given the first time the species is cited in the work;
- for botany and ecology, only the name of the author who made the description should be given the first time the species is cited in the work.

Manuscripts should be submitted through the system administration interface "SciELO Submission" whose address [www.scielo.br/bjb](http://www.scielo.br/bjb) (SUBMISSÃO - ONLINE).

### Tables and Figures

Tables should be numbered by Arabic numerals; descriptive legend should appear at the top. Figures should be numbered in the preceding way. Figure captions should be grouped on a separate sheet of paper. Do not type captions on the figures themselves.

Tables and Figures must be presented individually on separate sheets of white paper.

Original figures should be submitted on good quality paper with drawings in black ink and clear lettering, designed as to remain readable after reduction, on scales and graphs. References in the text to figures and tables should be indicated as in these two examples: (see Figure 1) or (as shown in Table 2). Photo- and electron micrographs should have scales.

Color photographs will not be accepted, unless the author agrees to pay for additional cost.

#### Units, Symbols, and Abbreviations

Only standard international units are acceptable. Authors are urged to comply with the rules for biological nomenclature.

#### References:

1. In-text citation: Use the name and year of publication, e.g., Reis (1980); (Reis, 1980); (Zaluar and Rocha, 2000); Zaluar and Rocha (2000). Use “et al.” for more than two authors.

2. Citations in the reference list shall be in compliance with the ISO 690/2010 norm.

In the text, the author-date system shall be used for citations (only what is strictly necessary), using “and” for the case of two authors. References, which should be typed on a separate sheet, must appear in alphabetical order. References to journal articles shall include the name(s) and initial(s) of the author(s), year, title in full, journal name (in full and in italics), volume, number, and first and last pages. References to books and monographs shall include the publisher and, depending on the citation, refer to the book chapter. The name(s) of the organizer(s) of the collection shall also be mentioned; for example:

#### Book:

LOMINADZE, D.G., 1981. Cyclotron waves in plasma. 2nd ed. Oxford: Pergamon Press. 206 p. International series in natural philosophy, no. 3.

#### Book chapter:

WRIGLEY, E.A., 1968. Parish registers and the historian. In: D. J. STEEL, ed. National index of parish registers. London: Society of Genealogists, pp. 15-167.

Journal article:

CYRINO, J.E. and MULVANEY, D.R., 1999. Mitogenic activity of fetal bovine serum, fish fry extract, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor on brown bullhead catfish cells--BB line. *Revista Brasileira de Biologia = Brazilian Journal of Biology*, vol. 59, no. 3, pp. 517-525. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71081999000300017>. PMID: 10765463.

Dissertation or thesis:

LIMA, P.R.S., 2004. Dinâmica populacional da Serra Scomberomorus brasiliensis (Osteichthyes; Scombridae), no litoral ocidental do Maranhã-Brasil. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 45 p. Dissertação de Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura.

Work presented at an event:

RANDALL, D.J., HUNG, C.Y. and POON, W.L., 2004. Response of aquatic vertebrates to hypoxia. In: *Proceedings of the Eighth International Symposium on Fish Physiology, Toxicology and Water Quality*, October 12-14, Chongqing, China. Athens, Georgia, USA: EPA, 2006, pp. 1-10.

Available online reference:

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS – ANA, 2013 [viewed 4 February 2013]. Hidro Web: Sistema de Informações hidrológicas [online]. Available from: <http://hidroweb.ana.gov.br/>

Final Recommendations

Papers should not exceed 25 typewritten pages including figures, tables, and references. Figures and Tables should be kept to the minimum necessary, and have a maximum of 30 cm in height by 25 cm in width. Each table or figure should appear on a separate sheet. Before sending a manuscript to the *Brazilian Journal of Biology*®, proofread the final version very thoroughly and correct any remaining errors.

Notes and Comments should not exceed 4 typewritten pages including figures, tables, and references.