

Diversidade genética de populações naturais de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] por RAPD

VALLE, J.S.¹; FONSECA, B.K.D.²; NAKAMURA, S.S.²; LINDE, G.A.¹; MATTANA, R.S.³; MING, L.C.³; COLAUTO, N.B.¹

¹Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Universidade Paranaense-UNIPAR, Praça Mascarenhas de Moraes, 4282, CEP: 87502-210, Umuarama-Brasil ²Curso de Farmácia, Universidade Paranaense-UNIPAR,

³Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Fazenda Experimental Lageado. *jsvalle@unipar.br

RESUMO: O objetivo desse trabalho foi analisar a estrutura genética de populações de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. com base em polimorfismos moleculares do tipo RAPD. Foram analisadas quatro populações naturais do estado de São Paulo (Jacareí, Jundiaí, Piquete e Ubatuba) e uma população do Paraná (Adrianópolis). Foram identificados 25 locos polimórficos (96,15%). Elevados índices de diversidade genética foram observados dentro das populações ($H_s = 0,2220$). Verificou-se que 65,33% da variabilidade genética total encontra-se dentro das populações e 34,67% entre as populações; índices estes, obtidos a partir do cálculo da divergência genética ($G_{ST} = 0,3467$). Os resultados sugerem que essas populações possuem níveis elevados de variabilidade genética, a qual pode ser fortemente impactada pela ação humana.

Palavras-chave: Pariparoba, caapeba, plantas medicinais, 4-nerolidilcatecol, diversidade genética

ABSTRACT: Genetic diversity of natural populations of pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] according to RAPD analysis. The aim of this study was to analyze the genetic structure of populations of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. based on RAPD molecular polymorphisms. Analysis included four natural populations from São Paulo State (Jacareí, Jundiaí, Piquete, Ubatuba) and one population from Paraná State (Adrianópolis). Twenty-five polymorphic loci (96.15%) were identified. There were high levels of genetic diversity within populations ($H_s = 0.2220$). Of the total genetic variability, 65.33% is within populations and 34.67% among populations ($G_{ST} = 0.3467$). Results suggest that these populations have high levels of genetic variability, which can be strongly impacted by human action.

Key words: Pariparoba, “caapeba”, medicinal plants, 4-nerolidylcatechol, genetic diversity.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais no Brasil é resultado da influência cultural indígena pré-colonial, de tradições africanas trazidas pelos escravos e da cultura européia dos colonizadores. Ainda hoje, é a principal forma terapêutica em muitas comunidades com pouco ou nenhum acesso à serviços de saúde. Não existem estatísticas precisas sobre o uso de plantas medicinais, contudo, um número crescente de iniciativas destinadas a garantir o acesso seguro e o uso racional dessas plantas e fitoterápicos tem ampliado e estimulado seu uso (Brasil, 2009).

Pothomorphe umbellata (L.) Miq. (Piperaceae) conhecida popularmente como caapeba ou pariparoba é típica da mata atlântica e ocorre desde a Amazônia até os estados de São Paulo e Paraná (Noriega et al., 2005). Encontrada frequentemente em bordas de mata e áreas

perturbadas, apresenta floração e frutificação durante todo o ano (Figueiredo, 1997); apresenta polinização mista (anemofilia e entomofilia) e há relatos da ocorrência de autofecundação espontânea (Figueiredo & Sazima, 2000).

Na medicina popular, *P. umbellata* é empregada no tratamento de uma grande variedade de doenças (Barros et al., 2005; Di Stasi, 2007; Valadares et al., 2007) o que estimulou estudos farmacológicos; permitindo a descrição de ações biológicas diversas como antitumoral (Sacoman et al., 2008) antiinflamatória, analgésica (Perazzo et al., 2005) e fotoprotetora (Röpke et al., 2005; da Silva et al., 2009). O metabólito secundário melhor caracterizado de *P. umbellata* é o fenilpropanóide 4-nerolidilcatecol (4-NC) (Kijjoa et al., 1980), que possui comprovada atividade antioxidante (Soares

et al., 2007), antiinflamatória (Perazzo et al., 2005; Soares et al., 2007), antibacteriana (Kashima et al., 1998), antimicrobiana (Soares et al., 2007), fotoprotetora (Röpke et al., 2005) e indutora de apoptose (Brohem et al., 2009). Tais atividades despertaram o interesse da indústria cosmética e de manipulação por *P. umbellata*, principalmente, devido ao sucesso como agente tópico fotoprotetor (Ereno, 2004).

O uso em maior escala baseia-se, essencialmente, no extrativismo de espécies nativas devido à falta de informações agrônômicas que orientem o cultivo da espécie. Essa prática tem provocado a eliminação de indivíduos e populações naturais, e a consequente perda de diversidade biológica (Ming et al., 2002). O manejo sustentável de espécies medicinais é, portanto, fundamental em políticas de uso, produção e pesquisa de fitoterápicos; e depende do conhecimento de aspectos botânicos, ecológicos e genéticos de espécies nativas (Pavan-Fruehauf, 2000).

O conhecimento da estrutura genética de populações de uma espécie é fator importante no manejo de recursos genéticos com a finalidade de conservação ou domesticação (Falk et al., 2001). Uma forma de se acessar informações sobre a estrutura populacional é empregando-se marcadores genéticos, por exemplo, do tipo RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*). O polimorfismo detectado por essa técnica possui natureza binária, comportando-se de maneira dominante pela detecção de apenas um alelo por loco (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

O objetivo desse trabalho foi analisar a diversidade genética de populações naturais dessa espécie coletadas nos estados de São Paulo e Paraná com o uso de marcadores moleculares de RAPD.

MATERIAL E MÉTODO

Folhas de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. - PIPERACEAE] foram coletadas de populações naturais nos estados de São Paulo e Paraná, conforme Tabela 1. Cada população foi representada por 10 plantas adultas, distantes aproximadamente 20 m, sendo coletadas 10 folhas

jovens de cada planta. Após a coleta, as folhas foram lavadas, ainda no campo, com água destilada, etanol 70% e mantidas em gelo. Em seguida, foram transferidas para o laboratório e mantidas a -70°C até o momento da extração do DNA.

A extração do DNA seguiu os procedimentos descritos por Doyle & Doyle (1987) com pequenas modificações. Retirou-se 4 cm² das folhas que foram trituradas na presença de tampão CTAB 2% [brometo de cetil-trimetilamônio 2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; b-mercaptoetanol 0,2% (v/v) e polivinilpirrolidona 1% (PVP)] pré-aquecido à 65°C. Adicionou-se proteinase K (20 mg mL⁻¹) ao macerado e o lisado resultante foi submetido à extração com igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado adicionando-se isopropanol gelado (v/v) à fase aquosa seguida de centrifugação. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol (70 e 95%). Após secar a temperatura ambiente, o *pellet* foi ressuscitado em TE (1 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA pH 8,0).

Inicialmente, foram testados três kits contendo 20 *primers* decaméricos (Invitrogen) (Tabela 2), visando identificar os melhores para amplificar o DNA de *P. umbellata*, considerando-se a quantidade e intensidade de bandas, reprodutibilidade e polimorfismo gerado, determinado por duas repetições por amostra.

A reação seguiu protocolo modificado a partir de Colauto et al. (2002) e Nadeau et al. (1992). Foram testadas cinco concentrações de MgCl₂ (1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM), quatro de dNTP (100 - 200 μ M) e quatro de *Taq* DNA polimerase (1, 1,2; 1,5 e 2 U). O volume final de reação foi de 25 μ L, sendo: DNA molde (25 ng); 1,0 a 3,0 mM de MgCl₂; tampão da enzima (200 mM Tris- HCl pH 8,4; 500 mM KCl); 100 a 200 μ M de cada dNTP; 0,2 μ M de *primer* e 1,0 a 2,0 U de *Taq* DNA polimerase. O termociclador (Eppendorf) foi programado para desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min; *annealing* a 36°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, com um ciclo adicional em 72°C por 7 min. Ao final, as amostras foram resfriadas a 4°C e armazenadas a -20°C. Um controle negativo foi elaborado para cada *primer*,

TABELA 1. Descrição da localização das amostras de *Pothomorphe umbellata* (N = 10).

Município	Estado	Georreferenciamento
Adrianópolis (Ad)	Paraná	24°42'59"S / 48°49'38"W / 160m
Jacareí (Ja)	São Paulo	23°15'40"S / 46°03'52"W / 586m
Jundiaí (Ju)	São Paulo	23°20'54"S / 48°42'13"W / 857m
Piquete (Pi)	São Paulo	22°46'50"S / 45°10'W / 576m
Ubatuba (Ub)	São Paulo	23°25'21"S / 45°06'44"W / 11m

TABELA 2. Sequência dos *primers* arbitrários empregados para amplificação de RAPD de *Pothomorphe umbellata*.

Primer	Sequência	Primer	Sequência	Primer	Sequência
A-01	5'-CAGGCCCTTC-3'	B-01	5'-GTTTCGCTCC-3'	C-01	5'-TTCGAGCCAG-3'
A-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	B-02	5'-TGATCCCTGG-3'	C-02	5'-GTGAGGCGTC-3'
A-03	5'-AGTCAGCCAC-3'	B-03	5'-CATCCCCCTG-3'	C-03	5'-GGGGGTCTTT-3'
A-04	5'-AATCGGGCTG-3'	B-04	5'-GGACTGGAGT-3'	C-04	5'-CCGCATCTAC-3'
A-05	5'-AGGGGTCTTG-3'	B-05	5'-TGCGCCCTTC-3'	C-05	5'-GATGACCGCC-3'
A-06	5'-GGTCCCTGAC-3'	B-06	5'-TGCTCTGCCC-3'	C-06	5'-GAACGGACTC-3'
A-07	5'-GAAACGGGTG-3'	B-07	5'-GGTGACGCAG-3'	C-07	5'-GTCCCGACGA-3'
A-08	5'-GTGACGTAGG-3'	B-08	5'-GTCCACACGG-3'	C-08	5'-TGGACCGGTG-3'
A-09	5'-GGGTAACGCC-3'	B-09	5'-TGGGGGACTC-3'	C-09	5'-CTCACCGTCC-3'
A-10	5'-GTGATCGCAG-3'	B-10	5'-CTGCTGGGAC-3'	C-10	5'-TGTCTGGGTG-3'
A-11	5'-CAATCGCCGT-3'	B-11	5'-GTAGACCCGT-3'	C-11	5'-AAAGCTGCGG-3'
A-12	5'-TCGGCGATAG-3'	B-12	5'-CCTTGACGCA-3'	C-12	5'-TGTCATCCCC-3'
A-13	5'-CAGCACCCAC-3'	B-13	5'-TTCCCCGCT-3'	C-13	5'-AAGCCTCGTC-3'
A-14	5'-TCTGTGCTGG-3'	B-14	5'-TCCGCTCTGG-3'	C-14	5'-TGCGTGCTTG-3'
A-15	5'-TTCCGAACCC-3'	B-15	5'-GGAGGGTGT-3'	C-15	5'-GACGGATCAG-3'
A-16	5'-AGCCAGCGAA-3'	B-16	5'-TTTGCCCGGA-3'	C-16	5'-CACACTCCAG-3'
A-17	5'-GACCGCTTGT-3'	B-17	5'-AGGGAACGAG-3'	C-17	5'-TTCCCCCAG-3'
A-18	5'-AGGTGACCGT-3'	B-18	5'-CCACAGCAGT-3'	C-18	5'-TGAGTGGGTG-3'
A-19	5'-CAAACGTCGG-3'	B-19	5'-ACCCCCGAAG-3'	C-19	5'-GTTGCCAGCC-3'
A-20	5'-GTTGCGATCC-3'	B-20	5'-GGACCCTTAC-3'	C-20	5'-ACTTCGCCAC-3'

subtraindo-se o DNA da reação.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, em tampão TAE (2 mM Tris base; 0,5 M EDTA pH 8,0; ácido acético glacial), com voltagem constante de 70 V. Os géis foram visualizados em luz ultravioleta (UV) e registrados digitalmente.

Cada fragmento amplificado é considerado um loco RAPD. Uma matriz de similaridade foi construída codificando-se como '1' a presença da banda e como '0' a ausência.

Os dados de RAPD foram analisados com auxílio do software POPGENE versão 1.31 (Yeh et al., 1997) utilizando-se parâmetros para dados diplóides dominantes. O percentual de locos polimórficos para cada população (Pp) e para o conjunto de todas as populações foi calculado, bem como o índice de diversidade genética de Nei (H_s). Para determinação da frequência genotípica assumiu-se que os locos de RAPD estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A divergência genética entre populações foi determinada pelo cálculo do coeficiente de diversidade genética de Nei (1972) (G_{ST}). Visualizamos a estruturação genética das populações através de agrupamentos sucessivos

baseados em distância genética usando o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average*).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Apesar do interesse econômico nos compostos bioativos de *P. umbellata* não há informações sobre sua variação genética em condições naturais. Este é o primeiro estudo conduzido para se avaliar a diversidade genética e a distribuição em populações naturais, o que pode contribuir para programas de conservação ou manejo dessa espécie.

Durante as condições de padronização da reação de RAPD os melhores resultados foram obtidos com 25 ng de DNA molde; 2,0 mM de $MgCl_2$; tampão da enzima (200 mM Tris- HCl pH 8,4; 500 mM KCl); 150 iM de cada dNTP; 0,2 μ M de *primer* e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase, sendo o volume final da reação de 25 μ L. Tais condições foram empregadas em todas as análises.

Considerando-se o número de bandas obtidas, a intensidade destas e a consistência de amplificação, foram selecionados cinco *primers* (A08, A10, B06, B10 e C16) que produziram bandas reprodutíveis. Estes foram utilizados para

a amplificação dos 50 indivíduos de *P. umbellata*. Os resultados foram analisados, verificando-se a presença ou a ausência de bandas (locos). As amplificações com os *primers* selecionados revelaram um total de 26 locos, uma média de 5,2 locos por *primer*. Destes, 25 eram polimórficos, variando de quatro (A10) a seis (C16) locos polimórficos por *primer* (Tabela 3).

Considerando-se as populações em conjunto obteve-se 96,15% de locos polimórficos (Tabela 3). A população com maior proporção de locos polimórficos foi Ubatuba (80,77%), seguida de Jundiá (73,08%), Jacareí (57,69%) e Piquete (53,85%), demonstrando elevada variabilidade genética nas populações de São Paulo. A população com menor variabilidade foi Adrianópolis no Paraná (30,77%), com o menor percentual de locos polimórficos.

Estudos envolvendo a análise da variabilidade genética de espécies de Piperaceae têm demonstrado polimorfismo elevado. Gaia et al. (2004) ao avaliarem 18 acessos de *Piper aduncum* provenientes de quatro municípios da Amazônia brasileira, também observaram valores elevados de polimorfismo (90,83%). Wadt & Kageyama (2004) analisaram 13 populações de *Piper hispidinervum* do Acre e obtiveram 78,57% de polimorfismo, contudo o percentual de locos polimórficos para cada população não excedeu 60%. Em comparação, os dados sugerem que as populações de *P. umbellata* analisadas possuem elevada variabilidade genética, com destaque para a população de Ubatuba com índices de variabilidade semelhantes à de espécies de Piperaceae da Amazônia.

Um resumo da diversidade genética das populações de *P. umbellata* é mostrado na Tabela 4. Os índices de diversidade de Nei (H_s) das populações de *P. umbellata* variaram de 0,12 a 0,30. Em ordem decrescente de diversidade em estão as amostras de Ubatuba, Jundiá, Piquete, Jacareí e Adrianópolis.

Populações amazônicas de *Piper aduncum* mostraram níveis mais elevados de diversidade (H_s) variando de 0,32 a 0,91 (Gaia et al., 2004), contudo os índices de diversidade observados em nosso trabalho para *P. umbellata* também são considerados elevados.

Observou-se diversidade genética total (H_T) de 0,3398 ($\pm 0,1390$) o que demonstra elevada heterozigosidade nas populações de *P. umbellata* analisadas. Tais valores são considerados relativamente altos, indicando que a espécie apresenta uma razoável reserva genética. Dessa forma, as populações de *P. umbellata* analisadas demonstram manutenção da diversidade genética total, o que é um bom indicador já que essa espécie está sujeita a grande pressão antrópica. Adicionalmente, a análise das frequências alélicas nas populações analisadas pelo teste qui-quadrado (χ^2) indicou que, do total de 26 locos gerados, as frequências de vinte deles diferiram com significância de $p < 0,05$, sendo doze $p < 0,01$. Desta forma, o baixo número de locos monomórficos evidencia a existência de elevada variabilidade dentro da maioria das populações analisadas nesse trabalho.

A ocorrência de polinização mista (ambofilia) aumenta as chances de polinização cruzada e possibilita a reprodução em diferentes condições de habitat (Figueiredo, 1997), mesmo para espécies auto-compatíveis como *P. umbellata* em que a autofecundação espontânea já foi observada (Figueiredo, 1997). Tal plasticidade reprodutiva confere grande habilidade de colonização e sobrevivência em locais com baixa diversidade de insetos polinizadores, o que pode estar contribuindo para a manutenção da variabilidade genética em populações naturais dessa espécie (Culley et al., 2002; Friedman & Barret, 2009).

Apesar da constatação de razoável variabilidade na maioria das populações analisadas, fica evidente que em Adrianópolis (PR), um dos ambientes mais impactados pela ação do homem,

TABELA 3. Número de locos RAPD amplificados por primer e proporção de locos polimórficos (Pp) gerados em populações de *Pothomorphe umbellata*.

Primer	Nº Locos	Nº Locos Polimórficos	Nº Locos Polimórficos por População				
			Ad	Ja	Ju	Pi	Ub
A08	6	5	3	3	4	3	4
A10	4	4	0	4	4	2	4
B06	5	5	1	4	2	3	5
B10	5	5	1	2	5	0	2
C16	6	6	3	2	4	6	6
Média	5,2	5	1,6	3,0	3,8	2,8	4,2
Pp (%)		96,15	30,77	57,69	73,08	53,85	80,77

TABELA 4. Parâmetros de diversidade genética obtida por de marcadores RAPD de populações naturais de *Pothomorphe umbellata*.

População	na	ne	H _s
Adrianópolis	1,3077	1,2193	0,1260
Jacareí	1,5769	1,3397	0,1978
Jundiáí	1,7308	1,4913	0,2800
Piquete	1,5385	1,3351	0,2028
Ubatuba	1,8077	1,5494	0,3034
Média	1,9615	1,5719	0,2220

na = número de alelos observados; ne = número efetivo de alelos; H_s = diversidade genética.

observou-se menor variabilidade em comparação com as demais localidades. Tal constatação indica a vulnerabilidade da espécie e a conseqüente erosão da diversidade que pode resultar do extrativismo desordenado ou da degradação ambiental, o que reforça a necessidade da elaboração de estratégias de manejo sustentável de espécies medicinais quer seja para programas de produção de fitoterápicos ou de conservação da espécie.

A média de divergência genética entre populações (G_{ST}) de *P. umbellata* foi de 0,3467, demonstrando que 34,67% da variabilidade genética é interpopulacional enquanto 65,33% está dentro das populações. Esses valores são superiores aos observados por Wadt & Kageyama (2004) em populações de *Piper hispidinervum* que observaram 28% de diferenciação entre as populações. Mariot et al. (2002) detectaram 29% de divergência entre populações de *Piper cernun* de Mata Atlântica, com forte estruturação espacial. Esses dados sugerem que há tendência de diferenciação entre as populações de *P. umbellata*.

A estimativa de fluxo gênico entre as populações, medido através do Nm (número médio de migrantes por geração) foi de 0,94. Valores de Nm menores que um são considerados baixos e indicam certo grau de isolamento genético (Falk et al., 2001). O Nm encontrado na análise de populações de *P. umbellata* confirma a tendência de diferenciação das populações e o fluxo gênico restrito pode estar contribuindo para os níveis de diferenciação

genética das populações analisadas.

A Tabela 5 representa a matriz de similaridade com base nas distâncias genéticas entre as populações, calculadas com base no coeficiente de Nei (1972). As distâncias genéticas entre os cinco locais de coleta de *P. umbellata* variaram de 0,1185 a 0,3111. Observou-se que a maior distância genética encontra-se entre as populações de Adrianópolis e Jacareí (0,3111) e a menor (0,1185) entre Jacareí e Jundiáí.

Nossos resultados não sugerem correlação entre a distância genética e distância geográfica, já que elevados coeficientes de similaridade foram observados entre populações geograficamente distantes.

A análise pelo método UPGMA resultou no dendrograma que reflete o agrupamento das distâncias genéticas das populações (Figura 1). No grupo dois está inserida a população de Ubatuba, que é a população que apresenta maior polimorfismo intra-populacional, seguida de Jundiáí e Jacareí. Estas duas últimas formam outro subgrupo dentro do grupo dois. No grupo três, estão inseridas as populações de Piquete e Adrianópolis, sendo esta última a de menor diversidade genética.

Ambas as populações ocorriam em reboleira, em local de pastagem degradada com resquícios de mata secundária. A menor diversidade genética poderia sugerir efeito fundador, ou seja, uma população que se originou a partir de um conjunto restrito de indivíduos com características semelhantes, o que é condizente com o nível de degradação ambiental observado. Por outro lado, em Jacareí, Jundiáí e Ubatuba; onde a variabilidade genética observada foi maior, as amostras foram coletadas em regiões extensas de borda de mata dentre um elevado número de indivíduos. Isto sugere que a degradação dos ambientes para implantação de agricultura e pecuária convencional, representa um fator importante na perda da variabilidade genética para esta espécie.

A variabilidade genética dentro e entre populações também pode ser influenciada por fatores ecológicos e a diferenciação entre populações depende, além de fatores genéticos, das condições de solo e de clima (Reisch et al., 2003).

TABELA 5. Matriz de similaridade de locos por RAPD.

População	Adrianópolis	Jacareí	Jundiáí	Piquete	Ubatuba
Adrianópolis	—				
Jacareí	0,3111	—			
Jundiáí	0,2807	0,1185	—		
Piquete	0,1724	0,2930	0,1207	—	
Ubatuba	0,1796	0,1365	0,1363	0,1744	—

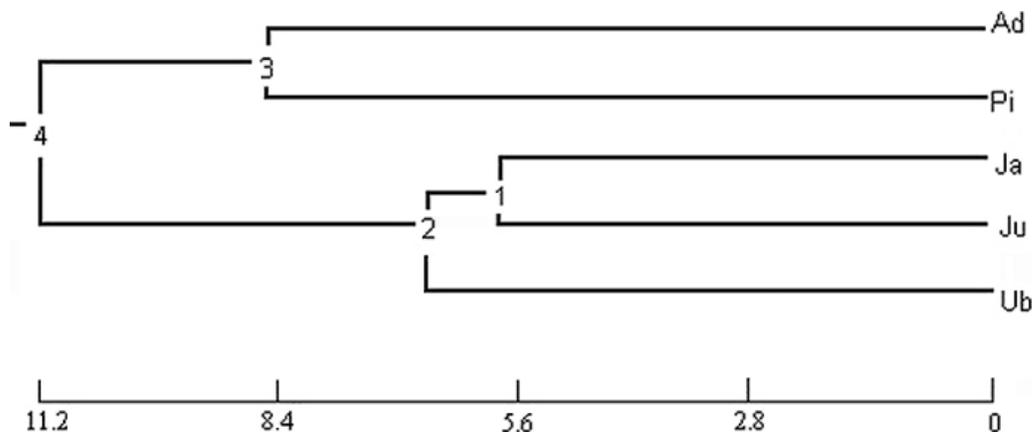


FIGURA 1. Dendrograma obtido pelo método UPGMA, apresentando o agrupamento das distâncias genéticas entre as populações de *Pothomorphe umbellata*.

Assim, diferenças entre populações relacionadas a tais aspectos podem contribuir para diferenciação micro-geográfica. A população de Ubatuba, que apresentou maior diversidade genética, ocorre em região litorânea com alta umidade relativa e temperaturas elevadas. Jundiaí, a segunda em variabilidade genética, localiza-se a mais de 700 m de altitude em uma região de clima tropical de altitude. Tais peculiaridades climáticas podem estar contribuindo para a diferenciação genética entre elas, além de menor ação antrópica em determinados locais. Entretanto, análises ecológicas sobre a espécie ainda são necessárias para elucidação de tais aspectos.

Conclui-se que as populações de *P. umbellata* estudadas apresentam variabilidade genética, com certa tendência à diferenciação entre as populações. As populações de Ubatuba e Jundiaí apresentam as maiores taxas de diversidade genética, enquanto Adrianópolis as menores. Os resultados sugerem que apesar de variabilidade observada, o impacto do homem no ambiente pode levar a perda rápida de diversidade genética.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a Universidade Paranaense (UNIPAR) pelo financiamento do projeto e pelas bolsas de Iniciação Científica concedidas.

REFERÊNCIA

ARNOUS, A.H.; SANTOS, A.S.; BEINNER, R.P.C. Plantas medicinais de uso caseiro - Conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, v.6, n.2, p.1-6, 2005.
 BARROS, S. et al. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (Pariparoba). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, p.53-61, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília. 2009. 135p.

BROHEM, C.A. et al. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. **Toxicology in Vitro**, v.23, p.111-9, 2009.

COLAUTO, N.B. et al. Genetic characterization of isolates of basidiomycete *Agaricus blazei* by RAPD. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.131-3, 2002.

CULLEY, T.M. et al. The evolution of wind pollination in angiosperms. **Trends in Ecology & Evolution**, v.17, n.8, p.361-9, 2002.

DA SILVA, V.V. et al. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* on UVB radiation-induced biomarkers involved in carcinogenesis of hairless mouse epidermis. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v.28, n.2, p.54-60, 2009.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-5, 1987.

ERENO, D. Proteção para a pele: extrato de pariparoba exerce ação antioxidante contra o sol e deve chegar ao mercado em breve. **Revista Pesquisa FAPESP**, v.104, p.1-2, 2004. Disponível em: <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=2621&bd=1&pg=1&lg=>>>. Acesso em: 19 jul. 2010.

FALK, D.A. et al. An introduction to restoration genetics. **Society for Ecological Restoration and Plant Conservation Alliance**. 2001. 30p. Disponível em: <<http://www.nps.gov/plants/restore/pubs/restgene/restgene.pdf>>. Acesso em: 19 jul. 2010.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1995. 220p.

FIGUEIREDO, R.A. **Fenologia e ecologia da polinização de espécies de Piperaceae em mata semidecídua do sudeste brasileiro**. 1997. 145p. Tese (Doutorado em Ecologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FIGUEIREDO, R.A.; SAZIMA, M. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. **Annals of Botany**, v.85, p.455-60, 2000.

FRIEDMAN, J.; BARRETT, S.C.H. Wind of change: new

- insights on the ecology and evolution of pollination and mating in wind-pollinated plants. **Annals of Botany**, v.103, p.1515-27, 2009.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto: Funpec, 2003. 631p.
- GAIA, J.M.D. et al. Similaridade genética de populações naturais de pimenta-de-macaco por análise RAPD. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.4, p.686-9, 2004.
- KASHIMA, S.; PIETRO, R.C.L.; ENNES, G. Atividade do extrato de *Pothomorphe umbellata* frente às cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15. 1998, Águas de Lindóia. **Livro de Resumos...** Águas de Lindóia, 1998.
- KIJJOA, A. et al. 4-Nerodyl-cathechol from *Pothomorphe umbellata*. **Planta Médica**, v.39, p.85-7, 1980.
- MARIOT, A. et al. Genetic diversity in natural populations of *Piper cernuum*. **The Journal of Heredity**, v.93, n.5, p.365-9, 2002.
- MING, L.C. et al. Manejo e cultivo de plantas medicinais: algumas reflexões sobre as perspectivas e necessidades no Brasil. In: SEMINÁRIO MATOGROSSENSE DE ETNOBIOLOGIA E ETNOECOLOGIA E SEMINÁRIO CENTRO-OESTE DE PLANTAS MEDICINAIS, 1., 2002, Cuiabá. **Resumos...** Cuiabá: UFMT, 2002. Disponível em: <<http://www.ufmt.br/etnoplant/artigos/index.html>>. Acesso em: 21 out. 2009.
- NADEAU, J.H. et al. Multilocus markers for mouse genome analysis: PCR amplification based on single primers of arbitrary nucleotide sequence. **Mammalian Genome**, v.3, p.55-64, 1992.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **The American Naturalist**, v.106, n.949, p.283-92, 1972.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.70, n.12, p.3321-3, 1973.
- NORIEGA, P. et al. Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.2, p.261-9, 2005.
- PAVAN-FRUEHAUF, S. **Plantas medicinais de Mata Atlântica: manejo sustentado e amostragem**. 1.ed. São Paulo: Annablume. 2000. 216p.
- PERAZZO, F.F. et al. Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p.215-20, 2005.
- REISCH, C. et al. Genetic differentiation among populations of *Sesleria albicans* Kit. Ex Schultes (Poaceae) from ecologically different habitats in central Europe. **Heredity**, v.91, p.519-27, 2003.
- RIEDEL, O.O. Subsídios para o estudo farmacognóstico de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth, **Tribuna Farmacêutica**, v.12, n.9, p.269-83, 1941.
- RÖPKE, C.D. et al. *Pothomorphe umbellata* Extract Prevents a-Tocopherol Depletion After UV-irradiation. **Photochemistry and Photobiology**, v.78, n.5, p.436-9, 2003.
- RÖPKE, C.D. et al. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.30, p.272-6, 2005.
- SACOMAN, J.L. et al. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.41, p.411-5, 2008.
- SOARES, L.A.; LEAL, A.F.V.B.; REZENDE, K.R. Determinação da estereoquímica de estabilidade do complexo de inclusão do 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) em 2-hidrozipropil-b-ciclodextrina. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.4, n.2, p.68-71, 2007.
- DI STASI, L.C. Caapeba- *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Família Piperaceae): Brasileira de Respeito. **Revista Racine**, v.17, n.99, p.78-82, 2007.
- VALADARES, M.C. et al. Protective effects of 4-nerolidilcatecol against genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Food Chemistry and Toxicology**, v.45, p.1975-8, 2007.
- WADT, L.H.O. **Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC.) visando seu uso e conservação**. 2001. 95p. Tese (Doutorado – Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- WADT, L.H.O.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética e sistema de acasalamento de *Piper hispidinervum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.2, p.151-7, 2004.
- YEH, F.C. et al. **POPGENE**: the user-friendly shareware for population genetic analysis. 1997. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.