

## Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD

Takeshi Kamada<sup>1</sup>, Edgard Augusto de Toledo Picoli<sup>2</sup>, Acelino Couto Alfenas<sup>3</sup>, Cosme Damião Cruz<sup>4</sup>, Roberto Fontes Vieira<sup>5</sup> e Wagner Campos Otoni<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia, Universidade de Rio Verde, Rio Verde, Goiás, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. <sup>3</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. <sup>4</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. <sup>5</sup>Recursos Genéticos e Biotecnologia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, Distrito Federal, Brasil. \*Autor para correspondência. Email: wotoni@ufv.br

**RESUMO.** *Pfaffia glomerata* é uma espécie nativa da América do Sul e de ocorrência natural em alguns Estados do Brasil. Porém, as populações naturais de fáfia têm sido ameaçadas em decorrência do intenso extrativismo, em virtude de suas propriedades terapêuticas de interesse. No presente estudo, objetivou-se estimar a diversidade genética de quatro populações naturais oriundas da bacia do Rio Paraná. Os indivíduos foram multiplicados *in vitro* e caracterizados de acordo com o padrão eletroforético de marcadores RAPD, utilizando-se 268 marcas polimórficas obtidas a partir de 67 *primers*. As estimativas de distância genética foram obtidas pelo complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li, e os genótipos agrupados de acordo com o método UPGMA. Três populações situadas próximas às margens do rio Paraná e na ilha do Mineiro apresentaram baixos índices de diversidade entre elas, e estas possuem o mesmo fluxo de dispersão dos propágulos. A população situada nas proximidades da margem do rio Ivaí (afluente do rio Paraná) apresentou maiores valores de diversidade dentro da população e entre as populações, indicando que sua preservação é prioritária e a origem da variabilidade pode estar relacionada ao fluxo de dispersão de propágulos.

**Palavras-chave:** 'ginseng brasileiro', conservação de germoplasma, melhoramento vegetal.

**ABSTRACT.** Genetic diversity in natural populations of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimated by RAPD markers. *Pfaffia glomerata* is a native species from South America, occurring naturally in some states of Brazil. The ever growing interest by the species, mainly due to its important therapeutic properties, has threatened the natural populations, as exploitation has occurred in a rather predatory way. The present study aimed to compare the genetic diversity of four natural populations originated from of the area of the Paraná River basin (Paraná and Mato Grosso States). The individuals were propagated *in vitro* and characterized by means of RAPD markers. A total of 267 polymorphic marks were obtained from 67 primers. The genetic distance estimates were obtained based on the complement arithmetic of Nei and Li's similarity coefficient, and the genotypes were grouped according to the UPGMA method. Three populations from the margin of the Paraná River and at Mineiro Island presented low diversity levels among them, though possessing the same propagule dispersal flow. The population located in the proximities of the margin of the Ivaí river (tributary of the river Paraná) presented greater diversity values within and among the populations, suggesting that its preservation should be a priority and that the origin of the genetic variability may be related to the dispersion flow of the vegetative propagules.

**Key words:** brazilian-ginseng, germplasm conservation, plant breeding.

### Introdução

Diversas espécies do gênero *Pfaffia* spp. são denominadas fáfia, também popularmente conhecidas como ginseng brasileiro, pertencem à família Amaranthaceae e possuem ampla distribuição nas Américas Central e do Sul, sendo algumas de frequente

ocorrência no território brasileiro (SIQUEIRA, 1988), onde populações naturais foram encontradas e estabelecidas próximas aos leitos dos rios nos Estados do Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás (ALVES et al., 2006; SIQUEIRA, 1988).

Na medicina popular, atribui-se propriedades medicinais ao ginseng brasileiro semelhantes ao

ginseng coreano (*Panax ginseng*), pela atividade adaptógena, contra estresses físico e mental (VIGO et al., 2003) e ao uso afrodisíaco atribuído à planta (LORENZI; MATOS, 2002).

O estudo da diversidade genética de espécies medicinais não-cultivadas vem se tornando indispensável em decorrência do crescente extrativismo e interesse da população pelos medicamentos fitoterápicos. Além disto, informações sobre diversidade genética são importantes não apenas para estudo da flora, mas também para elaboração de estratégias de conservação e uso racional de recursos genéticos.

Na caracterização da diversidade genética, basicamente se utilizam quatro tipos de marcadores: morfológicos, bioquímicos, moleculares e citológicos. Os moleculares apresentam a particularidade de poderem ser utilizados para a análise em qualquer estágio de desenvolvimento da planta.

O marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é muito utilizado em populações naturais (VICCINI et al., 2004; BOLARIC et al., 2005; GOULART et al., 2005; TELLES et al., 2007), pois podem detectar quantidade significativa de polimorfismo distribuída por todo genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) associado ao baixo custo e rapidez em obter os resultados (NYBOM, 2004; VICCINI et al., 2004; DIAS et al., 2004; GOULART et al., 2005) e ainda pela maioria dos demais marcadores moleculares serem específicos. Contudo, o RAPD apresenta desvantagens como a baixa reprodutibilidade e padrão de herança dominante (DIAS et al., 2004). Segundo Thormann et al. (1994), esse marcador é recomendável no estudo da divergência genética de indivíduos que estão próximos ou pertencem à mesma espécie.

O crescente interesse da *Pfaffia glomerata* pelos laboratórios de fitoterápicos tem contribuído para o aumento do extrativismo não-sustentável, predispondo ao risco de perda de variabilidade genética. Portanto, objetivou-se avaliar a diversidade genética de quatro populações naturais estabelecidas na região da bacia do rio Paraná, incluindo áreas de preservação e de intenso

extrativismo, para obter informações relacionadas à distribuição da variabilidade genética desta espécie na região e estabelecer estratégias de conservação *in situ* e *ex situ*.

## Material e métodos

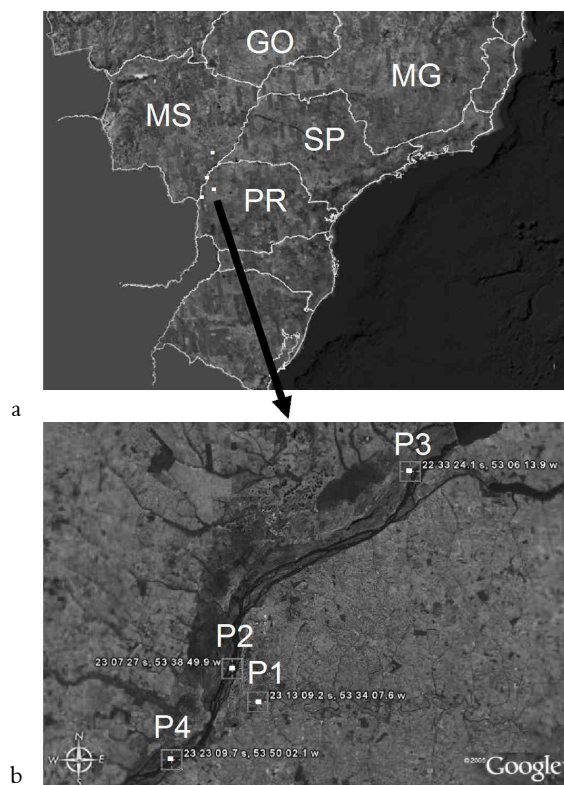
Foram estudadas quatro populações naturais de fáfia oriundas da região do rio Paraná (Tabela 1), totalizando 64 indivíduos. Três populações foram coletadas ao longo do rio Paraná e uma população nas proximidades do rio Ivaí (afluente do rio Paraná) em local de extrativismo no município de Querência do Norte, Estado do Paraná (Figura 1). As populações foram coletadas em 2001 e integram a coleção de germoplasma de plantas medicinais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (ALVES et al., 2006).

A diversidade foi estimada pela distância genética avaliada pelos marcadores RAPD. O DNA foi extraído seguindo método descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). Folhas de plantas recultivadas *in vitro* foram maceradas e misturadas em 600 µL de solução-tampão CTAB (2%), adicionada de mercaptoetanol (2 µL mL<sup>-1</sup>) e incubada por 45 min. a 60°C. A desproteíntização foi realizada em duas etapas consecutivas pela adição de 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugação (6 min. a 13.500 rpm). O DNA precipitado foi obtido pela adição de 500 µL de isopropanol (-20°C) e centrifugação (5 min. a 13.500 rpm). O precipitado foi lavado duas vezes em álcool 95% (500 µL) e seco no vácuo por aproximadamente 30 min. O material seco foi ressuscitado em 60 µL do tampão TE + RNAase (10 µL mL<sup>-1</sup>), em banho-maria a 37°C por 60 min.

Uma seleção inicial foi realizada a partir de 117 *primers* testados com base na reprodutibilidade e repetibilidade. Um grupo de quatro indivíduos, cada um representando uma das populações, indicou 74 *primers* que demonstraram polimorfismo. Numa segunda avaliação, foram selecionadas 67 *primers* com base na repetibilidade das bandas constatadas no grupo de quatro indivíduos e na consistência dos padrões de amplificação demonstradas nos indivíduos.

**Tabela 1.** Descrição das populações de fáfia (*Pfaffia glomerata*) avaliadas no estudo da diversidade genética.

População	N. de indivíduos	Local de coleta	Coordenadas geográficas	Vegetação predominante
1	19	Rio Ivaí, Querência do Norte, Paraná, Brasil	Lat 23° 13' 09,2" Long 53° 34' 07,6" Alt. 233 m	Pastagem e vegetação nativa em regeneração
2	18	Ilha do Mineiro, Querência do Norte, Paraná, Brasil	Lat 23° 07' 27" Long 53° 38' 49,9" Alt. 239m	Vegetação nativa
3	16	Porto Primavera, Baitaporã, MatoGrosso do Sul, Brasil	Lat 22° 33' 24,1" Long 53° 06' 13,9" Alt. 239 m	Vegetação nativa fragmentada
4	11	Parque Estadual de Ilha Grande, Vila Alta, Paraná, Brasil	Lat 23° 23' 09,7" Long 53° 50' 02,1" Alt. 232 m	Vegetação nativa preservada em área de conservação



**Figura 1.** Localização georreferenciada das populações de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]: a. Estados que contribuem com a formação do rio Paraná, iniciando-se em Minas Gerais/São Paulo (rio Grande) e Goiás/Minas Gerais (rio Paranaíba); b. coordenadas das populações coletadas.

As reações de amplificação seguiram o protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). A mistura foi composta de 9,4  $\mu\text{L}$  de água ultra-estéril e autoclavada; 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10X, composto por Tris-HCl (200 mM, pH 8,4) e KCl (500 mM); 2,1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (1,0  $\mu\text{M}$ ); 6,0  $\mu\text{L}$  de *primer* (5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ); 4  $\mu\text{L}$  DNA (2,5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ); e 0,5  $\mu\text{L}$  da enzima Taq polimerase (1 unidade). Realizaram-se 40 ciclos de amplificação nas seguintes condições: desnaturação (1 min. 92°C<sup>-1</sup>), anelamento (2 min. 35°C<sup>-1</sup>), polimerização (3 min. 72°C<sup>-1</sup>). Após o último ciclo, uma etapa de sete minutos a 72°C foi executada e finalizada em temperatura de 4°C. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose (1,5%), utilizando solução-tampão TBE (tris-borato 0,09 M e EDTA 0,002 M, pH 8,0). O padrão de tamanho (1 Kb DNA ladder) foi carregado juntamente com as amostras e submetidas à eletroforese nas condições de 75 a 100 mA 4-5h.<sup>-1</sup>.

As análises estatísticas foram realizadas a partir dos dados dos marcadores polimórficos, elaborando um arquivo de dados binários do tipo 0 e 1 para ausência ou presença da banda, respectivamente. Utilizou-se o índice de dissimilaridade do complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li

para estimar as distâncias entre os pares de indivíduos e obter a matriz de dissimilaridade. Os indivíduos e as populações foram agrupados pelo método hierárquico das médias aritméticas das medidas de dissimilaridade (UPGMA). Todas as análises foram realizadas no programa computacional Genes (CRUZ, 2001).

### Resultados e discussão

A utilização de material cultivado *in vitro* possibilitou a extração de DNA de boa qualidade. Foi obtido um total de 384 bandas, sendo 267 polimórficas (69,53%) e 117 monomórficas (30,46%). Alguns estudos de diversidade intraespecífica não demonstram altos níveis de bandas polimórficas, enquanto que nos estudos interespecíficos é comum observar altos níveis de polimorfismo. Vollmann et al. (2005) avaliaram a diversidade genética de 41 indivíduos de uma variedade cultivada de *Camelina sativa* mediante uso de 24 *primers* e observaram 63% de polimorfismo. No estudo realizado com 48 plantas de *Panax quinquefolius* oriundos de área de cultivo, utilizando-se 36 *primers*, foi obtido um polimorfismo de apenas 45,7% (BAI et al., 1997).

Viccini et al. (2004) estudaram a diversidade interespecífica de nove espécies de *Lippia* spp. utilizando 18 *primers* e obtiveram 489 marcas polimórficas do total de 490. Nsabimana e Staden (2007) avaliaram 51 genótipos de banana pertencentes a três grupos genômicos (AAA, AAB e BB) e obtiveram 90,9% de bandas polimórficas. Ambiel et al. (2008) verificaram que 24,4% da variabilidade genética total de acessos de diferentes espécies de *Brachiaria* estavam contidas entre as espécies e 75,6% dentro destas, com índice de fixação gênica (FST) 0,24. Neste trabalho foram utilizadas 107 bandas polimórficas com base em marcadores RAPD.

Comparando 84 genótipos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* por meio de marcadores RAPD, Picoli et al. (2004) observaram 88,9 e 95,8% de bandas polimórficas para as respectivas espécies. A proporção de diversidade total, estimada pelo índice de Shannon e com base em 501 bandas encontradas dentro de cada espécie, foi de 85 e 96%. Dentre as bandas avaliadas, uma foi exclusiva de *E. grandis*, enquanto outras nove foram exclusivas de *E. urophylla*. Estes valores sugerem a existência de menor diversidade dentro das populações de fáfia avaliadas ou reforçam a hipótese de serem constituídas por apenas uma espécie.

A matriz de dissimilaridade obtida dos 64 indivíduos resultou em 4.096 valores de índice de

dissimilaridade, sendo destacados e analisados apenas 20 valores de maior e menor dissimilaridade (Tabela 2). Os pares formados pelos indivíduos 54 x 41 e 47 x 48 estabeleceram a maior e menor distância, respectivamente. Em geral, as maiores distâncias foram encontradas entre indivíduos de diferentes populações, e as menores entre indivíduos da mesma população. Os indivíduos da população 1 foram predominantes para formar os pares de maiores índices. Os três pares que apresentaram as menores distâncias, 47 x 48, 25 x 26 e 59 x 60, coincidentemente, foram formados por acessos de números sequenciais em que a numeração foi atribuída conforme a sequência de coleta das plantas. Essa coincidência pode estar relacionada ao alto grau de parentesco entre os genótipos ou indica pequena distância entre os pontos de coleta.

**Tabela 2.** Pares de genótipos que obtiveram valores extremos de maior e menor medida de dissimilaridade (d) com base no índice do complemento aritmético de Nei e Li, calculados a partir de 267 marcadores RAPD em 64 indivíduos de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen].

Ordem	Maiores distâncias			Menores distâncias		
	Indivíduos	Populações	d	Indivíduos	Populações	d
1	54 x 41	4 x 1	0,5185	47 x 48	2 x 2	0,0277
2	54 x 5	4 x 1	0,5087	25 x 26	2 x 2	0,0310
3	54 x 31	4 x 3	0,4909	59 x 60	4 x 4	0,0320
4	8 x 9	1 x 1	0,4782	10 x 12	1 x 1	0,0531
5	39 x 13	3 x 1	0,4756	30 x 32	3 x 3	0,0556
6	5 x 57	1 x 4	0,4717	49 x 50	3 x 3	0,0638
7	39 x 5	3 x 1	0,4626	34 x 35	3 x 3	0,0732
8	39 x 8	3 x 1	0,4623	22 x 24	2 x 2	0,0965
9	39 x 42	3 x 1	0,4609	54 x 55	4 x 4	0,1045
10	5 x 23	1 x 2	0,4587	55 x 64	4 x 4	0,1088
11	8 x 50	1 x 3	0,4576	20 x 47	2 x 2	0,1137
12	39 x 9	3 x 1	0,4570	20 x 48	2 x 2	0,1181
13	8 x 30	1 x 3	0,4560	31 x 37	3 x 3	0,1225
14	39 x 1	3 x 1	0,4545	5 x 41	1 x 1	0,1705
15	8 x 44	1 x 2	0,4517	62 x 63	4 x 4	0,1808
16	9 x 44	1 x 2	0,4516	64 x 54	4 x 4	0,1875
17	36 x 41	3 x 1	0,4515	54 x 61	4 x 4	0,2063
18	9 x 41	1 x 1	0,4502	59 x 62	4 x 4	0,2088
19	6 x 54	1 x 4	0,4482	53 x 54	3 x 4	0,2121
20	11 x 56	1 x 4	0,4489	60 x 62	4 x 4	0,2137

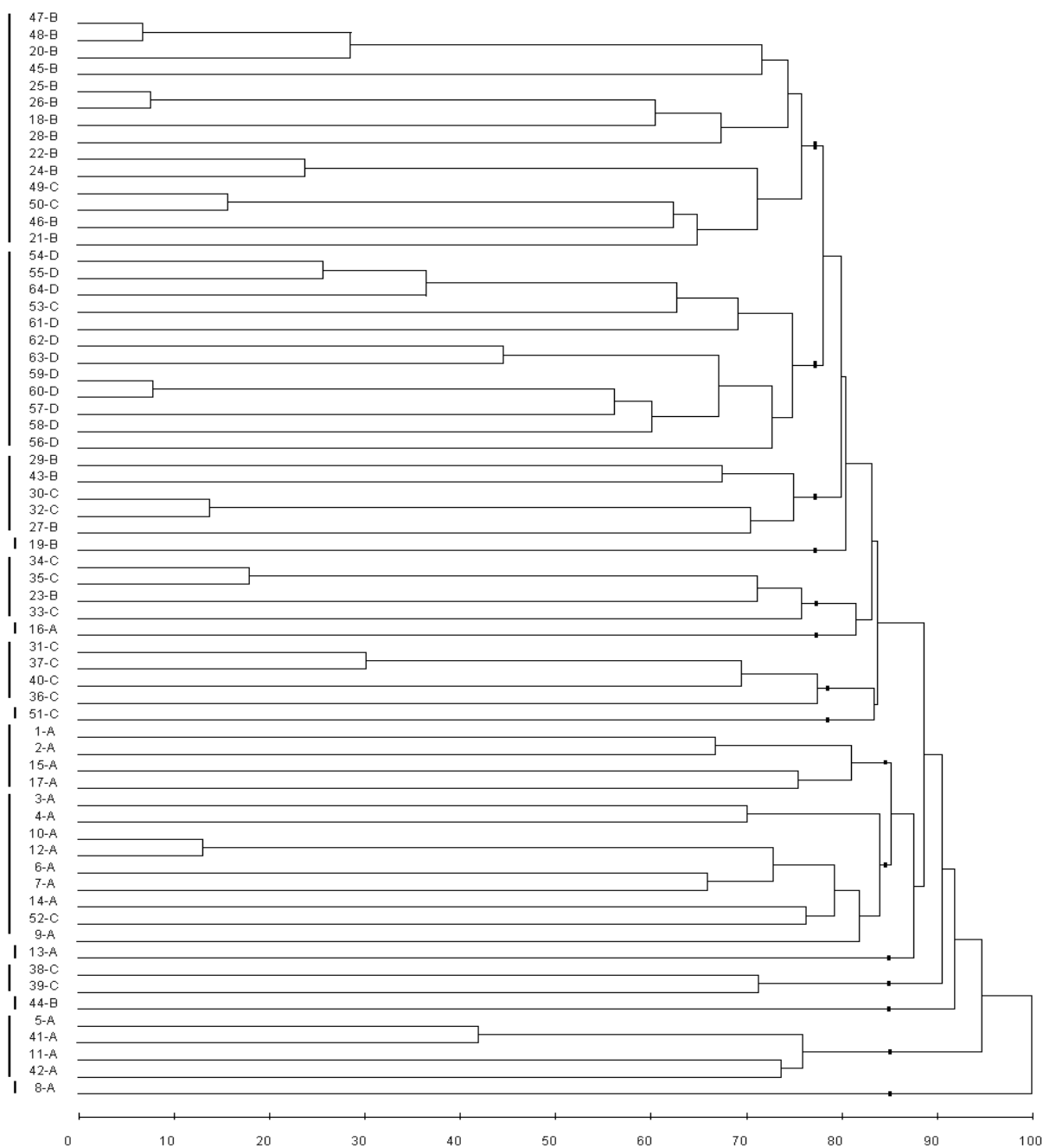
A associação entre similaridade genética e distância física entre os indivíduos em populações de *Eucalyptus* foi verificada mediante o uso de marcadores RAPD (SKABO et al., 1998). Os autores verificaram, em uma floresta nativa de *E. globulus*, a organização de pequenos grupos de indivíduos geneticamente similares num raio de 25 m, a partir do qual a similaridade genética foi insignificante. Ainda assim, na amplitude geográfica total estudada,

a similaridade genética foi apenas fracamente associada com a distância genética de árvores adultas. Estudos de diferenciação de híbridos naturais, entre *E. amygdalina* e *E. risdonii* e estandes próximos, baseados em RAPD, revelaram que as espécies compartilhavam as mesmas bandas, apesar de diferenças morfológicas. Contudo, diferentes frequências destas bandas indicaram divergência genética entre espécies, populações dentro de espécies e de indivíduos dentro das populações, em que, as variações foram maiores entre indivíduos dentro das populações e menores entre as espécies (SALE et al., 1996).

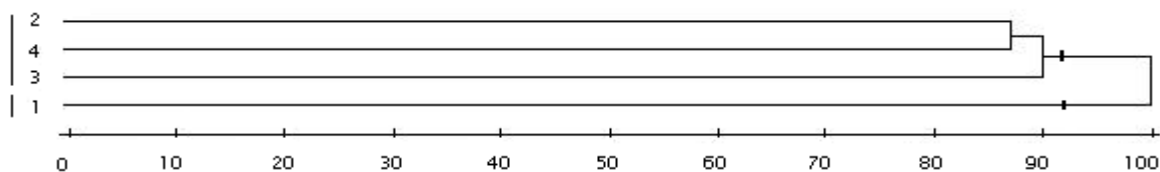
O agrupamento pelo método UPGMA possibilitou delimitar 15 grupos (Figura 2) entre os 64 indivíduos. O primeiro maior grupo foi constituído por 14 indivíduos oriundos das populações 2 e 3. O segundo foi formado por 12 indivíduos, e todos os indivíduos da população 4 foram incluídos nesse grupo. A população 1 foi predominante no terceiro grupo, em que apenas um indivíduo não pertence a essa população. Seis grupos foram formados contendo apenas um indivíduo; oriundos da população 1 (indivíduos 8, 13 e 16), população 2 (indivíduos 19 e 44) e população 3 (indivíduo 51). O método UPGMA separou nitidamente os indivíduos das populações 1 e 4, pois não foi formado nenhum grupo contendo indivíduos dessas duas populações. No entanto, não houve separação entre os indivíduos das demais populações nos grupos de dissimilaridade. Os indivíduos da população 1 demonstraram maior dissimilaridade uma vez que constituíram três grupos formados por único indivíduo.

O dendrograma com base no método UPGMA utilizando 501 marcas RAPD foi suficiente para separar 40 genótipos de *E. grandis* e 44 de *E. urophylla*. Conjuntos de bandas selecionadas aleatoriamente, e que resultaram em menos de 5% de estresse e correlação de 95% com o agrupamento obtido com o número total de bandas, proporcionaram a separação dos genótipos destas duas espécies de acordo com o agrupamento de Tocher (PICOLI et al., 2004). Contudo, grupos formados por somente um indivíduo também foram verificados nestas análises, semelhante ao observado para fáfia (Figura 2).

No agrupamento das populações foram delimitados dois grupos (Figura 3): as populações 2, 3 e 4 foram incluídas no mesmo grupo, e a população 1 destacou-se constituindo isoladamente o segundo grupo. No entanto, o aspecto fitogeográfico pode ter interferido no estabelecimento das populações, assim como na diversidade genética.



**Figura 2.** Dendrograma representativo do agrupamento de 64 genótipos de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] pelo método hierárquico UPGMA com base no índice de dissimilaridade (complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li), calculados a partir de 267 marcadores RAPD. Populações: A - população 1, rio Ivaí; B - população 2, ilha do Minciro; C - população 3, porto Primavera; D - população 4, Vila Alta.



**Figura 3.** Dendrograma representativo do agrupamento de quatro populações de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] pelo método hierárquico UPGMA com base no índice de dissimilaridade (complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li), calculados a partir de 267 marcadores RAPD.

A Figura 1 evidencia a posição geográfica das populações. As populações 3, 2 e 4 foram estabelecidas ao longo do curso do rio Paraná e teriam sido formadas a partir de propágulos transportados pelo rio Paraná ou a partir de outras populações mais à montante do rio Paraná. O fluxo e as cheias do rio Paraná atinge sequencialmente os locais das populações 3, 2 e 4 (Figura 1). Por outro lado, a população 1 encontra-se no rio Ivaí, um afluente do rio Paraná onde o fluxo de captação e trajetória fluvial difere dos propágulos das populações 3, 2 e 4.

Todas as introduções recebidas dos afluentes poderiam contribuir no aumento da diversidade das populações localizadas no rio Paraná. A população 4 situa-se em local com potencial de maior recebimento de propágulos e preservação (Parque Estadual de Ilha Grande) entre as quatro populações avaliadas, pois pode receber materiais das populações 3, 2 e 1 (Figura 1). No entanto, a população 4 apresentou menor dissimilaridade entre seus indivíduos e a população 1, maior dissimilaridade. Tal resultado sugere a busca de novas populações nas proximidades da população 4 ou re-amostragem da mesma. Por outro lado, também é possível que o fluxo de propágulos originários do rio Ivaí (população 1) tenha sido limitado por algum tipo de barreira que impediu a sua movimentação para o rio Paraná, viabilizando a coleta de novas populações nas proximidades do rio Ivaí antes de atingir o rio Paraná.

O agrupamento com base na análise de marcadores RAPD não somente agrupou os acessos de tomate testados dentro dos complexos *esculentum* e *peruvianum* como também os classificou com base na morfologia, cor de fruto e auto-incompatibilidade (EGASHIRA et al., 2000), demonstrando assim a utilidade da técnica na caracterização da diversidade genética e relações entre as populações. Utilizando apenas 100 marcadores, Conner e Wood (2001) diferenciaram 43 cultivares de *Carya illinoensis*, e as estimativas de distância apresentaram boa concordância com as informações de pedigree.

Utilizando marcadores RAPD, foi possível agrupar acessos e cultivares de *Brachiaria*, onde *B. brizantha* apresentou maior variabilidade genética e maior número de bandas polimórficas (AMBIEL et al., 2008). Adicionalmente, os autores concluíram que esta abordagem pode auxiliar a construção de uma chave taxonômica para o gênero. Esses resultados sugerem a capacidade de discriminação e agrupamento das análises com base nestes marcadores para espécies cultivadas e populações naturais como no caso de fâfia.

## Conclusão

A técnica molecular RAPD que utiliza material propagado *in vitro* foi favorável na obtenção de fragmentos polimórficos em quantidade e qualidade suficientes para estimar a distância dos indivíduos, observadas pela reprodutibilidade e repetibilidade do padrão dos fragmentos amplificados.

O agrupamento das populações 2, 3 e 4, no mesmo grupo de similaridade, pelo método UPGMA, foi concordante com os aspectos fitogeográficos estabelecidos pelo curso atual do rio Paraná, e o fluxo e as cheias do rio Paraná atingem sequencialmente os locais das populações 3, 2 e 4.

A população 1, localizada na região de extrativismo, apresentou evidente distância genética em relação às demais populações, indicando que a preservação do seu ambiente e novas coletas dessa população são indispensáveis para preservação da variabilidade genética da fâfia.

A população 4 demonstrou menor magnitude de dissimilaridade entre seus indivíduos, no entanto é necessário rever os critérios de coleta relacionados ao tamanho da amostra e distância entre os indivíduos, para, de fato, mencionar a baixa variabilidade existente no seu local de coleta (Parque Nacional de Ilha Grande, Vila Alta, Estado do Paraná).

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Fapemig, Capes e CNPq, pelo apoio financeiro.

## Referências

- ALVES, R. B. N.; MENDES, R. A.; MENDES, M. A.; CARNEIRO, R. M. D. G.; SILVA, D. B.; CARDOSO, L. D.; SALOMÃO, A. N.; VIEIRA, R. F. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] germplasm conservation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, esp., p. 1-4, 2006.
- AMBIEL, A. C.; GUALBERTO, L. M.; VANDERLEY, T. M.; MACHADO NETO, N. B. Agrupamento de acessos e cultivares de três espécies de *Brachiaria* por RAPD. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 4, p. 457-464, 2008.
- BAI, D.; BRANDLE, J.; REELEANDER, R. Genetic diversity in north American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) grown in Ontario detected by RAPD analysis. **Genome**, v. 40, n. 1, p. 111-115, 1997.
- BOLARIC, S.; BARTH, S.; MELCHINGER, A. E.; POSSELT, U. K. Molecular genetic diversity within and among German ecotypes in comparison to European perennial ryegrass cultivars. **Plant Breeding**, v. 124, n. 3, p. 257-262, 2005.
- CONNER, P. J.; WOOD, B. W. Identification of pecan cultivars and their genetic relatedness as determined by

- randomly amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of the American Society for Horticultural Sciences**, v. 126, n. 4, p. 474-480, 2001.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001.
- DIAS, L. A. S.; PICOLI, E. A. T.; ROCHA, B. R.; ALFENAS, A. C. A priori choice of hybrid parents in plants. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 3, p. 356-368, 2004.
- EGASHIRA, H.; ISHIHARA, H.; TAKASHINA, T.; IMANISHI, S. Genetic diversity of the 'peruvianum-complex' (*Lycopersicon peruviaum* (L.) Mill. and *L. chilense* Dun.) revealed by RAPD analysis. **Euphytica**, v. 116, n. 9, p. 23-31, 2000.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa/Cenargen, 1998.
- GOULART, M. F.; RIBEIRO, S. P.; LOVATO, M. B. Genetic, morphological and spatial characterization of two populations of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae), in different successional stages. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 2, p. 275-284, 2005.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- NSABIMANA, A.; STADEN, J. V. Assessment of genetic diversity of Highland bananas from the National Banana Germplasm Collection at Rubona, Rwanda using RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, v. 113, n. 3, p. 293-299, 2007.
- NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 5, p. 1143-1155, 2004.
- PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; CRUZ, C. D.; MOURA, D. F. Sample size for number of RAPD markers to estimate genetic diversity in *Eucalyptus*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 384-390, 2004.
- SALE, M. M.; POTTS, B. M.; WEST, A. K.; REID, J. B. Molecular differentiation within and between *Eucalyptus risdonii*, *E. amygdalina* and their hybrids using RAPD markers. **Australian Journal of Botany**, v. 44, n. 5, p. 559-568, 1996.
- SIQUEIRA, J. C. Considerações taxonômicas sobre as espécies brasileiras do gênero *Pfaffia*. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 10, n. 2, p. 269-278, 1988.
- SKABO, S.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M. Fine structure of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* forest revealed by RAPDs. **Australian Journal of Botany**, v. 46, n. 6, p. 583-594, 1998.
- TELLES, M. P. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; BASTOS, R. P.; SOARES, T. N.; GUIMARAES, L. D.; LIMA, L. P. Landscape genetics of *Physalaemus cuvieri* in Brazilian Cerrado: Correspondence between population structure and patterns of human occupation and habitat loss. **Biological Conservation**, v. 139, n. 1-2, p. 37-46, 2007.
- THORMANN, C. E.; FERREIRA, M. E.; CAMARGO, L. E. A.; TIVANG, J. G.; OSBORN, T. C. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, n. 8, p. 973-980, 1994.
- VICINI, L. F.; SOUZA-COSTA, D. C.; MACHADO, M. A.; CAMPOS, A. L. Genetic diversity among species of *Lippia* (Verbenaceae) based on RAPD markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 246, n. 1-2, p. 1-8, 2004.
- VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Validação metodológica de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen - Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl., p. 46-49, 2003.
- VOLLMANN, J.; GRAUSGRUBER, H.; STIFT, G.; DRYZHYRUK, V.; LELLEY, T. Genetic diversity in *Camelina* germplasm as revealed by seed quality characteristics and RAPD polymorphism. **Plant Breeding**, v. 124, n. 5, p. 446-453, 2005.

Received on April 6, 2007.

Accepted on February 15, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.