

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E
MUCURI - UFVJM**

THALYTA FERNANDES GODINHO

**ANÁLISE GENÉTICA DE MATRIZES DE *Caryocar brasiliense*
UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITE**

DIAMANTINA - MG

2013

THALYTA FERNANDES GODINHO

**ANÁLISE GENÉTICA DE MATRIZES DE *Caryocar brasiliense*
UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, área de concentração em Ciência Florestal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador: Dr. Marcelo Luiz de Laia

DIAMANTINA – MG

2013

THALYTA FERNANDES GODINHO

**ANÁLISE GENÉTICA DE MATRIZES DE *Caryocar brasiliense*
UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, área de concentração em Ciência Florestal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 7 de fevereiro de 2013

Prof^ª. Dr^ª. Maria Inês Tiraboshi Ferro - UNESP

Prof^ª. Dr^ª. Miranda Titon- UFVJM

Prof. Dr. José Sebastião Cunha Fernandes- UFVJM

Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia – UFVJM

Presidente

Ficha Catalográfica - Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Viviane Pedrosa
CRB6-2641

G585a Godinho, Thalyta Fernandes Godinho
2013 Análise genética de matrizes de *Caryocar brasiliense* utilizando marcadores moleculares microssatélite. –Diamantina: UFVJM, 2013.
43p.

Orientador: Marcelo Luiz de Laia

Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Pequi - conservação 2. Distância genética 3. Dendrograma I. Título.

CDD 634.9

Elaborada com dados fornecidos pelo (a) autor(a)

Aos meus pais e ao meu irmão,

Dedico

Aos meus avôs Antônio e Ismar,

Aos meus tios Geraldo e Lênio,

À minha tia Terezinha,

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir que eu chegasse até aqui. Pelo dom da vida, pela coragem e sabedoria. Por me abençoar sempre...

Aos meus pais por confiarem em mim e por acreditarem que eu conseguiria.

Ao meu irmão Ismar pelo companheirismo.

Ao Samuel pelo amor, incentivo e por me fazer tão feliz!

À minha família pelas orações.

Amo todos vocês!

Ao professor Marcelo pela orientação, apoio e ensinamentos.

À banca examinadora pela contribuição para que esse trabalho se tornasse ainda melhor.

À CAPES pela bolsa durante todo esse período.

À Janaína pela imensa ajuda.

Aos meus amigos por estarem comigo, de perto ou longe.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização desse trabalho.

RESUMO

Considerado como um “hotspot” mundial de biodiversidade, o Cerrado apresenta alta abundância de espécies endêmicas e possui mais de 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas. Dentre elas, o pequi (*Caryocar brasiliense*), espécie que possui grande importância ambiental e social neste bioma. A expansão da fronteira agrícola e a intensiva exploração do Cerrado, porém, têm colocado em risco a preservação e a variabilidade genética da espécie. Além disso, o extrativismo intensivo do pequi pode gerar perdas de material genético, já que quase todos os frutos de qualidade, oriundos de genótipos superiores, são coletados. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar o banco de matrizes de pequi, utilizando marcadores moleculares microssatélites, com fins de melhoramento e conservação da espécie. Para a extração do DNA genômico, foram utilizadas amostras foliares de 20 matrizes de *Caryocar brasiliense*, das quais 16 oriundas do Parque Estadual do Rio Preto (São Gonçalo do Rio Preto – MG) e as demais oriundas da Fazenda Experimental da UFVJM – Campus Moura (Curvelo – MG). Para a amplificação do DNA, foram testados dez oligonucleotídeos específicos para o pequi. Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 10% e ureia 6 M em TBE 1x. A partir da leitura dos géis gerou-se uma matriz binária em que os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas. Com essa matriz, através do programa estatístico R, calcularam-se as distâncias genéticas de Jaccard e obteve-se o dendrograma. As distâncias genéticas variaram de 0,15 a 0,70. A análise de agrupamento, representada pelo dendrograma, permitiu inferir que as matrizes foram divididas em quatro grupos distintos. Dessa forma, o programa de melhoramento do pequi poderá utilizar esses dados para o estabelecimento e avaliação de testes de progênies, com fins de produção ou conservação.

Palavras chave: pequi, conservação, distância genética, dendrograma.

ABSTRACT

Considered as a world hotspot of biodiversity, the Cerrado shows high abundance of endemic species and has more than 11.627 species of native plants already cataloged. Among them, the pequi (*Caryocar brasiliense*) specie that has large environmental and social importance in this biome. Although, the expansion of the agricultural frontier and the intensive exploration of Cerrado has put at risk the preservation of the specie genetic variability. Beyond that, the pequi intensive extractivism can generate losses of genetic material, since almost all quality fruits from superior genotypes are collected. Thus, the objective of this study was to analyze the database arrays pequi using microsatellite molecular markers, with the purpose of improvement and conservation of the species. For genomic DNA extraction, leaf samples were used from 20 arrays *Caryocar brasiliense*, of which 16 were originated from the Parque Estadual do Rio Preto (São Gonçalo do Rio Preto - MG) and the others coming from the Experimental Farm UFVJM - Campus Moura (Curvelo - MG). For amplification of DNA were tested ten primers specific for pequi. After amplification, the DNA fragments were separated on denaturing polyacrylamide gel 10% in 6 M urea and 1x TBE. From the reading of the gels was generated binary matrix in which one subjects were genotyped for presence (1) or absence (0) of bands. With this array, through the statistical program R, we calculated the genetic distances and Jaccard gave the dendrogram. The genetic distances varied from 0.15 to 0.70. Cluster analysis, represented by dendrogram allowed to infer that the arrays were divided into four groups. Thus, the improvement program pequi can use these data to the establishment and evaluation of progeny tests with production or conservation purposes.

Keywords: pequi, conservation, genetic distance, dendrogram.

ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O setor florestal brasileiro.....	1
1.2 O Bioma Cerrado.....	1
1.3 O Pequiizeiro.....	2
1.4 Análise da Variabilidade Genética.....	4
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	7
2.1 Material Vegetal.....	7
2.2 Extração do DNA Genômico.....	9
2.3 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	10
2.4 Eletroforese dos Produtos Amplificados.....	10
2.5 Análises Estatísticas dos Dados Obtidos.....	11
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
3.1 Extração do DNA genômico, Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e Eletroforese dos Produtos Amplificados.....	13
3.2 Análises dos Dados.....	17
4 CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

1.1 O SETOR FLORESTAL BRASILEIRO

A produção primária florestal em 2011, segundo o IBGE, somou R\$ 18,1 bilhões. Desse total, a silvicultura contribuiu com 72,6% (R\$ 13,1 bilhões), enquanto a extração vegetal participou com 27,4% (R\$ 5,0 bilhões). A participação de produtos madeireiros na extração vegetal totalizou R\$ 4,0 bilhões e o de não madeireiros somou R\$ 935,8 milhões. Na silvicultura, os produtos madeireiros somaram R\$ 13,0 bilhões e os não madeireiros, apenas R\$ 151,8 milhões.

Ainda em 2011, entre os principais produtos madeireiros da extração vegetal, o carvão e a lenha apresentaram decréscimo em suas produções (10,1% e 1,7%, respectivamente), quando comparados com as obtidas no ano anterior. Tais quedas estão relacionadas à atuação de órgãos fiscalizadores e ambientais. A quantidade de madeira em tora foi 11,5% superior a 2010, sendo a liberação para corte em áreas de manejo florestal e em áreas que serão alagadas uma das causas desse aumento (IBGE, 2011).

A produção de carvão vegetal, a partir do extrativismo, de oito estados brasileiros responde por 95% da quantidade obtida no país. De acordo com o IBGE, em 2011, esse valor totalizou 1.351.192 toneladas. O estado de Minas Gerais ocupou o terceiro lugar no ranking, produzindo 156.510 toneladas, sendo os municípios de Pompéu e João Pinheiro destaque na produção de carvão, com quantidades produzidas de 12.300 e 12.304 toneladas, respectivamente.

Considerando madeira em tora, em 2011, de um total de 139.969.520 m³ produzidos, 89,9% foram oriundos de florestas plantadas e 10,1% do extrativismo. Em relação à produção de lenha, o extrativismo vegetal colaborou com 42,1%, de um total de 89.315.636 m³, contra 57,9% da silvicultura (IBGE, 2011).

Dessa forma, pode-se afirmar que o setor florestal brasileiro tem contribuído com uma parcela importante para a economia nacional, gerando produtos para consumo direto ou para exportação, gerando impostos e empregos para a população e, ainda, atuando na conservação e preservação dos recursos naturais.

1.2 O BIOMA CERRADO

O Cerrado ocupa uma área de 2.036.448 km², cerca de 20% do território nacional. A sua área contínua incide sobre os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul,

Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos encaves no Amapá, Roraima e Amazonas (BRASIL, 2012).

Considerado como um hotspot mundial de biodiversidade, o Cerrado apresenta extrema abundância de espécies endêmicas e é reconhecido como a savana mais rica do mundo, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas. Apesar do reconhecimento de sua importância biológica, de todos os hotspots mundiais, o Cerrado é o que possui a menor porcentagem de áreas sobre proteção integral (BRASIL, 2012).

Além dos aspectos ambientais, o Cerrado tem grande importância social. Muitas populações sobrevivem de seus recursos naturais, incluindo etnias indígenas, quilombolas, geraizeiros, ribeirinhos, babaqueiras, vazanteiros que fazem parte do patrimônio histórico e cultural brasileiro e detêm um conhecimento tradicional de sua biodiversidade. Mais de 10 tipos de frutos comestíveis são regularmente consumidos pela população local e vendidos nos centros urbanos, como os frutos do pequi (*Caryocar brasiliense*), buriti (*Mauritia flexuosa*), mangaba (*Hancornia speciosa*), cagaita (*Eugenia dysenterica*), bacupari (*Salacia crassifolia*), cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile*), Araticum (*Annona crassifolia*) e as sementes do barú (*Dipteryx alata*) (BRASIL, 2012).

1.3 O PEQUIZEIRO

A espécie *Caryocar brasiliense*, também conhecida como pequi, pertence à família Caryocaraceae e ao gênero *Caryocar*, quem vem do grego *caryon* (que significa núcleo ou noz) mais *kara* (que significa espinho), em referência ao fruto globoso da espécie. Ocorre em dez estados brasileiros e seu porte pode variar de arbustivo a arbóreo, em que as árvores maiores atingem dimensões próximas a 11 m de altura e 83 cm de DAP na idade adulta. O tronco é tortuoso, com fuste curto, atingindo no máximo 5 m de comprimento. A casca mede até 10 mm de espessura, de cor externa cinza, com fissuras sinuosas e descontínuas. As folhas do pequi são compostas, de filotaxia oposta, e trifolioladas. Suas inflorescências ocorrem em racemos corimbosos, com 1 a 30 flores, agrupados no ápice da raque. Suas flores são protandras, actinomorfas, de esverdeadas a brancas (CARVALHO, 2008).

A espécie é bem adaptada a solos pobres, rasos, arenosos e de baixa nutrição. Suas raízes se multiplicam horizontalmente, são pivotantes e profundas, o que favorece sua adaptação a esse tipo de solo (ANTUNES *et al*, 2006; BORGES *et al*, 2012).

É uma espécie hermafrodita e possui fruto globoso, verde, com mesocarpo amarelo e carnoso e o endocarpo com espinhos e lenhoso (ALMEIDA *et al.*, 1998). A polpa pode ser usada

na produção de doces, geléias, ração para animais (porcos) e o fruto não pode ser consumido *in natura*, sendo consumido em pratos típicos de algumas regiões brasileiras (OLIVEIRA *et al.*, 2008). O pequi possui semente oleaginosa e comestível, sendo economicamente aproveitável. Da polpa se extrai um óleo rico em vitaminas A e E (CARVALHO, 2008).

Outro uso dos resíduos dos frutos do pequizeiro é o controle de nematóides em galhas de tomateiro. Ribeiro e colaboradores (2012) utilizaram a casca e a polpa do fruto na obtenção do extrato de pequi, que atuou na inibição da eclosão dos ovos de nematóides causadores de doenças no tomateiro. Nesse estudo, as doses de concentração 20% reduziram a eclosão dos ovos em 99,9%, quando comparadas com o controle (água). Além disso, utilizando o pó da casca e do mesocarpo externo do pequi, tais pesquisadores concluíram que o número de galhas e o número de ovos diminuem linearmente com o aumento da concentração do pó.

Pianosvski e colaboradores (2008) desenvolveram e avaliaram a estabilidade física de emulsões cosméticas contendo óleo de pequi. Os resultados dessa avaliação permitiram concluir que o óleo de pequi possui aplicabilidade cosmética, podendo fazer parte da cadeia produtiva de produtos naturais e de desenvolvimento sustentável.

Em que pese seu uso mais expressivo ser o alimento, vislumbra-se o seu potencial para a produção de biocombustíveis. A parte comestível é a polpa, enquanto que o caroço, rico em óleo, é descartado (ANTUNES *et al.*, 2006). Pesquisas iniciais mostraram que o óleo de pequi, misturado ao diesel, reduziu em 30% a emissão de poluentes. Além disso, enquanto é possível se obter até 3200 l/ha de biodiesel de pequi, apenas 400 l/ha são possíveis a partir da soja (OLIVEIRA *et al.* 2008). Recentemente, Borges e colaboradores (2012) demonstraram que 60% do fruto é óleo e que as características deste óleo estão de acordo com o padrão exigido pela Agência Nacional de Petróleo (ANP). Mesmo o subproduto da produção de biodiesel pode ser reaproveitado para a produção do bioetanol. Macedo e colaboradores (2011) demonstraram ser possível obter 53 litros de etanol por tonelada de restos de caroço de pequi.

Silva (2011), avaliando variáveis químicas de pequi, para matrizes localizadas em São Gonçalo do Rio Preto-MG e Curvelo-MG, encontrou valores médios de lipídeos na matéria seca do fruto em torno de 33,40%.

No entanto, o extrativismo descontrolado e a expansão da fronteira agrícola e a intensiva exploração do Cerrado têm colocado em risco a preservação e a variabilidade genética da espécie (ÂNGELO, 2012). Além disso, o extrativismo intensivo do pequizeiro pode gerar perdas de material genético, já que quase todos os frutos de qualidade, oriundos de genótipos superiores, são coletados. Dessa forma, a determinação dos níveis de variabilidade e o entendimento da

dinâmica de movimentação de alelos nas populações naturais da espécie podem trazer subsídios para a conservação da espécie (MELO JÚNIOR, 2004).

Logo, o pequiheiro possui qualidades importantes, tanto social quanto econômica e ambiental, principalmente para regiões como o Vale do Jequitinhonha mineiro, onde há uma condição financeira precária, os solos são pobres e há déficit hídrico acentuado.

No entanto, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos com esta espécie e pesquisas básicas devem ser realizadas.

1.4 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA

Nos últimos anos, houve aumento significativo de metodologias genético molecular (diversos tipos de marcadores moleculares) e suas aplicações para resolver problemas e aumentar a eficiência dos programas de conservação e uso dos recursos genéticos vegetais. As metodologias para detectar e analisar a variabilidade genética em nível molecular oferecem informações adicionais a outros estudos relativos à conservação e uso de bancos de germoplasma (FALEIRO, 2007).

Define-se como marcador molecular qualquer fenótipo molecular originário de um gene expresso ou de um determinado segmento de DNA, que corresponda a uma região expressa ou não do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Outra definição é que marcadores moleculares do DNA são segmentos de DNA vinculados a locos, que originam a característica de interesse (ALZATE-MARIM *et al.*, 2005). Essa tecnologia possibilita caracterizar e identificar espécies de tal forma que expõem as mínimas diferenças existentes entre genótipos (MELO; MORAIS, 2011).

A relevância no uso dos marcadores moleculares como auxílio ao melhoramento está no fato dos marcadores serem praticamente ilimitados em quantidade, possuem facilidade de detecção e não serem afetados pelo meio (MELO; MORAIS, 2011; FALEIRO, 2007).

A utilização dos marcadores se resume em desenvolver análise genética com as mais variadas finalidades como: identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, estimar diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco e mapas genéticos (BUSO *et al.*, 2003), além de possibilitar a discriminação genética ou avaliação da variabilidade genética existente nas diferentes famílias, seja entre ou dentro das mesmas (BERED *et al.*, 1997)

Segundo Milach (1998), os marcadores se diferenciam pela técnica usada para detectar a variabilidade em nível de DNA, podendo, portanto, variar quanto à habilidade de localizar diferenças entre os indivíduos, o custo, facilidade de utilização, consistência e repetibilidade.

Estudos realizados a partir da década de 80 demonstraram que existem diferentes classes de sequências repetidas no genoma de eucariotos. Estas sequências, quando se apresentam mais complexas, são denominadas de minissatélites. Já as mais simples representam os microsatélites (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os microsatélites, também denominados de SSR (Simple Sequence Repeats - Sequências Simples Repetitivas), são pequenos fragmentos de DNA com um a cinco pares de base que se repetem (BRAMMER, 2000), sendo os mais utilizados para análise genética em seres vivos (GRATTAPAGLIA, 2007). Eles se apresentam em maior frequência, além de estarem distribuídas ao acaso e formarem locos genéticos mais polimórficos. Por meio da técnica de PCR estes locos podem ser amplificados e o resultado comparado entre indivíduos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

As espécies florestais, por serem altamente heterozigotas, fazem dos marcadores microsatélites os mais indicados, pois estes apresentam maior conteúdo de informações e são de fácil utilização. Dentre as características desses marcadores, algumas merecem destaque em relação ao uso em espécies florestais: possuem herança codominante, são multi-alélicos, as sequências de microsatélites são abundantes e uniformemente distribuídas no genoma. Quando comparada a outras técnicas, a análise de polimorfismo de microsatélites é bem mais simples, além de poder ser transferida entre indivíduos, seja dentro de uma espécie ou entre espécies taxonomicamente próximas (GRATTAPAGLIA, 2007).

Dessa forma, as informações moleculares podem complementar as informações ecológicas e morfológicas dos recursos genéticos, contribuindo para aumentar a eficiência dos processos de coleta, direcionar o enriquecimento da base genética, analisar diversidade e pureza genética, auxiliar em trabalhos de identificação botânica, subsidiar a seleção de genitores, além de permitir o planejamento dos cruzamentos e a seleção de genótipos com características desejadas em um programa de melhoramento (FALEIRO, 2007).

As características das plantas são controladas por genes identificados e dispersos em seus cromossomos e estes podem contribuir de forma negativa ou positiva na expressão da característica, já que as mesmas podem sofrer intervenção do ambiente (PETERSON *et al.*, 1988, citado por BORÉM, 2001). A principal finalidade da análise destas características é poder relacioná-las com os marcadores moleculares e, existindo esta associação, o marcador deve apresentar ligação com o gene específico para a determinação da característica, podendo, deste modo, utilizar seleção indireta (BORÉM, 2001).

Por meio do uso de marcadores moleculares podem ser obtidas informações referentes à diversidade genética (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Cada marcador utilizado

corresponde a um caráter fenotípico distinto e independente e a interpretação é feita a partir da análise das bandas, de maneira que bandas em comum entre genótipos correspondem a similaridades genéticas e bandas não comuns, correspondem a diferenças genéticas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). A partir disto consegue-se determinar tanto a diversidade dos indivíduos estudados quanto a divergência ou distância genética entre eles. O conhecimento de divergência genética é um processo a ser desenvolvido anteriormente a implantação de programas de melhoramento genético, pois o entendimento de divergência permite conhecer genótipos para instalação de pomares de sementes e maximizar a distância genética pela recombinação de genes ou complexos gênicos em novas combinações favoráveis (CAIXETA *et al.*, 2003).

Além disso, a capacidade de análise genômica que os marcadores moleculares possuem, aliado ao fato de não sofrerem intervenção do meio ambiente, é o que propicia a geração de importantes informações relacionadas à diversidade e frequência genética populacional (HARTL e CLARK, 1989; OUBORG *et al.*, 1999 citado por FALEIRO, 2007).

Collevatti e colaboradores (2001a), analisando o sistema reprodutivo do pequi por meio do uso de marcadores moleculares microssatélite, observaram que esses marcadores fornecem uma resolução extraordinária para discriminar eventos de cruzamento e eventos de autofecundação. Assim, tais pesquisadores relacionaram o processo de fragmentação florestal aos cruzamentos endogâmicos, favorecendo o isolamento entre populações de pequi. Ressaltou, assim, a importância do não isolamento das populações do pequi, necessário para viabilidade da espécie no bioma Cerrado, fornecendo meios para o fluxo gênico de pólen e sementes. Além disso, estas áreas desempenham um papel importante na manutenção de pequenas populações em áreas altamente perturbadas, como uma fonte de pólen e sementes, e contribuem para a viabilidade das populações de polinizadores e dispersores.

Dessa forma, considerando a importância do pequi para a população residente no Cerrado, a importância ecológica e a possibilidade do uso do fruto na produção de biocombustíveis, o objetivo do presente trabalho foi analisar um grupo de matrizes de pequi, utilizando marcadores moleculares microssatélites, com fins de melhoramento e conservação da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Para a extração do DNA genômico, foram utilizadas amostras foliares de 20 matrizes de *Caryocar brasiliense*, das quais 16 oriundas do Parque Estadual do Rio Preto (PERP) (São Gonçalo do Rio Preto – MG) e as demais oriundas da Fazenda Experimental da UFVJM – Campus Moura (Curvelo – MG) (Tabela 1).

Foram coletadas de duas a três folhas jovens por matriz, escolhidas sem danos aparentes ou sinal de doença. Em seguida foram devidamente identificadas e guardadas em sacos plásticos. Do campo, o material coletado foi conduzido para o Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal da UFVJM onde foram armazenadas em freezer a -80°C . Todos os ensaios foram realizados no mesmo laboratório.

Tais matrizes foram selecionadas porque fazem parte de um programa de melhoramento do pequizeiro, conforme Giordani e colaboradores (2012), desenvolvido na UFVJM e coordenado pelo professor José Sebastião Cunha Fernandes (Figura 1).



Figura 1: Vista geral de um dos testes de procedência e de progênies de pequizeiro conduzido pela equipe da UFVJM.

Tabela 1: Matrizes e respectivas procedências utilizadas nesse estudo.

Identificação da Matriz	Local de Origem
RP 04	Parque Estadual do Rio Preto
RP 05	Parque Estadual do Rio Preto
RP 06	Parque Estadual do Rio Preto
RP 07	Parque Estadual do Rio Preto
RP 08	Parque Estadual do Rio Preto
RP 09	Parque Estadual do Rio Preto
RP 10	Parque Estadual do Rio Preto
RP 13	Parque Estadual do Rio Preto
RP 14	Parque Estadual do Rio Preto
RP 19	Parque Estadual do Rio Preto
RP 21	Parque Estadual do Rio Preto
RP 24	Parque Estadual do Rio Preto
RP 25	Parque Estadual do Rio Preto
RP 28	Parque Estadual do Rio Preto
RP 32	Parque Estadual do Rio Preto
RP 40	Parque Estadual do Rio Preto
MO 01	Fazenda Experimental da UFVJM – Campus Moura
MO 08	Fazenda Experimental da UFVJM – Campus Moura
MO 12	Fazenda Experimental da UFVJM – Campus Moura
MO 18	Fazenda Experimental da UFVJM – Campus Moura

2.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O método CTAB (DOYLE & DOYLE, 1991) (com algumas modificações) foi usado no processo de extração, em que 250 mg de tecido foliar, anteriormente armazenado a -80°C , foi macerado em cadinhos de porcelana, na presença de nitrogênio líquido, até se obter um pó muito fino. O macerado foi transferido para tubos Eppendorf de 1,5 mL, devidamente identificados. Em cada tubo foram adicionados 700 μL de tampão de extração pré-aquecido (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris HCl 100 mM pH 8,0, PVP 1% - Polivinilpirrolidona, β -mercaptoetanol 0,1%, proteinase K 0,01%). Os tubos foram agitados em vórtex e, em seguida, colocados em banho-maria a 65°C por 30 minutos. A cada 10 minutos, os mesmos eram agitados por inversão manual.

Os tubos foram retirados do banho e acomodados em gelo até resfriarem e, em seguida, adicionaram-se 600 μL de solução contendo 24 partes de clorofórmio para 1 parte de álcool isoamílico (CIA), homogeneizados em agitador e centrifugados a 12000 rpm (Marca: Beckman Coulter Modelo: Allegra X-22R) por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente (sem impurezas ou parte orgânica), transferido para um novo tubo devidamente identificado e adicionados 50 μL de solução CTAB 10% - NaCl 0,7 M (previamente aquecido a 65°C) e 600 μL de CIA. As amostras foram homogeneizadas manualmente (com cuidado para não quebrar as moléculas de DNA) e levadas para centrífuga a 8000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente transferido para um novo tubo, em que se adicionaram 600 μL de solução CTAB para precipitação (CTAB 1%, 50 mM TrisHCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0). Os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 30 minutos e posteriormente centrifugados a 12000 rpm por 30 minutos. Descartado o sobrenadante, foram adicionados 500 μL de solução tampão TE saturado com NaCl (10 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 1 M NaCl) em cada tubo e posteriormente mantidos em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 300 μL de isopropanol aos tubos, que foram homogeneizados cuidadosamente e mantidos em freezer -20°C por, no mínimo, 30 minutos.

Após o período de precipitação, os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante foi novamente descartado. Nessa fase foi possível observar um pélete no fundo do tubo. Foram então adicionados 1000 μL de etanol 70% aos tubos, que foram submetidos a centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e repetiu-se o passo por mais duas vezes (uma vez utilizando-se álcool 70% novamente e a outra utilizando-se álcool 95%). O pélete foi seco a vácuo e ressuspenso em 50 μL de solução TE

10:0,1 (10 mM Tris HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA) com RNase 10 µg/mL, agitados manualmente até a completa dissolução do pélete. Para finalizar, os tubos foram armazenados em freezer a -20°C para posterior uso.

A quantidade e a qualidade do DNA de cada amostra foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA), em cuba horizontal, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. As bandas foram comparadas com padrões de quantidade conhecidos de DNA.

2.3 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

Para a amplificação do DNA, as reações foram preparadas com volume final de 13 µL, contendo 1 µL de DNA genômico, 8,71 µL de água ultrapura, 0,39 µL de MgCl₂, 1,3 µL de tampão 10x da enzima, 1 µL de dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0,2 µL de cada oligonucleotídeo (direto e reverso)(Tabela 2) e 0,2 µL da enzima *Taq* DNA polimerase (Ludwig).

As reações foram realizadas em termociclador (Marca: Biorad Modelo: MyCycler version 1.065), submetidas a uma desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos, cada ciclo composto por: 1 minuto a 96°C, 1 minuto a 53°C e 1 minuto a 72°C. Ao final, foi realizada uma extensão a 72°C por 7 minutos. Em seguida, a temperatura foi mantida a 4°C até a retirada das amostras.

2.4 ELETROFORESE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 10% e ureia 6 M em TBE 1x (Tris-Borato-EDTA). Antes do preparo do gel, as placas de vidro foram lavadas, secas com papel toalha e limpas com álcool comercial. Aos pares, as placas de vidro foram montadas, usando espaçador adequado. Para o preparo do gel foram utilizados 20 mL de solução de poliacrilamida 10% e ureia 6 M, 140 µL de persulfato de amônio 10% e 14 µL de TEMED. Essa solução foi homogeneizada e aplicada no gel com o auxílio de uma seringa plástica descartável. As placas contendo a solução foram mantidas em repouso na bancada por 60 minutos para a completa polimerização. Após, as placas foram colocadas na cuba vertical, onde foi adicionado tampão TBE 1x nos devidos compartimentos e foi realizada uma pré-corrída, para aquecer o gel, numa potência de 80 W durante 60 minutos.

As amostras foram denaturadas com a adição de 13 μ L de tampão de carregamento (0,5% azul de bromofenol, ureia 6 M, EDTA 0,5 M pH 8,0, Tris 1M pH 7,5) em cada tubo contendo as amostras amplificadas de DNA e aquecidas no termociclador a uma temperatura de 95°C por 5 minutos. Ao serem retiradas do termociclador, foram transferidas, imediatamente, para um recipiente com gelo e mantidas nele até a sua aplicação no gel. Foram aplicados 13 μ L da reação desnaturada em cada poço do gel. A corrida foi feita durante aproximadamente 60 minutos, numa potência de 80 W. Após a corrida, o gel foi retirado da cuba, corado com brometo de etídio em solução TBE 1x por 15 minutos e fotografado sob luz UV.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS OBTIDOS

A partir da leitura dos géis gerou-se uma matriz binária em que os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas. Com essa matriz, no ambiente estatístico R (R CORE TEAM, 2012), calcularam-se as distâncias genéticas de Jaccard, em que valores mais próximos de 0 indicam indivíduos aparentados e, valores mais próximos de 1, indicam indivíduos menos aparentados (JACARD, 1901). Com base nessa matriz de distâncias, foi produzido um dendrograma, utilizando o método UPGMA. Por fim, obteve-se a correlação cofenética entre a matriz e o dendrograma gerados. A correlação indica se existe fidelidade entre o dendrograma e a matriz que o gerou.

Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos, repetições, tamanho esperado do fragmento para a sequencia dos dados, temperatura de pareamento (TP) para o loci SSR, desenvolvido para *Caryocar brasiliense*. FONTE: Collevatti *et. al.* 1999.

Loco	Repetição	Sequência dos oligonucleotídeos	Tamanho esperado do fragmento (pb)	TP (°C)
Cb 1	(AG) ₂₇	ggTgTgAgCTTAgAgCTgAA	189	54
		gTCCAgCTTAATgTCCgACT	150-195	
Cb 3	(AG) ₂₅	CAGCCATggTTCACgTTAgT	158	56
		CgCACATggAAACgCTTA	130-175	
Cb 5	(AG) ₁₉	gTCAgAATgAAggCAGCTTg	153	56
		ATAgAATCCAaggCCACACCA	130-180	
Cb 6	(AG) ₁₉	CTACCACAACCTCggAgACAA	123	56
		gACACTCCTgCAACTCCATT	105-160	
Cb 9	(AG) ₂₁	ATCgAgATgAgCCAACCgAC	92	56
		ggAAggTgTTgCAGCACTgA	55-95	
Cb 11	(AG) ₂₈	ggTCgTTATTgCTgTggT	176	56
		gTgAACATGaGCATCggT	135-185	
Cb 12	(AG) ₂₁ (AC) ₉	gACATgTggCAATAggCggT	179	56
		TTgTgTgTgAAggTgTgTTggTT	150-210	
Cb 13	(AG) ₁₅	AgCAgTTAgATgATgAAgTg	145	54
		CTATTgCCATATgTCgTAgT	125-170	
Cb 20	(AG) ₂₂	TgACACAACCATCACATTCT	164	56
		gCAACTgTCgCAATAAACAA	140-185	
Cb 23	(AG) ₁₈	ATACCAgCTCTgACAgAA	153	56
		AAgCCTgAgAgTAgAgAA	110-185	

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO, REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR) E ELETROFORESE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

A extração do DNA genômico das folhas do pequi, com qualidade para PCR, somente foi possível com alguns ajustes no protocolo de extração. A pureza das amostras de DNA é a base para o desenvolvimento de trabalhos moleculares com qualidade. As amostras devem ser puras o suficiente para não inibir a ação das enzimas na PCR ou causar interferências nos padrões de migração em gel de eletroforese. Nos primeiros testes das extrações, a concentração de β -mercaptoetanol utilizada foi de 0,2%, conforme Laia (2001).

Os resultados obtidos com tal concentração de β -mercaptoetanol não foram satisfatórios e, a partir daí, alterou-se a concentração do componente para 0,01%. Essa última concentração proporcionou os melhores resultados para o processo de extração do material genético das folhas de pequi, obtendo-se um pélete claro (variando de branco a incolor), livre da contaminação de polifenóis, indicando assim, que a amostra de DNA obtida possuía boa qualidade.

Silva (2010), a fim de padronizar o protocolo de extração de DNA de folhas de cinco espécies do Cerrado, utilizou o protocolo sugerido por Ferreira e Grattapaglia (1996) e variou as concentrações de β -mercaptoetanol de 0% a 5%. As espécies estudadas foram: *Annona crassiflora* (araticum), *Eugenia dysenterica* (cagaiteira), *Anacardium humilis* (cajueiro), *Hancornia speciosa* (mangabeira) e *Caryocar brasiliense* (pequi). Tais espécies possuem contaminantes nos tecidos foliares que interferem no processo de isolamento do DNA. Os resultados obtidos pela autora sugeriram que altas concentrações de β -mercaptoetanol (1% a 5%) no tampão de extração permitem a obtenção de maiores quantidades de DNA de boa qualidade, uma vez que não se observa nenhuma contaminação e nem degradação do DNA obtido. Além disso, a autora observou também que o padrão de qualidade e quantidade de DNA decaiu proporcionalmente com a redução da concentração de β -mercaptoetanol no tampão de extração, sugerindo elevado efeito desse componente sobre a qualidade de extração de DNA de tecidos foliares de espécies nativas do Cerrado.

Em um estudo com maracujazeiros (*Passiflora* spp.), Molinari & Crochemore (2001) avaliaram a quantidade e a qualidade de DNA das folhas de variedades dessa espécie, utilizando-se de três métodos de extração. Folhas de diversas espécies de *Passiflora* possuem níveis variados de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários, podendo comprometer a PCR. Em

um dos métodos de extração, muito semelhante ao método do presente trabalho, foi utilizado 0,2% de β -mercaptoetanol. Os três métodos de extração do material genético forneceram um DNA de qualidade e quantidade suficientes para a realização da PCR.

Além disso, adicionou-se ao protocolo o uso da proteinase K 0,01%, com o intuito de degradar vários tipos de proteínas impuras que prejudicam o processo de extração e facilitar a separação do DNA das proteínas de cromatina. Dessa forma, obteve-se um pélete de coloração branca, livre da contaminação com polifenóis, indicando amostras de boa qualidade e com boa quantidade de DNA. Mazza e colaboradores (2000), com o objetivo de obter um protocolo de extração de DNA para *Araucaria angustifolia*, modificaram o método CTAB, adicionando proteinase K ao protocolo. Os autores utilizaram as mesmas concentrações de β -mercaptoetanol e proteinase K do presente trabalho. Porém, o material foi liofilizado ao invés de macerado com nitrogênio líquido. Dessa forma, obtiveram um DNA incolor e livre de substâncias viscosas. O resultado do trabalho foi a obtenção de um DNA de boa qualidade, subsidiando estudos moleculares mais profundos sobre a espécie.

Assim, os polissacarídeos e os compostos fenólicos são os principais problemas encontrados no processo de extração do DNA das plantas. A contaminação de polissacarídeos depende da espécie, tecido e condições fisiológicas da planta. Certas espécies possuem um DNA muito contaminado por polissacarídeos, tomando difícil a obtenção do pélete. Dessa forma, a modificação dos protocolos faz-se necessária de modo a aperfeiçoar o processo de obtenção do material genético, fazendo com que as amostras de DNA obtidas sejam o mais pura possível, de modo a não danificar o DNA e não prejudicar a ação das enzimas na amplificação do mesmo.

O método do CTAB para a extração do DNA tem sido amplamente utilizado para a extração de DNA a partir de diversas partes da planta. Tal método, porém, possui altos indicativos de contaminação com polissacarídeos que podem inibir a PCR. A amplificação ineficiente pode ser resultante de uma baixa quantidade de DNA ou devido à presença de inibidores, que reduzem a eficiência da PCR e contribuem para resultados imprecisos. A presença de polissacarídeos nas plantas tem sido relatada como um dos principais inibidores nas amostras de DNA. Os compostos fenólicos também são considerados inibidores potenciais das reações de amplificação (DEMEKE, 2009).

A qualidade das amostras de DNA foi testada por Stefenon *et al* (2003), em que os pesquisadores tiveram como objetivo adaptar um protocolo para a extração do DNA de *Araucaria angustifolia*. Oito protocolos foram testados e eles mostraram que o principal metabólito contaminante das amostras de DNA de *A. angustifolia* são os compostos fenólicos,

as proteínas e os polissacarídeos. Nos protocolos em que não se usou PVP foram obtidas amostras escuras, indicando contaminação por fenol, podendo ser evitado também com a presença de β -mercaptoetanol no tampão de extração. Além disso, na ausência da proteinase K, o DNA indicou grande contaminação por proteínas.

Sá & Baptista (2011) utilizaram o método do CTAB para a extração do DNA de *Arbutus unedo* e não obtiveram sucesso na amplificação do DNA. Isto ocorreu, provavelmente, devido às características específicas da planta, como a presença de polifenóis, taninos, polissacarídeos, proteínas e outros metabolitos secundários, que conduzirão a incorporação de DNA numa matriz gelatinosa ou promover a degradação do mesmo. A partir daí, testaram três variações do mesmo protocolo, a fim de avaliar a qualidade do processo de amplificação dos fragmentos de DNA obtidos. Nestes novos protocolos otimizados (A, B e C), a composição do tampão de extração foi modificada através da utilização de PVP e 2-mercaptoetanol (método A), seguida por um aumento nas concentrações do CTAB (método B) e do cloreto de sódio (método C). Para excluir as impurezas proteicas, os autores testaram uma extração com fenol-clorofórmio (método B), seguido por uma extração com clorofórmio adicional (método C). O procedimento otimizado permitiu grande melhoria sobre o rendimento e a pureza do DNA. A completa remoção dos polissacarídeos durante o isolamento do DNA teve uma importância crítica, devido aos seus problemas de interferência bem estabelecidos, falhas nas amplificações de DNA durante PCR devido à inibição da atividade da *Taq* DNA polimerase.

Em estudo com uma espécie do Cerrado, Souza e colaboradores (2012) apresentaram resultados de extração de DNA de *Dimorphandra mollis* (barba timão falso), a fim de relatar problemas com contaminação de polissacarídeo. O protocolo do CTAB foi utilizado, porém não se obteve resultados satisfatórios. Então foram testados outros quatro protocolos diferentes, até se obter sucesso.

Além disso, houve necessidade de se ajustar e otimizar os parâmetros da reação de amplificação, uma vez que os parâmetros descritos por Collevatti e colaboradores (1999) não foram adequados. Variaram-se, principalmente, a concentração de $MgCl_2$ e a temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos. Em *Hordeum vulgare* L., diversos parâmetros da reação de polimerização também tiveram que ser padronizados a fim de se obter amplificações adequadas (AHMED *et al.*, 2009). Ainda, segundo Roux (2009), os parâmetros mais críticos de uma PCR são a concentração de Mg^{+2} e a temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos.

Por fim, o último passo antes de submeter as amostras as análises finais é padronizar o método de separação dos fragmentos amplificados. O primeiro a ser testado é a separação em gel de agarose, devido a facilidade no preparo, baixo custo e de já se ter sido utilizado para a

separação de fragmentos microssatélites com sucesso (ESCANDÓN *et al.*, 2005; FALEIRO *et al.*, 2003; RABEL *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2012).

Mesmo utilizando altas concentrações de agarose (3,5%), não foi possível obter sucesso. Assim, optou-se por utilizar géis de poliacrilamida não desnaturante, tal qual utilizaram Mengpei e colaboradores (2011), Gomez e colaboradores (2008), Rabel e colaboradores (2010) e Ahmed e colaboradores (2009). Ao final, buscou-se separar os fragmentos microssatélites em géis de poliacrilamida desnaturante, tal qual o fizeram Martins e colaboradores (2006), que utilizaram a concentração de 4%, e Amorim e colaboradores (2008), que obtiveram sucesso com géis a 6%.

O protocolo de extração, as condições de reação de amplificação e a concentração ideal do gel de separação dos fragmentos de DNA microssatélites ideais para esse estudo são aqueles apresentados na seção de Materiais e Métodos.

As figuras 2 e 3 mostram, respectivamente, o padrão de concentração e qualidade do DNA extraído, após a otimização do protocolo de extração, e os padrões de amplificação e resolução dos fragmentos amplificados após separação eletroforética.

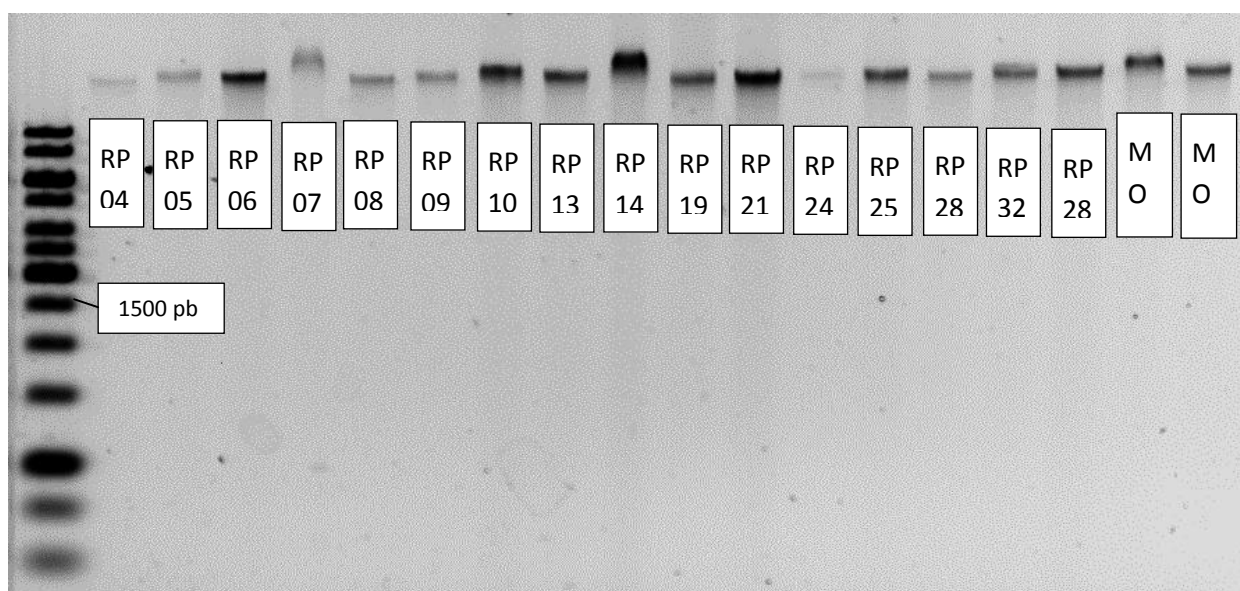


Figura 2: DNA total de 18 matrizes de pequiheiro em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. A intensidade das bandas está diretamente ligada à quantidade de DNA presente no gel.

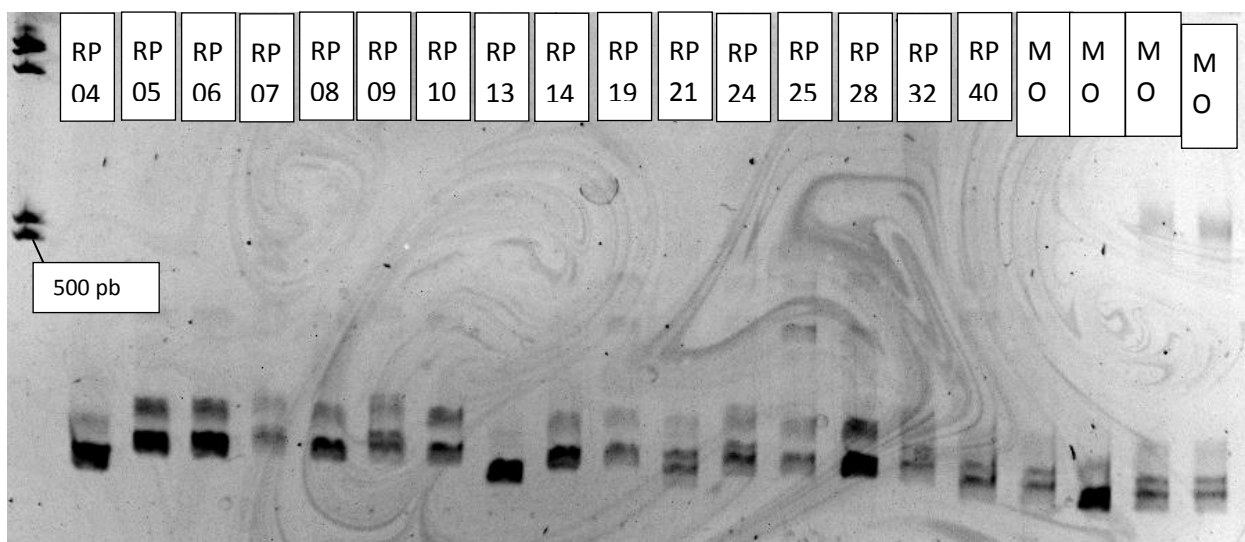


Figura 3: Resultado da PCR usando o oligonucleotídeo Cb 23 em gel de poliacrilamida 10%, corado com brometo de etídio. Presença de bandas polimórficas.

3.2 ANÁLISES DOS DADOS

Do total de 10 oligonucleotídeos utilizados, 4 deles apresentaram falhas na amplificação de alguns indivíduos. Contudo, todos os oligonucleotídeos apresentaram bandas polimórficas nos seus resultados. Alves (2002) estudando diversidade genética de espécies de cupuaçu obteve 37,5% das amostras sem amplificar fragmento de DNA e 43,8% apresentaram perfis polimórficos. Souza (2002) trabalhando com genótipos distintos de banana, também encontrou oligonucleotídeos que não amplificaram em alguns genótipos. De acordo com a autora, a ausência de amplificação pode refletir divergências nas sequências que flanqueiam os microssatélites, produzindo alelos nulos. Para ela, tais alelos podem ser detectados após várias repetições do experimento, para garantir que não ocorreram falhas na reação.

No total, foram obtidos 72 alelos para os 10 oligonucleotídeos analisados, o equivalente a 7,2 alelos por loco. Três oligonucleotídeos se destacaram quanto ao número de alelos obtidos, 10 alelos em média. O restante apresentou 5 alelos, em média (Tabela 3). Zucchi (2002) obteve, em média, 10,4 alelos polimórficos em seu trabalho com cagaita, usando marcadores microssatélites. Dentre os oligonucleotídeos analisados no trabalho de Alves (2002), aqueles com maior número de alelos amplificados foi 10 e o menor número foi 2. Souza (2002), em que a espécie analisada

foi a *Musa* spp.o número máximo de alelos encontrados foi 8 e o mínimo foi 2. Assim, os dados aqui encontrados estão de acordo com a literatura.

Em estudo da estrutura genética com marcadores microssatélites, para árvores de pequi, Collevatti *et. al.*(2001b) obtiveram resultados semelhantes, em que os 10 marcadores microssatélites apresentaram níveis de polimorfismo entre as populações, com o Cb 5 menos variável e o Cb 23 o mais variável.

Para o oligonucleotídeo Cb 1, a matriz RP 13 não amplificou nenhum fragmento de DNA, enquanto as demais amplificaram, gerando bandas 14 polimórficas. Uma banda desse oligonucleotídeo, porém, não serviu para discriminar os indivíduos por se tratar de uma banda comum em todos (monomórfica).

Tabela 3: Tamanho e número de alelos para cada oligonucleotídeo microssatélite.

Oligonucleotídeo	Varição dos Alelos (pb)	Número de Alelos
Cb 1	150-195	15
Cb 3	130-175	7
Cb 5	130-180	2
Cb 6	105-160	10
Cb 9	55-95	5
Cb 11	135-185	5
Cb 12	150-210	5
Cb 13	125-170	4
Cb 20	140-185	13
Cb 23	110-185	5

Todas as matrizes amplificaram seus fragmentos de DNA, quando analisadas com o oligonucleotídeo Cb 3. Esse oligonucleotídeo gerou 3 bandas polimórficas e 4 bandas monomórficas. Já o oligonucleotídeo Cb 5 foi aquele com menor valor de bandas geradas, apenas 2 bandas polimórficas.

Para o oligonucleotídeo seguinte, Cb 6, foram obtidas 3 bandas monomórficas, de um total de 10 bandas geradas. Esse oligonucleotídeo apresentou alto grau de polimorfismo, juntamente com o Cb 1.

O Cb 9, o Cb 11 e o Cb 12 geraram 5 bandas polimórficas. Entre esses oligonucleotídeos houve muitas matrizes que não amplificaram nenhum fragmento de DNA. Por exemplo, no Cb 11, 12 matrizes não amplificaram: RP 06, RP 07, RP 10, RP 13, RP 25, RP 28, RP 32, RP 40, MO 01, MO 08, MO 12 e MO 18. No Cb 12, por sua vez, 6 matrizes falharam. O Cb 13, também com um número baixo de bandas, gerou apenas 4 polimórficas e a matriz RP 32 não amplificou nenhum fragmento de DNA.

Zucchi (2002), em seu trabalho com cagaita, obteve 67,2% de oligonucleotídeos que não amplificaram nenhuma banda. Souza (2002), trabalhando com genótipos de bananeira, também obteve casos de ausência de amplificação, em que dos 11 oligonucleotídeos testados, 3 pares não apresentaram amplificação em alguns indivíduos. Nesse caso, a autora modificou os valores da temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos e fez um ajuste na concentração de $MgCl_2$, a fim de sanar os casos de não amplificação, bem como foi feito no presente estudo.

Do oligonucleotídeo Cb 20 obtiveram-se 13 bandas: 1 banda monomórfica e 12 polimórficas. Junto com o Cb 3 e o Cb 6, esses foram os oligonucleotídeos com maior número de bandas polimórficas obtidas. Já o Cb 23 apresentou 5 bandas polimórficas. Em ambos, todas as matrizes amplificaram os seus fragmentos de DNA. Isso indica que os oligonucleotídeos que falharam para algumas matrizes, podem ter falhado devido a mutações genéticas no sítio de pareamento daqueles oligonucleotídeos, eliminando possíveis erros de amplificação.

As distâncias genéticas de Jaccard obtidas variaram de 0,15 a 0,70, em que valores mais próximos de 0 indicam indivíduos mais aparentados e valores mais próximos de 1 indicam indivíduos menos aparentados.

Comparando somente as matrizes do Parque Estadual do Rio Preto (PERP), observaram-se valores entre 0,15 e 0,68. Isso indica que existem matrizes com alto grau de parentesco e outras mais divergentes entre si. Embora *C. brasiliense* seja polinizado por morcegos, que

podem potencialmente voar longas distâncias e promover o fluxo de pólen de longa distância, a população estudada pode apresentar altas taxas de autofecundação (Collevatti *et al.* 2010). A distância de uma árvore para a outra pode ser uma causa para tal semelhança, indicando a ocorrência de autofecundação ou cruzamento entre indivíduos muito próximos. Já as matrizes do Campus Experimental Moura são mais aparentadas do que as do PERP, pois as distâncias genéticas entre elas variaram de 0,18 a 0,49, indicando um maior grau de parentesco neste grupo.

Quando se comparou os dois locais, verifica-se que a menor distância genética é de 0,23 (MO 01 e RP 40) e a maior está entre as matrizes RP 19 e RP 13, ambas comparadas com a matriz MO 18, apresentaram distância genética igual a 0,70, o mais alto grau de diferença entre todas as matrizes (Tabela 4).

O dendrograma gerado a partir da matriz de distâncias genéticas permite verificar que as matrizes divididas em 4 grupos distintos, em que as matrizes RP 04 e RP 13 se distanciaram das demais, enquanto as outras matrizes formaram outros 2 grupos. As matrizes RP 19 e RP 25, que apresentaram menor valor de distância genética, foram representadas no dendrograma no mesmo grupo, uma ao lado da outra. Tal fato concorda com o resultado da matriz de distância genética, indicando que essas duas matrizes são mesmo bastante semelhantes.

Analisando de uma maneira mais específica, pode-se inferir que o mesmo dendrograma dividiu as matrizes em sete subgrupos distintos; em que as matrizes RP 04, RP 14 e RP 13 formaram três subgrupos cada. Os demais subgrupos se dividiram da seguinte maneira: um deles formado pelas matrizes RP 05, RP 28 e MO 18; outro formado pelas matrizes RP 06, RP 40, RP 08, MO 01, MO 12, RP 24 e MO 09; mais um formado pelas matrizes RP 07, RP 19 e RP 25 e o último formado pelas matrizes RP 09, RP 10, RP 21 e RP 32.

A matriz RP 04, quando comparada com as matrizes RP 09, RP 19 e RP 21, possui os maiores valores de distância genética, também concordando com o resultado do dendrograma. O maior valor de distância genética 0,70, apresentado pelas matrizes RP13 e RP 19 quando comparadas a matriz MO 18. Mais uma vez, os dados da matriz de distância genética concordam com os dados do dendrograma, alocando cada uma dessas três matrizes em grupos diferentes (Figura 5). A figura 6 apresenta a correlação cofenética entre a matriz e o dendrograma. O valor da correlação foi de 0,79, indicando grande fidelidade do dendrograma em relação a matriz que o gerou.

Tabela 4: Matriz de distância genética. Valores mais próximos de zero indicam alto grau de parentesco, enquanto valores mais próximos de um indicam alto grau de diferença genética.

	RP04	RP05	RP06	RP07	RP08	RP09	RP10	RP13	RP14	RP19	RP21	RP24	RP25	RP28	RP32	RP40	MO01	MO09	MO12	MO18
RP04	0,00																			
RP05	0,43	0,00																		
RP06	0,48	0,28	0,00																	
RP07	0,46	0,38	0,37	0,00																
RP08	0,53	0,42	0,26	0,32	0,00															
RP09	0,60	0,51	0,46	0,33	0,29	0,00														
RP10	0,61	0,49	0,47	0,40	0,43	0,18	0,00													
RP13	0,56	0,59	0,52	0,55	0,59	0,57	0,54	0,00												
RP14	0,55	0,51	0,43	0,45	0,49	0,51	0,55	0,53	0,00											
RP19	0,65	0,55	0,50	0,29	0,44	0,25	0,28	0,52	0,58	0,00										
RP21	0,63	0,51	0,40	0,38	0,47	0,29	0,32	0,41	0,38	0,35	0,00									
RP24	0,58	0,45	0,36	0,33	0,29	0,41	0,52	0,68	0,39	0,52	0,47	0,00								
RP25	0,56	0,44	0,42	0,29	0,51	0,33	0,35	0,48	0,54	0,15	0,24	0,52	0,00							
RP28	0,50	0,18	0,31	0,46	0,49	0,56	0,58	0,54	0,37	0,56	0,43	0,44	0,44	0,00						
RP32	0,50	0,41	0,42	0,40	0,43	0,33	0,35	0,56	0,59	0,41	0,30	0,48	0,32	0,50	0,00					
RP40	0,50	0,26	0,24	0,35	0,29	0,49	0,50	0,50	0,45	0,56	0,47	0,39	0,49	0,33	0,45	0,00				
MO01	0,48	0,36	0,25	0,41	0,29	0,50	0,52	0,55	0,39	0,58	0,49	0,35	0,50	0,40	0,47	0,23	0,00			
MO09	0,53	0,50	0,37	0,51	0,42	0,57	0,59	0,55	0,52	0,64	0,56	0,53	0,57	0,55	0,55	0,35	0,26	0,00		
MO12	0,55	0,44	0,34	0,45	0,34	0,54	0,56	0,66	0,43	0,62	0,57	0,35	0,58	0,49	0,52	0,32	0,18	0,36	0,00	
MO18	0,52	0,33	0,43	0,56	0,44	0,62	0,63	0,70	0,56	0,70	0,64	0,51	0,64	0,38	0,56	0,33	0,38	0,49	0,30	0,00

Salla *et al* (2002) utilizaram marcadores SSR em um estudo de variabilidade genética em 24 genótipos de acerola (*Malpighia emarginata*). Do total de 73 marcadores analisados, 49 foram polimórficos (68%). Esses marcadores foram utilizados para construir a matriz de diversidade. O agrupamento gerado a partir dos marcadores SSR mostrou a formação de quatro grupos distintos. Concluíram, então, que a similaridade gerada pelos marcadores SSR sugere uma maior correlação com os caracteres morfológicos. Além disso, concluíram que os resultados obtidos a partir de marcadores de DNA podem auxiliar na definição de estratégias para programas de melhoramento.

No seu trabalho com cagaita, Zucchi e colaboradores (2005) obtiveram resultados da matriz genética de Jaccard variando de 0,45 a 0,653. Tais pesquisadores também encontraram alto polimorfismo em alguns dos seus oligonucleotídeos e sua matriz de correlação teve valor igual a 0,9. Tais autores concluíram que suas matrizes possuíam alto valor de diversidade genética. Moura e colaboradores (2009) analisaram a diversidade e a estrutura genética de populações de *Solanum spp.* do Cerrado e também encontraram grande diversidade entre as populações estudadas.

Kageyama e colaboradores (2003), analisando a diversidade genética em espécies arbóreas tropicais por meio de marcadores genéticos, detectaram presença de cruzamentos entre indivíduos aparentados, sugerindo a existência de estruturas dentro das populações. Para *C. fissilis*, a espécie analisada por marcadores SSR, o valor de divergência genética foi alto. Ainda nesse estudo, os pesquisadores concluíram que os marcadores izoenzimáticos são menos informativos do que os marcadores microssatélites.

Amorim e colaboradores (2008), analisando genótipos de banana, encontraram um valor de correlação igual a 0,61. Tal valor foi considerado alto e adequado pelos autores, o que valida ainda mais o valor da correlação encontrada no presente trabalho. Além disso, tais autores encontraram alto valor de distância genética entre os genótipos.

Figura 5: Dendrograma produzido com base na matriz de distâncias genéticas de Jaccard, de 20 matrizes de *Caryocar brasiliense* (pequizeiro), utilizando o método UPGMA. O dendrograma permite verificar que as matrizes foram divididas em 4 grupos distintos.

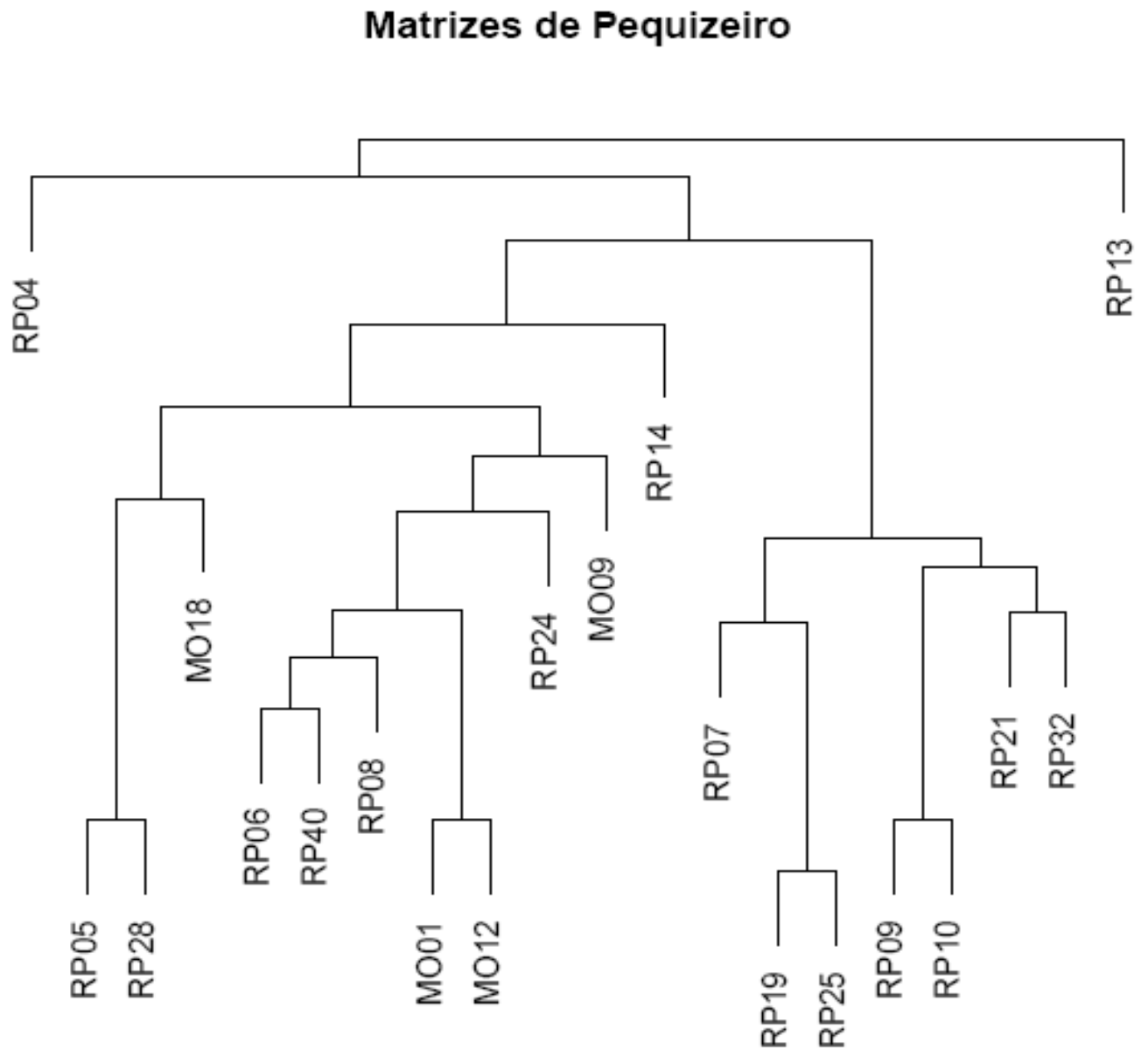
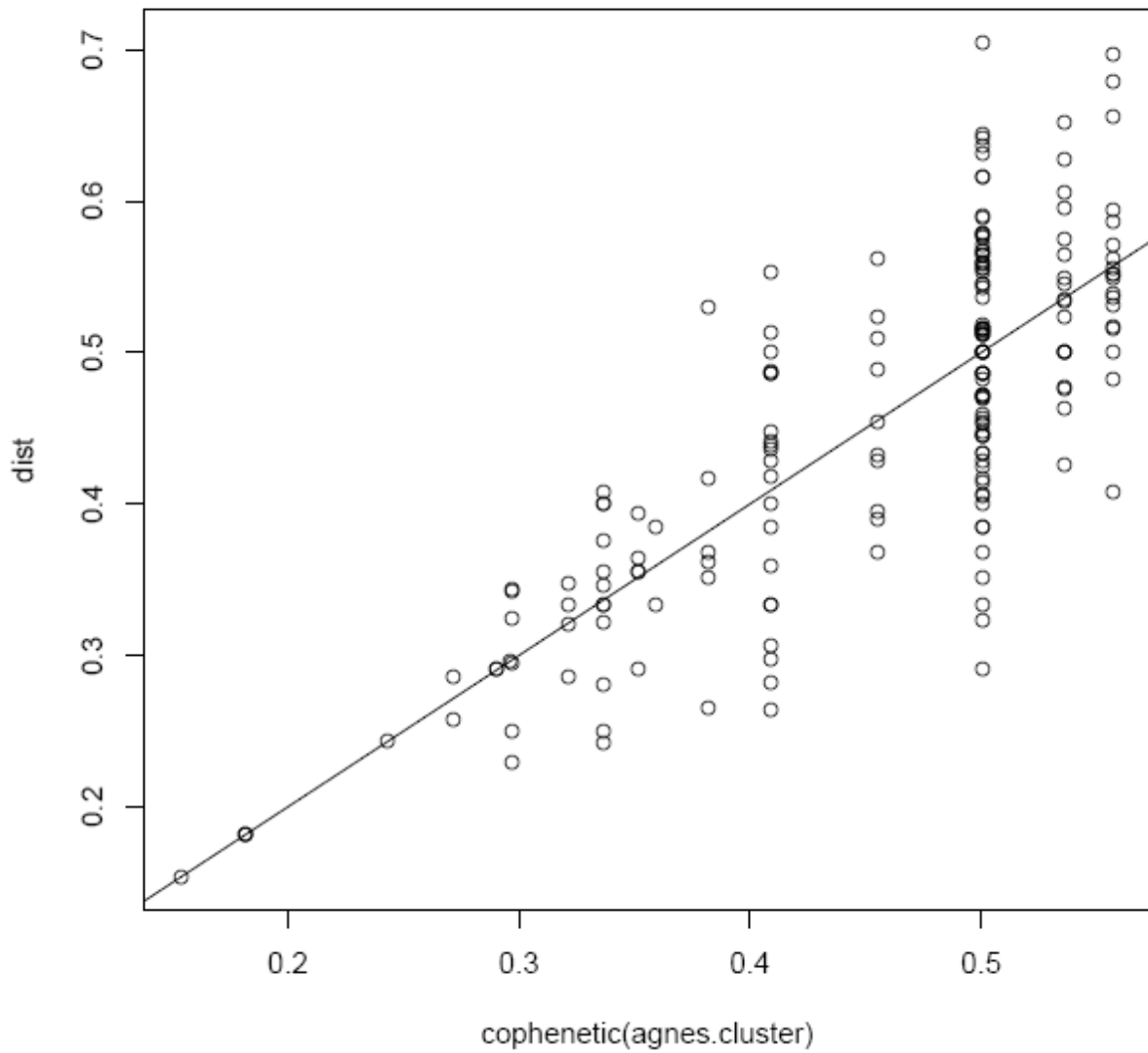


Figura 6: Correlação cofenética entre a matriz de distâncias genéticas de Jaccard e o dendrograma. O valor da correlação indica se existe fidelidade entre o dendrograma e a matriz que o gerou. O valor da correlação foi de 0,79, indicando grande fidelidade.



4 CONCLUSÃO

- As matrizes do Campus Experimental Moura são mais aparentadas entre si do que as do PERP;
- As matrizes RP 19 e RP 25 são as mais aparentadas;
- As matrizes RP 13 e RP 19 são as mais divergentes da matriz MO 18;
- O grupo de matrizes estudadas possui alta variabilidade genética.
- Os dados obtidos podem ser utilizados em programas de melhoramento do pequizeiro para o estabelecimento e avaliação de testes de progênies com a finalidade de produção e conservação.

REFERÊNCIAS

AHMED, I.; ISLAM, M.; MANNAN, A.; NAEEM, R.; MIRZA, B. Optimization of conditions for assessment of genetic diversity in Harley (*Hordeum vulgare* L.) using microsatellite markers. **Barley Genetics Newsletter** 39: 5-12. 2009.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. Cerrado – espécies vegetais úteis. Embrapa. Planaltina, DF. 1998.

ALVES, R. M. Caracterização genética de populações de cupuazeiro, *Theobroma grandiflorum* (Wild. Ex. Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos. **Tese de Doutorado em Agronomia**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP. 2002.

ALZATE-MARIM, L.A; CERVIGIN, L. D. G; MOREIRA, A. M; BARROS, G. E. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com ênfase em Feijoeiro e Soja. **Revista Fitopatologia Brasileira**. Brasília-DF, v.30, n. 4, 2005.

AMORIM, E. P.; REIS, R. V.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, V. B. O.; SILVA, S. O. Variabilidade genética estimada entre diploides de banana por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 43, n. 8, p. 1045-1052. 2008.

ÂNGELO, H.; POMPAMAYER, M. C. V.; ALMEIDA, A. N.; MOREIRA, J. M. M. A. P. e SOUZA, A. N. Valoração econômica do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) no Cerrado brasileiro. **ScientiaForestalis**. Piracicaba, SP. v. 40, n. 93, p. 35-45, março. 2012.

ANTUNES, E. C.; ZUPPA NETO, T. O.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; CASTRO, S; S. Utilização do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) como espécies recuperadora de ambientes degradados no Cerrado e fornecedora de matéria prima para a produção de biodiesel. In: **Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**. Brasília, DF. 2006.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa, UFV, 2001. 81 p, 385 p.

BORGES, K. A.; BATISTA, A. C. F.; RODRIGUES, H. S.; TERRONES, M. H.; VIEIRA, A. T.; OLIVEIRA, M. F. Production of methyl and ethyl biodiesel fuel from pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb). **Chemistry and Technology of Fuels and Oils**. v. 48, n. 2. 2012.

BRAMMER, P. S. Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal. **EMBRAPA**, 2000.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. [S.l.], 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>.

BERED, F; BARBOSA NETO, B. F. J; CARVALHO, F. I. C. Marcadores Moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Revista Ciência Rural**. Santa Maria, v.27, n.3, 1997.

BUSO, C. S.G; CIAMPI, Y.A; MORETZSOHN, C.N; AMARAL, S P. Z; BRANDONI, V. R. Marcadores moleculares em Espécies vegetais **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. n. 30, Jan/ jun, 2003.

CARRER, H; BARBOSA, L.A; RAMIRO, A. D. **Biotecnologia na Agricultura**. Estudos Avançados. v.70, p. 149-164, set/dez. 2010.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Embrapa Florestas. Colombo, PR. v. 3. 2008.

CAIXETA, R. P.; CARVALHO, D; ROSADO, S. C. S; TRUGILHO, P. F. Variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. detectadas por meio de marcadores moleculares. **Revista Árvore**. Viçosa, v.27, n.3, p.357-363, 2003.

COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**. n 83, p. 748-756. 1999.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**. n 86, p. 60-67. 2001. (a)

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Population structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**. n 10, p. 349-356. 2001. (b)

COLLEVATTI, R. G.; ESTOLANO, R.; GARCIA, S. F.; HAY, J.D. Short distance pollen dispersal and high self pollination in a bat pollinated neotropical tree. **Tree Genetics & Genomes** 6: 555-564. 2010.

DEMEKE, T.; JENKINS, G. R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Anal Bioanal Chem.** n. 396, p. 1997-1990. 2009.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus.** n 1, p. 13-15, 1991.

ESCANDON, A. S.; TORRE, M. P.; ACEVEDO, A.; MARCUCCI-POLTRI, S.; MIYAJIMA, I. Anchored ISSR as molecular marker to characterize accessions of *Jacaranda mimosifolia* L. Don. Proceedings of the Vth International Symposium on New Floricultural Crops. **Acta Horticulturae.** Issue: 683. P. 121-127. 2005.

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotropica** 15. P. 41-46. 2003.

FALEIRO, F. G. **Marcadores Genético-Moleculares aplicados a programas de uso e conservação dos recursos genéticos.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Cerrados. Platina, DF. 2007.

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

GIORDANI, S. C. O.; FERNANDES, J. S. C.; TITON, M.; SANTANA, R. C. Parâmetros genéticos para caracteres de crescimento em pequizeiro em estágio precoce. **Revista Ciência Agronômica.** v. 43, n. 1, p. 146-153, jan-mar. Fortaleza, CE. 2012.

GOMEZ, S. M.; DENWAR, N. N.; RAMASUBRAMANIAN, T.; SIMPSON, C. E.; BUROW, G.; BURKE, J. J.; PUPPALA, N.; BUROW, M. D. Identification of peanut hybrids using microsatellite markers and horizontal polyacrylamide gel electrophoresis. **Peanut Science** **35**. p. 123-129. 2008.

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In BORÉM, A. **Biotecnologia Florestal**. Viçosa:UFV. 2007.p 172-200.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura", **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles** **37**: 547–579. 1901.

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

LAIA, M. L. Clonagem e caracterização de análogos de genes de resistência e desenvolvimento de um marcador scar ligado ao gene *Ppr1* em *Eucalyptus grandis*. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 2001.

MACEDO, A. L.; SANTOS, R. S.; PANTOJA, L.; SANTOS, A. S. Pequi cake composition, hydrolysis and fermentation to bioethanol. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. v. 28, n. 1, p. 9-15. Diamantina-MG. 2011.

MARTINS, K.; CHAVES, L. J.; BUSO, G. S. C.; KAGEYAMA, P. Y. Mating system and fine scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics** **7**. P. 957-969. 2006.

MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J. V. M. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisa Florestal**. n. 41, p. 12-17. jul/dez. Colombo, PR. 2000.

MELO JÚNIOR, A. F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J. S. R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Florestalis**, n. 66, p. 56-65, dez. 2004.

MELO, B ; MORAIS, P. T. Biologia molecular aplicada ao melhoramento genético do cafeeiro. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.5, p 753-760, maio, 2011.

MENGPEI, L.; DALI, F.; JIANMIN, F.; MIN, T. A new DNA band display technology of microsatellite DNA. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, p. 19276-19279. 2001.

MILACH, S. C. K. **Marcadores de DNA**. Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. Ano 01, n.05, p. 14 - 17, Mar- Abr. 1998.

MOLINARI, H. B.; CROCHEMORE, M. L. Extração de DNA genômico de *Passiflora* spp. Para análises PCR-RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 23, n. 2, p. 447-450. Jaboticabal, SP. 2001.

MOURA, T. M.; SEBBENN, A. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; OLIVEIRA, G. C. X.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética e espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. **Sci. Forestalis**. v. 37, n. 82, p. 143-150. 2009.

OLIVEIRA, M. E. B.; GUERRA, N. B.; BARROS, L. M.; ALVES, R. E. Aspectos agronômicos e de qualidade do pequi. *Embrapa Agroindústria Tropical*. n. 113, p. 32. Fortaleza, CE. 2008.

OKSANEN, J.; BLANCHET, G. F.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; GAVIN, L.; SIMPSON, P. S.; SOLYMOS, P.; STEVENS, H. H.; WAGNER, H. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-5. 2012.

PIANOSVISK, A. R.; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. S.; LIMA, C. G.; SILVA, K. K.; CARVALHO, C. R. M.; MACHADO, S. R.; FERRARI, M. Uso do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V. 44, n. 2. 2008.

PINHEIRO, L. R.; RABBANI, A. R. C.; SILVA, A. V. C.; LÉDO, A. S.; PEREIRA, K. L. G.; DINIZ, L. E. C. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya alabiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. **Plant Syst. Evol.** 2012.

R Core Team, 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

RABEL, M.; VIEIRA, E. S. N.; LANA, U. G. P.; PAIVA, E.; SEHNEM, M. A. S.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares microssatélites na avaliação de sementes de soja com variação na coloração do hilo. **Revista Brasileira de Sementes**. V. 32, n. 2, p. 19-25. 2010.

RIBEIRO, H. B.; RIBEIRO, R. C. F.; XAVIER, A. A.; CAMPOS, V. P.; DIAS-ARIEIRA, C. R.; MIZOBUSTSI, E. H. Resíduos de frutos de pequi no controle do nematoide das galhas em tomateiro. **Horticultura Brasileira**. v. 30, n. 3. 2012.

ROUX, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. **Cold Spring Harbor Protocols**. v. 4. 2009.

SÁ, O.; PEREIRA, J. A.; BAPTISTA, P. Optimization of DNA extraction for RAPD and ISSR analysis of *Arbutus unedo* L. Leaves. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 12, p. 4156-4164. 2011.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; PIPOLO, V. C. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata*). **Revista Brasileira de Fruticultura**. V. 24, n. 1, p. 15-22. Jaboticabal, SP. 2002.

SILVA, M. N. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do Cerrado. **Revista Árvore**. v. 34, n. 6, p. 973-978. Viçosa, MG. 2010.

SILVA, F. H. L. Populações, matrizes e idade da planta na expressão de variáveis físicas, químicas e físico-químicas em frutos do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Dissertação de mestrado em Produção Vegetal**. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, MG. 2011.

SOUZA, S. A. C. Avaliação da variabilidade genética em *Musa* spp. Utilizando marcadores microssatélites. **Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP. 2002.

SOUZA, H. A. V.; MULLER, L. A. C.; BRANDÃO, R. L.; LOVATO, M. B. Isolation of high quality and polysaccharide free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. **Genetics and Molecular Research**. Universidade Federal de Minas Gerais. v. 11. Belo Horizonte, MG. 2012.

STEFENON, V. M.; NODARI, R. M.; GUERRA, M. P. Genética e conservação de *Araucaria angustifolia*: III. Protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPD para análise da diversidade genética em populações naturais. **Biotemas**. N. 17, p. 47-63. 2004.

ZUCCHI, M. I. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. **Tese de Doutorado em Agronomia**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP. 2002.

ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; COUTO, M. A.; MORAIS, L. K.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 40, n. 10, p. 975-980. Brasília, DF. 2005.