

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 151

Marcadores AFLP no Estudo da Variabilidade Genética de Populações de Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)

Rodrigo Cezar Franzon
Caroline Marques Castro
Maria do Carmo Bassols Raseira

Pelotas, RS
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado
Endereço: BR 392 Km 78
Caixa Postal 403, CEP 96001-970 - Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8199
Fax: (53) 3275-8219 - 3275-8221
Home page: www.cpact.embrapa.br
E-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade
Presidente: Ariano Martins de Magalhães Júnior
Secretária-Executiva: Joseane Mary Lopes Garcia
Membros: Márcia Vizzotto, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio
Suíta de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Christiane Rodrigues Congro Bertoldi,
Regina das Graças Vasconcelos dos Santos.
Suplentes: Isabel Helena Vernetti Azambuja, Beatriz Marti Emygdio

Supervisão editorial: Antônio Luiz Oliveira Heberlê
Revisão de texto: Bárbara Chevallier Cosenza
Normalização bibliográfica: Fábio Lima Cordeiro
Editoração eletrônica e capa: Juliane Nachtigall

1a edição
1a impressão (2011): 100 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação
dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Franzon, Rodrigo Cezar

Marcadores AFLP no estudo da variabilidade genética de populações de
pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) / Rodrigo Cezar Franzon, Caroline Marques Castro e
Maria do Carmo Bassols Raseira. – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2011.

50 p. – (Embrapa Clima Temperado. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 151).

ISSN 1678-2518

Pitanga – *Eugenia uniflora* – Myrtaceae – Biologia reprodutiva – Similaridade
genética. I. Castro, Caroline Marques. II. Raseira, Maria do Carmo Bassols. III. Título.
IV. Série.

CDD 634. 42

© Embrapa

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	15
Resultados e Discussão	22
Conclusão	39
Referências	40

Marcadores AFLP no Estudo da Variabilidade Genética de Populações de Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)

Rodrigo Cezar Franzon

Caroline Marques Castro

Maria do Carmo Bassols Raseira

Resumo

Foram utilizados marcadores AFLP para a avaliação de populações de plantas de pitangueira (*Eugenia uniflora*) oriundas de autopolinização e de polinização livre, com o objetivo de verificar a variabilidade existente entre e dentro dessas populações, visando fornecer mais informações que ajudem no entendimento do modo de reprodução dessa espécie. O material vegetal utilizado foi oriundo de duas seleções de pitangueira ("Pit 15" e "Pit 52"), mantidas na Embrapa Clima Temperado. De cada seleção, foram obtidas duas populações F1, por meio de autopolinização e de polinização livre, totalizando quatro populações. Foram analisados 18 indivíduos de cada população e as duas plantas-mãe, totalizando 74 indivíduos. Foram utilizadas três combinações de primers AFLP e calculada a similaridade genética entre plantas pelo coeficiente de Jaccard. Uma estimativa da variabilidade genética entre e dentro das populações

¹Engenheiro-agrônomo, D.Sc., pesquisadores da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, rodrigo.franzon@cpact.embrapa.br; ²caroline.castro@cpact.embrapa.br; maria.bassols@cpact.embrapa.br

foi estimada pela AMOVA. As três combinações de primers AFLP utilizadas amplificaram um total de 178 locos AFLP, dos quais 114 (64,0%) foram polimórficos entre todos os indivíduos. Não houve separação clara entre populações descendentes da mesma planta-mãe. Foi observado maior polimorfismo de marcadores AFLP em populações de polinização livre. A proporção da variabilidade genética total entre populações foi significativa, embora tenha sido menor do que aquela observada dentro das populações. A reprodução da pitangueira é decorrente tanto da autofertilização quanto da polinização cruzada, sendo necessário, no entanto, novos estudos para determinar a estratégia de reprodução mais eficiente.

Termos para Indexação: *Eugenia uniflora*, Myrtaceae, biologia reprodutiva, similaridade genética.

AFLP Markers in the Study of Genetic Variability in Populations of Surinam Cherry (*Eugenia uniflora* L.)

Rodrigo Cezar Franzon

Caroline Marques Castro

Maria do Carmo Bassols Raseira

Abstract

AFLP molecular markers were used aiming to study the genetic variability within and between Surinam cherry (*Eugenia uniflora*) populations, originated from self-pollination and open pollination of two selections (Pit 15 and Pit 52) kept at Embrapa Temperate Climate collection. The objective was to achieve a better understanding about the reproduction mode of this species. Two progenies were obtained from each selection being one from self-pollination and another from open-pollination, resulting in four populations. The analysis was carried out in 18 individuals of each progeny and the two mother plants, totalizing 74 genotypes. Three AFLP primer combinations were used and the genetic similarity was calculated by Jaccard coefficient. Genetic variability within and between populations was estimated by AMOVA. The three primer combinations amplified 178 loci, of which 114 (64%) were polymorphic, considering all the genotypes. There was not a clear separation between the two progenies of the same mother plant. Larger polymorphism of AFLP markers was observed in the open-

pollinated populations. The proportion of total genetic variability was significant, between populations from open-pollination, although smaller than the variability observed within populations. The Surinam cherry reproduction is based on both self-fertilization as well as cross-pollination. Nevertheless it is rather important to do further studies in order to determine which reproduction mode is the most efficient.

Index Terms: *Eugenia uniflora*, Myrtaceae, reproductive biology, genetic similarity.

Introdução

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) apresenta quatro diferentes centros de diversidade no Brasil: Nordeste-Caatinga, Sul-Sudeste, Brasil Central-Cerrado, e Mata Atlântica (DONADIO et al., 2002). Esta espécie faz parte do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Fruteiras Nativas da Região Sul do Brasil, mantido na Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, RS. Além da manutenção e preservação do germoplasma *ex situ*, são realizados trabalhos de caracterização das espécies mantidas no BAG. Também vem sendo realizado um trabalho de seleção dos melhores genótipos, principalmente quanto a caracteres dos frutos.

Paralelamente, vêm sendo conduzidos estudos para entender o modo de polinização e reprodução desta espécie, com o objetivo de saber se ocorre autopolinização, ou se a maioria dos descendentes de uma planta-mãe são oriundos de polinização cruzada. Informações desta natureza são importantes para o manejo, principalmente quando se planeja introduzir uma espécie em cultivos comerciais, bem como para trabalhos de melhoramento genético e de preservação. Uma alternativa para avaliar a variabilidade em populações seria a caracterização morfológica, fenológica e agrônômica dos indivíduos. Entretanto, a caracterização de genótipos, bem como o estudo da variabilidade com base nestes caracteres, apresenta uma série de limitações. Dentre estas limitações, podem ser citadas: a demora na avaliação; a impossibilidade de realização em qualquer período do ano; em

plantas frutíferas, muitas avaliações somente são possíveis de serem realizadas quando estas entram em produção, requerendo, assim, um custo elevado e tempo prolongado para análise; acessar pequena porção do genoma da planta; os marcadores morfológicos existem em número limitado, além de serem dependentes e influenciados pelo ambiente (DETTORI; PALOMBI, 2000; SALLA et al., 2002; BIANCHI et al., 2003; YAMAGISHI et al., 2005).

Outro inconveniente é que essas avaliações são subjetivas, e o resultado pode variar de acordo com a percepção dos avaliadores. Ainda, podem sofrer interferências ambientais, que influenciam na expressão do genótipo, principalmente quando se trata de estudos envolvendo cultivares ou genótipos com características muito similares (GREGOR et al., 1994; BELLINI et al., 1998; CASSAS et al., 1999).

Como alternativa a estes inconvenientes, surgiram novas metodologias para a caracterização genética de plantas. Dentre estes métodos, aqueles que revelam polimorfismo de sequências de DNA, conhecidos como marcadores moleculares, têm sido de grande importância para acessar a variabilidade genética dentro do pool gênico de espécies cultivadas, bem como na análise da diversidade e caracterização de germoplasma (SALLA et al., 2002; FERREIRA et al., 2007).

De acordo com Vieira (2005), marcadores genéticos são caracteres capazes de detectar diferenças entre dois ou

mais indivíduos ou organismos, e podem ser divididos em dois grupos: 1) aqueles que indicam produtos gênicos; e 2) aqueles que são sequências de DNA. No primeiro grupo se enquadram os marcadores morfológicos e as isoenzimas (MARKERT; MOLLER, 1959). Já no segundo grupo estão: os AFLPs – Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (VOS et al., 1995); os RFLPs – Polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA cortados (BOTSTEIN et al., 1980); os RAPDs – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990); e os SSRs – microssatélites (LITT; LUTY, 1989).

Os marcadores de DNA apresentam vantagens e superam muitos dos limites dos marcadores morfológicos e bioquímicos, uma vez que detectam variação em nível de DNA, além de poderem ser obtidos em grande número e não sofrerem influência de fatores ambientais e estágio de desenvolvimento da planta (BORÉM, 1998; UPADHYAY et al., 2004). Estes marcadores têm sido usados em diferentes espécies de fruteiras e outras espécies perenes para identificação varietal, avaliação da similaridade e relação genética entre genótipos, monitoramento da variabilidade genética, construção de mapas genéticos e para encontrar marcadores para características de interesse agrônômico, bem como para realizar seleção assistida por marcadores ou para introgressão de genes (WILLIAMS et al., 1990; MEHLENBACHER, 1995; PIGATO; LOPES, 2001; SALLA et al., 2002; UPADHYAY et al., 2004).

Por se tratar de uma espécie perene, o estudo da variabilidade genética em pitangueira, por meio de características fenotípicas, demanda longo período de tempo, principalmente para que as plantas entrem em produção. De acordo com Viana et al. (2003), o uso de marcadores moleculares na avaliação da variabilidade genética é altamente viável, pois permite caracterizar indivíduos de qualquer espécie de maneira precoce e em menor espaço de tempo.

Diversas técnicas de marcadores moleculares, como AFLP, RAPD e SSRs, baseadas na reação de polimerase em cadeia (PCR – Polymerase Chain Reaction), têm sido extensivamente utilizadas para análises de variabilidade e diversidade dentro e entre diferentes espécies (CARDOSO et al., 2000; DRUMMOND et al., 2000; MARGIS et al., 2002; SALGUEIRO et al., 2004; JACQUEMYN et al., 2007), bem como para caracterizar e descrever germoplasma, em diferentes regiões do mundo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; CERVERA et al., 1998; BREYNE et al., 1999). Também são utilizadas para traçar estratégias de conservação de espécies ameaçadas de extinção (DRUMMOND et al., 2000; AGRIMONTI et al., 2007) e, muitas vezes, são aplicadas em conjunto com marcadores morfológicos (CASTRO et al., 2003).

A técnica de AFLP (VOS et al., 1995) é baseada na detecção de polimorfismo no comprimento de fragmentos, e combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição, com a velocidade e praticidade de detecção

dos polimorfismos via PCR (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Desta forma, permite uma alta cobertura do genoma e não exige que se tenha um conhecimento prévio do genoma analisado, podendo ser utilizada para DNAs de qualquer origem e complexidade.

A análise através do uso de AFLP (VOS et al., 1995) é realizada em quatro etapas: 1) o DNA do indivíduo é clivado por enzimas de restrição (uma de corte raro e uma de corte frequente); 2) adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos de DNA gerados pela clivagem; 3) uma parte dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR, utilizando-se iniciadores especificamente construídos para reconhecer sequências nos adaptadores; 4) a subpopulação de fragmentos amplificados é separada, por eletroforese, em gel de alta resolução.

Como principais vantagens desta técnica, pode-se destacar: o índice multiplex, ou seja, o número de marcadores simultaneamente analisados em um único gel; reprodutibilidade; e o grande poder de detecção de variabilidade genética, pois gera um grande número de marcadores polimórficos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; BREYNE et al., 1999). Isto faz com que a técnica seja bastante útil em análises de paternidade, na determinação de fluxo gênico, na identificação de variedades, em estudos de diversidade genética e, principalmente, no mapeamento genético (VIEIRA, 2005). A principal desvantagem é que os marcadores AFLP são marcadores dominantes. Mesmo assim, a técnica é muito útil, pois o número

de marcadores analisados simultaneamente em um único gel pode ser muito alto.

De acordo com Margis et al. (2002), análises AFLP têm sido usadas para descrever a estrutura da população e polimorfismo genético de diversas espécies vegetais, incluindo soja, cevada, milho e arroz. Em fruteiras, tem sido utilizada em análises com pessegueiro (ARADHYA et al., 2004), várias espécies de Citrus (BRETÓ et al., 2001), em videira (CERVERA et al., 1998) e com ameixeira japonesa (VIEIRA et al., 2005), dentre outras.

Porém, poucos registros são encontrados na literatura em relação ao uso de marcadores moleculares em espécies nativas do Sul do Brasil. Schuch et al. (2002) utilizaram marcadores RAPD para avaliação da variabilidade genética de pitangueira em banco de germoplasma. Erig et al. (2003) utilizaram marcadores RAPD para avaliar a variabilidade genética em araçazeiro (*Psidium cattleyanum*). Dettori e Palombi (2000) utilizaram marcadores RAPD para elaborar fingerprinting em acessos de *Acca sellowiana* e para avaliar a variabilidade disponível em plantas domesticadas, anteriormente introduzidas de diversos países, existentes no banco de germoplasma da espécie mantido no Istituto Sperimentale per la Frutticoltura em Roma, na Itália. A técnica AFLP foi utilizada anteriormente em pitangueira (*E. uniflora*), com sucesso, para analisar o nível de variabilidade genética entre populações no Rio de Janeiro (MARGIS et al., 2002). Da mesma forma, Salgueiro et al. (2004), com o objetivo de estabelecer associação entre os

diferentes fatores que influenciam a distribuição da variabilidade genética entre populações desta espécie, distribuídas ao longo do litoral brasileiro, utilizaram esta mesma técnica, associada com SSRs e RFLP.

No presente trabalho, foram utilizados marcadores AFLP para a avaliação de populações de plantas de pitangueira oriundas de autopolinização e de polinização livre, com o objetivo de verificar a variabilidade existente entre populações, visando fornecer informações que ajudem no entendimento do modo de reprodução desta espécie.

Material e Métodos

Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, RS.

Material vegetal

O material vegetal utilizado foi oriundo de duas seleções de pitangueira ("Pit 15" e "Pit 52") do Banco Ativo de Germoplasma de Fruteiras Nativas do Sul do Brasil da Embrapa Clima Temperado. De cada seleção foram obtidas duas populações F1, entre fevereiro e março de 2006, por meio de autopolinização e de polinização livre, totalizando quatro populações. Para obtenção da população de autopolinização, foram ensacados ramos com botões florais próximos ao estágio de balão e, no dia da antese, as flores foram polinizadas manualmente com pólen da própria flor, para garantir

a ocorrência da polinização. Quando maduros, os frutos foram colhidos e as sementes colocadas para germinar em bandejas de isopor, contendo como substrato uma mistura de terra local e areia, na proporção 3:1. Em setembro de 2006, as mudas foram repicadas para sacos plásticos, contendo o mesmo substrato, e permaneceram em casa de vegetação para desenvolvimento. Para a população de polinização livre, frutos foram colhidos ao acaso, na mesma época de colheita dos frutos de autopolinização, e colocados para germinar nas mesmas condições descritas acima.

Para identificação, as plantas foram divididas em dois grupos. Um grupo formado pela seleção "Pit 52" e suas progênes, doravante denominado Gp52a, quando oriunda de autopolinização, e Gp52L, quando derivada de polinização livre, e outro grupo formado pela seleção "Pit 15" e suas progênes, doravante denominado Gp15a, quando oriunda de autopolinização e, Gp15L, quando derivada de polinização livre.

Extração do DNA

Para a extração do DNA, utilizou-se entre 0,15 g e 0,20 g de tecido vegetal, coletado de folhas jovens completamente expandidas, porém não muito lignificadas, de 20 indivíduos de cada uma das quatro populações e das duas plantas mãe, totalizando 82 indivíduos. Para extração de DNA das plantas-mãe, folhas jovens foram coletadas a campo.

O DNA utilizado nas análises de AFLP foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). Para ressuspender o DNA, foram utilizados 30 μL de tampão TE (Tris-EDTA), pH 8,0, ao qual foi adicionado 1 μL de RNase (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A quantificação foi realizada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, e revelado sob luz ultravioleta. A concentração de DNA, em $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, foi determinada com base na comparação visual da intensidade das bandas com o padrão de peso molecular λ DNA/Hind III. As amostras de DNA foram diluídas para uma concentração final de 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, em H_2O MilliQ[®] autoclavada.

Análises AFLP

Digestão do DNA: Inicialmente, foram testadas duas concentrações de DNA (50 ng ou 100 ng) na reação de digestão, com seis amostras escolhidas ao acaso. Na sequência dos trabalhos, optou-se por utilizar 100 ng de DNA na reação de digestão.

Os reagentes utilizados em cada reação de digestão foram: 2 μL de enzimas EcoRI/MseI (1,25 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$); 5 μL Tampão 5x [Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM, Acetato Mg 10 mM, Acetato K 50 mM], ambos fornecidos pela Invitrogen[®]. Utilizou-se 10 μL de DNA (10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), e 8 μL de H_2O MilliQ[®], suficiente para completar o volume final de reação (25 μL). A reação foi incubada por três horas a 37 °C, seguida por um período de 15 minutos a 70 °C.

Ligação dos adaptadores: Os fragmentos resultantes da digestão foram ligados aos adaptadores específicos para os locais de restrição EcoRI e MseI. Nesta etapa, utilizou-se 10 μL do DNA digerido, sendo adicionados 9,6 μL de solução de ligação de adaptadores, do Kit AFLP® Analysis System I (Invitrogen®), e 0,4 μL da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen®). O material foi incubado por duas horas a 20 °C.

Reação de pré-amplificação: Inicialmente, foram testadas duas diluições do produto da reação de ligação dos adaptadores, 1:5 e 1:10, em H₂O MilliQ® autoclavada, com as mesmas seis amostras escolhidas ao acaso na etapa de digestão do DNA. Por apresentar melhores resultados, na sequência dos trabalhos utilizou-se a diluição 1:10.

As reações de pré-amplificação foram desenvolvidas em um volume final de 10 μL , sendo compostas por 1 μL da solução resultante da ligação dos adaptadores diluída 1:10, 1 μL do 10X PCR Buffer [Tris-HCl pH 8,4 (20 mM), KCl (50 mM)]; 0,5 μL de MgCl₂ (50 mM), ambos da Invitrogen®; 0,8 μL de dNTP mix (2,5 mM de cada); 0,2 μL de Taq DNA polimerase (5 U· μL^{-1}); 0,3 μL do primer EcoRI + 1 (50 ng· μL^{-1}); e 0,3 μL do primer MseI + 1 (50 ng· μL^{-1}), completando o volume com 5,9 μL de H₂O MilliQ®. O programa de PCR utilizado seguiu o protocolo sugerido por Vos et al. (1995), num total de 20 ciclos, sendo cada ciclo composto por 30 segundos a 94 °C, 60 segundos a 56 °C, e 60 segundos

a 72 °C. O produto da reação de pré-amplificação foi diluído em H₂O MilliQ® autoclavada, na proporção 1:10, para então ser submetido à amplificação seletiva.

Amplificação final seletiva: Cada reação na amplificação seletiva foi realizada em um volume final de 10 µL, contendo: 2,5 µL da solução de DNA pré-amplificado diluída 1:10; 1 µL de solução PCR buffer 10X [Tris-HCl pH 8,4 (20 mM), KCl (50 mM)]; 0,4 µL de MgCl₂ (50 mM); 8 µL de dNTP mix (2,5 mM); 0,3 µL BSA (10 mg·µL⁻¹); 0,2 µL de Taq DNA polymerase (5 U·µL⁻¹); 1.7 µL de H₂O MilliQ® autoclavada; 2,0 µL do primer EcoRI + 3 (50 ng·µL⁻¹) e 0,3 µL do primer MseI + 3 (50 ng·µL⁻¹). O programa de PCR utilizado seguiu o protocolo proposto por Vos et al. (1995) (Tabela 1), e foram utilizadas três combinações de primers:

(P1) EcoRI +ACA – MseI +CTT;

(P2) EcoRI +AGC – MseI +CTT;

(P3) EcoRI +AAC – MseI +CAG.

Tabela 1: Programa de PCR utilizado para amplificação seletiva. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. 2008.

Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
1-13	94 °C por 10 segundos	65 °C, 30 segundos (reduzindo 0,7 °C em cada ciclo)	72 °C, 1 min
14-36	94 °C por 10 segundos	56 °C, 30 segundos	72 °C, 1 min

Todas as etapas das reações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ao produto da reação de amplificação final (10 μ L) foram adicionados 4 μ L da solução tampão de carregamento (formamida deionizada 99%, EDTA 10 mM, 0,025% de xilenociano e 0,025% de azul de bromofenol), e então procedeu-se à desnaturação das amostras a 94 °C por 5 min. Foram aplicados 6,0 μ L desta solução em gel de sequenciamento (poliacrilamida 6% p/v, ureia 7M).

Eletoforese: Os fragmentos amplificados foram separados eletroforéticamente em gel desnaturante de poliacrilamida (6%), em uma corrida a 60-70 W, durante 2 horas e 50 minutos. Estes fragmentos foram visualizados utilizando-se o protocolo de coloração com nitrato de prata (CRESTE et al., 2001). O tamanho dos alelos foi estimado em comparação visual com o marcador de peso molecular de DNA de 25 pb (InvitroGen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, USA).

Avaliação e análise estatística: Inicialmente, 20 indivíduos de cada população, mais a planta-mãe, foram utilizados neste estudo. Entretanto, dois indivíduos de cada uma das populações falharam nas reações com todos os pares de primers utilizados. Assim, foram utilizados 18 indivíduos de cada população, além das duas plantas-mãe.

Os dados de presença (1) e ausência (0) de marcadores obtidos na análise de AFLP dos 74 indivíduos estudados permitiram o cálculo da similaridade genética entre todos os pares de genótipos. Para o cálculo da similaridade genética (S_{ij}), foi utilizado o coeficiente de Jaccard, conforme a equação: $S_{ij} = a / (a + b + c)$, onde, “ S_{ij} ” é a similaridade entre os pares de genótipos i e j , “ a ” é o número de fragmentos presentes em comum entre i e j , “ b ” é o número de fragmentos presentes em i e ausentes em j , e “ c ” o número de fragmentos presentes em j e ausentes em i . Para análise, foram eliminados os marcadores que foram monomórficos para todos os 74 indivíduos.

Com base na matriz de similaridade gerada foi construído um dendrograma pelo método de agrupamento da distância média (UPGMA – Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Averages). O ajuste entre a matriz de similaridade e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r) (SOKAL; ROHLF, 1962).

Todas as análises descritas acima foram realizadas por meio do programa computacional NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 2000).

A partir da matriz original gerada com os dados de presença e ausência de marcadores, em locos polimórficos, estimou-se a variabilidade genética entre e dentro das populações pela análise da variância molecular (AMOVA), usando o programa GENES (versão 2007.0.0.). A AMOVA calcula o valor F_{st} , que equivale à

proporção da variação genética total fracionada entre populações (EXCOFFIER et al., 1992).

Resultados e Discussão

As três combinações de *primers* AFLP utilizadas amplificaram 178 locos AFLP, dos quais 114 (64,0%) foram polimórficos entre todos os indivíduos estudados (Tabela 2). O número total de locos amplificados para cada combinação de *primers* variou entre 49 e 65, com um nível de polimorfismo entre 47,7% e 75,5%. Todos os locos analisados apresentaram peso molecular entre 100 e 500pb. Estes números estão próximos aos obtidos por Salgueiro et al. (2004), que obtiveram 78,05% de locos polimórficos analisando cinco populações de pitangueira de diferentes regiões (Rio de Janeiro, Pernambuco e Rio Grande do Sul). Margis et al. (2002), por sua vez, obtiveram 91,4% de locos polimórficos na avaliação de três populações desta espécie no Rio de Janeiro, com uma distância entre elas não superior a 30 km entre as populações. O número de locos amplificados por combinação de *primers* variou entre 42 e 61, muito próximo ao obtido por Margis et al. (2002), que observaram entre 42 e 65 locos por combinação.

Tabela 2: Pares de *primers* utilizados no estudo, número de locos AFLP amplificados, número (Nº P) e percentagem (% P) de polimorfismo encontrada para cada grupo (Gp52 e Gp15), e Nº.P e % P total (avaliando-se todos os indivíduos juntos). Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. 2008.

Par de <i>primer</i> *	Gp52 (n = 37)		Gp15 (n = 37)		Total (n = 74)	
	Nº de locos	Nº P / (% P)	Nº de locos	Nº P / (% P)	Nº de locos	Nº P / (% P)
P1	50	26 / (52,0%)	52	27 / (51,9%)	64	46 / (71,9%)
P2	61	21 / (34,4%)	56	18 / (32,1%)	65	31 / (47,7%)
P3	42	17 / (40,5%)	43	26 / (60,5%)	49	37 / (75,5%)
Total	153	64 / (41,8%)	151	71 / (47,0%)	178	114 / (64,0%)

* (P1) *Eco*+ACA – *Mse*+CTT; (P2) *Eco*+AGC – *Mse*+CTT; (P3) *Eco*+AAC – *Mse*+CAG.

Os resultados evidenciam a eficiência da técnica AFLP em detectar marcadores moleculares em pitangueira. Neste estudo, assim como em outros estudos (MARGIS et al., 2002; SALGUEIRO et al., 2004), esta técnica mostrou-se confiável e eficiente na detecção de variação genética entre e dentro de populações. Esta técnica também vem sendo empregada com sucesso em diversas outras espécies (CARDOSO et al., 2000; DRUMMOND et al., 2000; LAURENTIN; KARLOVSKY, 2006; MWASE et al., 2006; AGRIMONTI et al., 2007; JACQUEMYN et al., 2007; WANG et al., 2007), pois, além de gerar um grande número de marcadores, tem a vantagem de ser altamente reproduzível.

A percentagem de locos polimórficos nas populações de polinização livre foi ligeiramente maior do que nas populações de autopolinização (Tabela 3). Isto já era esperado, pois a autopolinização leva a um aumento de endogamia nas sucessivas

gerações. Porém, as pequenas diferenças observadas entre as populações de autopolinização e de polinização livre (11,1% no Gp52 e 5,9% no Gp15 – Tabela 3) estão aquém do esperado, pois em populações de polinização livre o esperado era que ocorresse maior polimorfismo. Isso deve estar ocorrendo devido a um elevado grau de parentesco entre plantas do banco de germoplasma de pitangueira da Embrapa Clima Temperado. Esse fator também explica o menor grau de polimorfismo encontrado em relação a outros trabalhos (MARGIS et al., 2002; SALGUEIRO et al., 2004) com esta mesma espécie. Em populações ocorrendo em seu ambiente natural, a probabilidade de indivíduos geneticamente diferentes se cruzarem é maior, ocorrendo maior troca de genes entre plantas e conseqüentemente maior fluxo gênico entre populações. Outra possível explicação para a baixa variabilidade entre plantas é a ocorrência de autofertilização nesta espécie, o que também contribuiria para diminuir os níveis de polimorfismo.

Tabela 3 – Número total de locos, número de polimorfismos e percentagem de polimorfismo para cada população de pitangueira analisada. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. 2008.

Mãe	Polinização	Nº indivíduos	Nº de locos	Nº polimorfismos(% polimorfismo)
Gp52	Auto	18	153	41 (26,8%)
	Livre	18	153	58 (37,9%)
Gp15	Auto	18	151	56 (37,1%)
	Livre	18	151	65 (43,0%)

Os índices de similaridade obtidos reforçam estas duas possibilidades, elevado grau de parentesco entre plantas e autofertilização. Embora a análise de agrupamento (Figura 1) tenha separado claramente os indivíduos em dois grupos distintos (Gp52 e Gp15), dentro de cada grupo não ocorreu uma separação clara entre populações, inclusive com plantas de polinização livre no GP52 (por exemplo: L_15 e L_12) sendo observadas mais próximas da planta-mãe ("Pit 52") do que algumas plantas de autopolinização. A similaridade entre os dois grupos foi de aproximadamente 48%, com um coeficiente de correlação cofenética (r) de 0,96, o que evidencia um bom ajuste entre a representação gráfica das distâncias no dendrograma e a sua matriz original. A partir da matriz de similaridade, foi obtida a similaridade média entre todos os indivíduos analisados, que ficou em 60,4%.

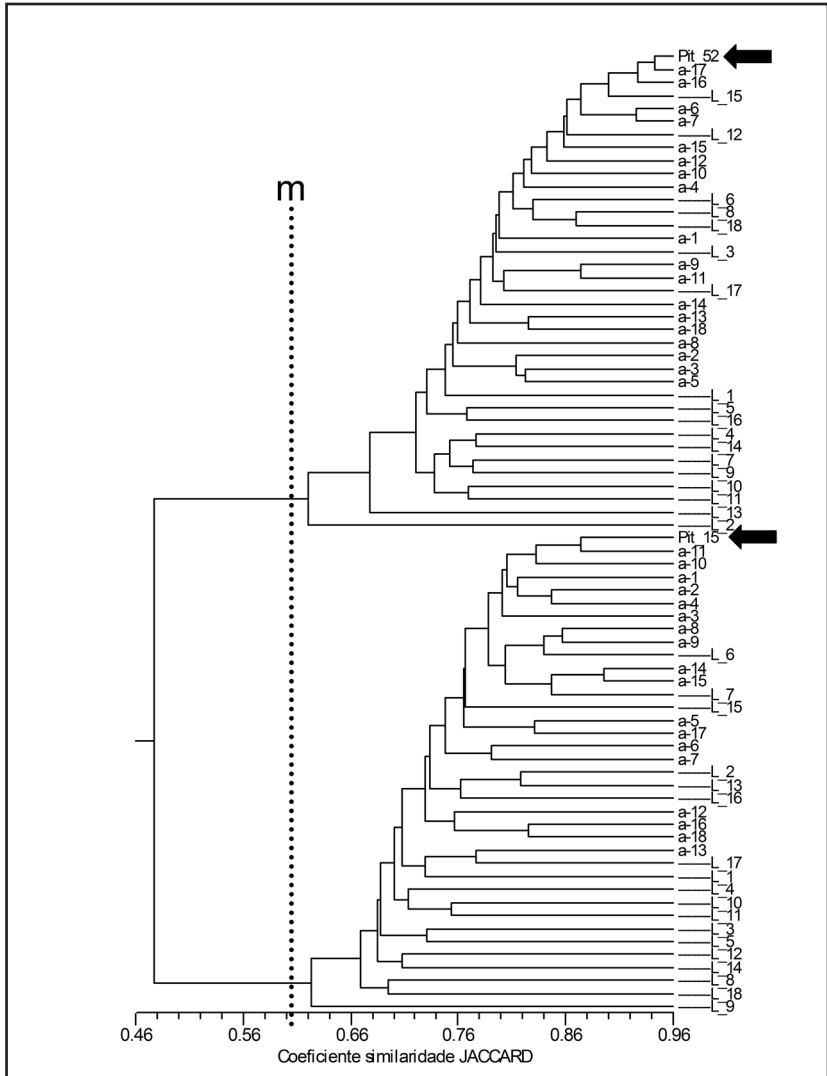


Figura 1: Dendrograma representando a similaridade genética entre 74 plantas de pitangueira, a partir de 114 marcadores AFLP, com base no coeficiente de Jaccard, utilizando o método UPGMA. Coeficiente de correlação cofenética ($r=0,96$). Setas indicam as plantas-mães (seleções "Pit 52" e "Pit 15"). (a) = indivíduo originado por autopolinização; (L) = indivíduo obtido por polinização livre; (m) = similaridade média entre todos os indivíduos. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. 2008.

Embora não tenha sido possível visualizar uma separação clara entre plantas oriundas de autopolinização daquelas de polinização cruzada, observou-se uma tendência de agrupamento, com plantas oriundas de autopolinização sendo mais similares entre elas e com a planta-mãe do que com as plantas de polinização livre (Figura 1). Quando os dados foram analisados separadamente para cada grupo (dendrogramas não apresentados), a estrutura hierárquica das populações permaneceu inalterada, e observou-se a mesma tendência de agrupamento.

A partir da matriz de similaridade também foram obtidos os índices de similaridade média para cada grupo (Gp52 e Gp15) e para cada população dentro do grupo. A similaridade média geral entre todos os indivíduos pertencentes ao grupo Gp52 foi 75,1%, enquanto que para o Gp15 foi de 71,6%. Entre plantas autopolinizadas, a similaridade média no Gp52a foi de 78,9%, e no Gp15a foi de 73,7%. Já entre plantas de polinização livre foi de 75,3% no Gp52L e de 69,0% no Gp15L.

Os resultados da análise da variância molecular (AMOVA) (Tabela 4) indicam que a maior variação está presente dentro das populações de pitangueira avaliadas. Porém, os valores de variação encontrados entre populações, embora baixos, foram altamente significativos. No grupo Gp52, o F_{st} estimado ($F_{st} = 0,1336$), indica que 86,64% da variação total está presente dentro das populações, e 13,36% entre populações. No grupo Gp15, o F_{st}

estimado ($F_{st \text{ Gp15}} = 0,061$) indica que 93,9% da variação esta presente dentro das populações, e apenas 6,1% entre elas. Maior variação dentro de populações desta espécie também foi observada em trabalhos anteriores (MARGIS et al., 2002; SALGUEIRO et al., 2004). Entretanto, de acordo com Ouborg et al. (1999), uma variação significativa entre populações pode indicar restrito fluxo de genes.

No presente trabalho, esse resultado era esperado, pois as populações analisadas têm a mesma origem materna, o que reduz a diferença entre elas, dentro de cada grupo (Gp52 e Gp15). No entanto, no trabalho de Salgueiro et al. (2004), a variabilidade observada dentro de populações (78,9%) foi maior do que o esperado, uma vez que as populações analisadas estavam a uma distância de pelo menos 99 km uma da outra e não existia interação entre elas. Os autores atribuem essa variabilidade a interações (fluxo gênico) ocorridas no passado. Margis et al. (2002), por sua vez, observaram 88% da variabilidade dentro das populações, e sugerem que ocorra um intenso fluxo de genes entre elas, uma vez que se encontravam a uma distância não superior a 30 km uma da outra. Porém, estes mesmos autores destacam que o grau de diferenciação populacional observado foi maior do que o esperado para uma espécie com pequenas distâncias entre populações, e sugerem que as mesmas estariam sendo influenciadas por diferentes graus de impacto humano, por meio da fragmentação da mata, o que estaria reduzindo o número de indivíduos ou, ainda, obstruindo

o fluxo contínuo de pólen e sementes. De acordo com revisão de Wang et al. (2007), a diferenciação genética entre populações é função do fluxo de genes entre elas, principalmente via dispersão de pólen e sementes. Estes autores observaram que, em *Musa balbisiana*, uma espécie de banana selvagem na China, a AMOVA detectou 27% de diferenciação populacional, e apontam como principais motivos para esta diferenciação a superexploração das florestas pelo homem, o que estaria reduzindo consideravelmente a população e atuação dos polinizadores, principalmente abelhas e morcegos, bem como a dispersão de sementes por roedores, o que contribui para a restrição do fluxo de genes e aumenta a probabilidade que indivíduos mais aparentados se cruzem.

Tabela 4: Análise da variância molecular (AMOVA) em dois grupos (Gp52 e Gp15) de plantas de pitangueira. Cada grupo é formado por 36 indivíduos, divididos em duas populações. GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrados médios. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. 2008.

Grupo	Fonte de variação	GL	SQ	QM	Componente de variância	Total (%)
Gp52	Entre populações	1	32,028	32,028	1,3079	13,36**
	Dentro de populações	34	288,5	8,485	8,4853	86,64**
	Total	35	320,52	9,158	9,7932	100,0
$F_{st} = 0,1336^{**}$						
Gp15	Entre populações	1	21,889	21,889	0,6554	6,1**
	Dentro de populações	34	343,11	10,092	10,0915	93,9 ^{ns}
	Total	35	365,0	10,429	10,7469	100,0
$F_{st} = 0,061^{**}$						

** significativo em nível de 1% de probabilidade de erro.

No entanto, o grau de diferenciação populacional observado em pitangueira por Margis et al. (2002) pode ser também devido à ocorrência de determinada taxa de autopolinização ou autofertilização ao longo do tempo. Considerando-se que as populações estavam isoladas e com restrição de fluxo de genes entre elas, a autopolinização poderia estar aumentando a frequência de genes raros em alguma das populações, o que contribuiria para esta diferenciação. Assim, este fator, juntamente com os fatores por eles discutidos, pode estar ocasionando aumento de endogamia e, conseqüentemente, maior diferenciação genética.

A possibilidade de aumento de endogamia por autopolinização é levantada em outras espécies. Em *Myrtus communis*, uma Myrtaceae típica da flora mediterrânea, Agrimonti et al. (2007) relatam heterozigosidade menor do que o esperado para uma espécie que, tudo indica, é de polinização cruzada. Os autores levantam a hipótese de que a estrutura da flor desta espécie, que é hermafrodita, favoreça certo grau de autopolinização. O mesmo acontece em *Syzygium nervosum*, uma Myrtaceae de polinização cruzada endêmica da Austrália (SHAPCOTT, 1999). Porém, neste caso, a perda de heterozigosidade é explicada pela estrutura das populações, que são compostas de indivíduos geneticamente muito próximos, e isolados de outros indivíduos da mesma espécie pela vegetação, limitando o fluxo de pólen a maiores distâncias e facilitando a autopolinização ou cruzamento entre estes indivíduos geneticamente mais próximos.

Valores de F_{st} entre 0,05 e 0,15 sugerem moderada diferenciação genética entre populações (Wright, 1978 *apud* Mwase et al., 2006). Os valores F_{st} observados no presente trabalho, nos dois grupos de plantas ($F_{st\ Gp52} = 0,1336$; $F_{st\ Gp15} = 0,061$), estão dentro desta faixa. No entanto, pode-se inferir que esta diferenciação só não foi mais acentuada devido à ocorrência de certa taxa de autofertilização, ou ainda polinização com pólen de indivíduos muito próximos geneticamente (aparentados), nas plantas de polinização livre. Isso é corroborado pela visualização do dendrograma, onde as populações dentro dos grupos são próximas, não havendo uma separação clara entre elas, conforme já discutido.

De fato, as plantas-mães utilizadas neste trabalho (“Pit 15” e “Pit 52”) têm a mesma origem, bem como as plantas vizinhas a elas, o que resulta em aumento de endogamia a cada nova geração. A planta “Pit 15” foi selecionada a partir de *seedlings* obtidos de sementes coletadas de uma única planta em propriedade particular no interior do município de Pelotas, RS. Já, a planta “Pit 52” foi selecionada de *seedlings* obtidos a partir de sementes coletadas da população F1 introduzida, tratando-se, portanto, de uma planta F2. A variabilidade quanto a caracteres morfológicos nestas populações leva a crer que a planta-mãe da qual foram coletadas as primeiras sementes era altamente heterozigota. Essa observação é reforçada pelos índices de similaridade e valores F_{st} obtidos, que demonstram aumento de endogamia na população F2, ou seja, nas populações do Gp52.

Outras possíveis causas desta baixa variabilidade são o pequeno tamanho de população utilizado ($N = 18$) e o fato de apenas três combinações de *primers* terem sido utilizadas. Margis et al. (2002) observam que a robustez da análise da diversidade entre e dentro das populações de pitangueira por eles avaliadas aumenta progressivamente com a adição de pares de *primers*, e concluem que isto provavelmente ocorra porque as populações são muito próximas. Por outro lado, um pequeno número de marcadores e combinações de *primers* é necessário para distinguir populações ou variedades menos próximas (ZHU et al., 1998).

Os resultados obtidos por Salgueiro et al. (2004) indicam uma considerável diferenciação entre as cinco populações de pitangueira avaliadas ($F_{st} = 0,211$). Levando-se em consideração o elevado índice de fragmentação que as matas nativas vêm sofrendo nas diferentes regiões do país, pode-se concluir que populações desta espécie, ao ficarem isoladas umas das outras, diferenciam-se ao longo do tempo, pelo aumento da frequência de alelos raros em diferentes populações. No presente estudo, quando se compara as populações em pares (Tabela 5), a AMOVA mostra que a maior parte da variação está entre as populações. Analisando as duas populações oriundas de autopolinização, o valor F_{st} estimado ($F_{st} = 0,6293$) indica que a percentagem da variação total residente entre as populações é 62,93%.

No entanto, o grau de diferenciação populacional observado em pitangueira por Margis et al. (2002) pode ser também devido à ocorrência de determinada taxa de autopolinização ou autofertilização ao longo do tempo. Considerando-se que as populações estavam isoladas e com restrição de fluxo de genes entre elas, a autopolinização poderia estar aumentando a frequência de genes raros em alguma das populações, o que contribuiria para esta diferenciação. Assim, este fator, juntamente com os fatores por eles discutidos, pode estar ocasionando aumento de endogamia e, conseqüentemente, maior diferenciação genética.

A possibilidade de aumento de endogamia por autopolinização é levantada em outras espécies. Em *Myrtus communis*, uma Myrtaceae típica da flora mediterrânea, Agrimonti et al. (2007) relatam heterozigosidade menor do que o esperado para uma espécie que, tudo indica, é de polinização cruzada. Os autores levantam a hipótese de que a estrutura da flor desta espécie, que é hermafrodita, favoreça certo grau de autopolinização. O mesmo acontece em *Syzygium nervosum*, uma Myrtaceae de polinização cruzada endêmica da Austrália (SHAPCOTT, 1999). Porém, neste caso, a perda de heterozigosidade é explicada pela estrutura das populações, que são compostas de indivíduos geneticamente muito próximos, e isolados de outros indivíduos da mesma espécie pela vegetação, limitando o fluxo de pólen a maiores distâncias e facilitando a autopolinização ou cruzamento entre estes indivíduos geneticamente mais próximos.

Valores de F_{st} entre 0,05 e 0,15 sugerem moderada diferenciação genética entre populações (Wright, 1978 apud Mwase et al., 2006). Os valores F_{st} observados no presente trabalho, nos dois grupos de plantas ($F_{st\ Gp52} = 0,1336$; $F_{st\ Gp15} = 0,061$), estão dentro desta faixa. No entanto, pode-se inferir que esta diferenciação só não foi mais acentuada devido à ocorrência de certa taxa de autofertilização, ou ainda polinização com pólen de indivíduos muito próximos geneticamente (aparentados), nas plantas de polinização livre. Isso é corroborado pela visualização do dendrograma, onde as populações dentro dos grupos são próximas, não havendo uma separação clara entre elas, conforme já discutido.

De fato, as plantas-mães utilizadas neste trabalho ("Pit 15" e "Pit 52") têm a mesma origem, bem como as plantas vizinhas a elas, o que resulta em aumento de endogamia a cada nova geração. A planta "Pit 15" foi selecionada a partir de seedlings obtidos de sementes coletadas de uma única planta em propriedade particular no interior do município de Pelotas, RS. Já, a planta "Pit 52" foi selecionada de seedlings obtidos a partir de sementes coletadas da população F1 introduzida, tratando-se, portanto, de uma planta F2. A variabilidade quanto a caracteres morfológicos nestas populações leva a crer que a planta-mãe da qual foram coletadas as primeiras sementes era altamente heterozigota. Essa observação é reforçada pelos índices de similaridade e valores F_{st}

obtidos, que demonstram aumento de endogamia na população F2, ou seja, nas populações do Gp52.

Outras possíveis causas desta baixa variabilidade são o pequeno tamanho de população utilizado ($N = 18$) e o fato de apenas três combinações de primers terem sido utilizadas. Margis et al. (2002) observam que a robustez da análise da diversidade entre e dentro das populações de pitangueira por eles avaliadas aumenta progressivamente com a adição de pares de primers, e concluem que isto provavelmente ocorra porque as populações são muito próximas. Por outro lado, um pequeno número de marcadores e combinações de primers é necessário para distinguir populações ou variedades menos próximas (ZHU et al., 1998).

Os resultados obtidos por Salgueiro et al. (2004) indicam uma considerável diferenciação entre as cinco populações de pitangueira avaliadas ($F_{st} = 0,211$). Levando-se em consideração o elevado índice de fragmentação que as matas nativas vêm sofrendo nas diferentes regiões do país, pode-se concluir que populações desta espécie, ao ficarem isoladas umas das outras, diferenciam-se ao longo do tempo, pelo aumento da frequência de alelos raros em diferentes populações. No presente estudo, quando se compara as populações em pares (Tabela 5), a AMOVA mostra que a maior parte da variação está entre as populações. Analisando as duas populações oriundas de autopolinização, o valor F_{st} estimado ($F_{st} = 0,6293$) indica que a percentagem da variação total residente entre as populações é 62,93%.

Tabela 5: Resumo da AMOVA. Percentagem da variação total observada entre populações. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. 2008.

Populações	52 auto	52 livre	15 auto	15 livre
52 auto	--	13,36**	62,93**	57,48**
52 livre		--	59,23**	53,52**
15 auto			--	6,10**
15 livre				--

** significativo em nível de 1% de probabilidade de erro.

Quando se comparam as duas populações oriundas de polinização livre, o $F_{st} = 0,5352$ indica que também ocorre uma grande diferenciação genética entre elas, o que não seria o esperado em populações oriundas de acasalamento ao acaso, considerando a ocorrência de polinização cruzada. Entretanto, muito pouco se conhece sobre o modo de reprodução da pitangueira, incluindo o modo de polinização, bem como a dispersão de pólen e sementes. A falta de informações desta natureza não é exclusividade desta espécie, e também é relatada por Proença e Gibss (1994) para outras espécies de Myrtaceae que ocorrem no Brasil. Além disso, sabe-se que para outras espécies nativas no Sul do Brasil desta família, tais como uvalheira (*E. pyriformis*), cerejeira-do-mato (*E. involucrata*), guabirobeira (*Campomanesia* sp), dentre outras, as informações são escassas.

Nas populações de pitangueira estudadas, algumas características, além dos fatores já mencionados, levam a acreditar numa diferenciação populacional pelo aumento de endogamia por autofertilização. Esta hipótese é sustentada pelo

padrão de floração da pitangueira, classificado como do tipo big-bang, ou floração em massa (LUGHADHA; PROENÇA, 1996), que se caracteriza por apresentar grande produção de flores em curto espaço de tempo (SILVA; PINHEIRO, 2007). De acordo com O'Brien e Calder (1993), essa característica pode ser uma estratégia para atrair polinizadores. Em espécies autocompatíveis que necessitam da ação de polinizadores para uma maior taxa de frutificação, a floração em massa pode ser uma estratégia para promover a autofertilização (BEARDSELL et al., 1993), pois, além de atrair polinizadores, faz com que os mesmos permaneçam mais tempo forrageando na mesma planta. Assim, de acordo com Silva (2006), a produção de frutos em pitangueira pode ocorrer por geitonogamia, aquela em que ocorre polinização com a transferência de pólen entre flores da mesma planta, embora a produção de frutos por autopolinização passiva possa ocorrer.

Estudos mais detalhados sobre a biologia reprodutiva da pitangueira, bem como sobre características anatômicas das flores, devem ser conduzidos para determinar como ocorre a polinização, dispersão do pólen e sementes, e estruturação de populações, a fim de se determinar a melhor maneira de conservação genética da espécie. Também, o uso de marcadores genéticos codominantes pode fornecer mais informações sobre os índices de polinização cruzada e de autopolinização, bem como melhores esclarecimentos sobre a estimativa do fluxo de genes, uma vez que o caráter dominante do AFLP impede que sejam diferenciados locos

homozigotos dominantes de locos heterozigotos, subestimando, assim, a frequência dos alelos recessivos.

Em termos de preservação da espécie, a existência de diferenciação populacional relatada em trabalhos anteriores encontrados na literatura, associada com a hipótese de que ocorra uma taxa de autofertilização considerável, indica que mais populações existentes nos fragmentos de mata original devam ser conservadas para assegurar variabilidade suficiente. Em relação ao BAG de fruteiras nativas da Embrapa Clima Temperado, a maioria das plantas de pitangueira existentes hoje tem a mesma origem, e poucas plantas foram introduzidas de outras regiões, como Paraná, Santa Catarina e região do Cerrado. Assim, torna-se necessário novas coletas e introdução de material. Essa coleta deveria ser realizada em vários locais de várias regiões, a fim de aumentar e preservar variabilidade para o futuro, principalmente quando se pretende desenvolver um programa de melhoramento genético.

Conclusões

Nas condições em que foram realizados os trabalhos, conclui-se que:

- Marcadores AFLP são apropriados para o estudo da variabilidade genética entre e dentro de populações de pitangueira.
- Há maior polimorfismo de marcadores AFLP em populações de polinização livre.
- A pitangueira produz frutos tanto por autofertilização quanto por polinização cruzada.
- A proporção da variabilidade genética total entre populações é significativa, embora menor do que aquela observada dentro das populações.

REFERÊNCIAS

AGRIMONTI, C.; BIANCHI, R.; BIANCHI, A.; BALLERO, M.; POLI, F.; MARMIROLI, N. Understanding biological conservation strategies: a molecular-genetic approach in the case of myrtle (*Myrtus communis* L.) in two Italian regions: Sardinia and Calabria. **Conservation Genetics**, Heidelberg, v. 8, n. 2, p. 385-396, 2007.

ARADHYA, M. K.; WEEKS, C.; SIMON, C. J. Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus* L. using amplified fragment length polymorphism. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 103, n. 1, p. 131-144, 2004.

BEARDSELL, D. V.; O'BRIEN, S. P.; WILLIAMS, E. G.; KNOX, R. B.; CALDER, D.M. Reproductive biology of Australian Myrtaceae. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 41, n. 4-5, p. 511-526, 1993.

BELLINI, E.; GIORDANI, E.; NENCETTI, V.; PAFFETTI, D. Genetic relationships in Japanese plum cultivars by molecular markers. **Acta Horticulturae**, Warszawa, v. 478, p. 53-59, 1998.

BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; SCHUCH, M. W. RAPDs na caracterização genético molecular e no estudo da variabilidade genética de cultivares de ameixeira. **Revista Brasileira de**

Fruticultura, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 272-274, 2003.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. V.
Construction of a genetic linkage map in man using restriction
fragment length polymorphisms. **American Journal of Human
Genetics**, Boston, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2. ed. Viçosa:
Universidade Federal de Viçosa, 1998. 453 p.

BREYNE, P.; ROMBANT, D.; VAN GYSEL, A.; VAN MONTAGU,
M.; GERATS, T. AFLP analysis of genetic diversity within and
between *Arabidopsis thaliana* ecotypes. **Molecular and General
Genetics**, New York, v. 261, n. 4-5, p. 627-634, 1999.

BRETÓ, M. P.; RUIZ, C.; PINA, J. A.; ASINS, M. J. The
Diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a Vegetatively
Propagated Crop Species. **Molecular Phylogenetics and
Evolution**, Amsterdam, v. 21, n. 2, p. 285-293, 2001.

CARDOSO, S. R. S.; ELOY, N. B.; PROVAN, J.; CARDOSO,
M. A.; FERREIRA, P. C. G. Genetic differentiation of *Euterpe
edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. **Molecular
Ecology**, Oxford, v. 9, n. 11, p. 1753-1760, 2000.

CASSAS, A. M.; IGARTUA, E.; BALAGUER, G.; MORENO, M.
A. Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analyzed by RAPD

markers. **Euphytica**, Netherlands, v. 110, n. 1, p. 139-149, 1999.

CASTRO, C. M.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; MAIA, M. S.; MATTOS, L. A.; FREITAS, F. Morphological and molecular characterization of italian ryegrass populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.3, n.4, p.245-254, 2003.

CERVERA, M. T.; CABEZAS, J. A.; SANCHA, J. C.; TODA, F. M.; ZAPATER, J. M. M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, n. 1-2, p. 51-59, 1998.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Georgia, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

DETTORI, M. T.; PALOMBI, M. A. Identification of *Feijoa sellowiana* Berg accessions by RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 86, n. 4, p. 279-290, 2000.

DONADIO, L.C.; MÔRO, F.V.; SERVIDONE, A.A. **Frutas brasileiras**. Jaboticabal: Novos Talentos, 2002. 288 p.

DOYLE, J. J; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh

tissue. **Focus**, Gaithesburg, v. 12, p. 13-15, 1987.

DRUMMOND, R. S. M.; KEELING, D. J.; RICHARDSON, T. E.; GARDNER, R. C.; WRIGHT, S. D. Genetic analysis and conservation of 31 surviving individuals of a rare New Zealand tree, *Metrosideros bartlettii* (Myrtaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 1149-1157, 2000.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; RASEIRA, M. C. B.; VIGHI, I. L.; ROCHA, P. S. G.; WENDT, S. N. Viabilidade de marcadores moleculares RAPD na avaliação da diversidade genética em plantas de araçazeiro. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 8, n. 2, p.101-106, 2003.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes – application to human mitochondrial-DNA restriction data. **Genetics**, Maryland, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p.

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p.

377-420.

GREGOR, D.; HARTMANN, W.; STÖSSER, R. Cultivar identification in *Prunus domestica* using random amplified polymorphic DNA markers. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 259, p. 33-40, 1994.

JACQUEMYN, H.; VANDEPITTE, K.; BRYNS, R.; HONNAY, O.; ROLDÁN-RUIZ, I. Fitness variation and genetic diversity in small, remnant populations of the food deceptive orchid *Orchis purpurea*. **Biological Conservation**, Essex, v. 139, n. 1-2, p. 203-210, 2007.

LAURENTIN, H. E.; KARLOVSKY, P. Genetic relationship and diversity in a sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm collection using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **BMC Genetics**, London, v. 7, 2006. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/7/10>>. Acesso em: 02 abr. 2008.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Boston, v. 44, n. 3, p. 397-401, 1989.

LUGHADHA, E. N.; PROENÇA, C. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). **Annals of the Missouri**

Botanical Garden, St. Louis, v. 83, n. 4, p. 480-503, 1996.

MARGIS, R.; FELIX, D.; CALDAS, J. F.; SALGUEIRO, F.;
ARAÚJO, D. S. D.; BREYNE, P.; VAN MONTAGU, M.;
OLIVEIRA, D. de; MARGIS-PINHEIRO, M. Genetic differentiation
among three neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.)
populations within the Brazilian Atlantic rain forest. **Biodiversity
and Conservation**, London, v. 11, n. 1, p. 149-163, 2002.

MARKERT, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: issue,
ontogenetic and species specific patterns. **Proceedings of the
National Academy of Sciences of the United States of America**,
Washington, v. 45, n. 5, p. 753-763, 1959.

MWASE, W.F.; BJORNSTAD, A.; STEDJE, B.; BOKOSI, J.M.;
KWAPATA, M.B. Genetic diversity of *Uapaca kirkiana* Muel.
Arg. populations as revealed by amplified fragment length
polymorphisms (AFLPs). **African Journal of Biotechnology**,
Nairobi, v. 5, n.13, p.1205-1213, 2006.

MEHLENBACHER, S. A. Classical and molecular approaches to
breeding fruit and nut crops for disease resistance. **Hortscience**,
Alexandria, v. 30, n. 3, p. 466-477, 1995.

O'BRIEN, S. P.; CALDER, D. M. Reproductive-biology and floral
phenologies of the sympatric species *Leptospermum myrsinoides*
and *L. continentale* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**,

Collingwood, v. 41, n. 4-5, p. 527-539, 1993.

OUBORG, N. J.; PIQUOT, T.; GROENENDAEL, M. V. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, Durham, v. 87, n. 4, p. 551-568, 1999.

PIGATO, S. M. P. C.; LOPES, C. R. Avaliação da variabilidade genética em quatro gerações de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake por meio de marcador molecular RAPD. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 60, p. 119-133, 2001.

PROENÇA, C. E. B.; GIBBS, P. E. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. **New Phytologist**, Oxford, v. 126, n. 2, p. 343-354, 1994.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. New York: Exeter Software, 2000. 83 p.

SALGUEIRO, F.; FELIX, D.; CALDAS, J. F.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. **Diversity and Distributions**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 201-210, 2004.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da

variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.).
Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p.15-22, 2002.

SHAPCOTT, A. Vagility and the monsoon rain forest archipelago of northern Australia: patterns of genetic diversity in *Syzigium nervosum* (Myrtaceae). **Biotropica**, Washington, v. 31, n. 4, p. 579-590, 1999.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C.; RASEIRA, M. C. B.; VIGHI, I. L.; ROCHA, P. S. G.; BRAGA, E. J. B. Viabilidade do uso de marcadores RAPD, na avaliação de diversidade genética em seleções de pitangueira, pertencentes ao banco de germoplasma de fruteiras nativas da Embrapa Clima Temperado. **Simiente**, Santiago del Chile, v. 72, n. 3-4, p. 146, 2002.

SILVA, A. L. G.; PINHEIRO, M. C. B. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, DF, v. 21, n. 1, p. 235-247, 2007.

SILVA, A. L. G. **Biologia reprodutiva de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae)**. 2006. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by

objective methods. **Taxon**, Berlin, v. 11, n. 1, p. 30-40, 1962.

UPADHYAY, A.; JAYADEV, K.; MANIMEKALAI, R.;
PARTHASARATHY, V.A. Genetic relationship and diversity in
Indian coconut accessions based on RAPD markers. **Scientia
Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, n. 3-4, p. 353-362, 2004.

VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA,
M. M.; MALDONADO, J. F. M.; JÚNIOR, A. T. A. Diversidade
genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo
(*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras
nativas determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de
Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 489-493, 2003.

VIEIRA, E. A.; NODARI, R. O.; DANTAS, A. C. M.;
DUCROQUET, J. P. H. J.; DALBÓ, M.; BORGES, C. V. Genetic
mapping of Japanese plum. **Crop Breeding and Applied
Biotechnology**, Londrina, v. 5, n. 1, p. 29-37, 2005.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. V.;
HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KULPER,
M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.
Nucleic Acids Research, London, v. 23, n. 21, p. 4407-4414,
1995.

WANG, X. L.; CHIANG, T. Y.; ROUX, N.; HAO, G.; GE, X. J.
Genetic diversity of wild banana (*Musa balbisiana* Colla) in China

as revealed by AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 54, n. 5, p. 1125-1132, 2007.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

YAMAGISHI, M.; SHIGEHITO, M.; NAKATSUKA, A.; ITAMURA, H. Identification of persimmon (*Diospyros kaki*) cultivars and phenetic relationships between *Dyospyros* species by more effective RAPD analysis. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 105, n. 2, p. 283-290, 2005.

ZHU, J. ; GALÉ, M. D.; QUARRIE, S.; JACKSON, M. T.; BRYAN, G. J. AFLP markers for the study of rice biodiversity. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 96, n. 5, p. 602-611, 1998.

