

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

DIEGO ALBINO MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE
JABUTICABEIRAS DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DA
UTFPR COM MARCADORES MICROSSATÉLITES**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2013

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

DIEGO ALBINO MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE
JABUTICABEIRAS DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DA
UTFPR COM MARCADORES MICROSSATÉLITES**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2013

DIEGO ALBINO MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE
JABUTICABEIRAS DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DA
UTFPR COM MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Américo Wagner
Júnior

Co-Orientador: Prof. Dr. Alessandro
Jaquiel Waclawovsky

PATO BRANCO

2013

M386c	<p>Martins, Diego Albino Caracterização molecular de acessos de jabuticabeiras do banco ativo de germoplasma da UTFPR com marcadores microsátélites / Diego Albino Martins. Pato Branco. UTFPR, 2013 70 f. : Il. ; 30 cm</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Américo Wagner Júnior Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro Jaquiel Waclawovsky</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Pato Branco, 2013.</p> <p>1. Germoplasma. 2. Plinia sp. 3. Marcador molecular . I. Wagner Júnior, Américo, orient. II. Waclawovsky, Alessandro Jaquiel, co-orient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 22.ed. 630</p>
-------	--

Ficha Catalográfica elaborada por:

Bibliotecária CRB 9^ª/770

Biblioteca da UTFPR - Câmpus Pato Branco



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Gerência de Ensino e Pesquisa
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 089

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE JABUTICABEIRAS DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DA UTFPR COM MARCADORES MICROSSATÉLITES

por

DIEGO ALBINO MARTINS

Dissertação apresentada às oito horas e trinta minutos do dia dezesseis de dezembro de dois mil e treze, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari
UFSC/FLN

**Prof. Dr. Alessandro Jaquiel
Waclawovsky**
UTFPR/DV

Prof. Dr. Idemir Citadin
UFPR/PB

Prof. Dr. Américo Wagner Júnior
UTFPR/DV
Orientador

Visto da Coordenação:

Prof. Dr. Idalmir dos Santos
Coordenador do PPGAG

* O termo de aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGAG.

Dedicatória

À sociedade brasileira, que financia meus estudos desde o jardim de infância até aqui. Que os resultados desse trabalho possam servir na construção de um mundo melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pelo incentivo aos estudos e por me ensinarem a dar valor a essa saga e que hoje me permite estar aqui.

Agradeço a minha noiva Daniela Lauermann pelo apoio e incentivo nesse período e a companhia ocasional nas viagens até Pato Branco.

Agradeço imensamente a meu orientador Américo Wagner Júnior e meu co-orientador Alessandro Jaquiel Waclawovsky pelo apoio, orientação, e acompanhamento constante.

Agradeço a Denise Olkoski e ao prof., Rubens Nodari, por terem disposto de sua estrutura, tempo e conhecimento no auxílio a execução deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Cosme Damião Cruz da Universidade Federal de Viçosa pelo auxílio no processamento dos dados.

Agradeço ao PPGAG, e por extensão aos colegas e professores com quem compartilhei esse período, por terem me proporcionado tantos momentos de aprendizagem.

Uma ciência empírica privada de reflexão e uma filosofia puramente especulativa são insuficientes; consciência sem ciência e ciência sem consciência são radicalmente mutiladas e mutilantes.”
(Edgar Morin Ciência com Consciência).

RESUMO

MARTINS, Diego. Caracterização molecular de acessos de jabuticabeiras do banco ativo de germoplasma da UTFPR com marcadores microssatélites. 70f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2013.

O Brasil é país detentor de grande biodiversidade, no entanto pequena parcela dessa já foi estudada e catalogada. Os recentes avanços antrópicos sobre os ecossistemas naturais tem levado a sua rápida fragmentação e eliminação de alguns biótipos ainda não estudados ou catalogados. Nessa realidade de erosão genética acelerada encontra-se também espécies de jabuticabeira (*Plinia* sp.) que são endêmicas do Centro Sul/Sudoeste do Paraná, no ecossistema Floresta com Araucária. Medidas de conservação de germoplasma para uso atual e futuro, bem como táticas de manejo e conservação dos recursos naturais são preponderantes para reduzir ao mínimo os danos causados a biodiversidade brasileira. Para tanto é necessário entender a diversidade genética existente nos ecossistemas naturais, que é o insumo básico para a sobrevivência e evolução entre os indivíduos frente as modificações ambientais. No presente trabalho foi realizada a caracterização genética de 110 jabuticabeiras que constituem o banco ativo de germoplasma desta espécie na UTFPR – Câmpus Dois Vizinhos. Foi possível identificar a transferibilidade de 9 marcadores moleculares microssatélites (SSR) com caráter polimórfico para a população estudada, e realizar a padronização de reação de PCR para cada um deles. Da análise das jabuticabeiras do banco ativo de germoplasma chegou-se a conclusão de que o mesmo abrigou valor considerável de diversidade alélica. No entanto tal diversidade está mal distribuída, já que 11 indivíduos sozinhos já são capazes de representar 59,2% de todos alelos da coleção de 110 plantas. Os valores encontrados de heterozigosidade observada e conteúdo informativo (PIC) nessa subpopulação de 11 indivíduos foram superiores aos valores encontrados para o conjunto integral do banco ativo. O agrupamento dos indivíduos mostrou a existência de 8 diferentes grupos, sendo que 89 indivíduos ficaram no grupo 1, demonstrando o seu possível grau de parentesco e baixo nível de diversidade genética.

Palavras-chave: *Plinia* sp. Germoplasma. Marcador molecular.

ABSTRACT

MARTINS, Diego Albino. Molecular characterization of accessions jabuticaba tree fruit of germoplasm bank from UTFPR with microsatellite markers. 70f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Federal University of Technology - Paraná. Pato Branco, 2012.

Brazil is a country of great biodiversity holder, however small portion of that has been studied and cataloged. Recent advances human activities on natural ecosystems has led to its rapid fragmentation and elimination of some biotypes still, not it studied or cataloged. In this reality of genetic erosion is also accelerated jabuticaba tree species (*Plinia* sp.). That are endemic from South Central / Southeastern Paraná State, in Araucaria forest ecosystem. Germplasm conservation measures for current and future use, as well as tactics for management and conservation of natural resources are crucial to minimize the damage caused to Brazilian biodiversity. So it is necessary to understand the genetic diversity in natural ecosystems, which is the basic input for the survival and evolution among individuals facing environmental changes. In the present study was to characterize genetic of 110 jabuticaba tree fruit, that constitute the germoplasm bank of jabuticaba tree fruit from UTFPR - Câmpus Dois Vizinhos. It was possible to identify transferability of 9 microsatellite markers (SSR) with polymorphic character for the population studied, and it carry out standardization of PCR reaction for each of them. The analysis of plant germoplasm bank came to the conclusion that houses a considerable amount of allelic diversity, but this diversity is poorly distributed, since 11 individuals alone are already able to represent 59.2% of all alleles of the collection of 110 plant. The found values of, observed heterozygosity and information content (PIC) in this subpopulation of 11 individuals were higher than the values found for the full set of the germoplasm bank. The grouping of individuals showed the existence of 8 different groups, and 89 subjects were in group 1, demonstrating a possible relationship and low level of genetic diversity.

Keywords: *Plinia* sp. Germplasm. Molecular Marker.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01A - Cuba e fonte utilizada para eletroforese em gel de poliacrilamida. Fonte: Martins, D.A..	25
Figura 01B - Cuba utilizada para eletroforese em gel de agarose. Fonte: VIEIRA, 2013.....	25
Figura 02 – Jaboticabeira pertencente ao BAG UTFPR/DV. Fonte: WAGNER JÚNIOR,A.....	28
Figura 03 – Remanescentes florestais do Sudoeste do PR onde foram coletados acessos de jaboticabeira. Fonte: DANNER, 2009.....	29
Figura 04 – Envelope utilizado para coleta e armazenamento de folhas com silica gel. Fonte: MARTINS, D.A.....	30
Figura 05 - Protocolo para extração de DNA utilizando o kit nucleo spin plant II. Fonte: Martins, D.A.	31
Figura 06 – Termociclador utilizado na amplificação das amostras de DNA e no detalhe o programa de amplificação utilizado. Fonte Martins, D.A.....	34
Figura 07 – Amplificação de loci polimórficos do marcador PLI 07 em gel de agarose sob iluminação ultravioleta. Fonte: Martins, D.A.....	35
Figura 08 – Sequenciador automático MegaBace e no detalhe corrida eletroforética em andamento. Fonte Martins, D.A.....	39
Figura 9 – Observação de gel de agarose sob luz ultravioleta mostrando resultado de PCR com problemas para o primer FSE_4. Fonte: Martins, D.A.....	42
Figura 11 - Matriz de similaridade entre acessos do banco ativo de germoplasma de Jaboticabeiras da UTFPR - Câmpus Dois Vizinhos, organizada a partir de dados de sistância intra e inter grupo. Fonte: Martins, D.A.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informações referentes aos 14 remanescentes florestais de coleta de sementes de jabuticabeira. Adaptado de DANNER, 2009.....	29
Tabela 2: Croqui representativo da disposição das jabuticabeiras no banco ativo de germoplasma da UTFPR – Câmpus Dois Vizinhos.....	37
Tabela 3: Marcadores SSR, sequência nucleotídica, temperatura de anelamento e tipo de fluorescência utilizada para leitura.....	38
Tabela 4: Diversidade alélica e quantidade de jabuticabeiras genotipadas em cada locus microsatélite estudado.....	44
Tabela 5: Valores de Heterozigosidade esperada (He), Heterozigosidade observada (Ho) e poder informativo (PIC) para cada locus analisado do banco ativo de germoplasma de jabuticabeiras da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos.....	45
Tabela 6: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homozigotos e heterozigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador PLI_01 do banco ativo de germoplasma de jabuticabeiras UTFPR/DV.....	46
Tabela 7: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homozigotos e heterozigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador PLI_05 do banco ativo de germoplasma de jabuticabeiras UTFPR/DV.....	47
Tabela 8: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homozigotos e heterozigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador PLI_07 do banco ativo de germoplasma de jabuticabeiras UTFPR/DV.....	48
Tabela 9: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homozigotos e heterozigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador PLI_12 do banco ativo de germoplasma de jabuticabeiras UTFPR/DV.....	49
Tabela 10: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homozigotos e heterozigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador PLI_15 do banco ativo de germoplasma de jabuticabeiras UTFPR/DV.....	49
Tabela 11: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homozigotos e heterozigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador PLI_16 do banco ativo de germoplasma de jabuticabeiras UTFPR/DV.....	50
Tabela 12: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homozigotos e heterozigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador PLI_18 do banco ativo de germoplasma de jabuticabeiras UTFPR/DV.....	51
Tabela 13: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homozigotos e heterozigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador FSE_16 do banco ativo de germoplasma de jabuticabeiras UTFPR/DV.....	52
Tabela 14: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homozigotos e heterozigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador FSE_4 do banco ativo de germoplasma de jabuticabeiras UTFPR/DV.....	52
Tabela 15: Jabuticabeiras portadoras de alelos raros ou com frequência < que 3% para cada loci microsatélite avaliado.....	53

Tabela 16: Parâmetros calculados para população hipotética formada pelos 11 indivíduos de jabuticabeira com alelos de baixa frequência no maior número de loci.....55

Tabela 17: Agrupamento de Toucher realizado com os 110 genótipos de jabuticabeira do banco ativo de germoplasma da da UTFPR – Câmpus Dois Vizinhos.....58

LISTA DE SIGLAS

SSR	Simple Sequence Repeat
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
UFV	Universidade Federal de Viçosa
PCR	Reação em cadeia da polimerase
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DNA	Ácido desoxirribonucléico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Considerações Gerais sobre a Jabuticabeira.....	16
2.2 Ecossistema floresta com araucária e dispersão natural das jabuticabeiras.....	18
2.3 Biodiversidade vegetal e bancos de germoplasma.....	19
2.4 Marcadores microssatélites (SSR) para caracterização molecular vegetal.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Coleta de material vegetal e extração de DNA.....	28
3.2 Transferibilidade de marcadores microssatélites.....	32
3.3 Amplificação de DNA via PCR e genotipagem dos genótipos.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
4.1 Coleta de tecido vegetal e extração de DNA.....	40
4.2 Transferibilidade de marcadores microssatélites.....	41
4.3 Genotipagem do BAG Jabuticabeiras UTFPR – CÂMPUS DOIS VIZINHOS.....	43
4 CONCLUSÕES.....	62
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca por ser um dos principais centros de diversidade genética de fruteiras silvestres do mundo. Entretanto, muito pouco se conhece sobre a grande maioria destas espécies. Porém muitas dessas fruteiras apresentam potencial para exploração econômica. Dentre elas cabe citar especialmente as plantas da família Myrtaceae, de grande diversidade e na qual Sobral (2003) catalogou 109 espécies no Estado do Rio Grande do Sul.

Dentro desta família assume especial importância as jabuticabeiras, encontradas no ecossistema floresta com araucária, importante ecossistema presente no Estado do Paraná e que está sob forte degradação devido a ação antrópica.

Esse rápido avanço da degradação dos ambientes naturais tem levado a erosão genética de espécies, como pode ser visto na listas de espécies de *Myrtaceae* ameaçadas no Brasil e divulgadas pela Biodiversitas (2006), o que gera maior preocupação.

Desse modo, a conservação dos recursos genéticos das fruteiras nativas da região é primordial quando se pensa em estratégias de redução dos danos já causados ao meio ambiente e da falta de informações técnicas necessárias para tornar realidade esse potencial.

No Brasil, mesmo sendo as jabuticabeiras encontradas em muitos “fundos de quintais”, existe atualmente poucos bancos de germoplasma. Nosso país, por ser o centro de origem da jabuticabeira (*Plinia* sp. Berg) e deter ampla variabilidade genética desta espécie, não pode basear-se apenas em poucos ou quase inexistentes bancos de germoplasma.

Recentemente, a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Pato Branco fez a caracterização morfogenética de jabuticabeiras coletadas em 14 fragmentos da região Sudoeste do Paraná, encontrando-se o mesmo ainda em avaliação. Por meio das sementes coletadas em cada centro, foi possível obter-se mudas que permitiram a criação do banco de germoplasma na UTFPR Câmpus Dois Vizinhos, em 2009.

Porém a dúvida que existe é se há ou não variabilidade genética entre os acessos coletados dentro e entre os fragmentos e que hoje constituem-se nos principais genótipos do banco de germoplasma da UTFPR – Câmpus Dois Vizinhos.

Essa caracterização torna-se importante e essencial para o início do desenvolvimento dos trabalhos de melhoramento genético com essa cultura na UTFPR, uma vez que a variabilidade genética é matéria prima para o melhorista, possibilitando avanços de acordo com a escolha dos genitores para uso na hibridação controlada, que permitirão gerar progênies superiores.

Além disso, com esta caracterização pode-se conhecer um pouco mais a biologia desta espécie e buscar melhor orientação para sua preservação com a criação da rede de conservação *on farm* na região, além de permitir potencializar seu uso na fruticultura comercial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A JABUTICABEIRA

As jabuticabeiras (*Plinia* sp.) compreendem conjunto de nove espécies botânicas, todas pertencentes a família Myrtaceae. Dessas espécies, apenas três são comumente utilizadas em áreas que não envolvem a mata, com outras seis localizadas em sítios de pesquisa (cinco espécies) ou considerada como extinta (uma espécie) (CITADIN, 2010). Das espécies mais comumente encontradas destacam-se a jabuticabeira Sabará [*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg] como mais conhecida e utilizada, principalmente na região Sudeste brasileira, a jabuticabeira de Cabinho [*Plinia trunciflora* (Berg) Mattos]; e a jabuticabeira paulista [*Plinia cauliflora* (DC.) Berg] como mais comuns do sul do país.

A classificação botânica de cada uma dessas espécies ainda concentra dificuldades, especialmente devido ao pequeno número de pesquisadores dedicados a esse tema no Brasil (DANNER, 2009). Contudo, alguns estudos vem sendo realizados, com importância para aqueles que envolvem o desenvolvimento da espécie em seu local de origem, pois estes determinam parâmetros edáficos e fenológicos que nortearão o desenvolvimento comercial da cultura, ou seja, a criação de pomares.

Danner (2009), avaliando áreas de ocorrência natural da jabuticabeira na região Sudoeste do Paraná inferiu que estas plantas são adaptadas a desenvolverem-se naturalmente em solos ácidos e com baixa saturação de bases, especialmente para a espécie *P. cauliflora*. Além disso o sistema radicular desta fruteira foi caracterizado como superficial, fato evidenciado no tombamento de plantas solitárias remanescentes de coberturas florestais, o que deve fazer com que nos plantios comerciais ocorra maior atenção com a realização das práticas de manejo do solo.

Em seu ambiente natural a jabuticabeira pode apresentar até duas safras anuais, ocorrendo no ecossistema Floresta com Araucária a safra em setembro/outubro e a safrinha em março/abril. Além da importância de sua frutificação para a fauna silvestre e como potencial econômico ainda pouco

explorado apresenta também importância apícola (BRAGA et al., 2013), pois sua floração da safrinha (março/abril) coincide com época de baixa disponibilidade florífera para as abelhas.

Apesar da produção comercial ser quase que inexistente, seu potencial de utilização é grande. Os frutos produzidos tem boa aceitabilidade de mercado quando destinados ao consumo *in natura* ou a agroindustrialização, sendo neste último caso por meio da elaboração de geleias, licores, vinagres e bebidas fermentadas. Existe também a potencialidade para indústria farmacêutica, pois os frutos apresentam altos conteúdos de substâncias antioxidantes (CITADIN, 2010), como taninos (MORTON, 1987), vitamina C (GIACOMETTI et al., 1994), flavonoides (DANNER et al., 2011a) e mais especificamente antocianinas em sua casca (SANTOS et al., 2010; DANNER et al., 2011a; GIACOMETTI et al., 1994; TERCI, 2004; ZANATTA et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2011) que a caracteriza como alimento funcional.

No que tange a quantidade dessas substâncias, Terci (2004) verificou alto conteúdo de antocianinas nos frutos de jabuticabeira, cujos teores ficaram entre 310 e 315 mg por 100 gr de fruto, valores estes superiores aos encontrados na uva e amora avaliadas no mesmo trabalho. A grande vantagem da atividade antioxidante demonstrada pela jabuticaba reside na capacidade que determinadas substâncias, especialmente as antocianinas, de inibirem e reduzirem as lesões celulares causadas por radicais livres, o que tem despertado o interesse crescente da população e da comunidade científica (SILVA et al., 2012).

Por estas características, a jabuticabeira mostra-se como fruteira de grande potencial para exploração econômica em pomares comerciais ou em áreas de reserva legal, já que é uma espécie nativa, possibilitando a recomposição desta área nas propriedades agrícolas, conforme define o código florestal brasileiro, gerando alternativas de exploração econômica para a agricultura familiar (MOREIRA et al., 2011; CITADIN, 2010).

Talvez o maior entrave para seu uso seja o período de juvenilidade que a planta apresenta quando oriunda de sementes, o que compreende de 12 a 15 anos. Contudo, apesar dessa desvantagem, ressalta-se em contrapartida a

vantagem de uma vez iniciada a produção é possível explorá-la economicamente por mais de 100 anos, fato que não ocorre com a maioria das espécies exóticas.

2.2 ECOSSISTEMA FLORESTA COM ARAUCÁRIA E DISPERSÃO NATURAL DAS JABUTICABEIRAS

A Floresta com Araucária é considerada ecossistema pertencente ao Bioma Mata Atlântica. Tal formação florestal é característica do Sul e do Sudeste brasileiro, em especial abrangendo o Estado do Paraná que tem 40% de sua área coberta com tal formação.

A principal característica desse ecossistema é a presença dominante do pinheiro brasileiro (*Araucaria angustifolia*) cuja copa se sobrepõe as demais árvores, conferindo a paisagem típica (APREMAVI, 2012).

Esse ecossistema ocupava originalmente área de 200.000 km². No entanto, tem sofrido constantes reduções como consequência da degradação ambiental causada pela ação antrópica. No Estado do Paraná, por meio do estudo realizado pelo PROBIO em 2004 (BRASIL, 2004), registrou-se que somente 0,8% da área original dessa formação florestal encontrava-se em estado avançado de regeneração, ou seja, com as condições e características originais. Portanto a situação atual é de clara fragmentação de remanescentes desse importante ambiente.

A regeneração da floresta com araucária está comprometida especialmente pelo hábito de entrada e permanência de animais domésticos nessas áreas, bem como as roçadas anuais realizadas e a proximidade que os remanescentes guardam de áreas urbanas (DANNER, 2009). A fragilidade de recuperação desse ambiente resulta também na fragilidade da conservação do germoplasma original de muitas espécies nativas, como as jabuticabeiras.

Trabalhos na literatura sobre a dispersão de sementes de jabuticabeiras são escassos. Porém nas análises realizadas por Danner (2009) em agrupamentos dessas plantas na Mata Atlântica, indicaram que distâncias de 60km já são suficiente para impedir a dispersão das sementes entre remanescentes diferentes.

Soma-se ao fato da dificuldade de dispersão, a baixa viabilidade das sementes de jabuticabeira, determinada por sua condição recalcitrante, que resulta em perda de poder germinativo 5 dias após extração dos frutos (AMBRÓSIO et al., 2008).

Como consequência disso, observa-se a ocorrência da jabuticabeira em ambientes naturais normalmente concentradas, não sendo comum a ocorrência de plantas isoladas, o que pode sugerir o provável grau de parentesco entre as plantas de cada agrupamento.

Tal estratégia de dispersão não generalizada parece ser antiga, podendo ter influência de ação antrópica, principalmente pelos indígenas que viviam na região, mesmo que essa possa ter agido posteriormente na seleção e eliminação de genótipos de acordo com o interesse de exploração e conservação.

Aliado a ações que diminuam o ritmo de degradação deste ecossistema, é necessário, como medida de segurança, a implantação e condução de bancos de germoplasma, seja através do armazenamento de sementes, plantas *in vitro*, ou mesmo plantas *in vivo*, para evitar os riscos de erosão genética.

2.3 BIODIVERSIDADE VEGETAL E BANCOS DE GERMOPLASMA

O Brasil é o país com a maior biodiversidade genética vegetal do planeta, com total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies. No entanto, pequena porção dessas espécies já foi estudada, bastando para isso perceber que dessa totalidade de plantas somente 55.000 estão catalogadas (NODARI et al., 2008).

Ao conjunto do material genético de determinada espécie, que é herdável entre os indivíduos, e portanto constitui sua base genética, é denominado germoplasma (FERREIRA, 2011)

A identificação e correta caracterização da diversidade genética de espécies e/ou local é o passo inicial para sua posterior utilização em programas de melhoramento genético vegetal, podendo resultar em ganhos econômicos (DANNER et al., 2011a). Nodari et al. (2008) descreveram que um gene com potencial de utilização nos países do Sul representam negócios na ordem de U\$\$ 1 bilhão nos

países do Norte, sendo tal evidência concretizada ao observar a contribuição do germoplasma do Sul em U\$\$ 66 bilhões na economia anual dos Estados Unidos.

Apesar da importância econômica oriunda da diversidade genética e por consequência de sua preservação, a situação atual demonstra clara crise ambiental, oriunda da forma predatória como os recursos naturais estão sendo tratados e consumidos, subordinados aos interesses econômicos (LUCION et al., 2006). Muitas plantas estão sendo perdidas antes mesmo de serem manipuladas e utilizadas pela complexo agroflorestal, permitindo perdas irreparáveis, especialmente quando se considera a quantidade de espécies pertencentes a biodiversidade brasileira que não foi domesticada (FERREIRA, 2011)

No Estado do Paraná, que concentra a maior parte do ecossistema Floresta com Araucária, pode-se perceber que vem ocorrendo fragmentações ao longo dos anos e por consequência a ocorrência de erosão genética do germoplasma vegetal original, abrangendo entre outras espécies, as fruteiras nativas, incluindo-se aquelas da família Myrtaceae.

Entre tais fruteiras figuram-se as jabuticabeiras que são endêmicas do Centro Sul/Sudeste do Brasil, podendo ser encontradas de maneira natural no ecossistema Floresta com Araucária. A espécie apresenta grande potencial de utilização econômica através de seu cultivo. No entanto, atualmente, a produção comercial ainda é restrita e insignificante, prevalecendo-se o extrativismo (DANNER et al., 2011a).

Um dos fatores que leva a esse baixo índice de exploração econômica pode estar vinculado com a baixa disponibilidade de material genético, já que estudos de variabilidade genética e conservação de germoplasma são pontos iniciais na domesticação de vegetais e uso racional dos recursos genéticos existentes (DANTAS et al., 2012), sendo ainda escassos para as espécies do gênero *Plinia*.

A pesquisa básica e tecnológica das espécies de jabuticabeira é o passo inicial para possibilitar sua domesticação e consequentemente ampliar seu cultivo comercial, que ainda é incipiente e se existente limitada a determinadas regiões, estando presente em pomares caseiros (CITADIN et al., 2010). Para isso,

deve-se partir para introdução de material superior ainda selecionado na mata, pois com esta fruteira não existem ainda programas de melhoramento.

Assim, torna-se importante a busca e o estudo da variabilidade genética existente em seus centros de origem, que servirão de matéria-prima para o melhorista e para introdução nos primeiros plantios comerciais.

Normalmente em seu habitat natural, as espécies vegetais possuem alto nível de variabilidade genética, pois isso é característica essencial para manutenção das populações ao longo dos tempos, culminando em sua habilidade de sobrevivência durante a evolução (MEDEIROS, et al., 2006). Considerando-se a importância que os recursos genéticos vegetais desempenham para adequada produção agrícola, sua conservação é essencial (CARNEIRO et al., 2010), sendo uma das técnicas possíveis de ser utilizada visando amenizar o processo de erosão genética, a criação de bancos de germoplasma, que são locais onde se pretende armazenar a representação da variabilidade genética de determinada espécie.

Para o caso específico das espécies frutíferas, este é feito normalmente em condições de cultivo em campo, sendo este o método utilizado para 93% dos acessos em coleções de germoplasma no mundo, conforme dados citados por Ferreira (2011).

A conservação de germoplasma em condições de campo demanda o uso de extensas áreas, além da necessidade elevada de recursos humanos para manter e conduzir tais coleções (VALOIS et al., 2001). Portanto, estas coleções devem ser planejadas de forma a armazenar a maior diversidade possível em menor número de indivíduos de forma a otimizar o uso dos recursos disponíveis e manter a função primordial do banco de germoplasma, que é o de abrigar o máximo da diversidade existente para determinada espécie.

Para garantir que o objetivo proposto para tais coleções seja alcançado é essencial conhecer e caracterizar a diversidade que ali está abrigada. No caso específico das jabuticabeiras, a escassez de dados aliada ao seu potencial de uso, bem como sua importância ambiental e conseqüentemente conservacionista, atesta a importância da promoção de programas de caracterização e conservação de seu germoplasma.

2.4 MARCADORES MICROSSATÉLITES (SSR) PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR VEGETAL

Apesar de que a domesticação de plantas para uso humano não ser prática recente, já que a seleção de plantas é realizada desde que se inicia a prática agrícola mesmo que de forma empírica, o uso de estudos de variabilidade genética é uma das ferramentas que permite otimizar e acelerar o processo, já que identifica um dos insumos básicos para a seleção de plantas, a existência de variabilidade genética, que junto com a “herdabilidade das características” constituem-se as bases da seleção e melhoramento de plantas (ROCHA et al., 2003).

Além de promover o uso eficiente do germoplasma disponível, o conhecimento do nível de dissimilaridade existente entre os genótipos permite a organização de coleções de germoplasma e a manutenção de indivíduos que abriguem alta diversidade, podendo conter materiais genéticos que venham a ser úteis futuramente com a doação de alelos adaptados a determinadas condições ambientais e adversidades que venham a surgir (CARVALHO, et. al., 2008).

Para o êxito de programas de conservação de espécies vegetais, como jabuticabeira, torna-se essencial a elaboração de estudos envolvendo a caracterização genética, aliado a isso a determinação dos fatores evolutivos de manutenção de sua estrutura populacional. Parâmetros genéticos são úteis para detectar populações com diferentes amplitudes de variabilidade genética e que portanto podem necessitar diferentes estratégias para sua conservação (FERREIRA, 2008). Tais estudos entre populações naturais são considerados a base de programas de conservação, já que a manutenção dessa diversidade é justamente a base sobre a qual se apoia a capacidade evolutiva e adaptativa das espécies (GALETTI et al., 2008).

Para jabuticabeira a maioria dos resultados encontrados na literatura referem-se a diversidade encontrada na caracterização de frutos, que via de regra demonstram resultados de grande variabilidade, mesmo entre genótipos de mesma espécie (DANNER, 2009). Um dos limitantes no uso desse tipo de descritor morfofenológico é a elevada influência ambiental que sofre a planta e o fruto (FILHO et al., 2013), o que pode levar a conclusões incorretas, já que o fenótipo expresso, nem sempre será capaz de representar adequadamente o genótipo do indivíduo

analisados, principalmente se baseado na qualidade do fruto, que é influenciada diretamente pelo clima.

Estes marcadores morfofenológicos, foram largamente utilizados próximo a década de 60, no entanto além de sofrerem influência ambiental conforme ressaltado, o que pode comprometer os resultados alcançados, geralmente demandam gastos excessivos de tempo e de recursos para sua execução (BIANCHI et al., 2004).

Tais complicações, seja do risco de efeito ambiental que mascare o genótipo, ou mesmo o tempo que pode se ter que esperar para fazer avaliações, especialmente no caso das fruteiras que apresentam longo período de juvenildade, podem ser eliminados com o uso de marcadores moleculares para análise da diversidade entre os genótipos (CARVALHO et al., 2008). O uso de marcadores moleculares é considerado uma das técnicas mais eficientes para caracterizar coleções de germoplasma (DANTAS et al., 2012), já que permite avaliar a diversidade existente entre os acessos diretamente em nível de DNA e associar aos indivíduos analisados em grupos que reflitam a diferença e/ou a semelhança entre estes (WEILER et al., 2010).

Entre as distintas classes de marcadores existentes, os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e os microssatélites são os mais utilizados para caracterização de diversidade em plantas (FILHO et al., 2013).

Atualmente os marcadores mais recomendados tem sido aqueles baseados em amplificação de regiões microssatélites, especialmente em estudos de caracterização varietal para fins de conservação de germoplasma (DANTAS et al., 2012), identificação *fingerprint* (FALEIRO, 2007) e programas de melhoramento vegetal (SILVA et al., 2008), por terem se mostrado bastante eficientes e precisos em detectar a diversidade genética.

Outra grande vantagem dos marcadores baseados em microssatélites é seu alto conteúdo informativo, sendo este determinado com eficiência de 3 a 4 vezes maior do que os marcadores RFLPs utilizados em alguns estudos (NODARI et al., 2008).

Os marcadores microssatélites são também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*), cuja técnica é baseada na existência de regiões

repetidas no genoma de eucariotos. Essas sequências repetidas têm entre 1 e 6 nucleotídeos e são repetidas continuamente, com a determinação do polimorfismo ocorrendo justamente com base na diferença do número de vezes que essa sequência é repetida (BUSO, et al., 2003). Tais regiões apresentam ampla variação entre indivíduos, apresentando taxas de mutação superiores ao restante do genoma, que foi estimada por Oliveira (2006), em 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos/loco/geração.

A alta variabilidade das regiões microssatélites, parece ter origem predominante em deslizamentos da enzima DNA-polimerase durante a replicação da fita de DNA, que culmina em adições ou deleções de unidades individuais de repetição (BLANKENSHIP et al., 2002). No entanto as regiões que flanqueiam o microssatélite são bastante conservadas, mesmo entre espécies, sendo únicas para cada região SSR. Esse fato é o que permite o uso de iniciadores (*primer's*) complementares a essas sequências com tamanho entre 18 e 24 nucleotídeos, para amplificar tais regiões específicas do DNA (HOFFMANN et al., 2006).

A amplificação do DNA ocorre graças ao uso da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que permite a obtenção de grande número de cópias idênticas de determinado fragmento de DNA, através de ciclos sucessivos de mudança de temperatura. Tais ciclos levam a desnaturação da fita de DNA e sua abertura, seguindo-se do uso de temperatura adequada ao anelamento dos marcadores nas regiões específicas e posterior mudança da temperatura para início da atividade da enzima taq-polimerase, que acrescenta nucleotídeos na fita complementar, completando a replicação da fita de DNA (SALLES et al., 2003)

Com o uso dos iniciadores que determinam a região de início e fim da amplificação do DNA, ao fim do processo ter-se-á grande quantidade de cópias idênticas do fragmento de interesse, o que permite sua separação através do campo elétrico, sendo normalmente realizado por meio do uso de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (FIGURAS 01 A e 01 B) (HOFFMANN et al., 2006).



Figura 01A - Cuba e fonte utilizada para eletroforese em gel de poliacrilamida. Fonte: Martins, D.A.

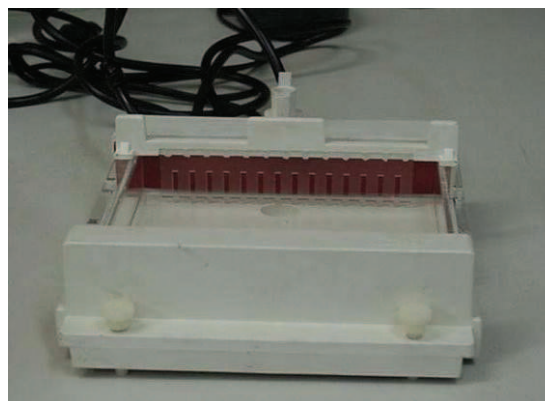


Figura 01B - Cuba utilizada para eletroforese em gel de agarose. Fonte: VIEIRA, 2013.

A carga global de uma fita de DNA é negativa. Portanto no campo elétrico com íons livres, os fragmentos do ácido nucléico ali presentes irão migrar em direção ao cátodo (positivo). Como os géis representam uma malha que dificulta a migração de tais fragmentos, quanto menor o fragmento, mais fácil esse se movimentará e mais lentamente se deslocará os fragmentos maiores. Dessa forma, através de comparação com padrão de tamanho conhecido, ou marcador de peso molecular (*Ladders*) é possível estimar o tamanho de cada fragmento e por consequência a diversidade de alelos entre os indivíduos (BUSO, et al., 2003)

Como as regiões microssatélites amplificadas através da PCR comumente são regiões não codificantes, esses marcadores são considerados neutros já que não sofrem influência de seleção natural, pois por não codificarem nenhuma proteína, sua existência não torna o indivíduos “menos” ou “mais” aptos para sobrevivência frente a fatores evolutivos, o que os torna especialmente favoráveis a estudos de caracterização, pois possibilita inferir em estudos de caracterização sobre a quantidade, a distribuição e a manutenção da variabilidade genética de determinado grupo de indivíduos (MEDEIROS et al., 2006).

Além de não sofrerem a influência ambiental, os SSR tem mostrado resultados altamente confiáveis e rápidos e têm sido utilizados em diversos estudos com vegetais (FALEIRO, 2007; FILHO, et al., 2013; DELLAGOSTIN, et al.; 2011; SANTOS et al., 2010) e especificamente com fruteiras (LEÃO et al., 2011; AMORIN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; SALLA, et al., 2002).

Para caracterizar variabilidade genética entre acessos de açaizeiro Oliveira et al., (2010) utilizaram sete *loci* SSR, no qual possibilitam caracterizar a variabilidade entre 116 acessos da coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, os separando em grupos de dissimilaridade e identificando os indivíduos mais divergentes, sendo estes com potencial para uso em cruzamentos dirigidos. Apesar do uso limitado de sete *loci* SSR foi conseguido poder informativo (PIC) médio de 0,75, demonstrando-se bom poder de discriminação dos marcadores SSR utilizados.

Avaliando sete variedades de abacateiro do banco de germoplasma da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), com o uso de 5 *loci* marcadores SSR, Martins et al. (2011) encontraram 18 alelos diferentes nesses 5 locus, conseguindo-se assim diferenciar os indivíduos e classificar um destes como raça pura e os demais dividi-los em dois subgrupos, identificados como raças de abacateiro.

Devido ao alto polimorfismo encontrado nesse tipo de marcador, por vezes mesmo com baixo número de *locus* SSR é possível distinguir genótipos, como relatado por Silva et al. (2008) que com uso de somente 3 pares de *primer's* SSR definiram o padrão de oito cultivares de mirtilo, permitindo concluir ao comparar com os resultados obtidos a partir de marcadores RAPD, que os *locus* SSR são mais precisos para identificar cultivares e servir de apoio a programas de melhoramento.

Amorim et al. (2008) ao analisar 38 diplóides de banana do programa de melhoramento da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, identificaram a eficiência dos SSR em classificar os genótipos segundo sua genealogia, tendo os resultados apontando para agrupamento entre indivíduos aparentados. No entanto, estes não foram totalmente eficientes em separar os genótipos silvestres dos melhorados.

O uso de SSR em fruteiras não serve somente para caracterizar acessos de coleções, mas tem outras funções como apresentado por Weiler et al. (2010) que a partir de progênies híbridas de tangerineiras as agruparam conforme a similaridade com os genitores, identificando aquelas mais próximas do parental masculino ou do feminino. Outro uso foi demonstrado por Leão et al. (2011) que caracterizaram um clone mutante da videira Itália selecionado inicialmente em

vinhedo comercial e comercializado como Itália Muscat, mas que no entanto, ao usar 7 locus SSR, não foi possível diferenciá-lo de sua cultivar original, demonstrando que em baixos níveis de diversidade, o uso de número maior de SSR pode ser requerido para conseguir dados confiáveis de agrupamento.

Para vários trabalhos com diferentes espécies fruteiras, os SSR têm se mostrado úteis, como pode ser observado para mamão (OLIVEIRA et al., 2008), acerola (SALLA et al., 2002), citros (CARNEIRO et al., 2010), pessegueiro e nectarineira (BIANCHI et al., 2004) entre outras espécies comerciais.

Na família botânica Myrtaceae, que constitui importante grupo de fruteiras nativas do Bioma Floresta com Araucária, apesar de existirem alguns estudos moleculares em populações naturais (CARDOSO et al., 2000; DRUMMOND et al., 2000; GUSSON et al., 2006), na literatura para jabuticabeira os dados são escassos. Cabe citar Pereira et al. (2005), que utilizaram marcadores RAPD, possibilitando obter diferenças moleculares entre as plantas, as quais foram agrupadas em quatro grupos distintos. Ressalta-se o fato de que o RAPD é considerado pouco informativo e com baixo índice de polimorfismo comparativamente aos marcadores baseados em microsátélites.

Considerando-se a utilidade dos marcadores SSR, aliado a necessidade urgente de preservação dos recursos genéticos de jabuticabeira, seja como estratégia conservacionista, ou para futuros programas de melhoramento genético, torna-se óbvio a importância do uso dessa técnica para caracterização da diversidade dessa espécie em seu ambiente natural, para caracterização de acessos que possam ser mantidos e preservados em coleções de germoplasma, garantindo uma salvaguarda frente aos processos de erosão genética.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DE MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DE DNA

Foram analisados indivíduos de três espécies de jaboticabeiras (*Plinia cauliflora*, *Plinia jaboticaba* e *Plinia trunciflora*) oriundos da coleção de fruteiras nativas da UTFPR - Câmpus Dois Vizinhos (Figura 2). Essa coleção foi implantada em novembro de 2009, utilizando-se mudas obtidas pela via seminífera, de frutos coletados de 14 fragmentos da região Sudoeste do Paraná (DANNER, 2009), cuja descrição do local de coleta estão apresentados na Tabela 1 e Figura 3. Além dos acessos oriundos da região Sudoeste existem 13 indivíduos que foram obtidos da coleção da Universidade Federal de Viçosa (MG).

O plantio foi no espaçamento 6m x 6m, recebendo atualmente os tratos culturais necessários para seu bom desenvolvimento, conforme Manica (2002).



Figura 02 – Jaboticabeira pertencente ao BAG UTFPR/DV. Fonte: WAGNER JÚNIOR,A.

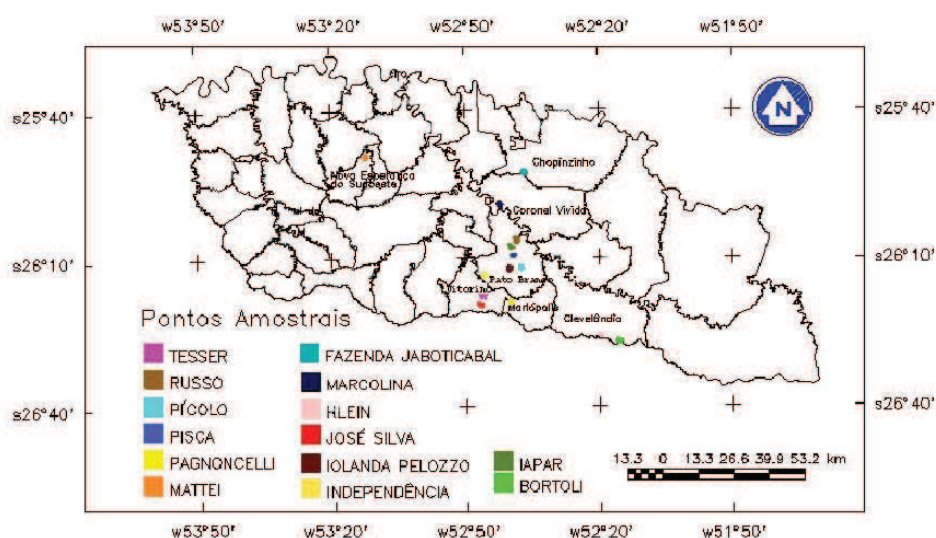


Figura 03 – Remanescentes florestais do Sudoeste do PR onde foram coletados acessos de jaboticabeira. Fonte: DANNER, 2009.

Tabela 1: Informações referentes aos 14 remanescentes florestais de coleta de sementes de jaboticabeira. Adaptado de DANNER, 2009.

Remanescente	Altitude média	Área (ha)	Nº de plantas
Tesser - Vitorino	814	12	100
Russo - Pato Branco	710	2,8	130
Pícolo - Pato Branco	778	7,5	65
Pisca - Pato Branco	675	1,6	65
Pagnoncelli - Mariópolis	824	10,8	165
Mattei - Nova Esp. do Sudoeste	648	10	115
Faz. Jaboticabal - Chopinzinho	854	23,5	1400
Marcolina - Coronel Vivida	577	4,9	320
Klein - Clevelândia	963	12,3	930
José Silva - Vitorino	820	2,4	110
Iolanda Pelozzo - Pato Branco	739	26,1	115
Independência - Pato Branco	730	3,6	70
Iapar - Pato Branco	717	78,3	55
Bortoli - Clevelândia	989	6,1	396

A porção das progênies escolhida para extração do DNA foram de folhas jovens (DANNER 2011b), sendo estas coletadas de cada planta e armazenadas imediatamente em envelope lacrado contendo sílica gel não hidratada (Figura 04). Tais envelopes foram etiquetados com o número e nome da planta, conforme croqui da coleção (Tabela 2), sendo rapidamente acondicionados em caixa térmica. A sílica presente nos pacotes foi trocada diariamente nos três primeiros dias, independente de sua coloração. Esta sílica quando retirada foi seca em estufa a temperatura de

70°C até apresentar coloração azul característica de sua condição “não hidratada”, para ser reutilizada na manutenção dos pacotes com as folhas.



Figura 04 – Envelope utilizado para coleta e armazenamento de folhas com silica gel.
Fonte: MARTINS, D.A.

Após as folhas serem coletadas e apresentarem-se desidratadas, foi realizado a extração do DNA com auxílio do Kit de extração de DNA *NucleoSpin® Plant II* (*Macherey-Nagel*). Após maceração das amostras em nitrogênio líquido foi utilizado protocolo recomendado pelo fabricante, representada na (Figura 5).

A verificação da qualidade do DNA extraído foi feito através de eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE 1X (Tris 28 mM, ácido bórico 88mM, EDTA 7mM, pH 8,3), sendo as amostras coradas com GelRed (*Biotium®*) na proporção de 1µL para cada 500µL de tampão de carregamento (0,2%), sendo visualizados sobre luz ultravioleta.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro do tipo NanoDrop® 1000 (*Thermo Scientific*), sendo consideradas adequadas para uso na reação em cadeia da polimerase (PCR) sem necessidade de ajustes com valores entre 2ng/mL⁻¹ a 10ng/mL⁻¹.



Figura 05 - Protocolo para extração de DNA utilizando o kit nucleos spin plant II. Fonte: Martins, D.A.

3.2 TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSATÉLITES

Os marcadores microssatélites, são os mais recomendados para uso em caracterização de acessos de bancos de germoplasma (AZEVEDO, 2010). Apesar da boa eficiência e alto nível de polimorfismo, a limitação ao uso de SSR em vários trabalhos reside na carência de bibliotecas descritas e caracterizadas para várias espécies, já que os iniciadores baseados em SSR são desenvolvidos especificamente para cada espécie estudada. No entanto entre espécies próximas evolutivamente, pode haver a transferibilidade das sequências flanqueadoras, que resultem em locus SSR detectáveis (FALEIRO 2003). Após detectado a transferibilidade de marcadores SSR o trabalho e os custos de análise são drasticamente reduzidos.

Neste trabalho foram testados três bibliotecas genômicas de iniciadores SSR, sendo duas para Feijoa (*Acca selowianna*) e uma biblioteca desenvolvida para uma das espécies de jaboticabeira (*Plinia jaboticaba*).

Os marcadores microssatélites são desenvolvidos a partir de metodologias que utilizam hibridação seletiva com enriquecimento de regiões determinadas no genoma da espécie estudada. Tais metodologias como citada por Buso, et al. (2003) conseguem isolar sequências com regiões microssatélites que após genotipadas permitem a determinação de suas regiões flanqueadoras, para síntese dos *primer's*. As três bibliotecas utilizadas no presente trabalho foram desenvolvidas no Laboratório de Genética Vegetal e Fisiologia do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina.

A transferibilidade dos iniciadores foi determinada através da realização de PCR com cada marcador analisado em seis diferentes temperaturas de anelamento, utilizando-se o gradiente de temperatura disponibilizado pelo termociclador a cada duas colunas de amostras. Foi utilizado como referência para temperatura de anelamento, valores próximos aquela determinada para o marcador nas espécies para o qual foi originalmente desenvolvido. Para cada marcador foi testado sua amplificação com o DNA de duas “plantas testes” escolhidas aleatoriamente do conjunto de plantas analisadas no presente trabalho, permanecendo as mesmas ao longo das análises em todos os marcadores.

Todas as reações de amplificação foram realizadas para o volume final de 12µL, conforme reação anteriormente padronizada para o marcador na espécie em que foi desenvolvido, com exceção da biblioteca genômica “Pli” que ainda não havia sido caracterizada, quando da realização desse trabalho. O “mix” de reagentes foi diferente para cada biblioteca, qual seja:

- (ASE): Tampão da enzima 1x; 1mM de MgCl₂; 0,2mM de nucleotídeos; 0,2µM de cada iniciador; 0,3U de enzima *taq polimerase* (BIOLASE DNA POLIMERASE 500 un), aproximadamente 20 ng de DNA, tendo o volume final completado com água ultra pura.

- (FSE): Tampão da enzima 1x; 2mM de MgCl₂; 0,2mM de nucleotídeos; 0,5µM de cada iniciador; 1,0U de enzima *taq polimerase* (BIOLASE DNA POLIMERASE 500 un), aproximadamente 20 ng de DNA, tendo o volume final completado com água ultra pura.

- (PLI): Tampão da enzima 1x; 2mM de MgCl₂ (concentrado no tampão); 0,2mM de nucleotídeos; 0,5µM de cada iniciador; 1,0U de enzima *taq polimerase* (GENET BIO Prime Taq DNA Polymerase 500 un), aproximadamente 20 ng de DNA, tendo o volume final completado com água ultra pura.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti ® (*Applied Biosystems*) e o programa de amplificação consistiu na desnaturação inicial do DNA a 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos à 95°C (desnaturação), 30 segundos em temperaturas de anelamento variando a cada duas amostras entre 47°C a 59°C (anelamento), 30 segundos a 72°C (polimerização), seguido da extensão final de 72°C por 10 minutos e manutenção das amostras a 4°C por tempo infinito (Figura 6).



Figura 06 – Termociclador utilizado na amplificação das amostras de DNA e no detalhe o programa de amplificação utilizado. Fonte Martins, D.A.

Os produtos da amplificação foram separados em eletroforese horizontal, em gel de agarose 1%, com tampão TBE 1X em voltagem constante de 120V. As amostras foram coradas com GelRed (*Biotium*®) (0,2%) misturado ao tampão de carregamento, e visualizadas em transiluminador sob luz ultravioleta. As imagens foram capturadas em câmera digital e armazenadas em computador para determinação de ocorrência de amplificação, bem como, da temperatura adequada de anelamento. Junto a isso foi possível ainda visualizar a ocorrência de problemas na amplificação que pudessem sugerir possíveis necessidades de ajuste da reação de PCR ou no *mix* de reagentes utilizados.

Dentre os marcadores transferidos para as espécies estudadas, foi realizado teste para detectar a presença de polimorfismos no *locus* transferido. No entanto para os primer's da biblioteca genômica ASE não foi possível realizar tais verificações devido a problemas na amplificação destes.

O teste de polimorfismo, foi realizado através da reação de amplificação de cada primer com 8 plantas da coleção que apresentavam origem bastante diversa e que, portanto eram candidatos a terem as maiores divergências genéticas.

A reação foi realizada em termociclador modelo Veriti ® (*Applied Biosystems*) e o programa de amplificação consistiu na desnaturação inicial do DNA a 95°C por 3

minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos em temperaturas determinada de anelamento para cada marcador (anelamento), 30 segundos a 72°C (polimerização), seguido da extensão final de 72°C por 10 minutos e manutenção das amostras a 4°C por tempo infinito.

O mix de reagentes utilizado em cada reação foi padronizado após as reações de verificação de transferibilidade, conforme segue: (PLI): Tampão da enzima 1x; 2mM de MgCl₂ (já incluído no tampão); 0,2mM de nucleotídeos; 0,5μM de cada iniciador; 1,0 U de enzima *taq polimerase* (GENET BIO Prime Taq DNA Polymerase 500 un), aproximadamente 20 ng de DNA, e o volume final completado com água ultra pura. (FSE): Tampão da enzima 1x; 1,5mM de MgCl₂; 0,2mM de nucleotídeos; 0,2μM de cada iniciador; 0,25 U de enzima *taq polimerase* (BIOLASE DNA POLIMERASE 500 un), aproximadamente 20 ng de DNA, e o volume final completado com água ultra pura.

O produto da reação foi corado com GelRed (Biotium®) (0,2%) misturado no tampão de carregamento, e os fragmentos separados em eletroforese horizontal em gel de agarose 4%, em tampão TBE 1X, tendo voltagem constante de 120 V por 2 horas. O resultado foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta e comparado com marcador de peso molecular conhecido e entre as plantas analisadas para determinar a ocorrência de *locus* polimórficos no marcador utilizado (Figura 7).

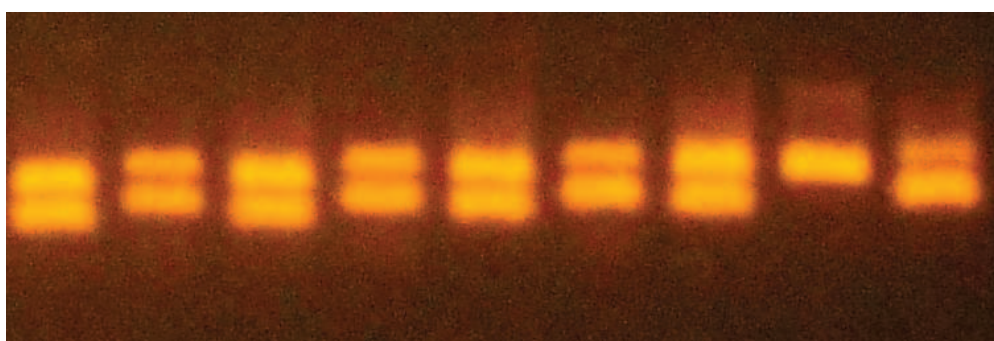


Figura 07 – Amplificação de *loci* polimórficos do marcador PLI 07 em gel de agarose sob iluminação ultravioleta. Fonte: Martins, D.A.

Os locus SSR que demonstraram ter amplificado fragmentos de diferentes tamanhos entre as plantas analisadas foram considerados polimórficos e escolhidos

para uso no presente trabalho, os demais tiveram seu uso descartado para a caracterização dessa coleção de plantas.

3.3 AMPLIFICAÇÃO DE DNA VIA PCR E GENOTIPAGEM DOS GENÓTIPOS

Todas as 110 plantas vivas pertencentes a coleção de germoplasma da UTFPR – Câmpus Dois Vizinhos, foram codificadas com números referentes a sua localização na coleção (Tabela 2) e foram genotipadas para nove locos SSR que apresentaram transferibilidade de *Acca selowianna* e *Plinia jaboticaba*, que comprovadamente apresentaram-se polimórficos em plantas da coleção.

A reação de amplificação foi realizada com termociclador modelo Veriti® (*Applied Biosystems*) e o programa de amplificação consistiu na desnaturação inicial do DNA a 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C cada, 30 segundos em temperaturas determinada de anelamento (Tabela 03), 30 segundos a 72°C, seguido de extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os marcadores SSR utilizados (Tabela 03) e o mix de reagentes em cada reação foi diferente dependendo da biblioteca genômica, sendo realizados conforme reações já padronizadas.

Tabela 2: Croqui representativo da disposição das jaboticabeiras no banco ativo de germoplasma da UTFPR – Câmpus Dois Vizinhos.

COLEÇÃO – JABUTICABEIRAS – UTFPR/Dois Vizinhos				
FILA 01	FILA 02	FILA 03	FILA 04	FILA 05
	14 – José 6	47 – José 7	75 – Silvestre	109 – Silvestre
	15 – José 6	48 – José 7	76 – Silvestre	110 – Cabinho
	16 – José 6	49 – José 7	77 – Silvestre	
	17 – José 6	50 – José 7	78 – F. Xavier	
	18 – José 5	51 – Faz Jab.(1)	79 – F. Xavier	
	19 – José 5	52 – Faz Jab.(1)	80 – F. Xavier	
	20 – José 5	53 – Faz Jab.(1)	81 – F. Xavier	
	21 – José 5	54 – Faz Jab.(2)	82 – Açú Paulista	
	22 – José 4	55 – Faz Jab.(3)	83 – Açú Paulista	
01 - Jaboticaba	23 – José 4	56 – Faz Jab.(3)	84 – Açú Paulista	
02 - Jaboticaba	24 – José 4		85 – Açú Paulista	
03 - Jaboticaba	25 – José 4	57 – Faz Jab.(4)	86 - Marcolina(3)	
	26 – José 4	58 – Faz Jab.(4)	87 - Marcolina(3)	
	27 – José 3	59 – Faz Jab.(5)	88 - Marcolina(1)	
	28 – José 3	60 – Marcolina	89 - Marcolina(1)	
	29 – José 3		90 – Sabará (2)	
	30 – José 2	61 - Marcolina(2)	91 – Sabará (2)	
	31 – José 2	62 - Marcolina(2)	92 – Sabará (2)	
	32 – José 2	63 - Marcolina(2)	93 – Sabará (2)	
04 – Klein 1	33 – José 2	64 - Marcolina(2)	94 – Sabará (1)	
05 – Klein 1	34 – José 2	65 - Marcolina(4)	95 – Sabará (1)	
06 – Klein 1	35 – José 2	66 - Marcolina(4)	96 – Sabará (1)	
07 – Klein 1	36 – José 2	67 - Marcolina(4)	97 – Sabará (1)	
08 – Klein 2	37 – José 2	68 - Marcolina(4)	98 – Iapar (4)	
	38 – José 2	69 - Marcolina(5)	99 – Iapar (4)	
09 – Klein 2	39 – José 2	70 - Marcolina(5)	100 – Iapar (4)	
10 – Klein 2		71 - Marcolina(5)	101 – Iapar (4)	
11 – Klein 3	40 – Klein 7	72 - Marcolina(5)	102 – Iapar (1)	
12 – Klein 3	41 – Klein 7	73 - Marcolina(8)	103 – Iapar (1)	
	42 – Klein 7	74 - Marcolina(8)	104 – Iapar (1)	
13 – Klein 4	43 – Klein 6		105 – Imbituva	
	44 – Klein 6		106 – Imbituva	
	45 – Klein 6		107 – Imbituva	
			108 – Imbituva	
	46 – Klein 5			

Tabela 3: Marcadores SSR, sequência nucleotídica, temperatura de anelamento e tipo de fluorescência utilizada para leitura.

Iniciador	Sequencia	Ta °C	Marcação
Pli 01	F: GAGAGCCGCGAAATTAACAG R: ATGCGTTCAGCGACCATAG	59°C	NED
Pli 05	F: GATTGGCCTTGTGTGTCATG R: CATCATGGAGCGGAAGACTT	56°C	6-FAM
Pli 06	F: GCCATTTAATTCGGAGGTGTC R:GCCACAAAGAAACGAGCTATG	59°C	NED
Pli 07	F: CAGGTAAATCGGAGTGTGGA R: TTATGCTCCACCGGGTAATC	59°C	NED
Pli 12	F: CAACCTGCCACGTAGTTCAA R: TGGGAGAGGACTGTGAAACC	62°C	6-FAM
Pli 15	F: GCCGTCTCCTACACCAGATT R: CTGTATGTTGATGTCGGTGCT	56°C	6-FAM
Pli 16	F: TCGCATTATTTGAAGCCAGA R: TTCCTCGCCCTTAACTCTGT	59°C	NED
Pli 18	F: CTCCTCATCGCTCACTCTCC R: CACCCTCAAGCAACCTACCA	56°C	6-FAM
Fse 04	F: TTCGTTTGGCGTTTACCTTC R: CGGTGCTCGTTTGTGTATG	55°C	6-FAM
Fse 16	F: CCATTGTTTTGGAAGGAACA R: TTGCGATTTTGAGAGTGGAG	47°C	6-FAM

A leitura dos alelos em sistema de detecção por fluorescência foi realizada em sequenciador MegaBACE 1000 DNA Analysis System GE Healthcare de 96 capilares com dois lasers, sendo um azul e um verde, no qual permitiram leitura em quatro comprimentos de onda (FAM, HEX, NED E ROX), sendo ROX (vermelho) o padrão, mediante eletroforese capilar com matriz de poliacrilamida linear (Figura 08). Os padrões de tamanho (GeneTab 500 GeneID®) foram utilizados em todas as 96 amostras.

Para a eletroforese por capilar foi utilizado sistema bplex de acordo com a fluorescência ou tamanho esperado do fragmento. Do produto de PCR foi retirado 1µl e diluído 8 x em água ultrapura autoclavada para os marcadores com fluorescência 6-FAM e 4 x para aqueles com fluorescência NED. Após a diluição, 1µl de cada amostra diluída foi adicionado a 8µl de 0,1% de Tween 20 (GE-Healthcare) e 0,25µL de GeneTab-500 (GeneID).

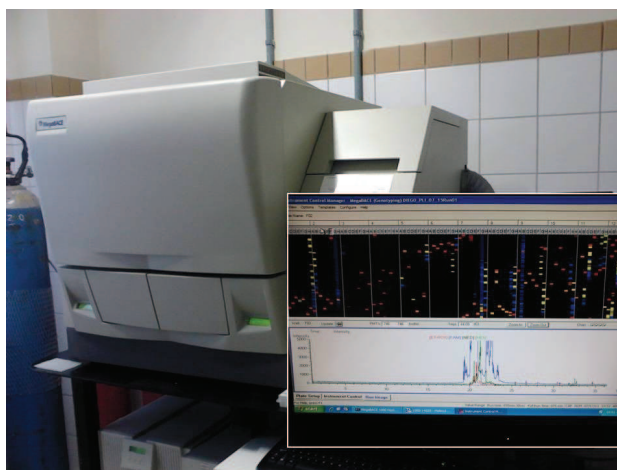


Figura 08 – Sequenciador automático MegaBace e no detalhe corrida eletroforética em andamento. Fonte Martins, D.A.

As amostras foram eletro-injetadas a 3 KV e a corrida (com até 96 amostras) aconteceu a 9 KV durante 80 minutos. Mediante leitura de 20 fragmentos do padrão que variam de 71 pb até 505 pb foi realizada comparação pelo software Fragment Profiler (*GE Healthcare*), que permitiu calcular o tamanho em pares de base (pb) dos dois alelos por um algoritmo do programa em comparação aos picos dos 20 fragmentos padrões.

Os dados referentes aos tamanhos de cada alelo foram tabulados em planilha eletrônica e submetidos a análise de frequência alélica no software Cervus 3.0.3 (Field Genetics), para obter o número de alelos por loco, bem como seu poder informativo (PIC) e a heterozigosidade esperada e observada, sendo a primeira utilizada como parâmetro de comparação com a segunda para estimar a diversidade existente na coleção, já o valor de PIC, calculado com base na equação ($PIC = 1 - \sum p_i^2$, onde i é o i ésimo alelo) serviu como parâmetro da capacidade informativa que o marcador apresentou para aquele conjunto de plantas, e portanto servindo de estimativa de sua eficiência. Os alelos foram identificados e nominados nas tabelas de acordo com o número que representa o seu tamanho em pares de base.

Para realizar análise de agrupamento, bem como criar a matriz de dissimilaridade que comparasse todos os genótipos, foi utilizado o software GENES (CRUZ, 2006). Os genótipos foram agrupados considerando o método de agrupamento de otimização de Tocher, levando em consideração a distância intra e intergrupos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 COLETA DE TECIDO VEGETAL E EXTRAÇÃO DE DNA

O tecido vegetal que foi coletado, armazenado imediatamente em envelope com sílica gel e acondicionado em caixa térmica mostrou condições adequadas para extração de DNA quando se fez uso do kit de extração mesmo decorridos 2 meses após sua coleta, o que demonstra viabilidade para técnica de coleta e de conservação das folhas, principalmente nos casos em que necessite realizar tal procedimento em épocas distintas.

A escolha pelo armazenamento das folhas com sua desidratação em sílica gel e o uso dos Kits de extração *NucleoSpin Plant II* ocorreram após as primeiras tentativas de coleta no campo, no qual utilizou pacote escuro de papel laminado de alumínio até o encaminhamento para o laboratório. Para extração do DNA fez-se uso do protocolo de extração de DNA proposta por Danner (2011b), baseado no uso do detergente catiônico CTAB (*cationic hexadecyl trimetyl ammonium bromide*). Tal metodologia que foi utilizada nas primeiras amostras mostrou-se inadequada, geralmente resultando em DNA degradado, com dificuldades de amplificação via reação de PCR e quando amplificado apresentou problemas na visualização das bandas polimórficas em gel de poliacrilamida.

Os problemas enfrentados na contaminação e degradação do DNA pareceram estar relacionados a contaminação com polifenóis, que tornaram a amostra mais escura, podendo oxidar a molécula de DNA, e isso pode ter levado a sua degradação. Conforme descrito por ROMANO et al. (1999). O conteúdo alto de substâncias desse tipo em plantas de jabuticabeira já havia sido relatado por outros autores (MOURA et al., 2009; TEIXEIRA, 2011).

O protocolo proposto por DANNER (2011b) mostrou-se capaz de extrair o DNA da jabuticabeira, no entanto tal DNA em várias amostras apresentou-se com alto nível de degradação, o que poderia comprometer as análises posteriores. A adição de PVP (polivinilpirrolidona) na concentração de 1% ao protocolo descrito, como agente antioxidante, foi testada como sugerido por Romano et al. (1999), e no entanto, este apresentou resultados insuficientes para evitar a degradação do DNA.

Os problemas advindos das primeiras tentativas de extração não foram totalmente elucidadas quanto a sua origem, mas parecem ter relação direta com dificuldades relacionadas a espécie estudada, como ocorre também com outras espécies como *Maytenus truncata* observado por Silva (2008), onde as substâncias naturalmente presentes na planta levaram a reações que dificultaram a extração de DNA íntegro.

Considerando-se a necessidade de DNA de boa qualidade com baixo nível de degradação e a contaminação mesmo que em pequena quantidade, foi optado por fazer uso dos kits de extração. Tal metodologia apesar de incorrer em custos normalmente mais elevados do que os protocolos baseados em CTAB otimizados a partir de Doyle & Doyle (1987) são confiáveis em termos de qualidade do DNA extraído e adaptáveis a diferentes espécies de vegetais, conforme resultados apresentados no presente trabalho.

Na quantificação do DNA do presente trabalho verificou-se que os valores variaram de 2,2 ng μL^{-1} até 14,7 ng μL^{-1} . Apesar da quantidade pequena em algumas amostras, esse não é fator considerado ruim, dado ao objetivo dessa extração que é a amplificação via PCR, a qual é suficientemente sensível até mesmo com pequenas quantidades de DNA. No entanto, a técnica de PCR é muito influenciada pela qualidade do DNA. Neste sentido, foram realizadas medições em espectrofotômetro a 280 nm para verificar a contaminação com proteínas, sendo detectadas em algumas amostras, o que no entanto, não prejudicaram as reações de amplificação.

4.2 TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSATÉLITES

Dentre as sequências SSR testadas para amplificação de DNA de *Plinia sp.* foram encontradas 3 marcadores da biblioteca ASE (ASE₅₉; ASE₄₂; ASE₃₄); 6 marcadores da biblioteca FSE (FSE₄; FSE₉; FSE₁₁; FSE₁₇; FSE₁₆; FSE₂₁) e 13 marcadores da biblioteca PLI (PLI₁; PLI₃; PLI₄; PLI₅; PLI₆; PLI₇; PLI₁₀; PLI₁₂; PLI₁₅; PLI₁₆; PLI₁₇; PLI₁₈; PLI₁₉) que apresentaram transferibilidade para os acessos testados.

Para o teste de polimorfismo, com os iniciadores da biblioteca genômica ASE não foi possível realizar tais verificações, pois os mesmos apresentaram problemas de amplificação, inclusive em sua espécie original (*Acca selowianna*). Suspeita-se

que os primer's possam ter sofrido degradação e que o tempo que decorreu entre transferibilidade do marcador e o teste de polimorfismo tenha sido a causa.

Para o teste de polimorfismo com os marcadores da biblioteca genômica FSE, alguns *loci* não amplificaram, o que pode ter ocorrido em virtude dos mesmos problemas ocorridos com a biblioteca ASE, já que o tempo decorrido entre a transferibilidade e o teste de polimorfismo foi superior a um ano. No entanto, entre aqueles que amplificaram foi possível identificar dois *loci* comprovadamente polimórficos e que portanto, foram selecionados para uso no presente trabalho.

O mix de reagentes para reação de PCR testado mostrou problemas na amplificação dos *loci* FSE, com excesso de amplificação em bandas inespecíficas e a presença de dímeros (Figura 09). Tal problema foi minimizado com a redução da quantidade de $MgCl_2$ do mix de 2 mM para 1,5 mM, que mostrou-se adequado para eliminar esta amplificação das bandas inespecíficas. A redução da quantidade de cada iniciador de 0,5 μM para 0,2 μM , demonstrou-se ser suficiente para impedir o aparecimento de dímeros na amplificação das amostras.

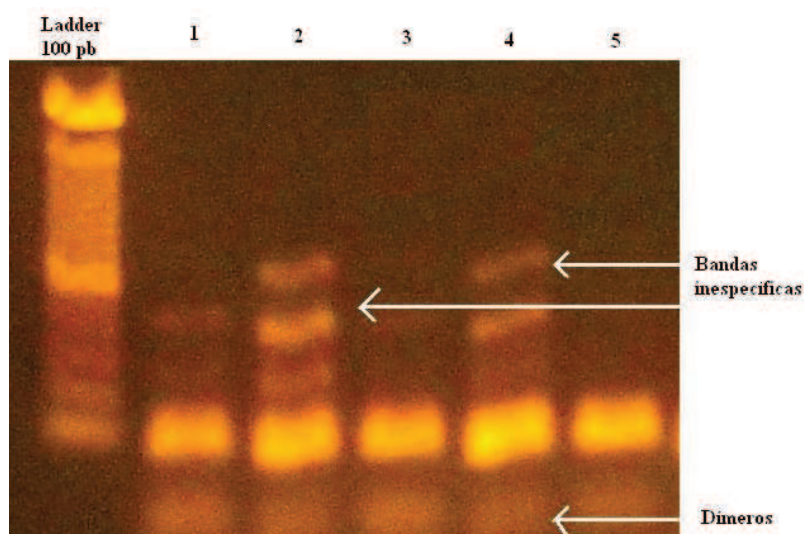


Figura 9 – Observação de gel de agarose sob luz ultravioleta mostrando resultado de PCR com problemas para o primer FSE_4. Fonte: Martins, D.A.

Para os iniciadores PLI não houve problemas de amplificação, considerando-se o ocorrido com as outras bibliotecas. Salienta-se que a etapa de verificação do polimorfismo aconteceu na mesma época em que foi testado a transferibilidade, o que pode ter reduzido as complicações com degradações do marcador. Foi possível

identificar 8 *locos* polimórficos, selecionados para uso no presente trabalho (Tabela 03). No entanto no momento da amplificação houve problema com um dos marcadores após sua marcação com fluoróforos (PLI_06) o que impediu sua utilização.

O mix de reagentes para reação de PCR testado para PLI mostrou-se adequado ao objetivo e não foi necessário realizar adequações e mudanças para que as amostras apresentassem bom padrão de amplificação, sendo mantido o mesmo utilizado no teste de transferibilidade.

Considerando-se o total de marcadores testados foi possível alcançar valor de 66,6% de transferibilidade com os marcadores testados da biblioteca genômica FSE e 61,9% de transferibilidade para os marcadores PLI.

Os níveis de transferibilidade mostraram-se altos, e no caso de PLI, concordaram com os valores citados por Leite et al. (2007) que encontraram para o gênero *Glycines* sp. valores próximos a 65%, dentro do mesmo gênero. Já para a biblioteca FSE, sintetizada originalmente para outro gênero botânico. Os valores foram próximos a aqueles encontrados entre espécies da família Curcubitácea, mas de diferentes gêneros que ficou em 50%, pelo mesmo autor.

Isso demonstrou que as regiões que flanqueadoras aos SSR podem ser bastante conservadas mesmo entre espécies diferentes, mas aparentadas, fato vantajoso para as análises em questão considerando-se os altos custos relacionados ao desenvolvimento dos marcadores SSR (LEITE et al., 2007).

4.3 GENOTIPAGEM DO BAG JABUTICABEIRAS UTFPR – CÂMPUS DOIS VIZINHOS

Com o uso dos nove marcadores SSR foi possível genotipar as 110 plantas da coleção, sendo considerado como aceitável até 10% de falhas na amplificação. Dessa forma foram genotipados 98% dos *loci* analisados, encontrando-se o total de 125 diferentes alelos, com média de 13,8 alelos por loco. O valor encontrado é alto, quando comparado a outros estudos, ainda que não tenham ocorrido com *Plinia* sp. (SILVA et al., 2010; AMORIN et al., 2008; BIANCHI, et al., 2004; MARTINS et al., 2001). Tal resultado é interessante pois demonstrou que o conjunto de primer's

utilizados amplifica *loci* com diversidade alélica significativa e ainda conservado no gênero.

A maior diversidade alélica foi encontrada para o *locus* PLI_16, que apresentou 21 alelos diferentes e a menor diversidade alélica para o *locus* PLI_01 com 8 diferentes alelos (Tabela 04). O valor alto encontrado para o marcador PLI_16 é considerado bom, podendo servir de referência para seu uso em futuros estudos com o gênero, pois possivelmente representa um *locus* com alta taxa de mutação e diversidade alélica.

Tabela 4: Diversidade alélica e quantidade de jabuticabeiras genotipadas em cada *locus* microsatélite estudado.

Locus	Nº alelos	Indivíduos genotipados
PLI_01	8	110
PLI_05	14	110
PLI_07	13	109
PLI_12	12	105
PLI_15	14	110
PLI_16	21	110
PLI_18	14	105
FSE_16	15	104
FSE_4	14	107

A heterozigidade observada variou de 0,86 (PLI_01) a 0,10 (PLI_07) obtendo-se valores maiores do que a heterozigidade esperada nos alelos PLI_01 e PLI_05, o que demonstrou elevada diversidade alélica para esses loci. Esse valor da heterozigidade esperada pode ser considerado juntamente com o conteúdo da informação do polimorfismo (PIC) como medida da diversidade genética (OLIVEIRA, et al 2010). O conteúdo de informação de polimorfismo médio ficou em 0,62, variando de 0,84 (FSE_04) a 0,39 (PLI_07) (Tabela 5). De forma geral, o valor encontrado foi satisfatório e adequado para estudos de caracterização de diversidade genética; no entanto cabe ressalva sobre os marcadores PLI_07, PLI_12 e PLI_16 cujos valores de PIC foram inferiores a 0,5 e portanto sendo de baixa capacidade informativa. Em estudos futuros, com limitação do número de marcadores utilizados, tais *loci* devem ser descartados preferencialmente em comparação aos demais primer's da biblioteca utilizada no presente estudo.

Tabela 5: Valores de Heterozigosidade esperada (H_e), Heterozigosidade observada (H_o) e poder informativo (PIC) para cada locus analisado do banco ativo de germoplasma de jabuticabeiras da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos.

Locus	H observada	H esperada	PIC
PLI_01	0.864	0.677	0.612
PLI_05	0.818	0.737	0.702
PLI_07	0.101	0.411	0,396
PLI_12	0.248	0.440	0,42
PLI_15	0.273	0.545	0,528
PLI_16	0.255	0.493	0,484
PLI_18	0.695	0.786	0,761
FSE_16	0.529	0.840	0,821
FSE_4	0.374	0.862	0,844
Média	0,4618	0,6435	0,6187

Considerando-se o conjunto de indivíduos da população e comparando-se as médias de H_o e H_e percebeu-se que a população teve baixo nível de diversidade média, mesmo que alguns *loci* tenham encontrado valores elevados.

Tal informação é referencial, especialmente quando se leva em conta que várias plantas que são irmãos completos ou meio-irmãos, já que foram obtidas de sementes cuja origem representa pequena quantidade de genitoras, além do fato da jabuticabeira apresentar efeito apomítico, o que permite igualdade genotípica.

No estudo realizado por DANNER (2009), com plantas oriundas dos mesmos fragmentos do presente trabalho, verificou-se que dentro do mesmo sítio já foi contraído o grau de diversidade genética. Se for considerado que a planta mãe faz parte de pequeno remanescente onde o número de cruzamentos aparentados deve ser elevado e restrito ao pequeno número de indivíduos potenciais fornecedores de pólen, fica previsível tal conclusão.

Especialmente para os *loci* PLI_01, PLI_05, PLI_18, FSE_16 e FSE_4, que apresentaram valores altos de PIC (conteúdo de informação de polimorfismo), no qual demonstrou alta capacidade de discriminação do marcador em questão, conforme ressaltado por Weiir (1996) apud Oliveira et al. (2010). Sendo assim tais marcadores podem ser recomendados para uso preferencial em futuros estudos com as espécies do gênero *Plinia* devido ao fato de expressarem alto poder informativo.

Os diferentes alelos encontrados para cada marcador apareceram em frequências bastante distintas dentro da população. A análise alélica para cada marcador torna-se importante pois garante que sejam identificados alelos de baixa

frequência no conjunto de indivíduos considerados alelos raros. A identificação de tais indivíduos é importante quando se pensa em estratégias de conservação da diversidade existente na coleção.

Como estratégia de conservação de diversidade genética pensando-se na redução do tamanho efetivo da coleção de germoplasma, buscando-se benefícios em termos de facilidade e economicidade no manejo e condução das plantas da coleção, torna-se interessante observar a permanência de indivíduos que portem sequências de ocorrência rara na população, pois tal informação sugere origem evolutiva distinta dos demais indivíduos e pode ser importante nos programas de conservação e para uso em futuras hibridações controladas, buscando-se máxima heterose (FALEIRO et al., 2007).

Para o marcador PLI_01, dos 8 alelos encontrados (Tabela 6), dois destes apareceram de maneira bastante repetida, representando mais de 75% de todos alelos encontrados, quando somados. Estes alelos são de ocorrência comum nas populações analisadas. No entanto para o mesmo *locus*, foram encontrados 4 alelos raros, que apareceram em frequência inferior a 1%, e mais um alelo de baixa frequência que ocorreu em valor inferior a 3%. Para esse *locus* 95 dos indivíduos analisados são heterozigotos e somente 15 indivíduos são homozigotos, demonstrando boa distribuição dos alelos encontrados já que grande parte dos indivíduos é portador de alelos distintos no mesmo *locus*.

Tabela 6: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homozigotos e heterozigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador PLI_01 do banco ativo de germoplasma de jabuticabeiras UTFPR/DV.

Alelo (pb)	Nº de cópias	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica (%)
132	2	2	0	0,91
134	2	2	0	0,91
150	2	2	0	0,91
152	87	85	1	39,55
154	40	14	13	18,18
156	81	79	1	36,82
158	5	5	0	2,27
160	1	1	0	0,45

Entre os 14 diferentes alelos encontrados para o marcador PLI_05 (Tabela 7), um alelo sozinho representou mais de 43% da frequência de alelos. Por outro lado foram encontrados 8 alelos raros, no qual cinco representam frequência de 0,45%, caracterizando-se como encontrado uma única vez na população. Além disso outros

3 alelos apresentaram frequência de 0,91%. Para esse locus 90 dos indivíduos analisados são heterozigotos e somente 20 são homozigotos. O quantitativo de heterozigotos é interessante e demonstra que na população a maioria dos indivíduos é portador de mais de um tipo de alelo.

Tabela 7: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homozigotos e heterozigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador PLI_05 do banco ativo de germoplasma de jabuticabeiras UTFPR/DV.

Alelo	Nº de cópias	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica (%)
136	2	0	1	0,91
138	2	0	1	0,91
148	21	17	2	9,55
156	1	1	0	0,45
158	15	15	0	6,82
160	95	73	11	43,18
162	53	53	0	24,09
172	8	6	1	3,64
174	17	9	4	7,73
180	1	1	0	0,45
182	1	1	0	0,45
186	1	1	0	0,45
194	1	1	0	0,45
198	2	2	0	0,91
Total (indivíduos)		90 plantas	20 plantas	

No *locus* PLI_07 o número de heterozigotos foi reduzido, havendo somente 11 indivíduos com essa característica, contra 98 homozigotos. Dos 13 alelos encontrados (Tabela 8), um deles sozinho foi responsável por mais de 76% da frequência alélica, ocorrendo totalmente em indivíduos homozigotos, o que correspondeu a 83 plantas. Tal situação é indesejável para a estrutura de uma coleção de plantas, visto que caracteriza a baixa diversidade abrigada para esse *locus*. O elevado número de indivíduos sugere que esse seja um locus com pouca diversidade, ou mesmo que entre os indivíduos analisados possa haver um grau de parentesco, que determine ancestralidade em comum.

Tabela 8: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homocigotos e heterocigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador PLI_07 do banco ativo de germoplasma de jaboticabeiras UTFPR/DV.

Alelo	Nº de cópias	Heterocigotos	Homocigotos	Frequência alélica (%)
142	2	0	1	0,92
144	166	0	83	76,15
146	9	1	4	4,13
162	1	1	0	0,46
166	4	2	1	1,83
176	6	4	1	2,75
178	19	7	6	8,72
186	4	2	1	1,83
188	1	1	0	0,46
190	1	1	0	0,46
192	1	1	0	0,46
194	3	1	1	1,38
196	1	1	0	0,46
Total (indivíduos)		11 plantas	98 plantas	

Para esse mesmo *locus*, 6 dos alelos encontrados foram de ocorrência rara, com frequência inferior a 1%, sendo 5 com frequência de 0,46%, portanto presentes em somente um indivíduo cada um.

Para o *locus* PLI_12 a quantidade de indivíduos heterocigotos também foi pequena e representada por 26 plantas, contra 79 indivíduos homocigotos, o que é indesejável para coleção de germoplasma, já que o elevado número de indivíduos homocigotos pode sugerir endogamia e cruzamentos aparentados, que não contribuirão com o objetivo de abrigar máxima diversidade genética estabelecida para a presente coleção.

Dos 12 alelos encontrados (Tabela 9), um deles sozinho foi responsável por mais de 73% da frequência de alelos e mais da metade, ou seja sete deles, teve frequência inferior a 1%, constituindo-se como alelos raros para esse *locus*. Dois destes *locus* foram de baixa frequência com valores inferiores a 3%. A presença de grande número de alelos raros, apesar do elevado número de homocigotos, demonstrou que a coleção abriga diversidade para esse *locus*, apesar dessa ser desproporcional ao número de indivíduos que a contêm.

Tabela 9: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homocigotos e heterocigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador PLI_12 do banco ativo de germoplasma de jaboticabeiras UTFPR/DV.

Alelo	Nº de cópias	Heterocigotos	Homocigotos	Frequência alélica (%)
155	2	0	1	0,95
165	1	1	0	0,48
169	2	2	0	0,95
171	1	1	0	0,48
173	1	1	0	0,48
177	16	12	2	7,62
179	155	21	67	73,81
181	21	7	7	10
183	4	2	1	1,9
185	2	2	0	0,95
186	1	1	0	0,48
187	4	2	1	1,9
Total (indivíduos)		26 plantas	79 plantas	

O *locus* PLI_15 apresentou 14 diferentes alelos (Tabela 10), sendo que 4 deles em frequência inferior a 1% do total. Dos outros, sete alelos a frequência foi entre 1 a 3%, apesar de não representarem alelos raros, foram de baixa frequência na população analisada. Nesse mesmo *locus*, um alelo sozinho foi responsável por 66% da frequência alélica total. Com 80 indivíduos analisados como homocigotos e 30 deles heterocigotos, percebeu-se mais um *locus* onde há predomínio de homocigotos. Tal fato reforça a ideia de que muitos indivíduos possam ter parentesco comum, demonstrado pelos alelos iguais e em alta frequência.

Tabela 10: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homocigotos e heterocigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador PLI_15 do banco ativo de germoplasma de jaboticabeiras UTFPR/DV.

Alelo	Nº de cópias	Heterocigotos	Homocigotos	Frequência alélica (%)
170	6	2	2	2,73
174	3	3	0	1,36
176	2	2	0	0,91
178	4	2	1	1,82
180	5	5	0	2,27
182	14	4	5	6,36
184	5	3	1	2,27
185	1	1	0	0,45
186	6	4	1	2,73
188	21	13	4	9,55
190	146	18	64	66,36
192	3	1	1	1,36
194	2	2	0	0,91
196	2	0	1	0,91
Total (indivíduos)		30 plantas	80 plantas	

Para o marcador PLI_16 foram encontrados 21 diferentes alelos (Tabela 11), sendo o maior número encontrado para um marcador no presente estudo. Esse dado é importante, pois a diversidade alélica normalmente está relacionada com o poder informativo do marcador, que foi considerado baixo pelo cálculo de PIC. No entanto, o elevado número de alelos pode ser utilizado para discriminar indivíduos e em estudos de *fingerprint*.

Tabela 11: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homocigotos e heterocigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador PLI_16 do banco ativo de germoplasma de jaboticabeiras UTFPR/DV.

Alelo	Nº de cópias	Heterocigotos	Homocigotos	Frequência alélica (%)
140	2	0	1	0,91
142	1	1	0	0,45
150	3	3	0	1,36
152	3	3	0	1,36
154	3	1	1	1,36
156	1	1	0	0,45
158	6	2	2	2,73
160	9	5	2	4,09
162	156	16	70	70,91
168	1	1	0	0,45
170	4	2	1	1,82
174	3	1	1	1,36
178	2	2	0	0,91
179	1	1	0	0,45
180	5	5	0	2,27
182	6	4	1	2,73
184	8	2	3	3,64
186	1	1	0	0,45
188	1	1	0	0,45
190	1	1	0	0,45
222	3	3	0	1,36
Total (indivíduos)		28 plantas	88 plantas	

No entanto um dos alelos sozinho foi responsável pela frequência superior a 70%, o que mostrou que, apesar da grande diversidade de alelos encontrados no *locus* ela está desigualmente distribuída, com muito indivíduos portadores dos mesmos alelos.

O número de alelos raros encontrados foi de 9, por apresentarem frequência inferior a 1%, e outros 9 mostraram baixa frequência, ficando entre 1 e 3%. Dentre os indivíduos analisados, 82 apresentaram-se em homocigose e 28 em heterocigose para o referido *locus*.

No *locus* PLI_18 observou-se o aparecimento de 14 diferentes alelos (Tabela 12), sendo um deles de alta frequência, cujo valor foi de 40%, contido em 62

indivíduos da coleção. A frequência de alelo raro, inferior a 1% apareceu em 3 diferentes alelos e as baixas frequências entre 1 e 3% ocorreram para outros 4 alelos. Para esse marcador, 72 indivíduos apresentam o caráter heterozigótico e 33 homozigóticos. O valor elevado de indivíduos em estado heterozigoto é interessante, já que esse atributo pode ser considerado como medida de diversidade e portanto, indicando que nesse *locus* a coleção abrigou vários indivíduos portadores de mais de um alelo para tal caráter.

Tabela 12: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homozigotos e heterozigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador PLI_18 do banco ativo de germoplasma de jaboticabeiras UTFPR/DV.

Alelo	Nº de cópias	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica (%)
176	1	1	0	0,48
178	5	5	0	2,38
198	6	4	1	2,86
200	11	5	3	5,24
202	11	11	0	5,24
204	12	8	2	5,71
206	84	40	22	40
208	26	22	2	12,38
210	8	2	3	3,81
214	3	3	0	1,43
216	37	37	0	17,62
218	4	4	0	1,9
224	1	1	0	0,48
226	1	1	0	0,48
Total (indivíduos)		72 plantas	33 plantas	

O marcados FSE_16 amplificou 16 diferentes alelos (Tabela 13), ocorrendo o alelo de maior frequência em 53 indivíduos, com 32,7% de frequência alélica. Apesar do elevado número de alelos, novamente foi encontrado supremacia de um dos alelos, que sozinho deteminou a maioria da frequência da população, sugerindo-se parentesco entre os indivíduos.

No mesmo *locus* foram encontrados 2 alelos raros, com frequência inferior a 1% e 6 alelos com baixa frequência, representada por valores entre 1 e 3%. Esse *locus* apresentou 54 indivíduos heterozigotos, contra 50 indivíduos em homozigose.

Para o *locus* FSE_4 foram encontrados 14 alelos (Tabela 14). O alelo de maior frequência ocorreu em 38 indivíduos, sendo a frequência alélica na população de 26,39%. Dos alelos encontrados somente um satisfaz a condições de ser considerado raro, devido a frequência inferior a 1%, com outros cinco apresentando baixa frequência na população, uma vez que ficaram entre 1 e 3%. O número de

indivíduos heterozigotos nesse *locus* foi 54 e em homozigose havia 50 indivíduos. O padrão apresentado foi o mesmo do marcador anterior, oriundo da mesma biblioteca e portanto apresentando bom equilíbrio na população. No entanto ainda com número elevados de indivíduos em homozigose, incoerente com os objetivos da coleção.

Tabela 13: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homozigotos e heterozigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador FSE_16 do banco ativo de germoplasma de jabuticabeiras UTFPR/DV.

Alelo	Nº de cópias	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica (%)
151	4	2	1	1,92
153	10	6	2	4,81
155	26	12	7	12,5
157	68	38	15	32,69
159	29	11	9	13,94
161	6	2	2	2,88
163	1	1	0	0,48
165	4	2	1	1,92
167	4	2	1	1,92
169	15	5	5	7,21
171	2	2	0	0,96
173	5	5	0	2,4
175	5	1	2	2,4
177	21	15	3	10,1
179	7	5	1	3,37
200	1	1	0	0,48
Total (indivíduos)		54 plantas	60 plantas	

Tabela 14: Número de cópias de cada alelo, número de indivíduos homozigotos e heterozigotos para cada alelo e frequência alélica encontrados para o marcador FSE_4 do banco ativo de germoplasma de jabuticabeiras UTFPR/DV.

Alelo	Nº de cópias	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica (%)
200	42	14	14	19,63
202	5	1	2	2,34
204	57	19	19	26,64
206	13	5	4	6,07
208	6	2	2	2,8
210	11	1	5	5,14
214	10	4	3	4,67
216	12	8	2	5,61
218	8	6	1	3,74
220	24	10	7	11,21
222	6	2	2	2,8
228	4	0	2	1,87
232	1	1	0	0,47
238	15	7	4	4,45
Total (indivíduos)		40 plantas	68 plantas	

De forma geral, a diversidade alélica presente na população teve valores considerados adequados, uma vez que foram encontrados 125 diferentes alelos

para os 9 *locus* analisados, resultando-se em média de 13,89 alelos *locus*⁻¹. No entanto, tal diversidade foi mal distribuída, já que ao analisar cada *locus* separadamente notou-se valores entre 26,39% a 76,15% de frequência de um único alelo, aquele de maior expressão em cada *locus*.

Tal fato sugere que apesar de haver nível de diversidade razoável na presente coleção de jaboticabeira, o tamanho desta é desproporcional ao nível de diversidade, visto que existem muitos indivíduos com alto grau de similaridade entre si, o que já era esperado, pois a origem de muitos é a mesma.

Esse fato pode ser confirmado pela origem dos genótipos ter sido a partir de sementes de mesma genitora, com maior risco para ter-se clone, já que a jaboticabeira é espécie que apresenta poliembrionia (WAGNER JÚNIOR et al. 2011).

Os indivíduos que apresentaram alelos de baixa frequência e/ou alelos raros em cada *locus* foram representados na (Tabela 15) e podendo servir de referência como genótipos que devem ser preservadas na coleção, por serem portadores de alelos de baixa frequência.

Tabela 15: Jaboticabeiras portadoras de alelos raros ou com frequência < que 3% para cada *loci* microsatélite avaliado.

PLI_01	PLI_05	PLI_07	PLI_12	FSE_4
01 - Jaboticaba	3 - Jaboticaba	3 - Jaboticaba	18 - José 5	06 - Klein 1
08 - Klein 2	76 - Silvestre	73 - Marcolina 8	24 - José 4	18 - José 5
10 - Klein 2	100 - Iapar 4	75 - Silvestre	58 - Faz. Jab. 4	19 - José 5
60 - Marcolina	102 - Iapar 1	78 - F. Xavier	60 - Marcolina	21 - José 5
84 - Açu paulista	105 - Imbituva 2	79 - F. Xavier	69 - Marcolina 5	23 - José 4
86 - Marcolina 3	106 - Imbituva	81 - F. Xavier	73 - Marcolina 8	38 - José 2
105 - Imbituva 2	107 - Imbituva	82 - Açu paulista	74 - Marcolina 8	39 - José 2
106 - Imbituva	110 - Cabinho	83 - Açu paulista	81 - F. Xavier	56 - Faz. Jab. 3
107 - Imbituva		84 - Açu paulista	84 - Açu paulista	64 - Marcolina 2
109 - Silvestre		85 - Açu paulista	91 - Sabará 2	76 - Silvestre
		90 - Sabará 2	94 - Sabará 1	82 - Açu paulista
		91 - Sabará 2	104 - Iapar 1	89 - Marcolina 1
		109 - Silvestre	109 - Silvestre	93 - Sabará 2
		110 - Cabinho	110 - Cabinho	100 - Iapar 4

PLI_15	PLI_16	PLI_18	FSE_16
01 - Jaboticaba	02 - Jaboticaba	03 - Jaboticaba	06 - Klein 1
03 - Jaboticaba	03 - Jaboticaba	04 - Klein 1	14 - José 6
12 - Klein 3	04 - Klein 1	05 - Klein 1	29 - José 5
19 - José 5	19 - José 5	07 - Klein 1	30 - José 6
21 - José 5	26 - José 4	08 - Klein 2	38 - José 2
23 - José 4	31 - José 2	09 - Klein 2	44 - Klein 6

34 - José 2	46 - Klein 5	10 - Klein 2	47 - José 7
37 - José 2	69 - Marcolina 5	23 - José 4	48 - José 7
45 - Kein 6	71 - Marcolina 5	41 - Klein 7	50 - José 7
50 - José 7	73 - Marcolina 8	53 - Faz. Jab. 1	53 - Faz. Jab. 1
60 - Marcolina	76 - Silvestre	59 - Faz. Jab. 5	55 - Faz. Jab. 3
66 - Marcolina 4	77 - Silvestre	75 - Silvestre	56 - Faz. Jab. 3
69 - Marcolina 5	78 - F. Xavier	76 - Silvestre	70 - Marcolina 5
75 - Silvestre	79 - F. Xavier	78 - F. Xavier	77 - Silvestre
78 - F. Xavier	80 - F. Xavier	80 - F. Xavier	79 - F. Xavier
79 - F. Xavier	81 - F. Xavier	81 - F. Xavier	80 - F. Xavier
80 - F. Xavier	82 - Açu paulista	82 - Açu paulista	82 - Açu paulista
81 - F. Xavier	84 - Açu paulista	84 - Açu paulista	85 - Açu paulista
84 - Açu paulista	90 - Sabará 2		99 - Iapar 4
86 - Marcolina 3	91 - Sabará 2		102 - Iapar 1
105 - Imbituva 2	92 - Sabará 2		110 - Cabinho
109 - Silvestre	93 - Sabará 2		
110 - Cabinho	97 - Sabará 1		
	105 - Imbituva 2		
	107 - Imbituva		
	108 - Imbituva		
	109 - Silvestre		
	110 - Cabinho		

Percebeu-se que entre os indivíduos citados na Tabela 15, alguns apareceram de forma repetida para vários *loci*, o que indicou serem portadores de diversidade rara dentro da coleção, havendo necessidade da criação de estratégias para privilégios para sua preservação e perpetuação.

Entre tais indivíduos cabe destacar especialmente 110-Cabinho e 84-Açu Paulista com alelos de baixa frequência encontrados em 6 dos 9 *loci*; 109-Silvestre, 82-Açu Paulista, 81-Fernando Xavier, 3-Jabuticaba com alelos de baixa frequência em 5 *loci*; 76-Silvestre, 78-Fernando Xavier, 79-Fernando Xavier, 80-Fernando Xavier, e 105-Imbituva2 com alelos de baixa frequência em 4 *loci*.

A maior concentração da diversidade alélica pode ser comprovada quando analisou-se a coleção hipotética formada pelos 11 indivíduos citados. Encontrou-se um total de 74 alelos, com média de 8,22 alelos *loci*⁻¹, cujo valor de heterozigosidade médio foi acima de 0,8 e o conteúdo informativo médio dos marcadores (PIC) de 0,7736, como pode ser observado na Tabela 16. Tais valores, comparativamente aos parâmetros da coleção original, são melhores.

Tabela 16: Parâmetros calculados para população hipotética formada pelos 11 indivíduos de jabuticabeira com alelos de baixa frequência no maior número de *loci*.

Locus	Número de alelos	Número de indivíduos analisados	H observada	PIC
PLI_01	5	11	0,636	0,675
PLI_05	9	11	0,818	0,767
PLI_07	11	11	0,455	0,864
PLI_12	6	9	0,667	0,695
PLI_15	10	11	0,818	0,863
PLI_16	10	11	0,727	0,863
PLI_18	8	11	0,818	0,809
FSE_16	6	9	0,556	0,73
FSE_4	9	11	0,364	0,696
Média	8,22		0,651	0,773

Percebeu-se portanto, que apesar de representar somente 10% do total dos genótipos, esses 11 indivíduos representaram 59,2% do total de alelos do banco ativo de germoplasma e em comparação a população original apresentaram valores médios de heterozigosidade observada e PIC superiores, como pode ser observado da comparação entre as Tabelas 16 e 5.

Entre todos os indivíduos da população foi também determinada sua divergência genética através da construção de matriz de similaridade construída a partir do índice de distância intra e intergrupos, que expressa em cada ponto a diferença/semelhança entre dois genótipos (DELLAGOSTIN, et. al. 2011) (Figura 12).

Todos os genótipos foram representados nos dois eixos da imagem, sendo o cruzamento entre dois indivíduos representado por coloração legendada no qual determinou a sua similaridade. Dessa forma quanto maior for grau de similaridade, menor foi a distância genética entre os indivíduos. Os pontos de coloração escura representaram a relação entre o indivíduo e ele mesmo e, por isso foram representados pelo valor 1, já que esse é parâmetro para indicar máxima similaridade. Os cruzamentos de máxima divergência foram descritos com a coloração amarela.

A compreensão da divergência entre os genótipos presentes na coleção torna-se importante quando se tem intenção de explorar esses indivíduos no programa de melhoramento vegetal, já que é possível orientá-los para hibridações controladas entre genitores divergentes com intenção de obter cruzamentos superiores de máxima heterose (PATERNIANI, et al., 2008).

As plantas do presente banco ativo de germoplasma ainda estão em período de juvenilidade e portanto não iniciaram o processo de frutificação. No entanto por ocasião das primeiras colheitas torna-se importante caracterizar morfologicamente tais indivíduos de maneira que se possa relacionar a diversidade genética abordada nesse estudo com a diversidade funcional baseada nos caracteres de interesse agrônômico.

Da análise da matriz (Figura 11), percebeu-se que alguns indivíduos foram bastante próximos em termos de similaridade, como é o caso das jabuticabeiras 17-José 6 e 24-José 4 cujos valores foram de 0,9. Portanto, o uso destes indivíduos como genitores não seriam interessantes para direcionamento de cruzamentos controlados no programa de melhoramento genético, já que resultaria em alto índice de endogamia. Já outros genótipos, apresentaram valores de similaridade baixos (0,1) que dessa forma devem ser os preferidos para uso como genitores em cruzamentos dirigidos. A jabuticabeira 84-Fernando Xavier é exemplo claro, pois apresentou baixa similaridade com 87 dos outros 109 genótipos presentes na coleção e que portanto, pode ser testado como genitor.

Entre vários indivíduos percebeu-se elevados graus de similaridade (exemplo: 17-José 6, 24-José 4, 52-Faz.Jab. 1, 25-José 4, 11-Klein 3, 53-Faz.Jab. 1, 51-Faz.Jab. 1, 33-José 2, 57-Faz.Jab. 4, 30-José 6, 14-José 6, 68-Marcolina 2, 64-Marcolina 4), com valores variando entre 0,7 e 0,9. Assim, também não é recomendado o uso destes indivíduos em hibridações controladas, pois a endogamia pode levar a depressão endogâmica causando perda de vigor pela homozigose de genes deletérios (FALCÃO et al., 2001).

A identificação dos níveis de diversidade genética, bem como, a relação existente entre os indivíduos da coleção é importante enquanto trabalho de “pré-melhoramento” já que é através deste que se consegue determinar quais acessos devem fazer parte do programa de melhoramento (DANTAS et al., 2012).

Conhecendo-se a similaridade entre cada genótipo da coleção foi possível estabelecer relação de agrupamento, formando-se conjuntos de acessos que tiveram alta relação de similaridade entre si. Dessa forma, constitui-se 8 grupos pelo método de Toucher, conforme Tabela 17.

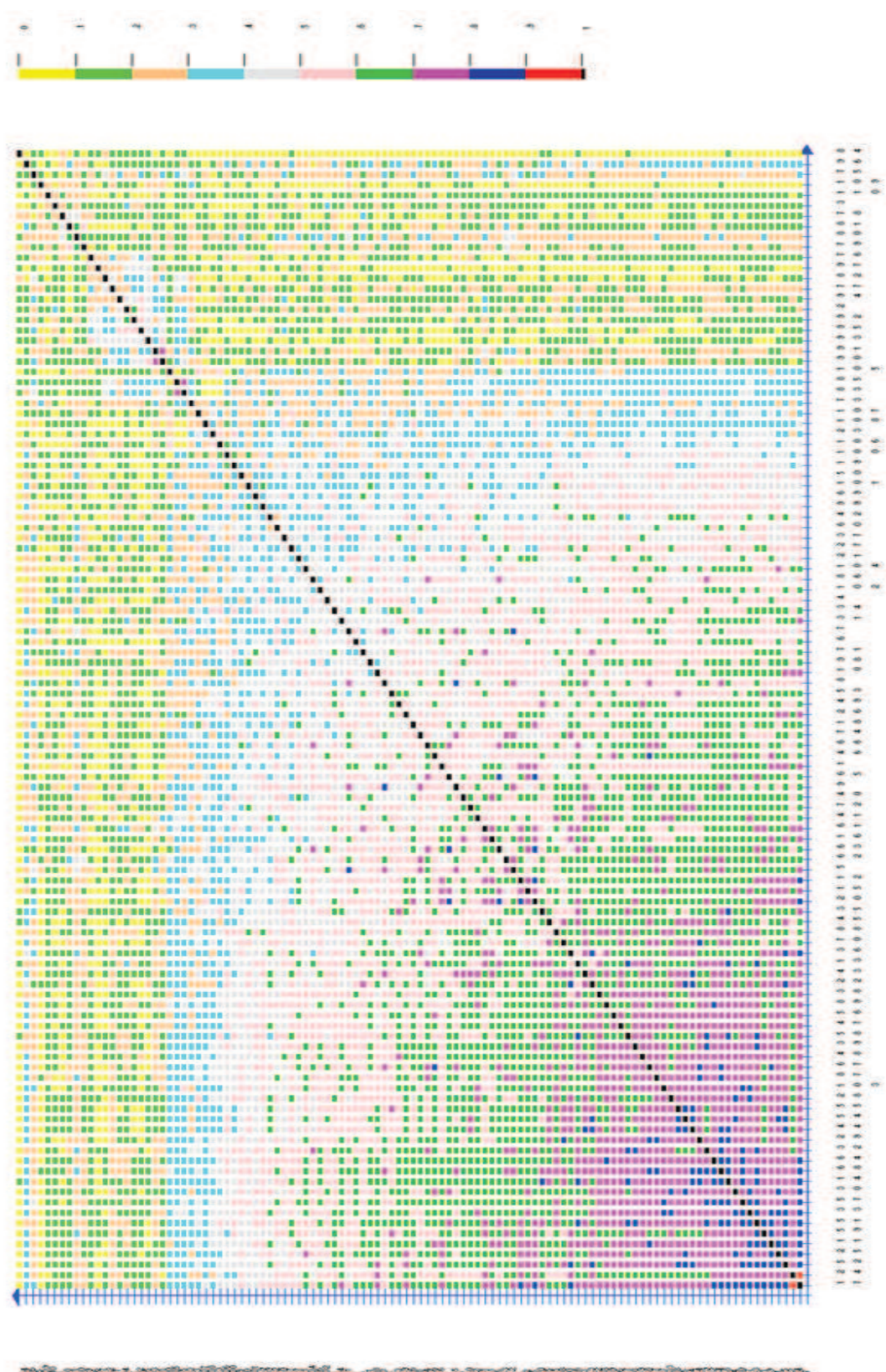


Figura 11 - Matriz de similaridade entre acessos do banco ativo de germoplasma de Jaboticabeiras da UTFPR - Câmpus Dois Vizinhos, organizada a partir de dados de sistância intra e inter grupo. Fonte: Martins, D.A.

Tabela 17: Agrupamento de Toucher realizado com os 110 genótipos de jabuticabeira do banco ativo de germoplasma da da UTFPR – Câmpus Dois Vizinhos.

GRUPO	ACESSO
1	x 17 x 24 x 52 x 25 x 11 x 59 x 51 x 33 x 57 x 30 x 14 x 68 x 64 x 32 x 29 x 44 x 54 x 55 x 28 x 103 x 87 x 67 x 48 x 39 x 58 x 47 x 56 x 89 x 38 x 22 x 43 x 13 x 36 x 70 x 88 x 45 x 35 x 20 x 15x 12 x 5 x 62 x 63 x 16 x 61 x 41 x 72 x 40 x 9 x 65 x 1 x 46 x 66 x 74 x 18 x 26 x 49 x 53 x 8 x 10 x 98 x 71 x 6 x 7 x 31 x 34 x 4 x 102 x 86 x 104 x 21 x 27 x 37 x 60 x 42 x 99 x 69 x 101 x 50 x 19 x 100 x 106 x 23 x 108 x 107 x 73 x 83 x 85 x 105
2	x 90 x 91 x 93 x 95 x 92 x 2 x 94 x 77 x 82 x 97 x 76
3	x 79 x 80 x 81 x 78
4	x 3 x 110
5	x 109
6	x 75
7	x 96
8	x 84

Dos 8 grupos formados percebe-se que a grande maioria dos acessos ficaram restritos ao primeiro (89 genótipos), com alguns no grupo 2 (11 genótipos) e 3 (4 genótipos), dois no grupo 4, além dos acessos isolados dos grupos 5 ao 8.

O grupo 1 absorveu a maior parte dos genótipos e nele reuniu-se praticamente todos os indivíduos com origem no Sudoeste do PR. No entanto, este não agrupou nele nenhum indivíduos com origem de material trazido de Minas Gerais, representados pelos conjuntos Sabará, Cabinho e Silvestre.

Os 89 indivíduos agrupados demonstraram similaridade apesar de terem origem em sítios de coleta diferentes, o que sugere que podem ter ancestralidade em comum, fato marcante ao se verificar o ecossistema local e perceber a ocorrência da Floresta de Araucária de maneira contígua nessa região antes da exploração antrópica, o que devia facilitar o fluxo gênico entre os indivíduos, principalmente pela ação do indígena que habitava a região.

O grupo 2 agrupou 11 indivíduos, dentre os quais nove tem origem comum, já que 7 são do grupo “Sabará” e 2 do grupo “Silvestre” e outro Açú Paulista. Todos estes acessos foram coletados no Estado de MG e cedidos pela Universidade Federal de Viçosa para composição do presente banco ativo de germoplasma. O outro indivíduo corresponde a um representante da “jabuticaba” e foi o único

contrastante quanto a presença de alelos raros ao ser comparado com os outros indivíduos do mesmo sítio de origem.

No grupo 3 enquadraram-se 4 acessos, sendo que todos eles fazem parte e são os únicos pertencentes ao local de coleta denominado “Fernando Xavier”, partindo de sementes de mesma origem. Esse material apesar de ser oriundo de planta da cidade Dois Vizinhos, tem sua origem de planta cultivada no Paraguai, o que explica seu agrupamento.

O grupo 4 foi formado por somente dois indivíduos, sem aparente grau de parentesco, já que um deles foi oriundo de coletas realizadas no Sudoeste do Paraná e outro é o único indivíduo representante do grupo “cabinho” cuja origem foi no Estado de Minas Gerais. Tal similaridade apesar de existente parece não ter origem em ancestralidade comum, já que seria mais provável que a ancestralidade se manifestasse antes entre os indivíduos que habitam a mesma região, do que entre acessos tão distantes geograficamente.

O grupo 5 foi constituído de um único indivíduo, pertencente a jabuticabeira silvestre, cuja origem é do Estado de Minas Gerais. Supõe-se que essas jabuticabeiras apesar de originárias de mesma planta, possam ter sido fecundadas com pólenes distintos, fazendo com que houvesse a segregação genética, demonstrada por esse agrupamento.

No 6º grupo enquadraram-se somente o indivíduo pertencente ao grupo “silvestre”, sendo este o último indivíduo desse conjunto e que não havia se enquadrado no grupo 03, apesar de ter a mesma origem geográfica que as plantas com essa nomenclatura pertencentes ao grupo 03.

O grupo 7 foi formado por um indivíduo da jabuticabeira sabará¹ e que segundo o presente agrupamento não tem relação direta com as outras três plantas oriundas de mesma origem.

No grupo 8 ficou isolado o indivíduo pertencente a jabuticabeira “Açu paulista”, também sem apresentar relação com os outros três indivíduos de mesma nomenclatura.

Através da análise dos 8 grupos formados pode-se dizer que não há grande diversidade entre os indivíduos, o que corrobora com os dados extraídos da matriz

de similaridade, cujos valores de semelhança entre os indivíduos foram altos, com raros índices de dissimilaridade.

Considerando-se a proposta do banco ativo de germoplasma das jabuticabeiras da UTFPR – Câmpus Dois Vizinhos, qual seja abrigar diversidade genética e funcional de materiais remanescentes das matas do Sudoeste do Paraná, com vistas para preservação dos recursos genéticos dessa espécie, bem como, genitores em futuras hibridações ou como cultivares a serem lançadas, pode-se pensar na possibilidade de se utilizar a presente coleção como ponto de partida para criação de coleção nuclear.

As coleções nucleares tem sido criadas em diversos programas de melhoramento, com objetivo de reduzir o trabalho e os recursos necessários para sua manutenção, já que esta é formada por representantes dos grupos de similaridade encontrados na coleção base, com a intenção de que tendo um tamanho efetivo, bem menor do que a coleção original, possa representar grande parte ou a totalidade da sua diversidade genética (BROWN, 1995).

Tal estratégia pode ser importante também com vistas a ensaios de campo dentro do programa de melhoramento, onde torna-se necessário testar e acompanhar o desenvolvimento de materiais em diferentes regiões, já que através dos resultados dessa pequena coleção pode-se estimar os possíveis efeitos dentro dos outros indivíduos em cada grupo.

A manutenção dessa coleção, bem como seu aumento e conservação serão essenciais no que tange a conservação dos recursos, ainda mais se for considerado o atual estado de degradação e avanço antrópico sobre as áreas naturais, podendo esta ser uma das poucas estratégias com alta eficiência.

Para isso é importante que existam programas de incentivo e fomento para a conservação *on farm* de forma que o conhecimento adquirido e conservado ao longo do tempo pelas famílias de camponeses que manejaram a cultura possam ser preservados junto com a preservação do conjunto genético da espécie.

4 CONCLUSÕES

O armazenamento durante três meses de folhas de jabuticabeiras em envelopes fechados hermeticamente e contendo sílica gel foi suficiente para armazenamento do tecido vegetal sem afetar o DNA dos genótipos envolvidos, quando a extração de DNA foi feita com uso do kit de extração.

Os marcadores moleculares FSE_16 e FSE_4, descritos originalmente para *Acca selowianna* podem ser utilizados em jabuticabeiras (*Plinia* spp.), apresentando bom perfil de amplificação e *locus* polimórficos para o conjunto de plantas estudadas.

Em futuros estudos com o gênero *Plinia*, havendo limitação de quantidade de marcadores a serem utilizados, sugere-se o uso preferencial de PLI_01, PLI_05, PLI_18, FSE_16 e FSE_4, pois foram aqueles com maior capacidade informativa.

A coleção de plantas de jabuticabeiras da UTFPR – Câmpus Dois Vizinhos apesar de abrigar nível mediano de diversidade, tem tamanho desproporcional ao tamanho do *pool* gênico que abriga, tendo 10% dos indivíduos sozinhos capazes de representar mais de 50% de toda diversidade alélica.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É premente que se estabeleçam programas oficiais de fomento e pesquisa da biodiversidade vegetal, manejada ou não, existente no Brasil. Se medidas rápidas e efetivas não forem tomadas corre-se o risco de perder o arcabouço genético trabalhado pelo homem desde que inicia a prática de agricultura e estabelece-se as relações de vivência e convivência com os vegetais de seu interesse, uma relação que se estabelecia para além do interesse econômico e que portanto não valorava essa diversidade pelo quanto ela poderia ser vendida, mas pelo valor de uso, preservação, estética e bem estar.

REFERÊNCIAS

AMBROSIO, R. et al. **Efeito do período e da temperatura de armazenamento na viabilidade de sementes de jaboticabeira (*Plinia cauliflora*)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20., Vitória, 2008. Anais... Vitória: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2008. 1 CD-ROM.

AMORIN, E.P.; REIS, R.V.; SEREJO, J.A.S.; AMORIM, V.B.O.; SILVA, S.O. **Variabilidade genética estimada entre diplóides de banana por meio de marcadores microssatélites**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.43, n.8, p.1045-1052, ago. 2008.

APREMAVI. ASSOCIACAO ... **Floresta com araucárias**. Disponível em: [://www.apremavi.org.br/floresta-com-araucarias](http://www.apremavi.org.br/floresta-com-araucarias). Acesso: 18/09/2012.

AZEVEDO, V.C.R.; **Manual de curadores de germoplasma vegetal : Caracterização molecular**. Documentos 314. Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia. 2010. Brasília: DF.

BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C.; SCHUCH, M.W.; SANSAVINI, S. **Caracterização molecular de cultivares de pessegueiro e nectarineira com microssatélites**. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v.26, n. 3, p. 490 - 493. 2004

BIODIVERSITAS. 2006. **Lista da flora ameaçada de extinção com ocorrência no Brasil IUCN**. http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/listas_flora.asp (acesso em 15/04/2008).

BLANKENSHIP, S.M.; MAY, B.; HEDGECOCK, D. **Evolution of a Perfect Simple Sequence Repeat Locus in the Context of Its Flanking Sequence**. Mol. Biol. Evol. 19(11):1943–1951. 2002.

BRAGA, L.S.; CURTI, S.M.; UMADA, M.K.; SEKINE, E.S. **Plantas apícolas nativas da região de Campo Mourão-PR**. Anais do 3º Seminário de extensão e inovação da UTFPR -SEI. UTFPR. 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira - PROBIO**. Relatório de atividades PROBIO 2002-2004 / Ministério do Meio Ambiente. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004.

BROWN, A. H. D. **The core collection at the crossroads**. In: HODGKIN, T. B., A. H. D.; HINTUM, T. J. L. VAN; MORALES, E. A. V. (Ed.). Core collections of plant genetic resources. 1995.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. **Marcadores Microssatélites em Espécies Vegetais**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v.7, p.46-50, 2003.

CARNEIRO, J.L.S.; FERREIRA, C.F.; FILHO, W.S.; PASSOS, O.S.; GESTEIRA, A.S.; **Caracterização molecular de acessos do banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Jornanda Científica - Embrapa Mandioca e Fruticultura. Embrapa: 2010.

CARVALHO, M.F.; CRESTANI, M.; FARIAS, F.L.; COIMBRA, J.L.M.; BOGO, A.; GUIDOLINI, A.F. **Caracterização da diversidade genética entre acessos crioulos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) coletados em Santa Catarina por marcadores RAPD**. Ciência Rural, v.38, n.6, set, 2008.

CITADIN, I.; DANNER, M.A.; SASSO, S.A.Z.; **Jaboticabeiras**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.32, p.343-656, 2010.

Cruz, C.D. **Programa Genes: Biometria**. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2006

DANNER, M.A.; CITADIN, I.; SASSO, S.A.Z.; SCARIOT, S.; BENIN, G. **Genetic Dissimilarity Among Jaboticaba Trees Native to Southwestern Paraná, Brazil**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.33, p.517-525, 2011a.

DANNER, M.A.; SASSO, S.A.Z.; BITTENCOURT, J.V.M.; CITADINS, I.; SACHET, M.R.; **Proposta de protocolo para extração de DNA de Jaboticabeira**. Revista Ciência Florestal, v.21, p.363-367. 2011b.

DANNER, M.A.; **Diagnóstico ecogeográfico e caracterização morfogenética de jaboticabeiras**. 2009. 130f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2009.

DANTAS, A.C.M.; NODARI, R.O.; **Marcadores Genéticos**. Disponível em: <http://www.lfdgv.ufsc.br/MARCADORESMOLECULARES2.pdf>. Acesso: 19/07/2012.

DANTAS, A.C.A.; NUNES, G.H.S.; ARAÚJO, I.S.; ALBUQUERQUE, L.B. **Caracterização molecular de acessos de melão coletados no nordeste brasileiro**. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 34, n. 1, p. 183-189, Março 2012.

DELLAGOSTIN, M.; HENNING, F.A.; MERTZ, L.M.; KOPP, M.M.; CRESTANI, M.; SCHUSTER, I.; ZIMMER, P.D. **Dissimilaridade genética em população segregante de soja com variabilidade para caracteres morfológicos de semente**. Revista Brasileira de Sementes, vol. 33, nº 4 p. 689 - 698, 2011.

DOYLE, J. J. e DOYLE, J. L. 1987. **A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues**. Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer. 19: 11-15.

FALCÃO, A.J.S.; FILHO, R.M.; MAGNABOSCO, C.U.; BOZZI, R.; LIMA, F.A.M.; **Efeitos da Endogamia sobre Características de Reprodução, Crescimento e Valores Genéticos Aditivos de Bovinos da Raça Pardo-Suíça.** Rev.bras.zootec.,30(1):83-92, 2001

FALEIRO, F.G.; **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 102p. 2007.

FALEIRO, F.G. **Seleção assistida por marcadores moleculares: diferentes aplicações:** mesa redonda. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Anais.... Londrina: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2003.

FERREIRA, D.K.; **Caracterização genética e estrutura populacional de diferentes origens de Araucaria angustifolia na FLONA de Três Barras.** (Dissertação Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

FERREIRA, F.R.; **Germoplasma de frutíferas.** Rev. bras. Frutic., Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. 001-006, outubro 2011.

FILHO, J.A.D.; RESENDE, L.V.; BASTOS,G.Q.; NETO, D.E.S.; MACHADO, P.R. **Utilização de marcadores moleculares RAPD e EST's SSR para estudo da variabilidade genética em cana-de-açúcar.** Revista Ciência Agronômica, v.44, n. 1,p 141 - 149, 2013.

GALETTI Jr, P. M., RODRIGUES, F. P., SOLÉ-CAVA, A., MIYAKI, C. Y., CARVALHO, D., EIZIRIK, E., VEASEY, E. A., SANTOS, F. R., FARIAS, I. P., VIANNA, J. A., OLIVEIRA, L. R., WEBER, L. I., ALMEIDA TOLEDO, L. F., FRANCISCO, M. R., REDONDO, R. A. F., SICILIANO, S., DEL LAMA, S. N., FREITAS, T. R.O., HRBEK, T., MOLINA, W. F. 2008. **Genética da conservação brasileira.** In: Fundamentos de Genética da Conservação. Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., Ribeirão Preto, SP, Editora SBG. 2008.

HOFFMANN, L.V.; BARROSO, P.A.V. **Marcadores moleculares como ferramenta para estudos de genética de plantas.** Embrapa Algodão, documentos 147. Campina Grande: 2006.

LEÃO, P.C.S.; BRANDÃO, E.O.; GONÇALVES, N.P.S. **Caracterização agronômica e molecular do clone Itália Muscat no submédio do vale do São Francisco.** Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 33, n. 1, p. 297-302, Março 2011.

LEITE, T. L.; MARCO, A. F.; TARCHETTI, B. D.; FERREIRA, M. A. J. F.; AMARAL, Z. P. S.; BUSO, G. S. C. **Análise de transferibilidade de primers microssatélites de Cucumis melo para Curcubita moschata e Luffa cylindrica.** Brasília, 2007. Disponível em:

<http://www.cenargen.embrapa.br/clp/publicacoes/2007/bpd/bpd203.pdf>. Acesso em: 10 de jan de 2013

LUCION, A.P.S.; SIEDEMBERGER, D.R.; MARASCA, E.N.; TEIXEIRA, U.M. **Desenvolvimento Sustentável**. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Ed.36. 2006.

MANICA, I. **Frutas nativas, silvestres e exóticas 1**: técnicas de produção e mercado: abiu, amora-preta, araçá, bacuri, biriba, carambola, cereja-do-rio-grande, jaboticaba. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2002. 327 p.

MARTINS, A.B.G.; RODRIGUES, M.G.F.; DE PAULA, D.R.; MENDES, H.S.J.; ARANTES, F.C.; SILVA, C.L.S.P. **Caracterização molecular e diversidade genética de diferentes variedades de abacate por marcadores microssatélites**. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 33, n. 4, p. 1178-1184, Dezembro 2011

MEDEIROS, C.F.L.; CARDOSO, M.A.; FERREIRA, P.C.G.; **Uso de microssatélites em estudos de biologia da conservação**. Revista Floresta e Ambiente. v. 13, n2, p25 - 36, 2006.

MOREIRA, R. A. ; CRUZ, M. C. M. . **Fruticultura : Particularidades da jaboticaba**. Jornal Democrata, São José do Rio Pardo - SP, v. 1137, p. 6 - Segundo Caderno, 05 de março de 2011.

MOURA, S.M; CARDOSO, T.G; SILVA, A.G; CONSTANT, P.B.L; FIGUEIREDO, R.W. **Determinação de antocianinas, polifenóis e antioxidantes totais do extrato aquoso de jaboticaba**. XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA DOMÉSTICA. 14 a 19 de setembro de 2009.

NIZIO, D.A.C.; MALUF, W.R.; FIGUEIRA, A.R.; NOGUEIRA, D.W.; SILVA, V.F.; NETO, A.C.G. **Caracterização de genótipos de tomateiro resistentes a begomovírus por marcador molecular co-dominante ligado ao gene Ty-1**. Pesquisa Agropecuária brasileira, , v.43, n.12, p.1699-1705, dez. 2008.

NODARI, R.N.; GUERRA, M.P.; STEFENON, V.M. **FIT 5806 - Biotecnologia. Apostila v.6**. 2008. (Material didático).

OLIVEIRA, E.J.; **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo**. Piracicaba, 2006. (tese de doutorado).

OLIVEIRA, E. J.; DANTAS, J. L. L.; CASTELLEN, M.S.; MACHADO, M. D. **Identificação de microssatélites para o mamoeiro por meio da exploração do banco de dados de DNA**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 30, n.3, p. 841-845, 2008.

OLIVEIRA, M.S.P.; SANTOS, J.B.; AMORIM, E.P.; FERREIRA, D.F. **Variabilidade genética entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microsátélites.** Ciencia agrotecnica, Lavras, v.34, n.5, p.1253 - 1260, 2010.

PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; GUIMARÃES, P.S.; LUDERS, R.R.; GALLO, P.B.; SOUZA, A.P.; LABORDA, P.R.; OLIVEIRA, K.M. **Capacidade combinatória, divergência genética entre linhagens de milho e correlação com heterose.** Bragantia, Campinas, v.67, n.3, p.639-648, 2008

PEREIRA, M. et al. **Morphologic and molecular characterization of Myrciaria spp species.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.27,n.3,p.507-510,2005.

ROCHA, R.B.; PEREIRA, J.F.; CRUZ, C.D.; QUEIROZ, M.V.; ARAÚJO, E.F.; **O Mapeamento Genético no Melhoramento de Plantas.** Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Ed.30. 2003.

ROMANO, E.; MIRANDA, A. C. B. **Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, 1999, v.2, n.9, p.40-43.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; CARPENTIERI-PIPOLO, 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.

SANTOS, C.A.F.; OLIVEIRA, V.R.; RODRIGUES, M.A.; RIBEIRO, H.L.C. **Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microsátélites.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.45, n.1, p.49-55, jan. 2010.

SILVA, S. D. A.; ANTUNES, L. E. C.; ANTHONISEN, D. G.; LEMÕES, J. S.; GONÇALVES, E. D. **Caracterização de genótipos de mirtilo utilizando marcadores moleculares.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.30, n.1, p.180-184, 2008.

SILVA, et al. **Atividade antioxidante total da jaboticaba (myrciaria cauliflora).** Disponível em: <http://revista.ulbrajp.edu.br/sic-xiii/anais/Biologia/1284-3349-1-CE.docx>. Acesso: 18/09/2012

SLATKIN, M.; BARTON, N.H. **A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow.** Evolution. n.43, p.1349-1368, 1989.

SOBRAL, M. 2003. A Família Myrtaceae no Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul: Unisinos,

TEIXEIRA, N.C.; **Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação sensorial de suco de jabuticaba.** (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos. 2011

TERCI, D.B.L. **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas.** 2004. 231F. Tese (Doutorado em química analítica) - Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L.; GOES, M. **Conservação “ex situ” de recursos genéticos vegetais.** In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). Recursos genéticos & melhoramento: planta. Rondonópolis: Fundação MT, 2001a. p. 123-158.

VENCOVSKY, R. 1997. **Biometrical approaches for molecular markers: estimation of effective population size.** In International Workshop on Agricultural Biotechnology, 1997. Proceedings. ESALQ-USP, Piracicaba, Cook College - New Jersey Agricultural Experiment Station, The State University of New Jersey, Rutgers. 2p.

VIEIRA, D.P.; **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações.** (Material didático) Disponível em: http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20-%20Biologia%20Celular/Principios_da_PCR.pdf Acesso: 04/05/2013.

WAGNER JÚNIOR, A.; Silva, J.O.C.; PIMENTEL, L.D.; SANTOS, C.E.M.; BRUCKNER, C.H. **Germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies de jabuticabeira em função do tamanho de sementes.** Acta Scientiarum. Agronomy. v. 33, n. 1, p. 105-109, 2011

WEILER, R.L.; BRUGNARA, E.C.; SCHWARZ, S.F.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A.; WITTMANN, M.T.S. **Caracterização molecular de uma progênie de tangerineira ‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’.** Ciência Rural, Santa Maria, v.40, n.7, p.1523-1529. 2010.