



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DIVERSIDADE GENÉTICA DE GABIROBEIRAS
(*Campomanesia* spp) POR MEIO DE CARACTERES
MORFOLÓGICOS E MARCADORES MOLECULARES RAPD

Elisvane Silva de Assis

Bióloga

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DIVERSIDADE GENÉTICA DE GABIROBEIRAS
(*Campomanesia* spp) POR MEIO DE CARACTERES
MORFOLÓGICOS E MARCADORES MOLECULARES RAPD

Elisvane Silva de Assis

Orientador: Prof. Dr. Edésio Fialho dos Reis

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio dos Santos Dias

Prof. Dr. Luis Antônio Serrão Contim

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás – UFG, Câmpus Jataí, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

Jataí– GO

Junho de 2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ELISVANE SILVA DE ASSIS – nasceu na cidade de Itarumã - GO em 11 de dezembro de 1983, filha de Valdeci de Assis e Noeme Batista da Silva. Em 2002 ingressou no Curso de Ciências Biológicas (Licenciatura) na Universidade Federal de Goiás (UFG) – Campus Jataí, concluiu em 2005. Em Março de 2009, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) na Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí UFG/Jataí, sob orientação do Professor Dr. Edésio Fialho dos Reis e co-orientação do Professor Dr. Luiz Antônio dos Santos Dias e Professor Dr. Luis Antônio Serrão Contim, sendo bolsista do CNPq, concluindo-o em junho de 2011.

“Talvez eu não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que eu deveria ser, mas sou o que irei ser e graças a Deus não sou o que eu era”.

(Martin Luther King)

Aos meus pais e em especial meu filho Pedro
Lucas, ao qual desejo ser espelho e exemplo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, o qual é presente em minha vida, a quem devo minha existência, minha sabedoria, minhas conquistas.

Aos meus pais, os quais, amo muito e são exemplos de coragem, trabalho, dedicação em tudo que já fizeram.

Aos meus irmãos Elisângela, Tatiane e Daniel, agradeço pelo companheirismo e pelo apoio que sempre me deram nas horas difíceis, por importarem com minha existência, por mandarem mensagens de entusiasmo, pelas conversas, pelos conselhos nas horas certas.

Agradeço ao meu filho, por completar minha existência, preencher meus dias de alegria.

Ao programa de Pós-graduação em Agronomia Campus Jataí (UFG) que abriu as portas para esta pesquisa, e aguardou por um resultado.

Agradeço meu orientador Dr. Edésio, o qual idealizou esta pesquisa e me deu a tarefa de desenvolvê-la.

Aos co-orientadores Luis Antônio Serrão Contim e Luiz Antônio dos Santos Dias por aceitarem essa tarefa.

Ao CNPq, órgão este, responsável pelo apoio financeiro, viabilizando o desenvolvimento do trabalho.

Ao parceiro de pesquisa Jefferson, pelo companheirismo e orientações que somaram atributos para o desenvolvimento da pesquisa.

Minhas amigas e companheiras Núbia e Luciene, eu agradeço por ter conhecido vocês, por mostrarem que sou corajosa, por me encher de elogios, quando nem sempre eu merecia. Obrigada amigas por tudo.

À companheira Natalia, hoje bióloga, que me deu apoio aos trabalhos de laboratório.

Aos alunos Djalma, Hudson, Eduardo, agradeço pelo esforço e dedicação nas horas que precisei.

A todos que torceram por mim e pelo sucesso da pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Aspectos gerais da família Myrtaceae	4
2.2 Gênero <i>Campomanesia</i>	5
2.2.1 Principais características e importância econômica do gênero <i>Campomanesia</i>	5
2.3 Diversidade genética	7
2.3.1 Diversidade Genética baseada em caracteres morfológicos e moleculares	8
2.3.1.2 Análise conjunta de dados morfológicos quantitativos e qualitativos	9
2.3.2.1 Análise de agrupamento	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Descrição de coleta	15
3.2 Experimento no Campo	18
3.3 Obtenção dos marcadores moleculares RAPD	18
3.3.1 Extração de DNA.....	19
3.3.2 Reação de amplificação do DNA de gabirobeiras	20
3.3.3 Seleção de primers para a obtenção dos marcadores RAPD	20
3.4 Análise estatística.....	21
3.4.1 Identificação do número de marcas	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Dados morfológicos de gabirobeiras nativas (matrizes)	24
4.1.1 Diferenciação Morfológica	24
4.1.2 Diversidade genética entre as 140 matrizes com base nos Caracteres morfológicos.....	26
4.2 Análise da diversidade genética entre as 140 progênies em desenvolvimento inicial.....	28
4.2.1 Análise Univariada	28
4.2.2 Análise de agrupamento entre as progênies de gabirobeiras em desenvolvimento inicial	29
4.3 Análise molecular	31
4.3.1 Quantidade e integridade do DNA extraído das plantas de gabirobeiras..	31
4.3.2 Seleção e nível de polimorfismo gerado pelos <i>primer's</i> RAPD	31
4.3.3 Análise do número ótimo de bandas (Bootstrap)	34
4.3.4 Análise da diversidade genética entre as 140 matrizes por meio dos dados moleculares RAPD.....	36
4.3.5 Diversidade genética entre as 17 procedências de gabirobeiras do Estado de Goiás.....	38
4.3.6 Diversidade genética dentro de cada procedência de gabirobeiras do Estado de Goiás.....	40
4.4 Considerações quanto ao uso dos dados morfológicos e moleculares no estudo da diversidade genética de gabirobeiras.....	41
5. CONCLUSÕES	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

DIVERSIDADE GENÉTICA DE GABIROBEIRAS (*Campomanesia* spp) POR MEIO DE CARACTERES MORFOLÓGICOS E MARCADORES MOLECULARES RAPD

RESUMO: A transformação de áreas nativas em áreas antropizadas é uma grande ameaça para a sobrevivência de populações naturais de espécies do Cerrado. Estudos sobre a variabilidade genética remanescente são imprescindíveis. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade genética de gabirobeiras a partir de marcadores moleculares RAPD e caracteres morfológicos. Para tal, utilizou-se 140 matrizes de gabirobeiras representantes de populações nativas, para a avaliação da variabilidade genética com base em dados morfológicos e moleculares. Sementes de cada indivíduo de cada população foram coletadas e utilizadas para a geração de progênies e estruturação de uma coleção de germoplasma da espécie. Nas progênies, oriundas das matrizes, foram feitas avaliações morfológicas no desenvolvimento inicial. Efetuou-se o agrupamento entre os genótipos para análise da diversidade genética. Foi observado tendência no agrupamento conforme as origens das plantas em estudo e variabilidade genética entre e dentro das procedências em estudo. Todas as procedências apresentaram taxa de polimorfismo superior a 60%. Tanto pela análise morfológica quanto pela análise molecular a variabilidade genética para o material de estudo foi identificada. A coleção de estudo de gabirobeiras implantada no Campus Jataí apresenta variabilidade genética para a conservação dessas plantas ou trabalhos voltados ao melhoramento das mesmas.

Palavras - chave: Biodiversidade do cerrado, polimorfismo e dissimilaridade genética.

Genetic diversity of “gabirobeiras” (*Campomanesia* spp) by morphological characters and RAPD markers.

ABSTRACT: The transformation of native areas in disturbed areas is a major threat to the survival of natural populations of species from “Cerrado”. Studies on genetic variability remaining are very important. This work aims to characterize the genetic diversity of “gabirobeiras” from RAPD markers and morphological characters. For this, we used arrays gabirobeiras 140 representatives of native populations, to assess the genetic variability based on morphological and molecular data. Seeds of each individual from each population were collected and used to generate progeny and structuring of a germplasm collection of species. In progenies from as matrices, morphological assessments were made in early development. It was conducted by the group between genotypes for analysis of genetic diversity. Trend was observed in the group as the origins of the plants under study and genetic variability between and within provenances under study. All provenances showed polymorphism more than 60%. Both morphological analysis and by molecular analysis of genetic variability for the study material was identified. The collection of study “gabirobeiras” implanted in “Jataí” also presents genetic variability for the conservation of the plant or work to improve them.

Keywords: Biodiversity from “Cerrado”, polymorphism and genetic dissimilarity.

1 INTRODUÇÃO

O cerrado possui grande fonte natural de recursos biológicos, o qual ocupa aproximadamente 21% do território brasileiro, dos quais, cerca de 90% de sua área estão distribuídas nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás e Bahia (Fonseca e Muniz, 1992). Esse bioma é considerado o segundo maior do País. Várias espécies nativas se destacam como alimentícias, medicinais, madeireiras, artesanais, além de outros usos (Aquino et al., 2007).

Dentre as espécies nativas, a gabirobeira (*Campomanesia*), frutífera pertencente à Família Myrtaceae e ao Gênero *Campomanesia* conhecida também por guabiroba, gabiroba-do-mato ou gabiroba-do-campo, guavira e cambucizeiro representa importante recurso vegetal do cerrado, pois apresentam importância diversificada. Seus frutos são considerados peculiares, possuindo interessantes propriedades aromáticas que além do consumo *in natura*, a gabiroba pode ser aproveitada pela indústria de alimentos para produção de doces e sorvetes (Ávidos & Ferreira, 2003), bem como servir de matéria-prima para produção de licores, devido aos seus atributos de qualidade como: elevada acidez, ácido ascórbico, minerais, fibras alimentares e hidrocarbonetos monoterpênicos (α -pineno, limoneno e β -pineno), presentes em maior quantidade no óleo volátil dos frutos, e que lhes conferem aroma cítrico (Vallilo et al., 2006). A planta tem sido usada também pela indústria de cosméticos e farmacológicos devido à presença de componentes importantes como: sesquiterpenos espatuleno, óxido de B-cariofileno, biciclogermacreno e o globulol, estas substâncias apresentam atividade farmacológica (Adati, 2001; Vallilo et al., 2006).

Algumas espécies como a *C. adamantium* (Cambess) O. Berg.; *C. pubescens* (DC.) O. Berg.; *C. sessiliflora* (O. Berg) Mattos apresentam ampla distribuição no bioma Cerrado, podendo ser facilmente encontradas, nas regiões sudeste e centro-oeste do país (Lorenzi et al., 2006). Outras espécies apresentam distribuição geográfica diversificada como é o caso da *C. guaviroba* (DC) Kiaersk, *C. neriiflora* (O. Berg) Nied. e *C. phaea* (O. Berg) Landrum, que podem ser encontradas em Floresta pluvial Atlântica da Serra do Mar e Planície costeira do Estado de São Paulo. A espécie *C. guazumifolia* (Cambess.) O. Berg é encontrada no Sul do país e

C. lineatifolia Ruiz & Pav é de ocorrência da floresta amazônica (Lorenzi et al., 2006).

As espécies do Gênero *Campomanesia* com ocorrência no Cerrado estão ameaçadas, em grande parte, devido à velocidade de conversão de áreas nativas em áreas antropizadas e também ao consumo extrativista. O avançado processo de fragmentação, caracterizado por ocupações humanas desorganizadas associadas à expansão agropecuária, faz com que pequenos e isolados fragmentos sejam os únicos representantes remanescentes da vegetação nativa do Cerrado. Esse processo desorganizado de fragmentação tem reduzido o tamanho das populações nativas de gabirobeiras. A preocupação com esse processo é que quanto maiores os danos à paisagem natural do Cerrado, maiores serão os recursos despendidos para a conservação dessas espécies.

Trabalhos que buscam conhecer a variabilidade genética ainda existente são imprescindíveis, pois fornecem estratégias voltadas à domesticação, manejo e conservação dessas espécies nativas, tanto para a implantação de bancos de germoplasma, coleções de estudo ou para conservação *in situ*. Para este conhecimento de indivíduos ou populações, a utilização de características morfológicas e mais recentemente os marcadores moleculares tem sido crescente. Embora o volume de informações genéticas provenientes de marcadores moleculares tenha aumentado em grandes proporções para estudos de diversidade genética, muitos estudos ainda têm dado ênfase ao uso de características fenotípicas, principalmente as quantitativas (Cruz, 2011). Descritores morfológicos são mais acessíveis e antecedem a utilização de outras metodologias, permitindo a orientação do trabalho a ser realizado com descritores mais sofisticados (Andrade et al., 2011)

Os programas de melhoramento genético têm utilizado as ferramentas biotecnológicas para avaliar a variabilidade e a diversidade nas espécies estudadas. Uma das principais vantagens da utilização desta ferramenta é propiciar a redução do tempo para identificação da diversidade genética entre os indivíduos trabalhados (Xavier et al., 2005). Um dos marcadores moleculares utilizados é o RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) por ser uma técnica rápida e de custo relativamente baixo, porém com potencial informativo (Areias et al., 2006). Na literatura há vários

trabalhos empregando esta técnica para estudos da diversidade genética em diversas culturas, dentre os quais se destacam os estudos: populações silvestres de passiflora (Junqueira et al., 2007; Bellon et al, 2009; Cerqueira-Silva et al.,2010), de açaizeiro (Oliveira et al., 2007; Oliveira & Silva, 2008), seringueira (Bicalho et al., 2008), butiazeiro (Nunes et al., 2008) e macadamia (Neto & Moryia., 2010). Nos estudos de goiabeira (Gomes Filho et al., 2010) utilizaram descritores morfológicos e moleculares para interpretação da diversidade genética.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo determinar a diversidade genética de gabirobeiras (*Campomanesia* spp) por meio de Caracteres morfológicos e marcadores moleculares RAPD.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da família Myrtaceae

A família Myrtaceae é considerada uma das maiores famílias pertencente à ordem Myrtales, é constituída por 130 gêneros e mais de 4000 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com centros de diversidade na região neotropical e na Austrália, sendo que no Brasil é representada por 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies (Lorenzi, 2006).

Do ponto de vista taxonômico, é uma das famílias mais complexas, tanto pelo número de espécies quanto pela utilização de alguns caracteres críticos na delimitação de grandes grupos (Souza & Lorenzi, 2005). Uma das características mais marcantes das Myrtaceae é a presença de glândulas translúcidas distribuídas no limbo foliar. Estas glândulas são cavidades secretoras contendo terpenóides e outros compostos aromáticos (Judd et al., 1999), que também se distribuem em outras partes das plantas. As folhas são opostas ou alternas, usualmente com nervação pinada. As flores são geralmente epíginas, mas podem apresentar periginia; os estames são comumente numerosos; os ovários são usualmente íferos a semi-íferos, com número variável de lóculos (Judd et al., 1999).

O potencial e o significativo interesse econômico pela referida família é reconhecido no Brasil. Várias espécies são utilizadas na alimentação, fornecimento de madeira, propriedades medicinais e potencial ornamental. Entre as espécies apreciadas por seus frutos além da gabirobeira, merecem destaque a goiaba (*Psidium guajava* L.), a uvaia (*Eugenia uvalha* L.), o jambo (*Syzygium jambos* (L.) Alston) e a jabuticaba (*Plinia cauliflora* L.), também utilizadas na fabricação de licores. As espécies de *Psidium* são utilizadas popularmente para aliviar disenteria, como anestésicos e por apresentar atividade fungicida. Entre as grandes produtoras de madeira e também anti-sépticos, destacam-se várias espécies de *Eucalyptus* L. Her. Como ornamentais, merecem destaque *Myrtus communis* L. e *Melaleuca* L. (Costa, 2004).

2.2 Gênero *Campomanesia*

2.2.1 Principais características e importância econômica do gênero *Campomanesia*

Pertencente a subtribo Myrtinae, o gênero *Campomanesia* é composto por árvores e arbustos, encontrando-se distribuído do Norte da Argentina à Trindade e da Costa do Brasil ao Peru, Equador e Colômbia (Landrum 1986). Ainda segundo o autor, as árvores são encontradas nas florestas subtropicais e tropicais do Leste do Brasil, norte da Argentina e nos Andes, já os arbustos ocorrem nos campos e cerrados do interior do Brasil. Possui cerca de 30 espécies, sendo 24 delas no Brasil (Landrum & Kawasaki, 1997). As plantas arbóreas medem entre 8 e 15 m, podendo chegar a 25 m, e as arbustivas, entre 0,80 e 1,5 m, ocorrendo normalmente em moitas. Durante o período de inverno, há caducifolia e, na primavera, as plantas rebrotam e florescem abundantemente (Almeida et al., 2000).

A Inflorescência da gabirobeira apresenta-se em racemo axilar altamente modificado no qual a ráquis continua o crescimento vegetativo e produz folhas normais abaixo de cada botão de modo a aparecer um ramo vegetativo normal com uma série de flores ou frutos axilares isolados (racemo precoce). Brácteas e bractéolas geralmente persistentes no fruto (Proença, 1994). Suas flores são pequenas de coloração creme-esbranquiçado, sendo hermafroditas. Almeida et al. (2000) destacaram que insetos são responsáveis pela polinização das flores, sendo as abelhas os principais agentes polinizadores. A floração ocorre normalmente de agosto a novembro e frutificação de setembro a novembro, em alguns anos até fevereiro, começando a produzir frutos a partir de um a dois anos após o plantio (Lorenzi et al., 2006).

Seus frutos são arredondados e de coloração verde-amarelada. Polpa amarelada, suculenta, envolvendo numerosas sementes (Avidos & Ferreira, 2003). Produz de 30 a 100 frutos por planta, com dimensões de 1 a 3 cm de comprimento por 2 a 3 cm de diâmetro. A principal forma de multiplicação de ambas as espécies do gênero *Campomanesia* é feita por meio de sementes (Lorenzi et al., 2006). A

gabirobeira se assemelha com a mangaba em relação à germinação de suas sementes, sendo que elas podem perder rapidamente o poder germinativo, por isso, devem ser semeadas logo após a extração dos frutos (Ávidos & Ferreira, 2003). Melchior et al. (2006) constataram que na espécie *Campomanesia adamantium* Camb, a semeadura de sementes recém retiradas do fruto apresentou melhores taxas de germinação. Os mesmos autores consideraram que a espécie estudada pode ser classificada como recalcitrante, por não suportar armazenamento, a baixa temperatura e ser intolerante à dessecação. Relataram ainda que o grau Brix da polpa da fruta é um parâmetro importante de se observar para ter melhores resultados na germinação das sementes, sendo indicado à colheita dos frutos, com no mínimo 15,75° para se obter 95% de germinação, isso significa colher frutos mais maduros onde a concentração de açúcares é maior.

Os frutos de gabirobeiras apresentam interessantes propriedades aromáticas que os favorecem como agentes flavorizantes em alimentos e bebidas (Adati, 2001). Vallilo et al. (2005) concluíram em estudos com a espécie *C. phae* que seus frutos são suculentos, com sabor e odor cítrico, com alto teor de umidade (88,80%), o que indica ser uma característica comum aos frutos da família Myrtaceae, e com pH igual a 2,91. Foram detectados elevados teores de fibras alimentares (4,00%), quando comparado a outras espécies popularmente conhecidas, da mesma família botânica. Foram obtidos valores baixos de proteína (0,44%), carboidratos totais (5,00%), lipídios (1,53%) e valores razoáveis de ácido ascórbico (33,37 mg 100g⁻¹). Entre os elementos inorgânicos, os que destacaram foram: sódio (171,50 mg kg⁻¹), potássio (622,65 mg kg⁻¹), fósforo (123,69 mg kg⁻¹) e cálcio (61,26 mg kg⁻¹) (Vallilo et al., 2005). Vallilo et al. (2004) verificaram a predominância dos sesquiterpenos espatuleno (27%) e do óxido de B-cariofileno (29,0%) em *C. guazumifolia*; o biciclogermacreno (13,6% e o globulol (10,8%) em *C. rombea* e o (E)-nerolidol (28,8%). Vallilo et al. (2006) avaliaram a composição dos óleos essenciais dos frutos de *C. adamantium*, identificaram 30 componentes entre monoterpenos e fórmulas moleculares C₁₀H₁₄, C₁₀H₁₆, C₁₀H₁₈O, C₁₁H₁₈O₂ e sesquiterpenos com fórmulas moleculares C₁₅H₂₄ e C₁₅H₂₄O. Sendo que estas substâncias apresentam atividade farmacológica, as quais podem ser encontradas nos frutos e também nas folhas (Vallilo et al., 2006). Adati (2001) por meio de um estudo fitoquímico e farmacológico

com folhas de plantas de *C. phaea*, detectaram grande quantidade de óleo essencial, rico em linalol (11,11%), óxido de cariofileno (11,77%), betacariofileno (6,33%), betasselineno (6,33%) e alfacadinol (1,94%).

De acordo com o exposto, a planta de gabirobeira pode ter seus frutos consumidos *in natura* e ser aproveitada pela indústria de alimentos para produção de doces e sorvetes (Avidos & Ferreira, 2003), bem como servir de matéria-prima para produção de licores, devido aos seus atributos de qualidade como: elevada acidez, ácido ascórbico, minerais, fibras alimentares e hidrocarbonetos monoterpênicos (α -p-nemo, limonemo e β -(z) ocimeno), presentes em maior quantidade no óleo volátil dos frutos, e que lhes conferem aroma cítrico (Vallilo et al., 2006). Devido à alta concentração de ácido ascórbico (vitamina C) nos frutos de *C. adamantium*, seus frutos constituem importantes fontes dessa substância para animais e habitantes que dela se alimentam (Vallilo et al., 2006).

2.3 Diversidade genética

Considera-se que a diversidade genética é a porção hereditária de uma variação possível de ser observada e mensurada, sendo empregada como termo alternativo para representar a variação genética, indicando o somatório da informação genética conhecida e potencial de indivíduos, grupos de indivíduos, populações ou subpopulações (Vilela-Morales et al., 1997). Essa diversidade é avaliada a partir de características agrônômicas, morfológicas, moleculares, entre outras (Cruz et al., 2011), sendo que as informações obtidas com as avaliações são expressas em medidas de dissimilaridade, que representam a diversidade no conjunto de acessos estudados. De maneira geral, estudos de diversidade genética são realizados a partir de informações das medidas de dissimilaridade obtidas de variáveis quantitativas discretas ou contínuas, dissimilaridades obtidas de variáveis qualitativas binárias e de variáveis qualitativas multicategóricas (Cruz et al., 2011). Ainda segundo os autores, buscam-se com o estudo da diversidade genética agrupar genótipos similares a partir de técnicas multivariadas e identificam genitores geneticamente diferentes, sendo estes mais convenientes para produzir alto efeito

heterótico, e maior variabilidade genética em gerações posteriores nos programas de melhoramento vegetal. Estes estudos ainda são essenciais para subsidiar programas de exploração e manejo de recursos vegetais, bem como traçar estratégias de conservação em escala regional ou geográfica.

2.3.1 Diversidade Genética baseada em caracteres morfológicos e moleculares

2.3.1.1 Uso de caracteres morfológicos

O uso de descritores morfológicos consiste na adoção de descritores botânicos herdáveis facilmente visíveis e mensuráveis, que, a princípio, são expressos em todos os ambientes (International Board for Plant Genetic Resources, 1988) citados por (Radmann & Oliveira, 2003). Embora o volume de informações genéticas provenientes de marcadores moleculares tenha aumentado para os estudos de diversidade genética, continua-se com uso de características fenotípicas (Cruz et al., 2011). Esse tipo de análise é mais simples e de menor custo (Ballve et al., 1997). Segundo Pereira (2003) a identificação de espécies e variedades tem se baseado tradicionalmente na descrição de características morfológicas (externas e internas) das plantas.

Existem várias maneiras de classificar as variáveis, a mais comum considera dois grandes grupos, chamados de variáveis quantitativas e qualitativas, sendo mais utilizadas as variáveis quantitativas para o estudo de diversidade, estas, são características que podem ser medidas em escala real, apresentam, geralmente, distribuição contínua, sendo determinadas por poligenes de pequenos efeitos e influenciadas pelo ambiente (Cruz et al., 2011), já as variáveis qualitativas são as que não possuem valores quantitativos, mas, são definidas várias categorias ou classes, representando uma classificação dos indivíduos.

2.3.1.2 Análise conjunta de dados morfológicos quantitativos e qualitativos

A variação existente entre indivíduos, grupos de indivíduos ou população são responsáveis pela determinação da diversidade genética existente entre os mesmos. Essa variação pode ser percebida através de caracteres quantitativos como: altura da planta; peso de frutos, comprimento; diâmetro de fruto e °Brix, e também por meio de caracteres qualitativos como: coloração e forma de frutos. Moura et al. (2010) relatam que esses dados avaliados conjuntamente podem ser potencialmente um indicador mais completo da diversidade genética existente. Ressaltam-se ainda, que esse tipo de estudo tem sido bastante explorado na área de botânica e taxonomia e não muito por pesquisadores da área de recursos genéticos, devido em grande parte ao pouco conhecimento sobre a técnica.

Em 1971, Gower propôs uma técnica que permite a análise de dados quantitativos e qualitativos simultaneamente, por meio de um algoritmo que estima a similaridade entre dois indivíduos utilizando dados com distribuições contínuas e discretas. Para tanto, uma tabela com os dados qualitativos e quantitativos deve ser organizada, sendo posteriormente obtida uma matriz de similaridade genética entre os acessos por meio do algoritmo seguindo a metodologia de Gower (1971), fazendo assim análise conjunta dos dados.

Esse algoritmo é expresso por:

$$S_{ijk} = \frac{\sum_{K=1}^P W_{ijk} \cdot S_{ijk}}{\sum_{K=1}^P W_{ijk}}$$

Onde: **K** = o número de variáveis ($K = 1, 2, \dots, p$); **i** e **j** = dois indivíduos que representam o acesso; W_{ijk} = peso dado à comparação **ijk**, atribuindo valor **1** para comparações válidas e valor **0** para comparações inválidas (quando o valor da variável está ausente em um ou ambos indivíduos); S_{ijk} = contribuição da variável **K** na similaridade entre os indivíduos **i** e **j**, com valores entre **0** e **1**. Para uma variável qualitativa (nominal), se o valor da variável **K** é o mesmo para ambos os indivíduos, **i**

e j , então $S_{ijk} = 1$, caso contrário, é igual a 0 ; para uma variável quantitativa (contínua) $S_{ijk} = 1 - |X_{ik} - X_{jk}| / R_k$ onde X_{ik} e X_{jk} são os valores da variável K para os indivíduos i e j , respectivamente, e R_k é o intervalo (valor máximo menos o valor mínimo), da variável k na amostra. A divisão por R_k elimina as diferenças entre escalas das variáveis, produzindo um valor dentro do intervalo $(0, 1)$ e pesos iguais. Posteriormente a matriz de similaridade obtida deve ser convertida em uma matriz de dissimilaridade por meio de seus complementos aritméticos ($d = 1 - S$).

Trabalhos que fizeram uso dessa metodologia de Gower para avaliar a diversidade genética de plantas obtiveram sucesso e os objetivos da pesquisa foram alcançados como, por exemplo, nos trabalhos com estudo de germoplasma de pimenta (Moura et al., 2010) e estudo de tomate (Rocha et al., 2010).

2.3.1.3 Uso de marcadores moleculares RAPD

Nos últimos anos, técnicas que permitem fazer a distinção diretamente ao nível de DNA têm permitido acessar a variabilidade genética dentro do “pool” gênico de espécies, assim como identificar a diversidade disponível em bancos de Germoplasma (Salla et al., 2002).

Entre os tipos de marcadores moleculares disponíveis, destacam-se os marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) envolvem uma técnica rápida e de custo relativamente baixo e com potencial informativo (Williams et al., 1990). Esta técnica é basicamente uma variação da técnica usada em PCR. O RAPD é a denominação mais utilizada, no qual envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos do genoma, utilizando-se um único *primer* (oligonucleotídeo iniciador) de seqüência arbitrária para realizar a amplificação (Welsh & McClelland, 1990; Williams et al., 1990).

O princípio da técnica é muito simples: o *primer* se liga às seqüências complementares em fitas opostas do DNA alvo e ocorre a amplificação *in vitro* do segmento de DNA entre dois *primer's* adjacentes com o auxílio da enzima *Taq* polimerase. Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), os sítios de ligação dos *primer's* devem estar separados por no máximo 3 a 4 mil pares de bases, uma vez que a *Taq* polimerase não é capaz de percorrer segmentos maiores nas condições

normalmente usadas durante a amplificação. Por serem pequenos, é grande a possibilidade de que os *primer's* encontrem diversas regiões do genoma para se ligarem, fazendo com que diversos fragmentos de tamanhos diferentes resultem de uma reação (Williams et al., 1990). A quantidade de fragmentos a serem produzidos para uma análise é virtualmente ilimitada, dependendo apenas do número de *primer's* utilizados (Lacerda, 2002). A detecção dos produtos de amplificação é feita, normalmente, em géis de agarose, separados por eletroforese em meio semisólido, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (Caixeta et al., 2006; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998) o polimorfismo detectado por estes marcadores tem natureza binária, ou seja, um determinado fragmento ou banda está presente ou ausente no gel. Dois tipos de polimorfismo são detectados com o RAPD: 1) não ocorre pareamento na região de homologia do *primer* com o do genoma ou o pareamento é muito dificultado, não havendo amplificação desta região e, conseqüentemente, não há formação de bandas; 2) ocorre alteração do comprimento da região amplificada (por duplicação, inserção ou eliminação de nucleotídeos), resultando no aparecimento de bandas. Por este motivo, é considerado um marcador dominante, não fazendo distinção das regiões do genoma amplificadas, simultaneamente, ou seja, de bandas de um mesmo loco com diferentes alelos e das provenientes de diferentes locos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Williams et al. (1993) ressaltaram que os marcadores RAPD são considerados neutros e aparentemente estão distribuídos ao acaso por todo o genoma, representando desde seqüências de cópia única até seqüências altamente repetitivas.

Entre as vantagens frequentemente citadas para a técnica de RAPD, pode-se destacar: simplicidade, rapidez, baixo custo, demanda de quantidades mínimas de DNA para realização das análises, possibilidade de estudo de espécies sobre as quais não se tem nenhum tipo de informação genética e espécies com pouco ou nenhum polimorfismo em locos isoenzimáticos (Lacerda et al., 2002).

Em estudo de diversidade genética com plantas nativas, os marcadores moleculares RAPD demonstram ser uma ferramenta subsidiária. Junqueira et al. (2007) avaliaram a variabilidade genética de maracujá-suspiro, agrupando os

acessos mais similares e identificando os mais distantes geneticamente um dos outros. Leal et al. (2008) avaliaram a diversidade genética de acessos de cacau oriundos de fazendas e bancos de germoplasma da Bahia. Neste estudo, os marcadores RAPD permitiram evidenciar, que os acessos das fazendas são parecidos geneticamente com acessos de banco de germoplasma considerados representativos em diversidade, o que representa potencial para seleção e futuros cruzamentos. Junqueira et al. (2010)a, a partir dos marcadores moleculares RAPD, constaram que existe variabilidade genética dentro da mesma espécie de pitaya, este levantamento pode subsidiar trabalhos com seleção e lançamento de cultivar no mercado. Em um trabalho subsequente, Junqueira et al. (2010)b consideraram o cerrado um dos centros de diversidade da pitaya, devido à alta diversidade genética encontrada entre acessos nativos dessas plantas por meio dos Marcadores RAPD.

2.3.2 Medidas para estimar a diversidade genética

Um método usado para estimar a diversidade genética de germoplasma é o de natureza preditiva que tomam por base as diferenças morfológicas, agronômicas e moleculares, quantificando-as por alguma medida de dissimilaridade que expressa o grau de diversidade genética entre os genótipos. Independente do tipo de variável em estudo, as medidas de dissimilaridade são frequentemente interpretadas e visualizadas por técnicas multivariadas (Cruz & Carneiro, 2003).

Os principais métodos multivariados empregados na visualização e interpretação da diversidade em plantas perenes têm sido: análises de componentes principais, análise de agrupamento e variáveis canônicas (Dias, 1994; Moura, 2003). As análises de agrupamento dependem de uma medida de dissimilaridade que, para variáveis quantitativas, várias medidas estão disponíveis na literatura, dentre elas, pode-se citar a distância euclidiana média e a de Mahalanobis. A escolha de uma ou de outra está baseada na presença ou não de delineamento experimental (Cruz et al., 2004).

Para dados moleculares, obtém uma matriz composta por dados binários, representados pelos números 0 (ausência) e 1 (presença de bandas), podendo ser aplicados vários índices de similaridade que variam de 0 e 1, sendo as

dissimilaridades obtidas de seus complementos (Cruz & Carneiro, 2003; Cruz et al., 2004). Reif et al. (2005) destacaram que os dados obtidos por marcadores por serem uma matriz binária, permitem a análise apenas pelo uso de coeficientes de similaridade e destacaram três deles como os mais importantes: o de coincidência simples (S_{SM}), o de Jaccard (S_J) e o de Dice ou Nei li (S_D), sendo que os dois últimos não contabilizam valores nulos (00). Relataram, ainda, que complementos aritméticos desses coeficientes representam dissimilaridades ($d = 1 - S$), as quais têm propriedades de distância.

2.3.2.1 Análise de agrupamento

A análise de agrupamento tem por objetivo reunir diversos acessos e identificar os grupos mais similares (populações, clones, procedências, progênes, etc.) com o uso de medidas de dissimilaridade (Cruz & Carneiro, 2003).

Os métodos de agrupamento classificam-se em dois tipos: nos hierárquicos e nos não hierárquicos. A diferença entre eles está no fato do primeiro envolver a construção de dendrograma, ou seja, os acessos são agrupados por um procedimento que se repete em vários níveis. Dentre as metodologias disponíveis, a de média aritmética entre pares não ponderados ou UPGMA (Unweighted pair-group mens arithmetics) tem sido extensivamente utilizada para evidenciar as distâncias genéticas obtidas por meio de marcadores moleculares e morfológicos conforme pode ser observado nos estudos de variabilidade de diversos tipos de plantas como em *Eucalyptus urophylla* (Pigato & Lopes, 2001), *Eucalyptus spp.* (Caixeta et al., 2003), Açaizeiro (Oliveira et al., 2007), Maracujá-suspiro (Junqueira et al., 2007), Pequiizeiro (Faleiro et al., 2008), Guariroba (Pinto, 2009), *Pffafia glomerata* (Kamada et al., 2009), Pitaya (Junqueira et al., 2010)a. Para o gênero em estudo não foram encontrados trabalhos na literatura.

Em relação ao agrupamento não hierárquico, tem-se o método de Otimização de Tocher, o qual estabelece grupos cujas médias das distâncias intragrupos são sempre menores que as distâncias médias intergrupos, formando, assim, grupos homogêneos mutuamente exclusivos entre si (Cruz, 1990). Esse tipo de análise de agrupamento também tem sido utilizado, por exemplo, nos estudos de diversidade

genética de guaranazeiro (Nascimento Filho et al., 2001), açazeiro com base em caracteres morfoagronômicos (Oliveira et al., 2007), gabioba em desenvolvimento inicial (Assis et al., 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Descrição de coleta

Foram realizadas cinco expedições no mês de novembro de 2009 para a coleta de material vegetal de gabirobeira (folhas e frutos). Durante as expedições foram visitados vários municípios e devido às condições locais, foi coletado material em apenas 17 municípios do estado de Goiás: Abadiânia, Alexânia, Anápolis, Caçú, Caiapônia, Caldas Novas, Catalão, Goianira, Mineiros, Ouvidor, Pirenópolis, Quirinópolis, Rio Verde, Santa Rita do Araguaia, Serranópolis e Três Ranchos. As coletas foram georeferenciadas (Tabela 01), e os dados foram usados para representar as localizações geográficas (Figura 01).

Tabela 01: Procedência dos acessos de gabirobeiras nativas com as informações de altitude, latitude e longitude.

			Altitude		
	Procedência	Acessos	(m)	Latitude (S)	Longitude (W)
1	M	1 ao 8	760	17°33'885"	52°36'786"
2	SR	9 ao 16	704	17°22'462"	53°06'027"
3	Ca	17 ao 24	711	16°56'005"	51°49'617"
4	T	25 ao 32	699	18°21'887"	47°46'497"
5	O	33 ao 40	833	18°20'137"	47°47'473"
6	Ct	41 ao 49	770	18°13'070"	47°49'742"
7	Cl	50 ao 57	671	17°43'386"	48°35'031"
8	G	58 ao 65	837	16°30'002"	49°25'847"
9	P	66 ao 73	808	15°50'394"	48°57'624"
10	An	74 ao 81	1095	16°19'999"	48°53'343"
11	Ab	82 ao 89	1025	16°11'267"	48°41'230"
12	Al	90 ao 97	1053	16°06'697"	48°29'323"
13	RV	98 ao 107	832	17°48'835"	51°16'071"
14	Q	108 ao 112	541	18°28'529"	50°44'938"
15	Cç	113 ao 123	570	18°29'526"	50°57'941"
16	J	124 ao 131	929	17°27'126"	51°54'136"
17	Se	132 ao 140	727	18°02'095"	51°48'721"

Obs. Gabirobeiras de: Mineiros (M), Santa Rita do Araguaia (SR), Caiapônia (Ca), Três Ranchos (T), Ouvidor (O), Catalão (Ct), Caldas Novas (Cl), Goianira (G), Pirenópolis (P), Anápolis (An), Abadiânia (Ab), Alexânia (Al), Rio Verde (RV), Quirinópolis (Q), Caçú (Cç), Jataí (J) e Serranópolis (Se).

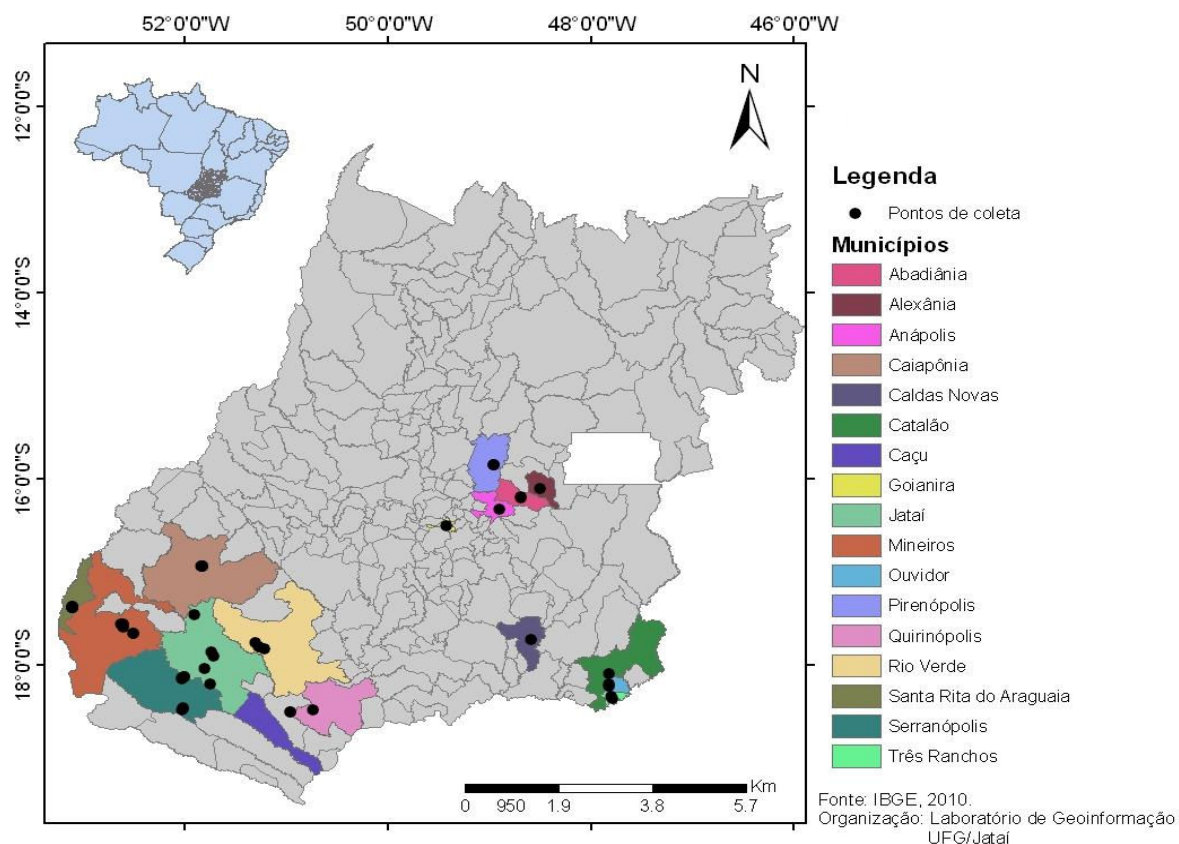


Figura 01: Procedências das matrizes de gabirobeiras.

Foram coletados frutos e folhas novas de 140 plantas de gabirobeiras, chamadas no trabalho de matrizes. A escolha das plantas foi aleatória, retirando-se frutos e folhas de no mínimo 8 indivíduos, porém em Quirinópolis foi possível apenas de 5. Durante a coleta, as seguintes características qualitativas foram avaliadas, fazendo uso de escalas de notas:

- a) Disposição das folhas no dossel (alternas (1), opostas cruzadas (2), opostas dísticas (3), verticiladas (4));
- b) Estudo do limbo quanto à forma (elíptica (1), ovada (2), deltóide (3), obovada (4));
- c) Estudo do limbo quanto à consistência (coriácea (1), membranácea (2));
- d) Estudo do limbo quanto à superfície (glabro (1), pubescente (2));
- e) Coloração da casca (amarelada (1), verde escura (2), arroxeada (3), alaranjada (4), amarelo esverdeado (5));

- f) Polpa (incolor (1), branca (2), creme (3), amarela (4) e avermelhada (5);
- g) Presença (1) ou ausência (0) de tricomas;
- h) Aspecto da polpa (gelatinosa (1) ou consistente (2));
- i) Disposição das sementes no fruto (soltos na polpa (1) ou organizados em lóbulos (2));
- j) Coloração das sementes (branca (1), com pontinhos avermelhados (2), amareladas ou marrons (3).
- k) Presença (1) ou ausência (0) de brácteas.

Para a avaliação dos dados quantitativos, foi obtida uma média a partir de 7 frutos de cada planta matriz, sendo as características:

- a) Comprimento e diâmetro dos frutos (mm);
- b) Comprimento do pedúnculo (mm);
- c) Número de sementes por frutos;
- d) Grau brix (Brix) com a polpa dos frutos maduros, fazendo uso de um refratômetro conforme Melchior et al., 2006.

Após as coletas, os frutos foram encaminhados ao laboratório de sementes do Campus Jataí (UFG) para a extração das sementes com a utilização de pó de serra. O Plantio foi imediato, para garantir boa germinação. Foram utilizados tubetes preenchidos com substrato orgânico industrial para a obtenção das mudas e mantidas em casa de vegetação (Figura 02) com temperatura máxima de 25 °C e irrigação duas vezes ao dia.

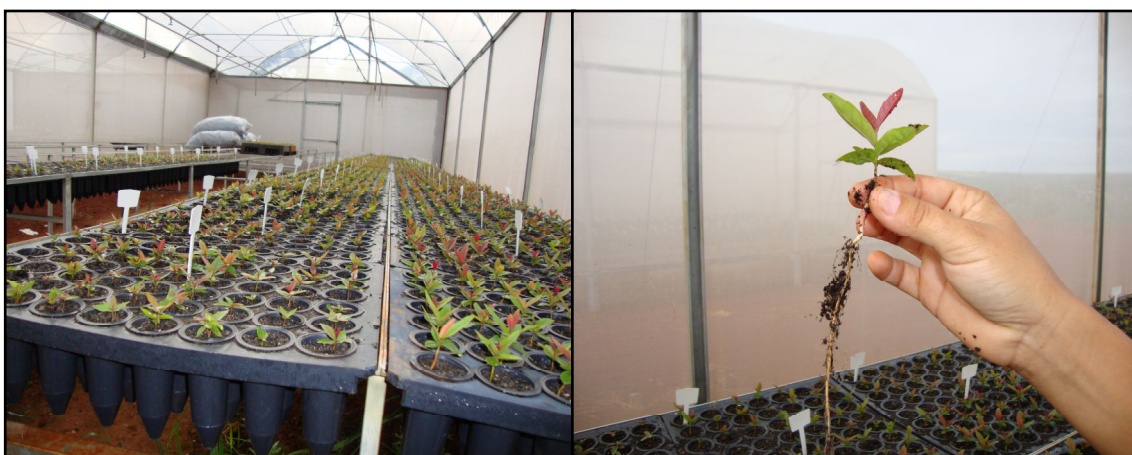


Figura 02: Foto de plântulas de gabirobeiras mantidas em casa de vegetação com temperatura e irrigação controladas, 30 dias após sementeira.

3.2 Experimento no Campo

Em abril de 2010 as mudas já com 4 meses de idade foram transplantadas para o campo. Foi utilizado delineamento em blocos ao acaso (DBC), com quatro repetições e espaçamento de 2 metros entre fileiras e 1 metro entre plantas, cada parcela composta por 4 plantas (Figura 03).



Figura 03: Foto do experimento, 60 dias após transplântio das mudas para o campo.

A primeira avaliação foi feita aos 30 dias após o transplântio, sendo realizadas outras três avaliações aos 70, 110 e aos 230 dias após o transplântio. Os seguintes descritores foram utilizados: Altura da planta (AP) em centímetro (cm), fazendo uso de uma régua, número de folhas (NF), diâmetro do caule (DC) ao nível do solo em milímetro (mm) diâmetro da folha (DF) e comprimento da folha (CF) em milímetro (mm), essas três últimas medidas foram feitas com uso de um paquímetro digital.

3.3 Obtenção dos marcadores moleculares RAPD

O material vegetal foliar coletado de cada matriz foi armazenado em tubo falcon contendo sílica, devidamente identificado e transportado para o laboratório de genética molecular do Campus Jataí (UFG) e acondicionado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior extração do DNA e análise molecular.

3.3.1 Extração de DNA

A extração do DNA do tecido foliar sem nervuras (Tabela 01) foi realizada pelo método do CTAB proposto por Doyle & Doyle (1990) com algumas modificações conforme se segue.

As folhas de cada uma das amostras de gabioba foram maceradas em Nitrogênio (N₂) líquido até atingir a consistência de um pó fino e, foram colocadas imediatamente em microtubos de 2 ml previamente identificados aos quais foram adicionados 900 µl de tampão de extração CTAB (2% CTAB; 100 mM Tris HCl - pH 8,0; 25mM EDTA; 2M NaCl; 2% PVP; 2% β-mercaptoetanol 2% e proteinase K, pré-aquecidos a 65°C). A mistura foi agitada em vortex por 1 minuto e incubado em banho Maria por 10 min a 65 °C.

Após esse período os tubos foram retirados do banho-maria e resfriados a temperatura ambiente por 5 minutos, a cada um deles foram adicionados 400 µl de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1), e agitados em vortex rápido. As amostras foram centrifugar a 13.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente e a fase aquosa contendo o DNA foi transferida para um novo microtubo. A extração com CIA foi repetida uma vez para uma maior limpeza das amostras.

A precipitação do DNA foi obtida pela adição de 1 mL de isopropanol gelado a cada tubo, seguido da incubação a -20°C por 2 horas. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm à temperatura ambiente para a obtenção do *pellet* de DNA. O precipitado obtido foi lavado com etanol 70% e seco à temperatura ambiente por 1 hora antes de ser ressuspensionado em 100 µl de água deionizada.

Um volume de 10µl de cada amostra de DNA genômico extraído foi utilizado para a análise de sua integridade por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 1x (Tris Base 10,8 g/L, 5,5g/L ácido bórico, 0,2 mM EDTA pH8,0). Para a visualização das bandas foi feita a coloração do gel com brometo de etídio a 0,01 µl/ml. Após eletroforese, o gel foi exposto à luz U.V. (transiluminador) e a

imagem obtida referente ao padrão de bandas de cada indivíduo foi digitalizada e analisada sua integridade.

A análise da concentração e pureza do DNA extraído foi estimada por espectrofotometria (Faleiro et al., 2003).

As amostras de DNA foram estocadas a -20 °C até o momento do uso.

3.3.2 Reação de amplificação do DNA de gabirobeiras

As reações de amplificação do DNA de gabirobeiras foram realizadas conforme a metodologia de Barros et al. (2005), onde se utiliza um volume total de 13 µL por reação, que contem: Tris-HCl (10 mM, pH 8,3), KCl (50 mM), MgCl₂ (3 mM), 100 µM de cada um dos desoxirribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de um primer decâmero (Operon Technologies Inc.), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Em cada tubo de reação foi adicionada uma gota de óleo mineral para evitar perda de material.

As amplificações foram efetuadas em termociclador *BIONER* programado para: 2 minutos a 94°C e 40 ciclos, cada ciclo, constituído pela seguinte seqüência: 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e 90 segundos a 72°C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 6 minutos a 72°C e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4°C, para conservar o material (Faleiro et al., 2003).

Após a reação de PCR, o volume total de cada amostra foi aplicado em gel de agarose (1,5%), corado com brometo de etídio e submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 Mm).

A separação eletroforética foi realizada durante três horas e 30 min, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta (UV), para a visualização e caracterização das bandas, de acordo com a presença ou ausência das mesmas.

3.3.3 Seleção de primers para a obtenção dos marcadores RAPD

Inicialmente, foi realizado um ensaio, no qual três amostras de DNA de gabirobeiras foram usadas para testar 47 *primer's* decâmeros de combinação

arbitrária da *Operon Technologies* para determinar quais *primer's* seriam empregados no estudo da variabilidade genética das matrizes, sendo eles: OPA (01, 04, 05, 08, 09, 11, 18, 19, 20); OPB (02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 14); OPG (04,16); OPJ (05,19); OPM (02 03); OPN (02 05); POR (06, 10, 19); OPS-07; OPV (05,12); OPW (01, 05) OPY-06; OPAB (08, 09, 11); OPAF-05; OPAU-08; OPAV-06; OPAW (02, 07, 09, 10, 15).

3.4 Análise estatística

Para o estudo da diversidade genética entre as 140 matrizes de gabirobeiras foi realizada análise dos dados quantitativos, fazendo uso da distância euclidiana média para a obtenção da matriz de distância entre as plantas. Para os dados qualitativos (multicategóricos), utilizou-se o método de coincidências simples (c) considerando os caracteres analisados. Posteriormente foi conduzida análise conjunta dos dados morfológicos, para tanto a metodologia de Gower foi utilizada com uso do aplicativo computacional MULTV (Pillar, 2001). Essa análise forneceu uma matriz de similaridade entre os progenitores, a qual foi convertida em uma matriz de dissimilaridade por meio de seus complementos aritméticos ($d = 1 - S$). Procedeu-se análise das distâncias entre as matrizes e análise de agrupamento, verificando indivíduos mais similares e mais divergentes.

No estudo da variabilidade genética existente entre as progênes em campo experimental utilizou os dados morfológicos quantitativos relacionados ao desenvolvimento inicial da 4ª avaliação, procedendo à análise de variância e análise de agrupamento com o uso da matriz de dissimilaridades obtidas pela distância de Mahalanobis.

Os marcadores moleculares obtidos nas reações de amplificação foram identificados e interpretados numa matriz de dados binários (0,1), sendo "0" ausência da marca e "1" a presença. 19 matrizes foram geradas, sendo uma com os dados binários obtidos entre os 140 acessos, gerados a partir da análise com os *primer's* selecionados, outra entre as 17 procedências e o restante dentro de cada procedência.

A partir da matriz binária, foi efetuado o cálculo das estimativas de similaridade genética (sg_{ij}) entre o i -ésimo e o j -ésimo acesso pelo emprego do coeficiente de Nei Li. Este coeficiente foi escolhido por dar um peso maior às coincidências de presença de bandas ($d=11$) entre os acessos e também por excluir a coincidência do tipo ausência de bandas ($d=00$). A expressão para as estimativas de Nei Li encontra-se abaixo:

$$\hat{s}g_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Em que:

$\hat{s}g_{ij}$: coeficiente de similaridade de Nei Li (1945)

a : presença de bandas (11) no par de genótipos i e j ;

b : discordância do tipo 1 e 0 no par de genótipos, com presença de banda no i -ésimo genótipo e ausência no j -ésimo genótipo;

c : discordância do tipo 0 e 1 no par de genótipos, com ausência de banda no i -ésimo genótipo e presença no j -ésimo genótipo.

Para análise de agrupamento dos acessos, foi utilizada a matriz constituída pelas estimativas de dissimilaridade, obtidas a partir do complemento aritmético do coeficiente de similaridade ($dg_{ij} = 1 - \hat{s}g_{ij}$).

Para todas as análises utilizou o aplicativo computacional genes (Cruz, 2008) para obtenção das matrizes de distâncias e obtenção dos grupos pelo método de Otimização de Tocher. A fim de certificar a dispersão entre os genótipos estudados procedeu-se em alguns momentos análise de coordenadas principais e dendrograma UPGMA. O ponto de corte para obtenção dos grupos foi feita visualmente conforme salto de distância ou mudança de nível no dendrograma (Cruz, 2011).

3.4.1 Identificação do número de marcas

Foi realizada a análise de *bootstrap* para verificar o número mínimo de bandas polimórficas geradas pelos 12 primers de RAPD capazes de amostrar

satisfatoriamente a variabilidade das plantas em estudo. Para tanto foi utilizado o programa *Dboot* desenvolvido por Coelho (2000) com 1000 permutações.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dados morfológicos de gabirobeiras nativas (matrizes)

4.1.1 Diferenciação Morfológica

Foi possível observar variação nos dados morfológicos qualitativos avaliados entre as 140 matrizes de gabirobeiras estudados, sendo possível obter as proporções fenotípicas para cada característica (Tabela 02). Porém, as características que se destacaram nos frutos de gabirobeiras nativas das regiões coletadas foram: Frutos glabros e coloração externa amarelada, presença de brácteas, mucilagem incolor, textura gelatinosa e sementes amareladas. Uma característica pouco comum representando apenas 2,14% dos frutos avaliados foi à coloração da superfície dos frutos arroxeadada, sendo encontrado em matrizes oriundas de Caçú, Caldas Novas e Catalão.

Tabela 02: Proporções fenotípicas encontradas para os dados qualitativos avaliados entre as 140 matrizes de gabirobeiras estudados.

Características	Proporções fenotípicas
Disposição das folhas no dossel	10% alternas, 79,28% opostas cruzadas e 10,71% opostas dísticas.
Forma da folha	90,70% elíptica e 9,3% espatuladas.
Consistência da folha	93,42% são coriáceas e 3,57% herbáceas.
Superfície da folha	82,85% glabras e 17,5% pubescentes
Coloração da casca	70,27% amarelada, 24,28% verde escura, 4,2% alaranjada, 2,14% arroxeadada.
Coloração da polpa	60,75% incolor, 39,25% creme amarelada.
Superfície do fruto	80,71% frutos glabros e 19,28% pubescentes.
Aspecto da mucilagem	93,57% mucilagem gelatinosa e 6,42% consistente.
Coloração das sementes	4,28% branca, 27,85% com pontinhos avermelhados (2), 62,85% amareladas e 5% marrons.

Em relação à morfologia foliar, as características que predominaram foram: disposição foliar do tipo opostas cruzadas, forma elíptica, consistência coriácea,

superfície glabras, ou seja, desprovidas de pêlos. Estas características são coerentes em relação à morfologia geral das plantas do Gênero *Campomanesia* conforme Proença (1994), Ávidos & Ferreira (2003), Lorenzi et al. (2006).

A figura 04 apresenta a variação dos dados morfológicos quantitativos (CP, CF, DF, NS e °Brix), o que também demonstra variabilidade entre as procedências em estudo. Em relação ao número de sementes dos frutos (NS), observou uma média de 5 sementes por fruto, variando de 2 a 7 sementes. Relacionando as variáveis (CF) e (DF), 94,11% dos indivíduos estudados apresentaram frutos com (DF) superiores ao (CF), este resultado pode evidenciar que os frutos são arredondados e achatados.

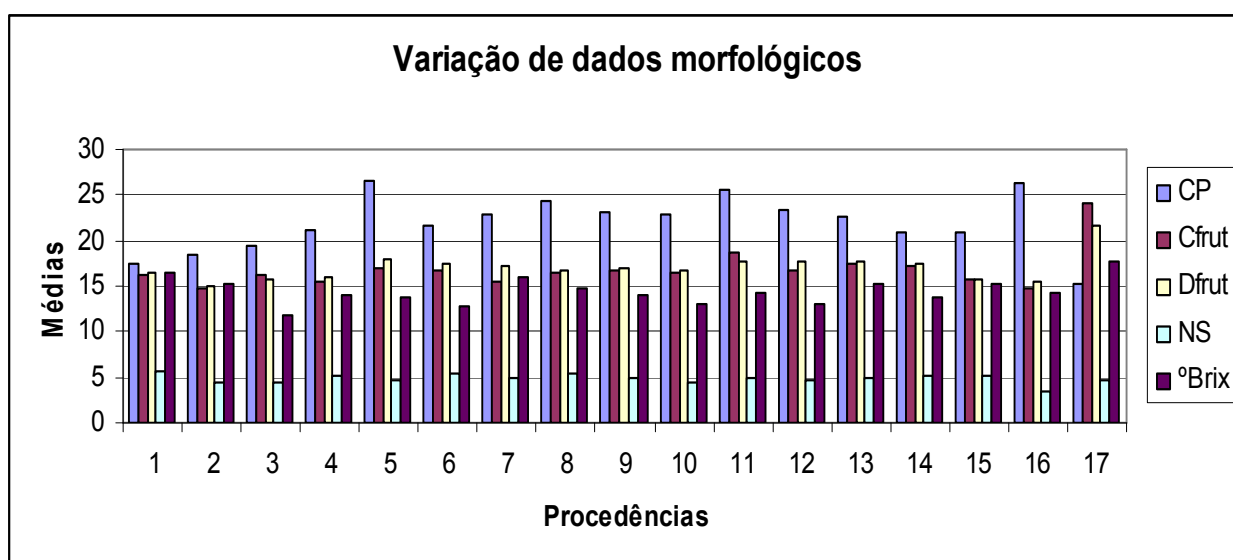


Figura 04: Variação de médias de: comprimento do pedúnculo (CP), comprimento do fruto (CF) e diâmetro do fruto (DF), número de sementes (NS) e grau Brix (°Brix) em função das procedências de: Mineiros (1), Santa Rita do Araguaia (2), Caiapônia (3), Três Ranchos (4), Ouvidor (5), Catalão (6), Caldas Novas (7), Goianira (8), Pirenópolis (9), Anápolis (10), Abadiânia (11), Alexânia (12), Rio Verde (13), Quirinópolis (14), Caçú (15), Jataí (16) e Serranópolis (17).

Na avaliação do grau brix (°Brix) dos frutos (figura 04) a média geral observada foi de 14,43°, valor próximo a 15,75°, o qual é considerado ideal para ter melhores resultados na germinação das sementes, Melchior et al. (2006)

consideraram que quanto maior o valor de °Brix maior será a quantidade de açúcares no fruto. Neste trabalho os menores valores de °Brix foram observados no Município de Caiapônia com média igual a 11,44° e os maiores valores foram observados em Serranópolis com média igual a 17,70° e Mineiros com média de 16,47.

A determinação dos parâmetros apresentados acima se torna importante quando se busca selecionar em programas de melhoramento indivíduos com menores ou maiores tamanhos de frutos os quais podem apresentar maior quantidade de massa fresca e também indivíduos com alto °Brix, o que representa maiores taxas de açúcar no fruto, porém mais trabalhos devem ser desenvolvidos a fim de certificar quais procedências realmente apresentam estas características. Este trabalho poderá ser desenvolvido nas progênes em campo experimental.

4.1.2 Diversidade genética entre as 140 matrizes com base nos Caracteres morfológicos

Com base na análise dos dados morfológicos qualitativos e quantitativos foi possível identificar os indivíduos mais dissimilares fenotipicamente e também os mais semelhantes. A distância média observada entre todas as matrizes com base na análise de Gower foi de 0,207 e a máxima observada foi de 0,458 entre os indivíduos 131 de Jataí e 139 de Serranópolis, esses indivíduos são pertencentes a procedências situados em áreas geográficas diferentes, porém próximas, com altitudes médias de 929m e 727m respectivamente. Esses dois indivíduos apresentaram diferença para as características morfológicas avaliadas em condições naturais, podendo ser devido aos genótipos serem diferentes ou devido à interação genótipo-ambiente.

A análise de agrupamento pelo método de Otimização de Tocher (Tabela 01 anexo 01) com base na matriz de dissimilaridade entre as 140 matrizes levou a formação de 23 grupos divergentes em relação aos caracteres morfológicos avaliados conjuntamente, 10 grupos a partir dos dados morfológicos quantitativos e 19 com os dados morfológicos qualitativos. Estas análises demonstraram a existência de variabilidade genética.

Conforme observado no trabalho de Moura et al. (2010) no estudo da diversidade genética de pimentas o uso do algoritmo de Gower demonstrou maior amplitude de variação para o material de estudo. Para este estudo a variação entre os indivíduos estudados foi maior com o uso da análise conjunta dos dados. Mesmo assim, podem ser observadas em ambas as análises que o agrupamento das matrizes está relacionado com as regiões geográficas onde foram coletados, pois indivíduos de um mesmo Município foram agrupados de forma semelhante.

Vale ressaltar que os indivíduos foram agrupados de acordo com a similaridade existente entre eles, conforme pode ser observado no grupo 1 da análise conjunta dos dados onde 50% dos indivíduos de Serranópolis são encontrados juntamente com apenas um de Santa Rita do Araguaia, um de Mineiros e um de Caiapônia, já o segundo grupo concentra 55,71% dos indivíduos estudados, demonstrando a possibilidade de identificação de plantas semelhantes entre si para as características morfológicas avaliadas. Entre os indivíduos do grupo 2, são encontrados 100% dos representantes de: Anápolis, Alexânia, Rio Verde e Quirinópolis, e pelo menos um representante dos outros Municípios, exceto de Jataí. 11 indivíduos, o que representa 7,85% dos progenitores não foram agrupados com outros, os quais apresentam características divergentes de todos os demais, sendo representantes dos Municípios de Ouvidor, Jataí, Serranópolis, Santa Rita do Araguaia, Três Ranchos, Mineiros e Caldas Novas.

No gráfico (Figura 05) é possível observar que os indivíduos de Jataí, Santa Rita do Araguaia, Mineiros e Caldas Novas apresentaram maior dispersão, o que demonstra maior divergência genética quando comparados com os demais. Já os representantes de Anápolis, Rio Verde, Quirinópolis, Alexânia ficaram posicionadas próximos uns dos outros, podendo ter o mesmo agrupamento, sendo estes mais similares em relação aos dados avaliados. Assim, a dispersão das matrizes no agrupamento de Tocher pode ser observada também pela análise bidimensional na figura 05. Observa-se concordância entre os dois tipos de análise para o agrupamento levando a interpretação da diversidade genética existente.

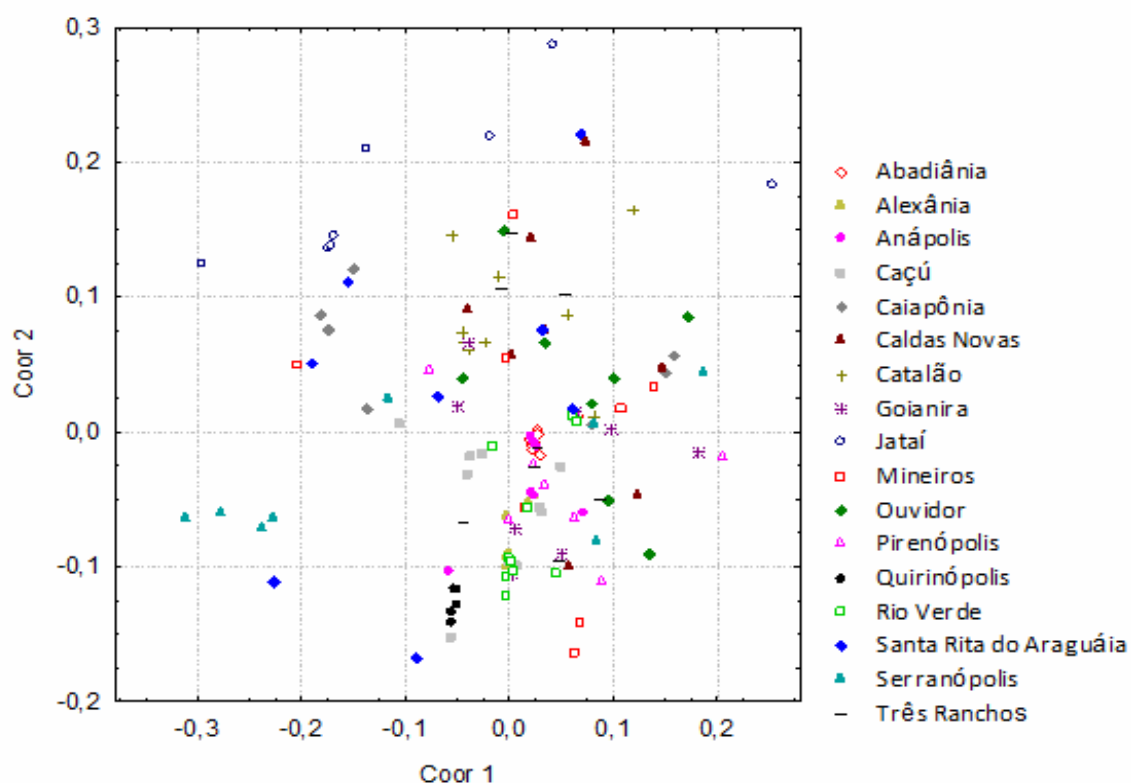


Figura 05: Análise bidimensional por coordenadas principais, entre as 140 matrizes de gabirobeiras a partir das distâncias geradas pelo algoritmo de Gower.

A variabilidade identificada entre as matrizes em ambos os métodos de agrupamento para os dados avaliados é um fator importante, pois demonstra a possibilidade de variabilidade entre as progênes de gabirobeiras em campo experimental formando a coleção de estudo.

4.2 Análise da diversidade genética entre as 140 progênes em desenvolvimento inicial

4.2.1 Análise Univariada

O resumo da Análise de variância (ANOVA) para as 140 progênes de gabirobeiras encontra-se na tabela 03. Observa-se diferença significativa entre as progênes para as características avaliadas. Isto indica presença de variação entre todas as progênes, o que é indício de divergência genética para o material em

estudo. Observa-se variação no Coeficiente de Variação (CV%) experimental, o maior CV% é observado para característica número de folhas (NF) correspondendo a 42,208%. Verifica-se comportamento diferenciado entre as progênes quanto ao desenvolvimento.

Tabela 03: Estimativa de média geral (M), do quadrado médio (QM) e do coeficiente de variação (CV%) para as progênes de gabirola em desenvolvimento inicial.

Variáveis	M	QM	CV%
AP	12,73	22,733*	37,445
NF	17,419	54,059*	42,208
DC	2,660	0,472*	25,73
DF	22,790	20,294*	19,758
CF	60,299	115,166*	17,797

* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F. Altura da planta (AP), Número de folhas (NF), Diâmetro do caule ao nível do solo (DF), Diâmetro de folha (DF), Comprimento de folha (CF). Avaliação feita aos 230 dias após transplântio.

4.2.2 Análise de agrupamento entre as progênes de gabirolas em desenvolvimento inicial

As 140 progênes avaliadas em campo experimental foram agrupadas pelo método de Otimização de Tocher com base na matriz de distâncias de Mahalanobis (Tabela 04). Foi possível obter 16 grupos distintos, sendo que o primeiro grupo foi formado por 54,28% das progênes avaliadas, estas, apresentam maior similaridade em relação aos dados morfológicos que foram avaliados, possivelmente por serem plantas em desenvolvimento inicial e por estarem submetidas a condições ambientais semelhantes. Além disso, podem ser plantas de uma mesma espécie, apresentando menos heterose.

Tabela 04: Análise de agrupamento pelo método de Otimização de Tocher com base na matriz de distância de Mahalanobis entre as 140 progênies avaliadas em campo experimental.

Grupos	Acessos												
1	59 _G	120 _{Cç}	3 _M	119 _{Ca}	108 _Q	88 _{Ab}	92 _{Al}	133 _{Se}	123 _{Cç}	94 _{Al}	105 _{RV}		
	34 _O	98 _{RV}	118 _{Cç}	83 _{Ab}	122 _{Cç}	75 _{An}	130 _J	134 _{Se}	47 _{Ct}	41 _{Ct}	65 _G		
	113 _{Cç}	36 _O	76 _{An}	23 _{Ca}	72 _P	80 _{An}	121 _{Cç}	77 _{An}	96 _{Al}	95 _{Al}	127 _J	140 _{Se}	
	136 _{Se}	90 _{Al}	126 _J	102 _{RV}	67 _P	137 _{Se}	85 _{Ab}	99 _{RV}	101 _{RV}	112 _Q	37 _{Se}		
	107 _{RV}	87 _{Ab}	28 _T	71 _P	50 _{Cl}	45 _{Ct}	24 _{Ca}	31 _T	115 _{Cç}	44 _{Ct}	46 _{Ct}	82 _{Ab}	
	106 _{RV}	129 _J	61 _G	103 _{RV}	25 _T	125 _J	111 _Q	128 _J	110 _Q	78 _{An}	35 _O		
			81 _{An}	73 _P	33 _O	138 _{Se}	55 _{Cl}	93 _{Al}	131 _J	66 _P			
2	7 _M	20 _{Ca}	12 _{SR}	5 _M	2 _M	21 _{Ca}	6 _M	14 _{SR}	13 _{SR}	8 _M	1 _M	22 _{Ca}	64 _G
3	17 _{Ca}	48 _{Ct}	57 _{Cl}	26 _T	43 _{Ct}	9 _{SR}	10 _{SR}	60 _G	42 _{Ct}	16 _{SR}	30 _T	51 _{Cl}	
						18 _{Ca}							
4		52 _{Cl}	54 _{Cl}	49 _{Ct}	53 _{Cl}	70 _P	117 _{Cç}	97 _{Al}	109 _Q	132 _{Se}	32 _T		
5						27 _T	38 _O	84 _{Ab}					
6			63 _G	86 _{Ab}	104 _{RV}	68 _P	62 _G	89 _{Ab}	91 _{Al}	69 _P			
7						39 _O	79 _{An}	74 _{An}					
8						29 _T	58 _G						
9						124 _J	135 _{Se}						
10						40 _O	56 _{Cl}						
11						100 _{RV}	116 _{Cç}						
12						15 _{SR}	114 _{Cç}						
13						11 _{SR}							
14						139 _{Se}							
15						19 _{Ca}							
16						4 _M							

Obs: Gabirobeiras de: Mineiros (M), Santa Rita do Araguaia (SR), Caiapônia (Ca), Três Ranchos (T), Ouidor (O), Catalão (Ct), Caldas Novas (Cl), Goianira (G), Pirenópolis (P), Anápolis (An), Abadiânia (Ab), Alexânia (Al), Rio Verde (RV), Quirinópolis (Q), Caçú (Cç), Jataí (J) e Serranópolis (Se).

Nos demais grupos observam-se dispersão das progênies (Tabela 04), sendo agrupados de forma comum indivíduos de distribuição geográfica diferente e em grupos distintos representantes de uma mesma procedência, demonstrando a disseminação dessas plantas nas regiões de coleta. Quatro progênies demonstraram comportamento diferenciado dos demais em relação ao desenvolvimento inicial, os quais apresentaram maior dissimilaridade quando comparados com os demais, sendo formados grupos individuais, sendo representantes de Serranópolis, Santa Rita do Araguaia, Caipônia e Mineiros.

4.3 Análise molecular

4.3.1 Quantidade e integridade do DNA extraído das plantas de gabirobeiras

As extrações de DNA genômico de gabirobeiras foram conduzidas com sucesso, a figura 06 representa uma foto de um gel de agarose corado com brometo de etídio contendo amostras de DNA de plantas de gabirobeiras de Caiapônia (GCa), de Rio Verde (GRV) e Serranópolis (GSe). Nas canaletas pode ser visualizada presença de DNA genômico de gabirobeira. O mesmo padrão de integridade do DNA foi observado também nos demais municípios.

Na análise da concentração e pureza do DNA por espectrofotômetro observou-se que todos os DNA extraídos apresentaram leitura satisfatória. Na relação A_{260}/A_{280} (DNA/proteína) os valores variaram de 1,2 a 2,6 demonstrando presença de DNA genômico na amostra.

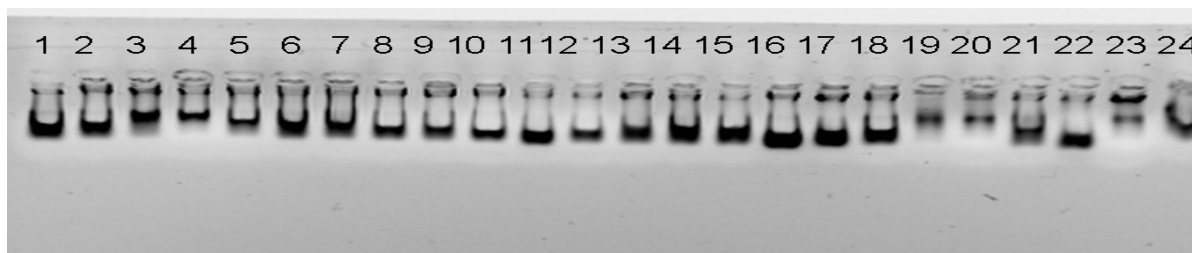


Figura 06: Gel de agarose com amostras de DNA genômico de gabiropa corado com brometo de etídio. Nas canaletas 1 a 8 (GCa), Canaletas 9 a 16 (GRV) e Canaletas 17 a 24 (GSe).

4.3.2 Seleção e nível de polimorfismo gerado pelos *primer's* RAPD

Foram testados 47 *primer's*, destes, 12 foram selecionados (Tabela 05) em função do padrão de amplificação, e, empregados no estudo da variabilidade genética de gabirobeira. Um exemplo do perfil eletroforético obtido pode ser observado na figura 07, pela amplificação do DNA de 20 genótipos de gabirobeira, utilizando o *primer* com identificação 05 (OPA – 18).

Tabela 05: Número de bandas polimórficas geradas pelos 12 *primer's* nos 140 genótipos de gabirobeiras nativas (progenitores).

Identificação	Primers	5` para 3`	Nº de bandas polimórficas
1	OPA – 01	CAGGCCCTTC	13
2	OPA – 04	AATCGGGCTG	12
3	OPA – 08	GTGACGTAGG	13
4	OPA – 09	GGGTAACGCC	16
5	OPA – 18	AGGTGACCGT	18
6	OPA – 20	GTTGCGATCC	14
7	OPM – 03	GGGGGATGAG	12
8	OPS-07	TCCGATGCTG	13
9	OPV-05	TCCGAGAGGG	13
10	OPV-12	ACCCCCCACT	14
11	OPAB-09	GGGCGACTAC	14
12	OPAF-05	CCCGATCAGA	09
Total	-	-	178

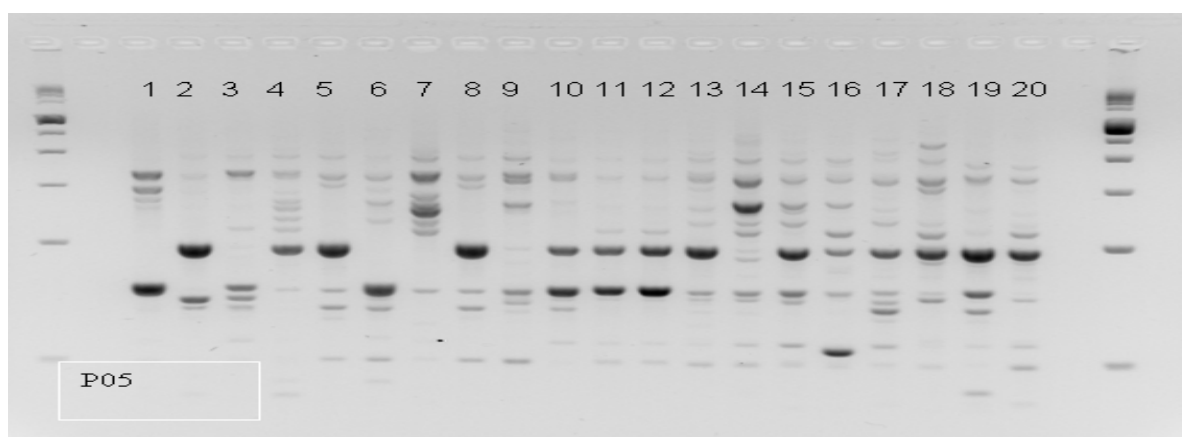


Figura 07: Perfil eletroforético obtido pela amplificação do DNA de 20 genótipos de gabirobeira, utilizando o *primer* 05 (OPA – 18), sendo usado marcador padrão igual a 10000 pb.

Os 12 *primer's* selecionados produziram um total de 178 amplificações entre os 140 genótipos de gabirobeiras nativas, tendo uma média de 14,83 bandas por *primer's*, sendo que os iniciadores OPA 09, OPA 18, OPA 20, OPV 12 e OPAB 09

foram os quais proporcionaram maior número de bandas polimórficas, entre 14 e 18 bandas.

Foi observado um nível de polimorfismo correspondente a 90,44% (Tabela 06). Este resultado foi próximo aos valores de polimorfismo observados por Junqueira et al. (2010a) nos estudos com pitayas nativas do Cerrado cujo polimorfismo foi de 95,06%, por Gomes Filho et al. (2010) no estudo de cultivares e acessos de goiabeiras, encontrando 87,97% e por Pessanha et al. (2011) no estudo de goiabeiras de 3 regiões do Rio de Janeiro, neste foi observado polimorfismo de 97,5%. Em ambos os trabalhos citados, os autores consideraram alto o nível de polimorfismo encontrado, o que representa a variabilidade genética do material em estudo. Assim, para esta análise, o resultado obtido pode ser considerado uma representação consistente da diversidade genética ao nível molecular de gabiobeiras nativas do Cerrado para regiões onde foram coletadas.

Todas as procedências apresentaram taxa de polimorfismo superior a 60% (Tabela 06), podendo considerar que há variabilidade genética entre as mesmas. Este polimorfismo pode ser devido às plantas serem de polinização cruzada, o que tende a favorecer o fluxo genético nas mesmas, caso sejam da mesma espécie, além disso, são plantas nativas e ainda não domesticadas.

O Município que apresentou maior porcentagem de polimorfismo em relação aos demais foi Jataí, no qual 84,66% dos fragmentos amplificados são polimórficos. Já o Município que nas análises apresentou menor taxa de polimorfismo foi Goianira, no qual 61% dos fragmentos amplificados pelos 12 *primer's* RAPD foram são polimórficos nos 8 genótipos estudados, provavelmente, por serem plantas próximas umas das outras, podendo ter origens (antecedentes) comuns, porém apresentando variação molecular.

Tabela 06: Porcentagem de polimorfismo (%Pol) identificado entre os indivíduos de cada procedência (**Proc**) e entre procedências (**EP**) e entre os 140 genótipos de gabirobeiras nativas (**EGN**). Número de marcas necessárias para amostragem satisfatória do genoma (**Dboot**) e o grau de heterogeneidade (**b**).

Proc*	N. de Bandas	Primer mais Polimórficos	% Pol	Dboot	b
Ab	138	OPA 18	79,71	50	0,470
Al	118	OPA 04	72,03	60	0,430
An	140	OPV 12	68,34	30	0,480
Cç	150	OPA 04	78,86	40	0,440
Ca	123	OPA 18	80,00	70	0,470
Cl	131	OPA 09	67,93	30	0,475
Ct	123	OPA 18	80,48	30	0,477
G	124	OPV 12	60,97	40	0,494
J	150	OPAB 09	84,66	70	0,443
M	152	OPA 18	80,79	60	0,478
O	111	OPA 09	69,64	30	0,470
P	146	OPV 12	79,45	70	0,460
Q	104	OPS 07	61,53	35	0,500
RV	148	OPA 18	81,75	60	0,475
SR	123	OPA 18	80,27	60	0,473
Se	146	OPA 18	75,00	50	0,467
TR	109	OPAB 09	65,24	30	0,491
EP	176	OPA 18	80,00	20	0,495
EGN	178	OPA 18	90,44	120	0,374

* procedência: Abadiânia (Ab), Alexânia (Al), Anápolis (An), Caçú (Cç), Caipônia (Ca), Caldas Novas (Cl), Catalão (Ct), Goianira (G), Jataí (J), Mineiros (M), Ouvidor (O), Pirenópolis (P), Quirinópolis (Q), Rio Verde (RV), Santa Rita do Araguaia (SR), Serranópolis (Se) e Três Ranchos (T).

4.3.3 Análise do número ótimo de bandas (Bootstrap)

Os resultados obtidos encontram-se resumidos no gráfico da figura 08. Os coeficientes de variação CV% foram relacionados com o número de marcas ajustando-se uma função potência, sendo $y = 63,816x^{-0,3745}$. O coeficiente de determinação da função estimada foi de 0,958, demonstrando que os valores da curva apresentaram um bom ajuste. De acordo com Pequeno et al. (2003), uma maneira de se determinar o número mínimo de marcas necessárias para se obter uma boa precisão de dados é por meio do ponto de curvatura máxima da função.

Para este estudo (Figura 08), o ponto de curvatura máximo da função foi $x_c = 120$, sendo este, o número mínimo de bandas necessárias para amostrar o genoma de gabirobeiras com CV correspondendo a 10%. Este resultado permite obter uma noção do esforço e dos recursos necessários para se obter os dados moleculares em futuros trabalhos com as plantas deste gênero, uma vez que a obtenção de um número elevado de bandas polimórficas não necessariamente levava a um aumento real da significância da precisão da análise, tendo somente aumentado os custos da pesquisa. Por outro lado, a utilização de um número muito pequeno de bandas polimórficas pode acarretar na não amostragem satisfatória do genoma, resultando em uma baixa precisão dos dados moleculares. Para este estudo, pode-se observar que o número de bandas polimórficas geradas pelos 12 *primer's*, os quais foram utilizados para se realizar a análise de variabilidade genética foram bem superiores a quantidade mínima de bandas polimórficas obtidas pela análise de *Bootstrap*, demonstrando que a amostragem do genoma foi satisfatória e que os resultados são consistentes.

Com relação ao grau de heterogeneidade (Tabela 06) representado pelo parâmetro **b** da equação, ele apresentou uma variação de 0,430 a 0,5 dentro das procedências, de 0,485 entre procedências e entre as 140 matrizes o valor **b** correspondente a 0,374 sendo próximos de 0,5, o qual é considerado valor máximo para o grau de heterogeneidade (b) por Pequeno et al. (2003). Este resultado demonstra que existe heterogeneidade entre as bandas na população de gabirobeiras do estado de Goiás, demonstrando a variabilidade entre as plantas estudadas.

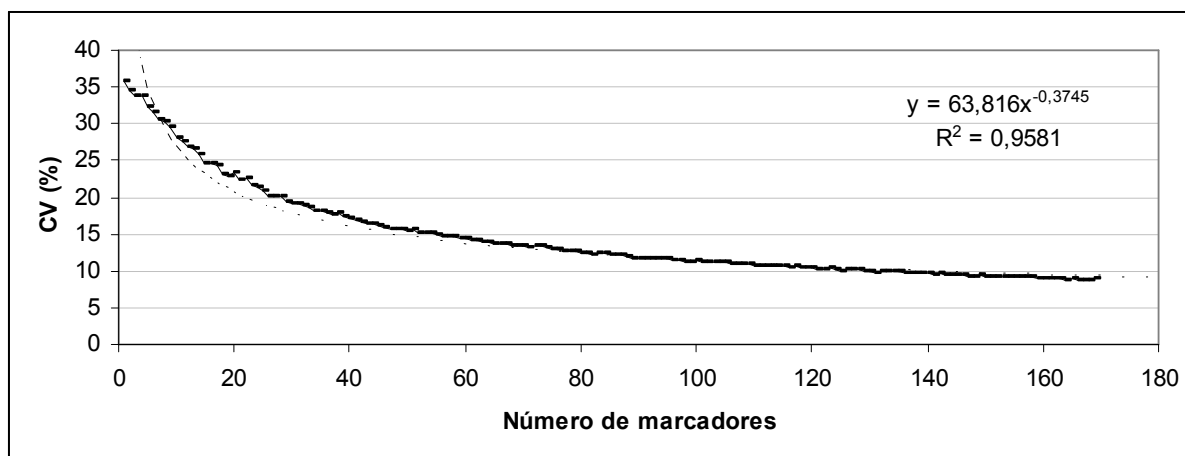


Figura 08: Valores observados e estimados do coeficiente de variação (CV%) em função do número de bandas obtidos por meio das 178 marcas de RAPD com DNA de gabioba.

4.3.4 Análise da diversidade genética entre as 140 matrizes por meio dos dados moleculares RAPD

A dissimilaridade obtida pelo complemento aritmético de Nei Li entre os 140 genótipos de gabiobeiras (EGN) variaram de 0,072 a 0,660, com média de 0,42. Foi observada maior distância genética de 0,66 entre os indivíduos 11 e 91, os quais são oriundos das procedências de Santa Rita do Araguaia e Alexânia, já a menor distância de 0,072 foi observada entre os indivíduos 57 e 58, que são originados das procedências de Caldas Novas e Goianira, os quais são geograficamente distantes, aproximadamente 200 Km. Esta observação demonstra que os genótipos estudados apresentam variantes, o que facilita a prospecção de alternativas voltadas para a conservação e uso das mesmas ou buscam-se trabalhar com cruzamentos entre plantas divergentes a fim de ampliar a variabilidade genética de um material em estudo com possibilidade de seleção de indivíduos com maior heterose.

Pelo agrupamento de Otimização de Tocher (Tabela 07), observa-se a formação de 17 grupos divergentes, sendo que os primeiros grupos foram formados de acordo com o ponto de coleta das mesmas, isso pode evidenciar que o local pode ter influenciado no agrupamento. Indivíduos geograficamente próximos (mesmo município) podem ser mais semelhantes e intercruzarem, gerando

descendentes. Neste método de agrupamento os municípios que tiveram seus representantes mais dispersos foram: Caçú, Rio Verde, Santa Rita do Araguaia, Serranópolis e Mineiros, pois se observa indivíduos distribuídos em mais de três grupos divergentes. Cinco matrizes de gabirobeiras mostraram ser mais dissimilares dos demais, pois não se agruparam com outros, sendo representantes de Rio verde, Santa Rita do Araguaia, Mineiros, Serranópolis e Pirenópolis.

Tabela 07: Agrupamento pelo método de Tocher de todos os acessos com base na matriz de distância gerada a partir da análise molecular.

Grupos	Acessos													
1	57 _{Cl}	58 _G	60 _G	59 _G	61 _G	62 _G	56 _{Cl}	65 _G	66 _P	64 _G	63 _G	55 _{Cl}	54 _{Cl}	
2				51 _{Cl}	52 _{Cl}	50 _{Cl}	53 _{Cl}	49 _{Ct}	47 _{Ct}	48 _{Ct}				
3			129 _J	130 _J	131 _J	128 _J	127 _J	1 _M	4 _M	5 _M	6 _M	2 _M		
4	94 _{Al}	95 _{Al}	109 _Q	92 _{Al}	93 _{Al}	111 _Q	113 _{Cç}	90 _{Al}	118 _{Cç}	114 _{Cç}	120 _{Cç}			
5	116 _{Cç}	88 _{Ab}	89 _{Ab}	115 _{Cç}	87 _{Ab}	110 _Q	105 _{RV}	107 _{RV}	108 _Q	117 _{Cç}	112 _Q			
6	28 _T	29 _T	26 _T	27 _T	25 _T	33 _O	30 _T	31 _T	37 _O	138 _{Se}	139 _{Se}	140 _{Se}	134 _{Se}	
7	40 _O	133 _{Se}	104 _{RV}	39 _O	46 _{Ct}	38 _O	35 _O	43 _{Ct}	42 _{Ct}	45 _{Ct}	36 _O	44 _{Ct}	41 _{Ct}	
8				103 _{RV}	102 _{RV}	137 _{Se}	32 _T	34 _O	101 _{RV}					
9	77 _{An}	78 _{An}	74 _P	73 _P	72 _P	76 _{An}	69 _P	68 _P	75 _{An}	67 _P	83 _{Ab}	82 _{Ab}	81 _{An}	
10				80 _{An}	79 _{An}	84 _{Ab}	85 _{Ab}	86 _{Ab}	70 _P					
11				12 _{SR}	13 _{SR}	10 _{SR}	15 _{SR}	20 _{Ca}	19 _{Ca}	21 _{Ca}	22 _{Ca}			
12							7 _M	8 _M						
13	24 _{Ca}	99 _{RV}	97 _{Al}	98 _{RV}	17 _{Ca}	14 _{SR}	100 _{RV}	16 _{SR}	18 _{Ca}	23 _{Ca}	9 _{SR}			
14					91 _{Al}	96 _{Al}	119 _{Cç}							
15							135 _{Se}	136 _{Se}						
16						124 _J	125 _J	123 _{Cç}	126 _J					
17							121 _{Cç}	122 _{Cç}						
18								132 _{Se}						
19								3 _M						
20								11 _{SR}						
21								106 _{RV}						
22								71 _P						

Obs: Gabirobas de: Mineiros (M), Santa Rita do Araguaia (SR), Caiapônia (Ca), Três Ranchos (TR), Ouidor (O), Catalão (Ct), Caldas Novas (Cl), Goianira (G), Pirenópolis (P), Anápolis (An), Abadiânia (Ab), Alexânia (Al), Rio Verde (RV), Quirinópolis (Q), Caçú (Cç), Jataí (J) e Serranópolis (Se).

Verificou-se a ocorrência de diversidade genética entre as 140 matrizes de gabirobeiras estudadas através da técnica de marcadores do tipo RAPD. Os resultados indicam que a técnica RAPD subsidiou a identificação da diversidade genética nas populações naturais de gabirobeira. Resultado também observado por

Pinto (2009) nos estudos de diversidade genética de guariroba nativas e por Nunes et al. (2008) nos estudos de butiazeiro do banco de germoplasma da UFPel.

4.3.5 Diversidade genética entre as 17 procedências de gabirobeiras do Estado de Goiás

As distâncias entre as procedências variaram de 0,094 a 0,32. A dissimilaridade mínima foi observada entre Anápolis e Abadiânia e a máxima dissimilaridade foi observada entre Mineiros e Serranópolis, mostrando que essas procedências são dissimilares.

Observa-se concordância entre os métodos de agrupamento Tocher (Tabela 08) e dendrograma UPGMA (Figura 09), 6 grupos divergentes foram formados a partir das 17 procedências estudadas. Indicando que as mesmas apresentam diversidade quando comparadas entre si. O primeiro grupo concentrou 52,54% das procedências indicando que os progenitores destes municípios apresentam semelhança genotípica. As procedências de Quirinópolis, Catalão e Goianira não demonstraram semelhança entre si de acordo com as análises de agrupamento, pois foram postas de forma individualizada.

Tabela 08: Agrupamento pelo método de Otimização de Tocher com base na matriz de dissimilaridade gerada a partir da análise molecular das amostras compostas de DNA (procedências).

Grupos	Procedências
1	10 _{An} 11 _{Ab} 9 _P 1 _M 16 _J 13 _{RV} 2 _{SR} 3 _{Ca} 7 _{Cl}
2	12 _{Al} 15 _{Cç} 17 _{Se}
3	4 _T 5 _O
4	14 _Q
5	6 _{Ct}
6	8 _G

Obs: Gabiropas de: Mineiros (M), Santa Rita do Araguaia (SR), Caiapônia (Ca), Três Ranchos (TR), Ouidor (O), Catalão (Ct), Caldas Novas (Cl), Goianira (G), Pirenópolis (P), Anápolis (An), Abadiânia (Ab), Alexânia (Al), Rio Verde (RV), Quirinópolis (Q), Caçú (Cç), Jataí (J) e Serranópolis (Se).

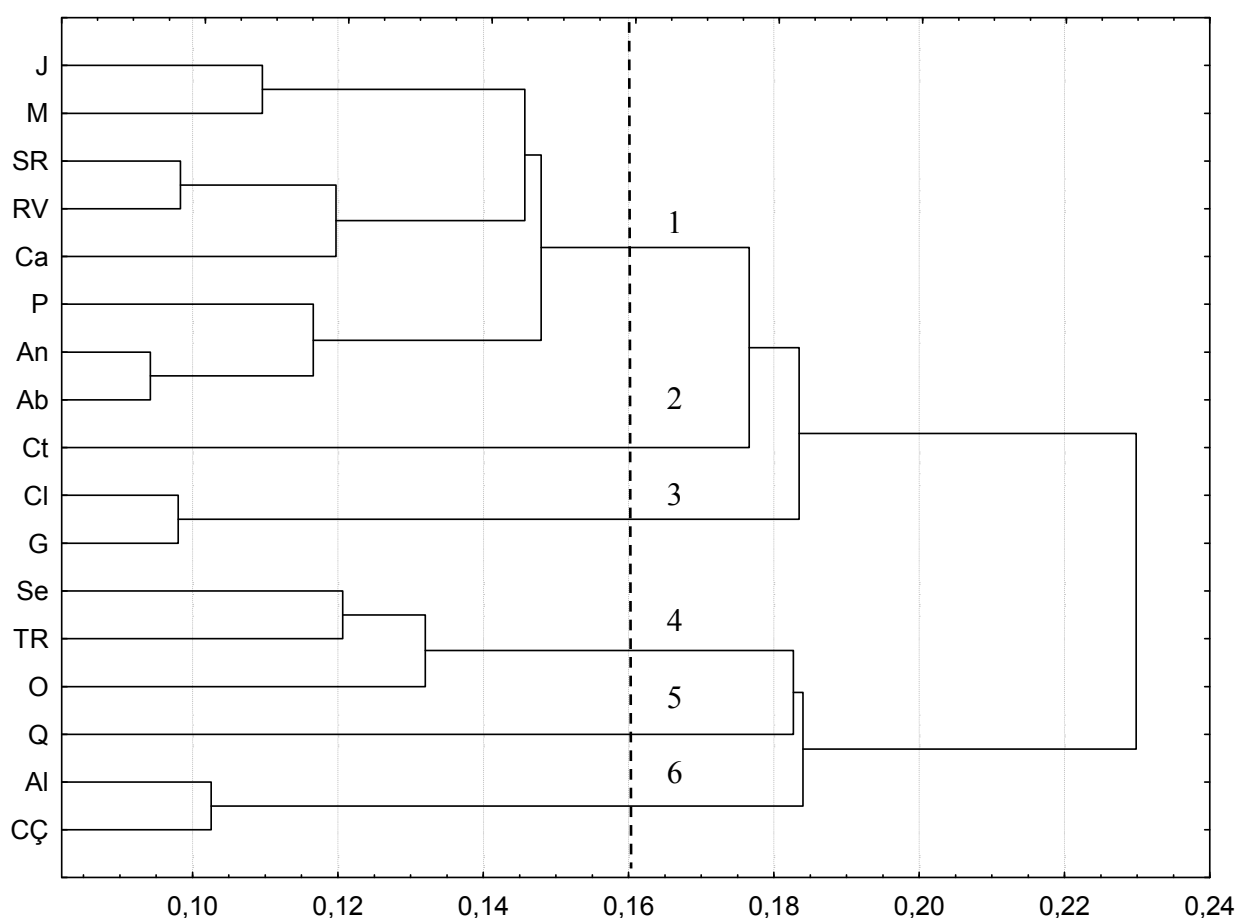


Figura 09. Dendrograma de distâncias genéticas entre 17 procedências de gabirobeiras obtido pelo método UPGMA, com base na matriz de marcadores de RAPD.

Observa-se que as procedências foram agrupadas de forma correlacionadas com a distribuição no estado de Goiás em ambas as análises (Tabela 08) e (Figura 09) como podem ser notadas no grupo 1 as procedências de Jataí, Mineiros, Santa Rita do Araguáia e Rio Verde, sendo ambos da microrregião Sudoeste de Goiás, porém, pode ser observado também que procedências distantes geograficamente apresentaram comportamento similar também, como é observado entre Alexânia e Caçú, fato justificado pela disseminação destas plantas pelas regiões onde foram coletadas, sendo feita na maior parte das vezes pela Avifauna da região.

4.3.6 Diversidade genética dentro de cada procedência de gabirobeiras do Estado de Goiás

Observa-se diversidade genética dentro de cada município (Tabela 09), pois pelo menos 2 grupos divergentes foram formados. As dissimilaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Nei Li variaram de 0,206 entre os progenitores de Goianira e 0,36 dentro de Caiapônia. Este resultado demonstra que as matrizes de gabirobeiras apresentam variabilidade genética entre si mesmo estando situados geograficamente próximos um do outro, o que facilita a coleta de germoplasma para a implantação de coleções de estudo ou de conservação, sendo que a coleta do germoplasma pode ser feita em regiões próximas (Pinto, 2009), pois garante a variabilidade genética entre os acessos mesmo estando geograficamente próximos.

Tabela 09: Agrupamento pelo método de Tocher dentro de cada município.

	Procedências	Grupos e Acessos	Distância média entre os indivíduos
1	Abadiânia	I (1 2 6 3 5 4) e II (7 8)	0,295
2	Alexânia	I (6 7 4 5 2), II (3 8) e III (1)	0,298
3	Anápolis	I (5 6 2 1 4), III (8 7) e III (3)	0,227
4	Caçú	I (6 8 7 5 3 1 10), II (2 4) e III (9 11)	0,280
5	Caiapônia	I (3 4 5 6), II (1 2 8) e III (7)	0,360
6	Caldas Novas	I (3 6 1), II (7 8), III (2 5) e IV (4)	0,239
7	Catalão	I (2 3 6 5 4 1) e II (7 8)	0,293
8	Goianira	I (1 2 4 3), II (5 7), III (6) e IV (8)	0,206
9	Jataí	I (8 7 5 6 2 4 3), II (1)	0,338
10	Mineiros	I (7 8), II (2 3), III (5 6), IV (4) e V (1)	0,339
11	Ouvidor	I (7 8 6 5 1 4 3) e II (2)	0,232
12	Pirenópolis	I (3 4 5 8), II (1 2), III (6) e IV (7)	0,332
13	Quirinópolis	I (3 4 2 5) e II (1)	0,260
14	Rio Verde	I (6 7 8 5), II (1 2) e III (3 4)	0,341
15	Santa Rita do Araguáia	I (4 5 2 7), II (1 6 8) e III (3)	0,337
16	Serranópolis	I (1 2 8 6 7), II (3 4) e III (5)	0,298
17	Três Ranchos	I (4 5 2 3 1 7 6) e II (8)	0,206

4.4 Considerações quanto ao uso dos dados morfológicos e moleculares no estudo da diversidade genética de gabirobeiras

Neste estudo, a técnica RAPD juntamente com a análise de dados morfológicos subsidiou a identificação da diversidade genética nas populações de gabirobeiras estudadas. Foi possível observar que a região sudoeste de Goiás representada por Caipônia (Ca), Jataí (J), Mineiros (M), Rio Verde (RV), Santa Rita do Araguáia (SR) e Serranópolis (Se) apresentou grande variabilidade entre os genótipos. Estas informações permitem direcionar a coleta de material genético.

Observou-se que as origens geográficas das gabirobeiras influenciaram no agrupamento das mesmas. Em média 75% das gabirobeiras avaliadas por dados morfológicos e 67% avaliadas com dados moleculares apresentaram correspondência no agrupamento conforme a origem. Demonstrando que a diversidade obtida por avaliação morfológica foi concordante com aquela obtida pela avaliação molecular.

A análise conjunta dos dados morfológicos quantitativos e qualitativos por meio do algoritmo de Gower demonstrou ser uma ferramenta importante no levantamento da variabilidade existente entre genótipos de gabirobeiras, indicando a diversidade entre os indivíduos ou grupos de indivíduos. Porém torna-se necessário observar essas informações com certa reserva, pois se tratam de variações diferentes, em termos genéticos podem estar associados ao tipo de herança, enquanto o primeiro é predominantemente de herança poligênica, o segundo é de herança monogênica ou oligogênica.

5. CONCLUSÕES

As análises moleculares e morfológicas realizadas demonstraram a diversidade genética entre os 140 genótipos de gabirobeiras, entre as 17 procedências, e dentro de cada procedência, com potenciais chances de desenvolvimento de futuros trabalhos voltadas à conservação destas plantas *in situ* ou *ex situ* e trabalhos de melhoramento genético.

Os métodos de agrupamentos utilizados apresentaram coerência no agrupamento de indivíduos mais similares e demonstraram a dispersão entre os mesmos devido à existência de variabilidade.

Os iniciadores OPA 09, OPA 18, OPA 20, OPV 12 e OPAB 09 foram os que proporcionaram maior número de amplificações, representando maior polimorfismo, podendo ser então, indicados no estudo da diversidade genética de gabirobeiras.

A análise estatística *Bootstrap* indica ser necessário, para um CV de 10%, o uso de pelo menos 120 marcas polimórficas para caracterizar a divergência genética entre os 140 indivíduos de gabirobeiras estudadas.

A coleção base de gabirobeiras implantada no Campus Jataí apresenta variabilidade genética.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADATI, R.T. **Estudo biofarmagnóstico de *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum. Myrtaceae.** Dissertação (Mestrado em Farmacognosia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001. 128f.

ALMEIDA, M.J.O.F.; NAVES, R.V.; XIMENES, P.A. Influência das Abelhas (*Apis mellifera*) na polinização da gabirola (*Campomanesia* spp). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 30 (2): 25-28, jul./dez. 2000.

ANDRADE, R.A.; WICKERT, E.; MARTINS, A.B.G.; ANDRADE, M.M.C.; LEMOS, E.G.M. Diversidade genética de acessos de *Nephelium lappaceum* L. através de caracterização morfológica e molecular. **Comunicata Scientiae**, p. 91-99, 2011.

AQUINO, F.G.; WALTER, B.M.T.; RIBEIRO, J.F. Espécies Vegetais de Uso Múltiplo em Reservas legais de Cerrado – Balsas, MA. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 147 – 149, jul. 2007.

AREIAS, R. G. B. M.; PAIVA, D. M.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Similaridade genética de variedades crioulas de arroz, em função da morfologia, marcadores RAPD e acúmulo de proteínas nos grãos. **Bragantia**, v. 65, n. 1, p. 19-28, 2006.

ASSIS, E. S.; REIS, E.F.; NASCIMENTO, C.F.; SCATENA, N. F. Análise da diversidade genética de plantas de gabirolas com base em avaliações do desenvolvimento inicial. VII Seminário de Pós-graduação da Universidade Federal de Goiás, **Conpeex**, 2010.

ÁVIDOS, M. F. D.; FERREIRA, L. T. Frutos dos Cerrados – Preservação gera muitos frutos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.3, n.15, p.36-41, 2003.

BALLVE, R. M. L.; MEDINA-FILHO, H. P.; BORDIGNON, R. Identification of reciprocal hybrids in citrus by the broadness of the leaf petiole wing. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 4, p. 697-702, 1997.

BARROS, A.M.; FALEIRO, F.G.; KARÍA, C.T.; SHIRATSUCHI, LI.S.; ANDRADE, R.P.; LOPES, G.K. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes*

macrocephala determinadas por RAPD e SIG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.9, p.899-909, set. 2005.

BELLON, G; FALEIRO, F.G; PEIXOTO, J.R; JUNQUEIRA, K.P; JUNQUEIRA, N.T.V; FONSECA, K.G; BRAGA, M.F. Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 1, p. 197-202, Março 2009.

BICALHO, K.C; OLIVEIRA, L.E.M; SANTOS, J.B; MESQUITA, A.C; MENDONÇA, E.G. Similaridade genética entre clones de seringueira (*Hevea brasiliensis*), por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1510-1515, set./out., 2008.

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

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. **Tipos de marcadores moleculares**. In BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). Marcadores Moleculares – Viçosa, MG, p. 9-78, 2006.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M; CONCEIÇÃO, L.O.H.C.S; CARDOSO-SILVA, C.B; PEREIRA, A.S; SANTOS, E.S.L; OLIVEIRA, A.C; CORRÊA, R.X. Genétic diversity in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) based on RAPD. **Crop Breeding and Applied Biothnology** 10: 154-159, 2010.

COELHO, A.S.G. **Dboot**: Avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores (softwares). [S.I.] Laboratório de genética vegetal, Instituto de ciências biológicas, UFG, 2000.

COSTA, I.R. **Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss, no Sudeste do Brasil**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia, Campinas SP, 2004.

CRUZ, C.D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1990.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Diversidade genética**. In: Cruz, c.d.; carneiro, p.c.s. (Ed). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, v.2, Cap. 6, p.338-434, 2003.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, J. A.; CARNEIRO, P.C.S. **Divergência genética**. In: CRUZ, C.D.; REGAZZI, J.A.; CARNEIRO, P.C.S. (Ed). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, v. 1, Cap. 8, p. 377-413, 2004.

CRUZ, C. D. . Programa Genes - **Diversidade Genética**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008. v. 1. 278 p.

CRUZ, C.D; FERREIRA, F.M; PESSONI, L.A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2011, 620p.

DIAS, L.A. dos S. **Divergência genética e fenética multivariada na predição de híbridos e preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1994, 94 p.

DOYLE, J.J; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S. GELAPE.; CORDEIRO, M.C.R.; KARIA, C.T. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: **Embrapa Cerrados**, comunicado Técnico 92, ISSN 1517-1469, 2003. 5p.

FALEIRO, F.G.; BELLON, G.; PEREIRA, A.V.; PEREIRA, E.B.C. JUNQUEIRA, N.T.V.; VIEIRA, E.A.; DUBOC, E.; SANO, S.M.; MELO, J.T.M.; FERNANDES, F.D. Variabilidade Genética de coleção de trabalho de pequizeiro com base em marcadores moleculares. **IX simpósio Nacional Cerrado**, ParlaMundi, Brasília, DF, Outubro de 2008.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2a. ed. Brasília, EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220 pp.

FONSECA, C. E. L.; MUNIZ, I A. F. Informações sobre a cultura de espécies frutíferas nativas da região dos cerrados. **Informe Agropecuário**, v. 16, n. 173, p. 2-16, Mar./Abr. 1992.

GOMES FILHO, A; OLIVEIRA, J.G; VIANA, A.P; SIQUEIRA, A.P.O; OLIVEIRA, M.G; PEREIRA, M.G. Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy Maringá**, v. 32, n. 4, p. 627-633, 2010.

GOWER, J.C. **A general coefficient of similarity and some of its properties**. **Biometrics** 27: 857-874. 1971

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. Plant systematics: a phylogenetic approach. **Sinauer Associates** Inc. Publishers, Massachusetts, 1999.

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; RAMOS, J.D. BELLON, G.; JUNQUEIRA, T.V.; BRAGA, M.F. Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 29 n.3 Jaboticabal, 2007.

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, T.V.; FONSECA, K.G.; LIMA, C.A.; SANTOS, E.C. Variabilidade genética de acessos de pitaya com diferentes níveis de produção por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura** v. 32 n.3 Jaboticabal Sept. 2010a.

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, T.V.; FONSECA, K.G.; LIMA, C.A.; SOUZA, L.S. Diversidade genética de pitayas nativas do cerrado com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 32 n.3 Jaboticabal Sept. 2010b.

KAMADA, T.; PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A.C.; CRUZ, C.D.; VIEIRA, R.F.; OTONI, W.C. Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. **Revista Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.31, n.3, p. 403-409, 2009.

LACERDA D. R.; ACEDO M. D. P.; LEMOS FILHO J. P. & LOVATO M. B. **A técnica de RAPD**: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. Instituto de Ciências Biológicas – UFMG ISSN 1676-6180. Belo Horizonte, MG, Brasil. 2002.

LANDRUM, L.R. *Campomanesia*, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma (Myrtaceae4). **Flora Neotropica**, Monographs 45: 1-179. 1986.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI. M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia** 49(4): 508-536, Dec. 1997.

LEAL, J.B.; SANTOS, L.M.; SANTOS, C.A.P.; PIRES, J.L.; AHNERT, D.; CORRÊA, R.X. Diversidade genética entre acessos de cacau de fazendas e de banco de germoplasma na Bahia. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.43 n.7 Brasília Julho, 2008.

LORENZI, H.; SARTORI, S.; BACHER, L.B.; LACERDA, M. Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas: de consumo *in natura*. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, São Paulo, 2006.

MELCHIOR, S.J.; CUSTÓDIO, C.C.; MARQUES T.A.; MACHADO NETO, N.B. Colheita e Armazenamento de Sementes de Gabiroba (*Campomanesia adamantium* Camb. – Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 28, nº3, p.141-150, 2006.

MOURA, M.C.C.L.; GONÇALVES, L.S.A.; SUDRÉ, C.P.; RODRIGUES, R.; AMARAL JUNIOR, A.T.; PEREIRA, T.N.S. Algoritmo de Gower na estimativa da divergência genética em germoplasma de pimenta. **Revista Brasileira Horticultura**, v.28, n.2. abr. – jun. 2010.

NASCIMENTO FILHO, F.J. do; ATROCH, A.L.; SOUZA, N.R. de.; GARCIA, T.B.; CRAVO, M. da S.; COUTINHO, E.F. Divergência genética entre clones de guaranazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n.3, p. 501-506, mar. 2001.

NETO, N.B.M; MORYAL, A.T. Variability in macadamia integrifolia by RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 10: 266-270, 2010.

NUNES, A.M.; BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C. CARVALHO, A.Z. de; CARDOSO, G. Caracterização molecular de butiazeiro por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 30, n. 3, p. 702-707, Setembro 2008.

OLIVEIRA, M. S. P.; AMORIM, E. P.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, D.F. Diversidade genética entre acessos de açazeiro baseada em marcadores RAPD. **Ciências Agrotécnicas**. Lavras, v. 31, n. 6, p. 1645-1653, 2007.

OLIVEIRA, M.S.P; SILVA, K.J.D. Diferenciação genética entre procedências de açazeiro por marcadores RAPD e SSR. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 2, p. 438-443, Junho 2008.

PEQUENO, S.A.; PINHEIRO, J.B.; ZUCCHI, M.I.; VENCOSVSKY, R.; COELHO, A.G.; TRINDADE, M.G. Determinação do número de marcadores RAPD para estudos da diversidade genética em soja utilizando o método BOOTSTRAP. **Bioscience Journal**. UFU. Uberlândia, v.19, n.2, p.45-48, 2003.

PEREIRA, M. **Propagação Via Estacas apicais, Caracterização Morfológica e Molecular de Jaboticabeira (*Myrciaria* spp)**. Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo – Brasil, Out. 2003.

PESSANHA, P.G.O; VIANA, A.P; AMARAL JUNIOR, A.T; SOUZA, R.M; TEIXEIRA, M.C; PEREIRA, M.G. Avaliação da diversidade genética em acessos de *Psidium* spp. Via marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 33, n. 1, p. 129-136, Março 2011.

PIGATO, S.M.P.C.; LOPES, C.R. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio do marcador molecular RAPD em um teste de progênies em *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. **Revista Scientia Florestalis**, n.60, p.135-148, dezembro, 2001.

PILLAR, V.D. **MULTIV: Multivariate Exploratory Analysis, Randomization Testing and Bootstrap Resampling. Software (free distribution version MULTIV Minor) and manual available** 2001. <http://ecoqua.ecologia.ufrgs.br>.

PINTO, J.F.N. **Variabilidade Genética de Guariroba (*Syagrus oleraceae* Becc.) Determinada por Descritores Morfológicos e Moleculares RAPD**. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Goiás -Campus Jataí (UFG), 2008.

PROENÇA, C. **Listagem Comprovada das Myrtaceae do Jardim Botânico de Brasília** "Check-List". Bol. Herb. Ezechiasn Paulo Heringer v. 1: 6-8, 1994.

RADMANN, E.B.; OLIVEIRA, R.P. Caracterização de cultivares apirênicas de citros de mesa por meio de descritores morfológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38 nº. 9 Brasília Sept. 2003.

REIF, J.C.; MELCHONGER, A.E.; FRISCH, M. Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients and applied in plant breeding and seed bank management. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 1, p. 1-7, Jan./feb. 2005.

ROCHA, M.C.; GONÇALVES, L.S.A.; RODRIGUES, R.; SILVA, P.R.A.; CARMO, M.G.F.; ABOUD, A.C.S. Uso de algoritmo de Gower na determinação da divergência genética entre acessos de tomateiro do grupo cereja. **Maringá**, v.32, n. 3, p. 423-431, 2010.

SALLA, M.F.S.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; PÍPOLO, V.C. 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.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 260 -261, 2005.

VALILLO, M.I.; AGUIAR, O.T. de; FIUMARELLI, J.; MARTINS JUNIOR, H.A.; SASSINE, A.; BUSTILLOS, O.V. Identificação de terpenos no óleo dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessèdes) O.BERG. Landrum - Myrtaceae. **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo-SP, v.71, p.1-749, 2004.

VALLILO, M.I.; GARBELOTTI, M.L.; OLIVEIRA, E.; LAMARDO, L.C.A. Características físicas químicas dos frutos do cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 27 n. 2, p. 241-244, Agosto 2005.

VALILLO, M.I.; LAMARDO, L.C.A.; GABERLOTTI, M.L.; OLIVEIRA, E.; MORENO, P.R.H. Composição Química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessèdes) O. Berg. **Ciên. Technol. Aliment.** Campinas, 26(4): 805-810, out.-dez. 2006.

VILELA-MORALES, E.A.; VALOIS, A.C.C.; NASS, L.L. **Recursos genéticos vegetales**. Brasília: Embrapa – SPI/Embrapa-Cenargen, 1997. 78 p.

WELSH, L.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, Dec. 1990.

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

WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, 218: 704-740, 1993.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; FREIRE FILHO, F. R. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 4, p. 353-359, 2005.

ANEXO

Tabela 01: Agrupamento pelo método de Otimização de Tocher a partir das matrizes de dissimilaridade obtidas com os dados morfológicos quantitativos, multicategóricos qualitativos e com análise conjunta dos dados entre as 140 matrizes de gabirobeiras em estudo.

Grupos	Matrizes (dados Quantitativos)	Matrizes (dados Qualitativos)	Matrizes (Análise conjunta)
1	135 _{Se} 136 _{Se} 140 _{Se} 139 _{Se} 137 _{Se} 138 _{Se} 133 _{Se} 102 _{RV} 36 _O 120 _{Cç} 8 _M 55 _{Cl} 125 _J 110 _Q 101 _{RV} 87 _{Ab} 83 _{Ab} 123 _{Cç} 100 _{RV} 90 _{Al} 104 _{RV} 67 _P 43 _{Ct} 89 _{Ab} 58 _G 93 _{Al} 94 _{Al} 35 _O 103 _{RV} 96 _{Al} 72 _P 50 _{Al} 59 _G 117 _{Cç} 53 _{Cl} 106 _{RV} 29 _T 48 _{Ct} 62 _G 80 _{An} 118 _{Cç} 81 _{An} 85 _{Ab} 60 _G 71 _P 7 _M 75 _{An} 37 _O 86 _{Ab} 31 _T 79 _{An} 41 _{Ct} 32 _T 16 _{SR} 108 _Q 95 _{Al} 76 _{An} 24 _{Ca} 74 _{An} 27 _T 91 _{Al} 17 _{Ca} 66 _P 70 _P 63 _G 109 _Q 28 _T 99 _{RV} 112 _Q 119 _{Cç} 12 _{SR} 97 _{Al} 34 _O 3 _M 64 _G 116 _{Cç} 65 _G 49 _{Ct} 82 _{Ab} 77 _{An} 44 _{Ct} 98 _{RV} 68 _P 105 _{RV} 69 _P 121 _{Cç} 57 _{Cl} 88 _{Ab} 40 _O 20 _{Ca} 45 _{Ct} 42 _{Ct} 73 _P 4 _M 15 _{SR}	11 _{SR} 60 _G 35 _O 73 _P 75 _{An} 77 _{An} 79 _{An} 90 _{Al} 91 _{Al} 104 _{RV} 113 _{Cç} 115 _{Cç} 99 _{RV} 5 _M 16 _{SR} 74 _{An} 85 _{Ab} 100 _{RV} 101 _{RV} 123 _{Cç} 140 _{Se} 76 _{An} 78 _{An} 81 _{An} 82 _{Ab} 83 _{Ab} 84 _{Ab} 117 _{Cç} 32 _T 65 _G 103 _{RV} 58 _G 66 _P 92 _{Al} 93 _{Al} 94 _{Al} 96 _{Al} 97 _{Al} 98 _{RV} 105 _{RV} 106 _{RV} 107 _{RV} 118 _{Cç} 121 _{Cç} 64 _G 133 _{Se} 31 _T 67 _P 95 _{Al} 69 _P 70 _P 72 _P 80 _{An} 108 _Q 109 _Q 110 _Q 111 _Q 112 _Q 119 _{Cç} 120 _{Cç} 122 _{Cç} 44 _{Ct} 46 _{Ct} 48 _{Ct} 45 _{Ct} 47 _{Ct} 39 _O 42 _{Ct} 68 _P 139 _{Se} 17 _{Ca} 23 _{Ca} 24 _{Ca} 50 _{Cl} 62 _G 132 _{Se} 59 _G 86 _{Ab} 87 _{Ab} 88 _{Ab} 89 _{Ab} 36 _O 61 _G 1 _M 116 _{Cç} 54 _{Cl}	135 _{Se} 136 _{Se} 134 _{Se} 137 _{Se} 138 _{Se} 15 _{SR} 7 _M 19 _{Ca}
2	127 _J 129 _J 128 _J 131 _J 130 _J 39 _O 92 _{Al} 22 _{Ca} 23 _{Ca} 30 _T 107 _{RV} 122 _{Cç} 13 _{SR} 52 _{Cl} 21 _{Ca} 47 _{Ct} 10 _{SR} 78 _{An} 26 _T 11 _{SR} 111 _Q	124 _J 125 _J 126 _J 127 _J	31 _T 81 _{An} 76 _{An} 83 _{Ab} 82 _{Ab} 78 _{An} 84 _{Ab} 79 _{An} 77 _{An} 91 _{Al} 90 _{Al} 104 _{RV} 115 _{Cç} 113 _{Cç} 94 _{Al} 97 _{Al} 93 _{Al} 118 _{Cç} 96 _{Al} 106 _{RV} 66 _P 105 _{RV} 121 _{Cç} 98 _{RV} 58 _G 107 _{RV} 92 _{Al} 102 _{RV} 95 _{Al} 67 _P 61 _G 112 _Q 109 _Q 108 _Q 75 _{An} 65 _G 32 _T 99 _{RV} 103 _{RV} 73 _P 111 _Q 56 _{Cl} 110 _Q 119 _{Cç} 117 _{Cç} 70 _P 100 _{RV} 74 _{An} 123 _{Cç} 85 _{Ab} 16 _{SR} 64 _G 101 _{RV} 69 _P 120 _{Cç} 122 _{Cç} 30 _T 42 _{Ct} 39 _O 140 _{Se} 5 _M 59 _G 114 _{Cç} 27 _T 3 _M 133 _{Se} 35 _O 72 _P 80 _{An} 60 _G 48 _{Ct} 14 _{SR} 40 _O 44 _{Ct} 46 _{Ct} 45 _{Ct} 6 _M 68 _P

Tabela 01, Cont.

3	113 _{Cç} 6 _M	115 _{Cç} 25 _T	114 _{Cç} 14 _{SR} 56 _{Cl}	1 _M 2 _M 46 _{Ct}	134 _{Se} 138 _{Se}	135 _{Se} 7 _M	136 _{Se} 15 _{SR}	137 _{Se} 12 _{SR} 114 _{SR}	86 _{Ab}	88 _{Ab}	89 _{Ab}	87 _{Ab}	25 _T
4	61 _G	124 _J	33 _O	9 _{SR} 54 _{Cl}	4 _M	57 _{Cl} 38 _O	18 _{Ca} 53 _{Cl}	51 _{Cl} 55 _{Cl}	17 _{Ca}	24 _{Ca} 62 _G	50 _{Cl} 37 _O	23 _{Ca} 71 _P	132 _{Se}
5		132 _{Se}	134 _{Se}		9 _{SR}	41 _{Ct}	37 _O	28 _T 2 _M	125 _J	126 _J	124 _J	63 _G	22 _{Ca}
6		5 _M	126 _J	51 _{Cl}	20 _{Ca}	22 _{Ca}	19 _{Ca}	21 _{Ca}	4 _M	54 _{Cl}	53 _{Cl} 18 _{Ca}	57 _{Cl}	55 _{Cl}
7			38 _O		26 _T	27 _T	63 _G 43 _{Ct}	6 _M 25 _T 30 _T	9 _{SR}	41 _{Ct}	29 _T 28 _T	33 _O 49 _{Ct}	47 _{Ct} 8 _M
8			19 _{Ca}		29 _T	49 _{Ct}	33 _O				129 _J	130 _J	
9			84 _{Ab}		3 _M	14 _{SR}	8 _M			11 _{SR}	116 _{Cç}	13 _{SR}	
10			18 _{Ca}		10 _{SR}	52 _{Cl}				20 _{Ca}	21 _{Ca}		
11					129 _J	130 _J				34 _O	43 _{Ct}		
12						40 _O				1 _M	36 _O		
13						131 _J					38 _O		
14						71 _P					26 _T		
15						13 _{SR}					10 _{SR}		
16						34 _O					2 _M		
17						56 _{Cl}					52 _{Cl}		
18						128 _J					139 _{Se}		
19						102 _{RV}					12 _{SR}		
20											51 _{Cl}		
21											128 _J		
22											131 _J		
23											127 _J		

Procedência: Abadiânia (Ab), Alexânia (Al), Anápolis (An), Caçú (Cç), Caipônia (Ca), Caldas Novas (Cl), Catalão (Ct), Goianira (G), Jataí (J), Mineiros (M), Ouvidor (O), Pirenópolis (P), Quirinópolis (Q), Rio Verde (RV), Santa Rita do Araguaia (SR), Serranópolis (Se) e Três Ranchos (T).