



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**ESTUDO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E
VARIABILIDADE GENÉTICA DE BARU E ARATICUM UTILIZANDO
MARCADORES RAPD E MICROSSATÉLITES**

MARCELA VERSIANI VENANCIO PIRES

**ORIENTADOR: FÁBIO GELAPE FALEIRO
CO-ORIENTADOR: JOSÉ RICARDO PEIXOTO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

**BRASÍLIA/DF
MARÇO/2011**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**ESTUDO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E
VARIABILIDADE GENÉTICA DE BARU E ARATICUM UTILIZANDO
MARCADORES RAPD E MICROSSATÉLITES**

MARCELA VERSIANI VENANCIO PIRES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDO AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE/DOCTOR EM AGRONOMIA.

APROVADO POR:

**FÁBIO GELAPE FALEIRO, Pós Dr. (Embrapa Cerrados)
(ORIENTADOR) CPF: 739.634.706-82
E-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br**

**NARA OLIVEIRA SILVA SOUZA, Dra. (UnB - FAV)
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 033.300.726-36.
E-mail: narasouza@unb.br**

**SUELI MATIKO SANO, Dra. (Embrapa Cerrados)
(EXAMINADORA EXTERNA) CPF: 000.630.238-65
E-mail: sueli@cpac.embrapa.br**

BRASÍLIA/DF, 30 de março de 2012.

FICHA CATALOGRÁFICA

P667 Pires, Marcela Versiani Venancio

Estudo de características morfológicas e variabilidade genética de Baru e Araticum utilizando marcadores RAPD e microssatélites / Marcela Versiani Venancio Pires. – Brasília : Unb / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2012.

70f.

Orientador: Fábio Gelape Faleiro

Co-orientador: José Ricardo Peixoto

Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

1. Baru. 2. Araticum - genética. 3. Técnica de Amplificação ao Acaso de DNA Polifórmico. I. Faleiro, Fábio Gelape. II. Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

PIRES, M. V. V. **Diversidade genética de coleções de trabalho de fruteiras nativas do cerrado com base em características morfológicas e análises do DNA.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012. 70 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Marcela Versiani Venancio Pires

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Diversidade genética de coleções de trabalho de fruteiras nativas do cerrado com base em características morfológicas e análises do DNA.

GRAU: Mestre

ANO: 2012

É concedida à Unidade de Brasília permissão para reproduzir cópias dessa dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si outros direitos de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Marcela Versiani Venancio Pires

CPF: 725.237.861-68

SQN 412, Bloco O, apto 110 – Asa Norte

CEP: 70867-150 – Brasília-DF

Telefone: 61 84026841

E-mail: maversiani@yahoo.com.br

À toda a minha querida e amada família, de todos os lados possíveis, pelo incentivo, encorajamento e valor que sempre me deram e que me faz acreditar.

Ao meu noivo, em muito breve marido, por todo o grande amor, carinho, paciência, apoio, companheirismo e encorajamento

diário.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meus passos, meus caminhos em toda minha vida,

À minha família que sempre me incentiva, encoraja e valoriza o que sou.

À Universidade de Brasília e a Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária pela oportunidade de realização do mestrado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Cerrados – CPAC), pela disponibilização de infra-estrutura para o desenvolvimento científico deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Fábio Gelape Faleiro, pela orientação, pelo inestimável aprendizado, clareza, tranquilidade, amizade e incentivo durante o curso.

À Reserva do Exército, pela preservação da área que nos proporcionou a continuidade da pesquisa, em especial ao Comandante Ten. Cel. Valério Luis Lange, Cap. Fábio Araújo, Ten. Edinaldo e Sub. Ten. Pedro pela atenção, acolhimento, simpatia e apoio na realização das visitas de campo.

Aos professores José Ricardo Peixoto e Jean Kleber Matos pela amizade e grande incentivo à continuidade dos estudos acadêmicos.

Aos amigos Graciele Bellon, Bernardo, João Gilberto e João Batista dos Santos, e toda equipe do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados pela valiosa ajuda na execução dos experimentos.

À Dra. Sueli Matiko Sano e ao Dr. José Teodoro de Melo, juntamente com suas equipes, pelas informações, tempo, pela paciência e pelo precioso aprendizado.

Ao José Carlos Sousa Silva, sua equipe pelas informações, atenção e auxílio das análises, em especial ao Valdecir, pela grande atenção e ajuda nas análises categóricas do baru e araticum.

Ao Geovane Alves de Andrade pelo auxílio com as matrizes do CPAC.

Às minhas amadas amigas Livia, Isabela, Luise e Alessandra por fazerem as matérias da pós-graduação tão mais animadas, divertidas e proveitosas. E Silvinha, Ju e Maroca por estarem presente mesmo sem estar na pós. Vocês são maravilhosas amigas.

E TODOS os outros inestimáveis amigos e familiares que de alguma forma ajudaram, incentivaram e apoiaram essa dissertação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
O Cerrado	6
Aproveito alimentar e econômico de espécies nativas do Cerrado	8
Fruteiras nativas do Cerrado	9
Baru	10
Araticum	11
Caracterização e uso de recursos genéticos do Cerrado	12
Uso de marcadores moleculares no estudo de espécies nativas do Cerrado.....	13
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPITULO I	22
RESUMO	23
ABSTRACT	24
1. INTRODUÇÃO	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	26
Material genético	26
Obtenção e análise de marcadores RAPD	27
Obtenção e análise de marcadores microssatélites	28
Obtenção e análise de características morfológicas quantitativas.....	29
Obtenção e análise de características morfológicas categóricas.....	30
Análises de Correlação, Agrupamento e Dispersão com base nas matrizes de dissimilaridades genéticas	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4. CONCLUSÕES	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

CAPÍTULO II	47
RESUMO	48
ABSTRACT	48
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	52
Material genético	52
Obtenção e análise de marcadores RAPD	52
Obtenção e análise de marcadores microssatélites	53
Obtenção e análise de características morfológicas categóricas.....	55
Análises de Correlação, Agrupamento e Dispersão com base nas matrizes de dissimilaridades genéticas	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4. CONCLUSÕES	67
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ESTUDO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E VARIABILIDADE GENÉTICA DE BARU E ARATICUM UTILIZANDO MARCADORES RAPD E MICROSSATÉLITES

RESUMO GERAL

Os frutos das espécies nativas do cerrado oferecem um elevado valor nutricional, além de atrativos sensoriais como, cor, sabor e aroma peculiares e intensos, ainda pouco explorados comercialmente. O baru (*Dipteryx alata* Vog.), árvore da família Leguminosae, é uma fruteira amplamente disseminada no Cerrado. O araticum (*Annona crassiflora* Mart.) é uma espécie frutífera da família Annonaceae, nativa da região do Cerrado, muito estudada atualmente em diversas áreas. Os objetivos deste estudo foram: a) estudar a variabilidade genética de acessos de baru com base em características morfológicas e com base em análise de DNA por marcadores moleculares RAPD e Microssatélites; b) estudar a variabilidade genética da coleção de trabalho de acessos de araticum, utilizando características morfológicas e marcadores moleculares RAPD e Microssatélites. Folhas de 10 acessos de baru e 18 acessos de araticum da coleção de trabalho da Embrapa Cerrados foram coletadas e o DNA genômico extraído utilizando o método do CTAB, com modificações. Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas via Reação em Cadeia da Polimerase para obtenção de marcadores moleculares RAPD e Microssatélites. Foram avaliadas 15 características morfológicas quantitativas do baru e 23 características morfológicas categóricas de baru e de araticum. As análises das amostras de DNA demonstraram grande diversidade genética entre os acessos. Os trabalhos de caracterização morfológica e molecular mostraram a importância dos diferentes grupos de características para avaliar a variabilidade genética dos acessos. Observou-se que o ambiente pode ter interferido muito nas características morfológicas dos acessos. Estudos de variabilidade genética utilizando apenas características morfológicas avaliadas *in situ* podem não ser adequados devido à grande influência ambiental sobre tais características. Os acessos de baru e araticum avaliados são importantes fontes de variabilidade para enriquecimento da atual coleção de trabalho da Embrapa Cerrados. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a análise das progênies ou de matrizes clonadas em diferentes ambientes assume importância estratégica para futuros estudos de caracterização morfo-agronômica de germoplasma.

Palavras-chave: variabilidade genética, baru, araticum, RAPD, SSR, característica morfológica.

STUDY OF MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND GENETIC VARIABILITY OF BARU AND ARATICUM USING RAPD AND MICROSATELLITES MOLECULAR MARKERS

GENERAL ABSTRACT

The fruits of native species of the Brazilian Savanna offer a high nutritional value, as well as attractive color, flavor and intense aroma. Most of these species were not exploited commercially. The baru (*Dipteryx alata* Vog.) is a fruit widely disseminated in the Brazilian Savanna. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) is an Annonaceae fruit, native in the Brazilian Savanna region, nowadays widely studied in several areas. The objectives of this work were: a) to analyze the genetic variability of baru accessions based on morphological characteristics and on DNA analysis using RAPD and microsatellite markers; b) studying the genetic variability of the araticum germplasm collections, using morphological and RAPD and microsatellites molecular markers. Young leaves of 10 baru and 18 araticum accessions from Embrapa Cerrados collections were collected and used to genomic DNA extractions using the CTAB method, with modifications. DNA samples from each genetic material were amplified by Polymerase Chain Reaction for obtaining. Fifteen quantitative and 23 categorical morphological characteristics were used to analyze baru and araticum genetic variability. DNA analyzes showed high genetic diversity among baru and araticum accessions. The characterization using morphological and molecular markers showed the importance of different types of characteristics to evaluate the genetic variability of accessions. It was observed that the environment may have high interference on morphological characteristics of the accessions. Genetic variability studies using only morphological characteristics assessed in situ may not be effective due to the large environmental influence on these phenotypic characteristics. The baru and araticum accessions evaluated in these work are important sources of variability to enlarge the current Embrapa Cerrados collections. The present results suggest that analysis of accessions (progeny or cloned plants) in different environment have strategic importance for future studies of morpho-agronomic germplasm characterization.

Keywords: genetic variability, baru, araticum, RAPD, SSR, morphological characteristics.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado é considerado o segundo maior bioma brasileiro, com aproximadamente 200 milhões de hectares. É reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade com mais de 12 mil espécies de plantas vasculares (MENDONÇA et al., 2008). A riqueza de suas espécies, segundo Aguiar et. al. (2004), pode representar 33% da diversidade biológica brasileira. Mesmo com limitações de chuva e solo, o Cerrado apresenta surpreendente variabilidade de espécies. Hopkin et al. (2004), afirma que essa rica biodiversidade está em risco de desaparecer devido à falta de planejamento adequado relacionado a investimentos em pesquisa, conservação e cumprimento das políticas públicas já existentes.

Soares et al. (2009) cita Barbosa (1996) ao dizer que algumas destas espécies podem constituir potenciais fontes de exploração econômica, desde que a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias viabilizem seu aproveitamento. Isso porque ainda existem muitas lacunas no conhecimento científico sobre a fauna e a flora existentes no Cerrado, sendo, portanto, imprescindível um aumento e uma intensificação nos estudos para a caracterização, conservação e manejo sustentável desse bioma, além de uma maior capacitação técnica e destinação adequada de recursos financeiros.

Segundo Sano et al. (2007), o Cerrado apresenta em torno de 40% da vegetação alterada pela atividade humana. Isso se deve ao fato de ser o bioma que possui a menor porcentagem de área legalmente protegida, apenas 5,2 %, integralmente protegida na forma de unidades de conservação (JEPSON, 2005). Portanto muitas espécies estão ameaçadas pela ocupação antrópica desordenada do Cerrado e o extrativismo predatório. É uma perda para a saúde, bem estar e economia da sociedade, pois, espécies nativas de grande potencial de uso econômico como frutíferas, medicinais, madeireiras ou ornamentais são substituídas por culturas, muitas vezes, sem o devido cuidado com boas práticas para conservação dos recursos naturais.

Para conservar as espécies com potencial econômico, além da criação de unidades de conservação maiores, devem-se recuperar áreas degradadas e recompor reserva legal das propriedades rurais com mudas oriundas destas espécies (HOPKIN, 2004). Outra forma seria o estabelecimento de sistemas de produção comercial. Estudos sobre a variabilidade genética destas espécies geram importantes informações para subsidiar diferentes práticas de manejo, estabelecimento e manejo de bancos de germoplasma e também etapas iniciais de seleção e melhoramento genético (FALEIRO, 2007; FALEIRO 2011a).

Os métodos para detectar, analisar e quantificar a variabilidade genética em nível molecular oferecem algumas vantagens como a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos, a possibilidade da análise a partir de pequena quantidade de tecido das plantas e a não influência do ambiente. As informações geradas são importantes para complementar os estudos morfológicos e agrônômicos de inúmeros acessos de diferentes espécies de interesse científico e tecnológico.

Atualmente, existem vários tipos de análises do DNA, como aquelas baseadas na obtenção de marcadores moleculares e aquelas baseadas em análises de seqüência. Entre os marcadores moleculares utilizados em estudos de diversidade genética, aqueles baseados em polimorfismos de DNA amplificados ao acaso (RAPD) e em polimorfismos de DNA obtidos em regiões de microssatélites (SSR) têm sido muito utilizados. Análises de seqüência de DNA de cloroplastos também têm sido utilizadas com sucesso em estudos de filogenia e evolução. As diferentes técnicas apresentam vantagens e desvantagens, as quais devem ser consideradas em estudos genéticos (FALEIRO, 2011b).

Entre as espécies nativas de potencial agrônômico, as fruteiras do cerrado possuem grande importância. O grande desafio destas espécies envolve a produção e a comercialização, onde esforços pontuais aprimoram o conhecimento e possibilitam o avanço desse novo mercado (VIEIRA et al., 2010).

Essas frutas estão altamente adaptadas aos solos locais e necessitam de poucos insumos químicos, apresentando baixo custo de implantação e manutenção. Além de serem usadas na formação de pomares domésticos e comerciais, essas fruteiras podem ser utilizadas com sucesso na recuperação de áreas desmatadas ou degradadas; no plantio intercalado com reflorestas, no enriquecimento da flora; no plantio em parques e jardins; no plantio em áreas acidentadas para controle de erosão e no plantio de áreas de proteção ambiental – APAs. Elas são comercializadas em feiras da região Centro-Oeste e margens de rodovia com grande aceitação pelo consumidor e preços competitivos. (VIEIRA et al., 2010).

Dentre as espécies que possuem maior potencial para a exploração sustentada em médio e em curto prazo, com base em seu potencial econômico, nutricional, social e ambiental, com perspectiva de fomentar seu uso pelo pequeno agricultor e por comunidades rurais está o baru (*Dipteryx alata* Vog.) e o araticum (*Annona crassiflora* Mart.).

Sano et al. (2010) destacam o baru que, apesar da sua irregularidade na produção de frutos, possui alta produtividade, facilidade no transporte e armazenamento dos frutos e a qualidade do produto. Como alimento, a amêndoa é rica em proteínas, lipídios insaturados, fibras e minerais essenciais. Além disso, é uma espécie-chave, pois amadurece na época da seca, alimentando várias espécies da fauna do Cerrado.

Melo (2010) destaca o araticum que, apesar da produção irregular como o baru e o alto grau de dormência de suas sementes, por sua vez, atrai o consumidor pelo seu tamanho e características físicas do fruto; já dispõe de mercado, ainda que local; os frutos já são explorados por pequenas indústrias de doces, sorvetes etc; apresenta boa produção de polpa e facilidade de uso em despolpadeiras; além de já dispor de razoável conhecimento gerado pelas pesquisas, especialmente sobre a produção de mudas.

Dentro do contexto apresentado, objetivou-se neste trabalho, analisar a diversidade genética – por meio de marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), e utilizando características morfológicas (análises quantitativas e categóricas) de coleções de trabalho de araticum (*Annona crassiflora*) e baru (*Dipteryx alata*), gerando informações para subsidiar diferentes práticas de manejo, estabelecimento e manejo de bancos de germoplasma e também etapas iniciais de seleção e melhoramento genético dessas plantas.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L. M. S., MACHADO, B. M. & MARINHO-FILHO, J. A. Diversidade Biológica do Cerrado. In: AGUIAR, L. M. S. & CAMARGO, A. J. A. (Eds.). **Cerrado: ecologia e caracterização**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. p.17-40.

BARBOSA, A. S. **Sistema biogeográfico do cerrado: alguns elementos para sua caracterização**. Goiânia: UCG, 1996. 44 p.

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

FALEIRO, F. G. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de.; REIS JÚNIOR, F. B.; (Org.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011a, p. 55-118.

FALEIRO, F. G. Princípio científico e análises genéticas utilizando marcadores moleculares. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de.; REIS JÚNIOR, F. B.; (Org.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011b, v. , p. 31-52.

HOPKIN, M. Brazilian savannah 'will disappear by 2030'. **Nature**, 2004. News 040719-6

JEPSON, W. A disappearing biome?: reconsidering land-cover change in the Brazilian savanna. **The Geographical Journal**. v. 171, n. 2, p. 99-111, 2005.

MELO, J. T. de. Araticum. In: VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, D. B.; SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. (Eds) **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 322p. Cap. 4.

MENDONÇA, R. C. de; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JUNIOR, M. C. da; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. Flora vascular do bioma cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Ed.) **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. v. 2. p. 241-1279.

SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L. S.; FERREIRA, L. G. **Mapeamento de Cobertura Vegetal do Bioma Cerrado: estratégias e resultados**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2007. ISSN 1517 – 5111. (Documento 190)

SANO, S. M.; BRITO, M. A. de; RIBEIRO, J. F. Baru. In: VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, D. B.; SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. (Eds) **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 322p. Cap. 5. P. 76-99.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C.; SANTANA, J. R. F. Marolo: ma fruteira nativa do cerrado. Lavras: Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2009. Boletim técnico nº 82, 17p.

VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, D. B.; SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. (Eds) **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 322p.

WONDRACEK, D. C. **Caracterização e diversidade genética de acessos de maracujás do cerrado com base no perfil carotenóides**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília: 2009. 101p. Dissertação de Mestrado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Cerrado

O Cerrado caracteriza-se como uma formação do tipo savana tropical, com aparente sazonalidade (EITEN, 1994; RIBEIRO & WALTER, 1998), destacando-se pela riqueza de sua biodiversidade. A grande heterogeneidade vegetal e espacial do Cerrado, onde diversas fitofisionomias alternam-se na paisagem, está ligada à variação dos solos e de suas características (composição química, profundidade, tipo de drenagem) (LOPES & COX, 1977). Fatores ligados à geomorfologia e evolução do relevo determinam fortemente os tipos de solo e terrenos do Cerrado, favorecendo a diversidade de paisagens e ambientes. De modo geral, essa região pode ser definida como um domínio de planaltos antigos, com topografia suave ou levemente onduladas, em geral acima dos 500 m, entrecortados por depressões periféricas, lentamente erodidas pelas maiores bacias hidrográficas da América do Sul (Tocantins-Araguaia, São Francisco, Paraná-Paraguai) (MACHADO et al., 2008).

O bioma cerrado é um complexo de formações vegetais: inclui o tipo florestal, cerradão e mata seca; formações intermediárias como o cerrado sensu stricto, o campo-cerrado, o campo sujo e formações distróficas tipicamente campestres, como o campo limpo de cerrado (COUTINHO 1978). Existem outros fatores que determinam a fisionomia do cerrado, além do gradiente de fertilidade do solo. Dentre eles, de acordo com Dias (1992), está a disponibilidade de água do solo, resultante do total anual e estacionalidade das chuvas bem como a capacidade de retenção de água no solo, dada pela textura e profundidade deste. Goodland & Ferri (1979) ainda destacam a saturação de alumínio e Coutinho et al. (2002) ressaltam a incidência do fogo e outras ações antrópicas.

Embora a biodiversidade ofereça grande valor econômico, ambiental e espiritual para a humanidade, tem sido ameaçada pelo consumo insustentável de recursos naturais e pelo rápido crescimento populacional e aumento da pobreza. A expansão da agricultura, das indústrias e da urbanização de forma desordenada tem fragmentado, degradado e eliminado o habitat de inúmeras espécies. Também, a introdução de espécies exóticas em locais antes habitados por nativas e a poluição tem alterado os ciclos climáticos e biogeoquímicos ocasionando mudanças drásticas no planeta. A caça, a pesca e o comércio predatórios estão dizimando as últimas populações de espécies de alto valor (LANGHAMMER et al., 2007).

Estas ações antrópicas interferem também na ocupação do espaço nos solos do Cerrado, fazendo com que o avanço de suas atividades cause a perda de espécies, caso medidas compensatórias não sejam adotadas. Somente o cumprimento do Código Florestal não é suficiente para evitar a perda de espécies, que poderá chegar a um quarto daquilo que é conhecido para o domínio do Cerrado (MACHADO et al., 2008). Até mesmo porque as mudanças que já foram aprovadas, mas ainda não publicadas, no Congresso Nacional para o novo Código interferem muito nas áreas de preservação ambiental além de não impor a compensação ou recuperação de áreas já degradadas. É preciso que sejam promovidas ações complementares de proteção da biodiversidade por meio de unidades de conservação públicas e de adoção de melhores práticas em sistemas produtivos.

Dias (2008) considera ainda que a solução dos problemas ambientais da região depende de uma maior cooperação internacional, de uma atuação maior das organizações não-governamentais e, acima de tudo, de uma mudança de atitude e política que priorize o uso sustentado dos recursos naturais num trabalho cooperativo entre proprietário particular e governo. O que facilitaria essa ação seria o reconhecimento do Cerrado como patrimônio nacional, como já aconteceu com a Amazônia, Mata Atlântica e ao Pantanal (DIAS, 2008).

Segundo Aguiar et al. (2004), ainda existem muitas lacunas no conhecimento científico sobre a fauna e a flora existente no Cerrado sendo, portanto, imprescindível um aumento e uma intensificação nos estudos para a caracterização, conservação e manejo sustentável desse bioma, além de uma maior capacitação técnica e destinação adequada de recursos financeiros.

Segundo Pereira et al. (2001), citados por Parron et al. (2008), embora o Brasil detenha a maior diversidade de espécies de plantas, a grande maioria das espécies cultivadas no país é exótica. Esses autores pressupõem que essa condição decorre de nossa recente descoberta e do pouco conhecimento das espécies, aliados ao domínio cultural imposto pelas civilizações mais antigas que introduziram as espécies vegetais e os animais que mais lhe interessavam. Parron et al. (2008) ressaltam ainda que a domesticação de espécies nativas permite a preservação dessas espécies seja pelo incentivo ao cultivo e conseqüente perpetuação, seja pelo fato de que as demandas da sociedade têm caráter de apoio e estímulo para as pesquisas científicas que visam a obtenção de conhecimento e produtos de melhor qualidade e mais adequados às exigências do mercado.

Importância alimentar e econômica de espécies nativas do Cerrado

O Cerrado possui grande diversidade de plantas, entre as quais muitas apresentam grandes possibilidades de exploração, cujo maior potencial é sua utilidade na alimentação. Os frutos das espécies nativas do cerrado oferecem um elevado valor nutricional, além de atrativos sensoriais como, cor, sabor e aroma peculiares e intensos, ainda pouco explorados comercialmente.

A valorização e a descoberta de meios de uso sustentável da biodiversidade do Cerrado são alternativas interessantes para a sua conservação. A utilização sustentável dos recursos naturais é um desses meios, através da apresentação do potencial de uso e da importância socioeconômica. Os frutos nativos do Cerrado, que são a base de sustentação da vida silvestre e fonte de alimento para as populações locais podem ser inseridos nesse contexto (SILVA et al., 2001). Diversos estudos sobre a caracterização físico-química de frutas nativas do Cerrado têm encontrado várias fontes de proteínas, lipídeos, carboidratos, minerais, fibras, vitaminas e substâncias bioativas, tais como, carotenóides e compostos fenólicos (ALMEIDA et al., 2008; WONDRACEK et al., 2008), aumentando o interesse nas pesquisas tanto de caracterização físico-química quanto na agrônômica.

Algumas frutas nativas do cerrado, como o araticum, o buriti, a cagaita e o pequi, apresentam teores de vitaminas do complexo B, tais como as vitaminas B1, B2 e PP, equivalentes ou superiores aos encontrados em frutas como o abacate, a banana e a goiaba, tradicionalmente consideradas como boas fontes destas vitaminas. Grande parte das frutas nativas em regiões típicas de clima tropical é, especialmente, rica em carotenóides. Os frutos de palmeiras, como o buriti, o tucumã, o dendê, a macaúba e a pupunha são fontes potenciais de carotenóides pró-vitamina A.

Frutas nativas do cerrado brasileiro, de consumo regional bastante difundido, como o araticum e o pequi, são importantes fontes de carotenóides. Frutos de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) procedentes de populações nativas do sul de Minas Gerais apresentaram teores de pró-vitamina A que variaram entre 70 e 105 retinol equivalente por 100g de polpa. A geléia caseira de araticum, processada termicamente, conservou melhor os teores de carotenóides, de vitamina C e o potencial pró-vitamina A do que o licor caseiro que foi obtido por infusão alcoólica a frio. Vitaminas e antioxidantes são altamente instáveis e susceptíveis a degradações durante o processamento pós-colheita. A natureza do produto e as condições de processamento e estocagem podem afetá-los,

comprometendo a aparência, o aroma e o valor nutritivo do alimento (Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br>> Acessado em janeiro/2011).

Publicações como *Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá* (ALMEIDA, et al., 1987) e *Cerrado: aproveitamento alimentar* (ALMEIDA, 1988) destacam a importância das espécies nativas e descrevem receitas sobre o aproveitamento de frutas nativas da região Centro-Oeste, com grande ênfase para o pequi, o buriti, o baru e o araticum, reforçando a sua possível inserção no sistema de produção agrícola da região (AGOSTINI-COSTA et al., 2010)

Fruteiras nativas do Cerrado

O aumento do fluxo de informação disponível nos meios de comunicação aliado ao crescimento das influências multiculturais, à busca por uma dieta mais saudável e às grandes variedades de sabores e cores que as frutas tropicais conferem às refeições está provocando uma mudança nos hábitos alimentares da população (AGOSTINI-COSTA, 2010)

O crescente aumento no consumo de frutas constitui uma importante tendência da década. Fibras, vitaminas, minerais e antioxidantes caracterizam a função diferenciada que as frutas exercem sobre o adequado desenvolvimento e funcionamento do organismo. Fitoquímicos especiais desempenham um importante potencial protetor e preventivo de doenças causadas pelo estresse oxidativo, que incluem distúrbios cardiovasculares, cânceres, catarata, reumatismo e muitas outras doenças auto-imunes (SLOAN, 1999; KAUR & KAPOOR, 2001).

De acordo com Ávila et. al. (2009), para que ocorra a disseminação do conhecimento sobre os benefícios provindos dos frutos do cerrado e conseqüentemente sua ampla utilização por todo o Brasil, e por que não o mundo, deverá aumentar a divulgação, sendo um dos meios interessantes a pesquisa.

O conhecimento sobre técnicas de cultivo e de produção de mudas de frutíferas do Cerrado é, como um todo, insuficiente, pois estas plantas encontram-se, ainda, em estado selvagem, apresentando grande variabilidade genética. Pequenos plantios podem e devem ser feitos para garantir a sobrevivência e a perpetuação dessas espécies ameaçadas de extinção, de forma que, ao mesmo tempo em que se faça a preservação, se possa trabalhar a questão da exploração comercial sustentável (LEITÃO FILHO, 1981).

Atualmente, já existe um número de estudos consideráveis sobre o assunto, no entanto necessitam ser ampliados, já que além de propagarem informações podem

descobrir novas aplicações e tecnologias. Ávila et al. (2009), colocam que outro fator que poderia proporcionar o contato destes frutos com regiões não nativas seria o plantio comercial, o que, ainda, possibilitaria uma maior quantidade de frutos, contribuindo para utilização dos mesmos em escala industrial e a diminuição do risco da extinção.

Baru

O barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) é uma leguminosa arbórea (*Papilionoideae*), possui árvore hermafrodita de até 15 m de altura, podendo alcançar mais de 25 m em solos mais férteis, com tronco podendo atingir 0,7 m de diâmetro e copa podendo ser alongada ou larga, medindo de seis a onze metros de diâmetro, densa e arredondada. Folhagem bonita, com folhas compostas por seis a doze folíolos, alternos ou sobpostos, de coloração verde intensa. Com ramos lisos e que oferecem resistência ao vento. Flores pequenas, de coloração alva e esverdeada. Fruto tipo legume drupóide, monospérmico, indeiscente, geralmente ovóide, com alguns frutos de forma não bem definida, fibroso, cor variando de bege-escuro a marrom-avermelhado, opaco, superfície irregular apresentando algumas depressões, textura lisa, com ápice arredondado, base estreita e bordo inteiro, com um dos lados apresentando-se levemente achatado, assemelhando-se a uma linha de sutura. Quando o fruto é aberto, o pericarpo é bem distinto, o epicarpo é fino de consistência macia e quebradiça, o mesocarpo é marrom, consistência macia, farináceo, espesso, constituindo a polpa; endocarpo lenhoso, amarelo-esverdeado ou marrom. Semente única, forma variando entre levemente ovalada e largo elíptica, sendo a última mais comum, apresenta dimensões e massa variadas, associadas com a massa do fruto. A cor brilhante do tegumento varia de marrom-amarelada ou avermelhada a quase preta (CORREA et al., 2008; NEPOMUCENO, 2006; SANO et al., 2004; SILVA et al., 2003; SANO et al., 1999; FERREIRA et al., 1998).

Em muitas propriedades tradicionais, voltadas para a pecuária, as árvores do baru são preservadas na abertura das pastagens, devido a sua integração e convivência pacífica com o modelo de exploração praticado pelas populações rurais, já que o fruto amadurece na época da seca e alimenta várias espécies da fauna, incluindo o gado, servindo de complemento alimentar e, ainda, a árvore serve de abrigo (SANO et al., 2004; CORREA et al., 2000; SANO et al., 1999).

O barueiro faz parte do grupo de espécies nativas usadas pela população regional como fonte complementar de renda familiar, pela exploração extrativista de seu fruto, o baru. É uma das espécies frutíferas nativas mais promissoras para cultivo, em razão do

seu uso múltiplo, alta taxa de germinação de sementes e de estabelecimento de mudas. Em longo prazo, o uso dessa planta nas áreas a serem recuperadas como reservas legais e de proteção ambiental, margens de rios e córregos favorecerá a sua conservação e a manutenção de outras espécies associadas (SANO et al., 2004). Como a exploração se dá por extrativismo, e são ainda insuficientes as informações sobre a biologia e manejo do barueiro, é indispensável a realização de estudos que contribuam para direcionar estratégias mais eficientes para sua domesticação, conservação e uso sustentável (SILVA et al., 1997).

Araticum

A árvore do araticum é hermafrodita com seis a oito metros de altura por dois a quatro metros de diâmetro de copa. É preferencialmente alógama, com flores; freqüentemente carnosas, de coloração esverdeada ou branco-amarelada; folhas; rígidas, dispostas caracteristicamente intercaladas na posição horizontal ao longo dos ramos; e ramos jovens, apresentando densa pilosidade marrom-avermelhada e apresenta caducifolia na época seca. Possui de trinta a oitenta frutos por plantas, tendo cada fruto formato oval a arredondado e dimensões de 0,09 a 0,15 m de comprimento por 0,10 a 0,15 m de diâmetro, peso de quinhentos a quatro mil e quinhentos gramas, densidade de 1,09 g/cm³ e de sessenta a cento e noventa sementes elípticas e marrom-escuras (BRAGA FILHO et al., 2005; SILVA et al., 2003; SILVA et al., 1994; ALMEIDA et al., 1987). A floração acontece, principalmente nos meses de setembro a novembro, a frutificação nos meses de novembro a março e a colheita dos frutos nos meses de fevereiro a março (SILVA et al.; 2003; SILVA et al.; 1994).

O fruto é muito apreciado pela fauna e pela população local, tornando-os valorizados para comercialização (MESQUITA et al., 2007). Na fauna, por exemplo, as antas (*Tapirus terrestris*) alimentam-se do fruto e, como consequência acaba contribuindo para a biodiversidade do cerrado, já que os consome e defeca a maioria das sementes intacta e as dispersa em locais de terreno seco, propício a germinação (GOLIN, 2008).

Quanto ao consumo humano, além do aproveitamento alimentar este fruto pode ser utilizado como fármaco e/ou cosmético (BLANCO et al., 2007).

O valor comercial dos frutos e dos produtos deles derivados confere a esta espécie elevado potencial de utilização econômica. Apesar disso, poucos estudos têm

sido feitos no sentido de subsidiar uma exploração racional e melhor aproveitamento desta frutífera nativa (NAVES et al., 1994).

Caracterização e uso de recursos genéticos do Cerrado

Segundo Goedert (2007), entende-se por recursos genéticos vegetais o material genético vegetal com valor atual ou potencial. Os recursos genéticos vegetais abrangem as seguintes categorias: espécies silvestres, parentes silvestres das plantas cultivadas, raças locais de planta, variedades de plantas, linhagens melhoradas e populações experimentais e linhagens com características genéticas e citogenéticas especiais, dentre outras (VALOIS, 1999).

Valls (2009) foi citado por Wondracek (2009) por colocar que a conservação, prospecção, coleta, caracterização, avaliação e documentação dos recursos genéticos vegetais, também chamados de recursos fitogenéticos, para alimentação e a agricultura são essenciais para o desenvolvimento agrícola sustentável para as gerações presente e futura. São a matéria-prima indispensável para o melhoramento genético das culturas pela incorporação de espécies ou genótipos novos à matriz agrícola ou, em programas mais específicos, à incorporação de caracteres úteis, não disponíveis nas cultivares em uso. Além disso, são essenciais para a adaptação às alterações ambientais e as necessidades humanas futuras.

Os mesmos fatores que levam ao isolamento por dissimilaridade, entre populações de plantas, são também responsáveis pela subdivisão genética dentro das populações. A subdivisão genética local, ou estruturação em parentesco, resulta de um agrupamento espacial de indivíduos, que estão mais intimamente relacionados do que seria esperado em genótipos que estão distribuídos aleatoriamente (HEYWOOD, 1991). Espécies de plantas com baixas densidades e bancos de semente discretos, desenvolvem estrutura genética espacial positiva em pequenas escalas, ou seja, as plantas mais próximas espacialmente são mais similares geneticamente do que o esperado pelo acaso. Em contraste, espécies com sobreposição de banco de sementes, alta taxa de fecundação cruzada, estabelecimento raro das plântulas e recrutamento distante da planta mãe, apresentam pouca estruturação genética intrapopulacional (CAVERS et al., 2005).

As técnicas moleculares tornaram possível distinguir a estrutura genética, dentro e entre populações, e têm auxiliado no esclarecimento dos padrões de fluxo gênico, dispersão e seleção (CAVERS et al., 2005). Aliadas às técnicas de auto-correlação espacial, elas possibilitaram o aprimoramento dos métodos de análise e permitiram a

estimativa do fluxo gênico aparente dentro de populações, com base na estrutura genética espacial entre plantas (EPPERSON, 2003; FENSTER et al., 2003; VEKEMANS & HARDY, 2004; DINIZ-FILHO et al., 2008). Por meio desses métodos, a estrutura genética que tradicionalmente era avaliada apenas em grandes escalas espaciais, entre populações, passou também a ser feita em escala local (DEGEN, 2001; HARDY, 2003).

A falta de informações sobre os aspectos genéticos das espécies é um dos principais problemas na avaliação de recursos genéticos e decorre, principalmente, da carência de estudos sobre diversidade genética. Esse problema dificulta o estabelecimento de estratégias que assegurem não só a conservação de populações naturais de plantas ecologicamente importantes, mas também a de outros recursos genéticos potencialmente úteis às populações humanas (BLANCO, 2007).

Uso de marcadores moleculares no estudo de espécies nativas do Cerrado

A biotecnologia representa um importante papel na agricultura, sendo aplicada em áreas como o estudo de células, em cultura de tecidos, para promover a rápida propagação de uma espécie, em diagnóstico de pragas e doenças, na engenharia genética, bem como em programas de melhoramento genético. Em várias metodologias, o monitoramento com marcadores moleculares, ao lado dos conhecidos marcadores morfológicos, trouxe progressos significativos (KUMAR, 1999).

Nos últimos anos, com o desenvolvimento da biotecnologia, diversas técnicas de marcadores moleculares têm permitido indicar, com precisão, as variações genéticas presentes no DNA de um determinado organismo.

A utilização de marcadores moleculares é uma ferramenta chave que possibilita aos programas de melhoramento determinar mapeamento e diagnósticos genéticos, taxonomia molecular, análises de integridade genética e estudos evolutivos de macro e microrganismos. Alternativamente, o uso de marcadores genéticos baseados na identificação de polimorfismo de DNA, é utilizado pelo melhorista para criar um padrão genético próprio de cada cultivar (WÜNSCH & HORMAZA, 2007).

Os parâmetros genéticos populacionais estimados com base em marcadores podem ser utilizados para diversos fins. Quando o objetivo é a conservação de espécies importantes, ou de espécies que estão inseridas em biomas que devem ser preservados, estes parâmetros podem ser úteis na detecção de populações que apresentem diferentes magnitudes de variabilidade genética e que, portanto, requerem diferentes estratégias

para sua conservação *in situ* ou *ex situ* (AVISE & HAMRICK 1996, NEWTON et al. 1999). Quando, por outro lado, o interesse for a domesticação da espécie e sua utilização econômica, estes parâmetros podem auxiliar na definição de programas de coleta visando a seleção de apenas parte da variabilidade que seja de interesse para o melhorista (BORÉM 1998).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização e revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*; WILLIAMS et al., 1990), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), Microsatélite e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (MILLACH, 1999).

O primeiro, RAPD, por ser uma metodologia mais simples e relativamente mais barata, tem sido intensamente utilizado por diversos laboratórios, para diferentes culturas e as mais variadas finalidades. O segundo tipo, Microsatélite, apresenta vantagens de fornecer maior conteúdo de informação de polimorfismo por loco, devido à expressão co-dominante e ao multialelismo, em relação ao RAPD, que tem comportamento dominante, detectando apenas um alelo por loco. Entretanto, sua utilização é limitada pela necessidade prévia do desenvolvimento de *primers* específicos para a obtenção dos marcadores (SAWAZAKI et al., 2002).

A detecção de polimorfismo de marcadores microsatélites, também chamados de seqüências curtas repetidas em tandem (STR – Short Tandem Repeats) ou seqüências simples repetidas (SSR – Simple Sequence Repeats), é hoje a tecnologia mais utilizada para a identificação individual, a investigação de vínculo familiar e o mapeamento genético em seres humanos, animais domésticos e plantas.

As espécies nativas dos cerrados merecem especial atenção, pois este bioma foi considerado recentemente como um dos “hotspots” mundiais de diversidade (Myers *et al.* 2000). Essa diversidade bioma pode ser observada nas suas fruteiras. Estas possuem grande variabilidade genética, como as pitayas (JUNQUEIRA et al., 2010), araticum (PIRES et al., 2010a), baru (PIRES et al., 2010b), pequi (MELO JUNIOR, 2003; LOPES et al., 2004; FALEIRO et al., 2008) dentre outras espécies e estudos importantes.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L. M. S.; MACHADO, R. B.; MARINHO-FILHO, J. A. A diversidade biológica do Cerrado. In: AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO, A. (Eds.). **Ecologia e caracterização do Cerrado**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. p. 19-42.

AGOSTINI-COSTA, S. T.; SILVA, D. B. da; VIEIRA, R. F.; SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. Espécies de maior relevância para a região Centro-Oeste. In: VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, D. B. SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Embrapa Informação Tecnológica – Brasília, DF, 2010, cap. 1, p. 12-24.

ALMEIDA, S. P. de. **Cerrado: aproveitamento alimentar**. 2. Ed. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1988. 188p.

ALMEIDA, S. P. de; SILVA, J. A. da; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1987. 83p. (Embrapa-CPAC. Documentos, 26)

ALMEIDA, S. P.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, J. A. Frutas Nativas do Cerrado Caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S.M; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Eds). **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, v. 1. P. 353-381.

ÁVILA, R. de, OLIVEIRA, L. F., ASCHERI, D. P. R. Caracterização dos frutos nativos dos cerrados: araticum, baru e jatobá. **Agrotécnica**. Goiânia: UEG, 2009. Cap. 4, p. 53-69.

AVISE, J.C. & HAMRICK, J.L. Conservation genetics, case histories from nature. **Chapman & Hall**, New York: Kluwer Academic Publishers, 1996. 512p.

BLANCO, A. J. V.; PEREIRA, M. de F.; COELHO, A. S. G.; CHAVES, L. J. Diversidade genética em populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) por meio da análise de seqüências de CpDNA. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia: UFG, 2007. v. 37, n. 3, p. 169-175.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 2a ed.

BRAGA FILHO, J. R.; VELOSO, V. da. R. S.; NAVES, R. V.; NASCIMENTO, J. L. do. Danos de *Telemus chapadanus* (Casey 1922) sobre o florescimento do Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) no estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia: UFG, 2005. v. 35, n. 1, p. 25-29.

CAVERS, S.; DEGEN, B.; CARON, H.; LEMES, M.R.; MARGIS, R.; SALGUEIRO, F.; LOWE, A.J. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. **Heredity**, 2005. v.95, p.281-289.

CORREA, G. de. C.; NAVES, R.V.; ROCHA, M. R. da.; CHAVES, L. J.; BORGES, J. D. Determinações físicas em frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.), cajuzinho (*Anacardium othonianum* Rizz.) e pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), visando melhoramento genético. **Bioscience Journal**, Uberlândia: UFU, 2008. v. 24, n. 4, p. 42-47.

CORREA, G. de. C.; NAVES, R. V.; ROCHA, M. R. da.; ZICA, L. F. Caracterização física de frutos de baru (*Dipteryx alata* Vog.) em três populações nos cerrados do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia: UFG, 2000. v. 30, n. 2, p. 05-11.

COUTINHO, L. M. O conceito de Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**. São Paulo, 1978. p. 17-23. V. 1, p. 17-23.

COUTINHO, L. M.; MIRANDA, H. S.; MORAIS, H. C. **O bioma do Cerrado e o fogo I** – Caracterização . 2002. Séries Ciências Ambientais 20:1-48.

DEGEN, B.; PETIT, R.; KREMER, A. SGS: spatial geneticsoftware: a computer program for analysis of spatial genetic andphenotypic structures of individuals and populations. **Journal of Heredity**, Oxford: Oxford University, 2001. v.92, p.447-448.

DIAS, B. F. S. Cerrados: uma caracterização. In: DIAS, B. F. S.(coord). Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: Manejo e conservação dos recursos natrais renováveis. Brasília: Fundação Pró-Natureza, IBAMA, 1992. p. 11-25.

DIAS, B. F. S. Conservação da Biodiversidade no Bioma Cerrado: histórico dos impactos antrópicos no Bioma Cerrado. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. de (Ed.). **Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. Cap 10, p. 303-333.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; TELLES, M. P. de C. Spatial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations. **Conservation Biology**, 2002. v.16, p.924-935.

EITEN, G. Vegetação do Cerrado. In: PINTO, M. N. (Org.). Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas. **Rev. Ampl.** Brasília: Universidade de Brasília, 1994. cap. 1, p. 17-73. 2. ed.

EPPELSON, B.K. **Geographical genetics**. New Jersey: Princeton University Press, 2003. 356p. (Monographs in Population Biology, 38).

FENSTER, C.B.; VEKEMANS, X.; HARDY, O.J. Quantifying gene flow from spatial genetic structure data in a metapopulation of *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). **Evolution**, The Society for the Study of Evolution. 2003. v. 57, p.995-1007.

FERREIRA, R. A.; BOTELHO, S.A.; DAVIDE, A.C.; MALAVASI, M. de M. Caracterização morfológica de frutos, sementes, plântula e muda de *Dipteryx alata* VOGEL – BARU (Leguminosae Papilionoideae). **Cerne**. Lavras: Universidade Federal de Lavras - UFLA, 1998. v. 4, n. 1, p. 073-087.

GOEDERT, W. J.; WAGNER, E.; BARCELLOS, A. O. Savanas Tropicais: dimensão, histórico e perspectivas. In: FALEIRO, F. G.; NETO, A. L. F. (Eds.). **Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 49-80.

GOLIN, V. **Frugivoria e dispersão de sementes de araticum *Annona crassiflora* Mart. por animais em área de cerrado matogrossense**. Cáceres: Universidade do Estado de Mato Grosso, 2008. 62p. (Mestrado em Ciências Ambientais).

GOODLAND, R. & FERRI, M. G. **Ecologia do cerrado**. São Paulo: EDUSP, 1979.

HARDY, O. J. Estimation of pair wise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. **Molecular Ecology**, 2003. v.12. Issue 6, p. 1577-1588.

HEYWOOD, J.S. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**. Annual Reviews, 1991. v.22, p.335-355.

JUNQUEIRA, K. P. **Características físico-químicas de frutos e variabilidade genética de *Passiflora nítida* Kunth. por meio de RAPD** Lavras: Universidade Federal de Lavras - UFLA, 2006. 114 p. Dissertação (Mestrado).

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Review – antioxidants in fruits and vegetables: the millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**. Oxford: GB, 2001. v. 36, p. 703-725.

KUMAR, L.S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology Advances**. Amsterdam, 1999. v.17, p.143-182.

LANGHAMMER, P. F.; BAKARR, M. I.; BENNUN, L. A.; BROOKS, T. M.; CLAY, R. P.; DARWALL, W.; SILVA, N. de; EDGAR, G. J.; EKEN, G.; FISHPOOL, L. D. C.; FONSECA, G. A. B. da; FOSTER, M. N.; KNOX, D. H.; MATIKU, P.; RADFORD, E. A.; RODRIGUES, A. S. L.; SALAMAN, P.; SECHREST, W.; TORDOFF, A. W. **Identification and Gap Analysis Key Biodiversity Areas: Targets for Comprehensive Protected Area Systems**. Gland: IUCN, 2007. 116p.

LEITÃO FILHO, H. F.; MARTINS, F. R. Espécies de Cerrado com potencial em fruticultura. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Floricultura e Plantas Ornamentais, 2., 1981, Campinas. **Anais...** Campinas: Unicamp, 1981. p. 1-15.

LOPES, A. S.; COX, F. R. Cerrado vegetation in Brazil: edaphic gradient. **Agronomy Journal**. Madison, 1977. v.69, p. 828-831.

LOPES, P. S. N., MARTINS, E. R.; OLIVEIRA, M. N. S. de; ALVES, J. da S.; FERNANDES, R. C.; GONÇALVES, W. S. Seleção de acessos de pequi (*Caryocar brasiliense*) para constituição de banco de germoplasma. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18, 2004, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2004.

MACHADO, R. B.; AGUIAR, L. M. S.; CASTRO, A. A. J. F.; NOGUEIRA, C. C.; RAMOS NETO, M. B. Caracterização da fauna e Flora do Cerrado. In: FALEIRO, F. G.; NETO, A. L. F. (Eds.). **Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. Cap. 9, p. 285-300.

MELO JUNIOR, A. F. **Variabilidade genética em populações naturais de pequi** (*Caryocar brasiliense* Camb.) **caracterizado por meio de isoenzimas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2003. 82 p. Dissertação (Mestrado)

MESQUITA, M. A. M; NAVES, R.V; SOUZA, E. R. B. de; BERNARDES, T. G.; SILVA, L. B. e. Caracterização de ambientes com alta ocorrência natural de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, 2007. v. 29, n. 1, p. 15-19.

MILLACH, S. C. K. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R., (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em <<http://www.cpatsa.embrapa.br>> Acesso em 09 de fevereiro de 2011.

NAVES, R. V., M. R. ROCHA, J. D. BORGES & D. T. FILHO. Armazenamento e estratificação de sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). In: **Reunião Especial da SBPC**. Uberlândia, MG: UFU/SBPC, 1994. 1. 85 p. p.11.

NEPOMUCENO, D. L. M. G. **O extrativismo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) em Pirenópolis (GO) e sua sustentabilidade**. Goiânia: Universidade Católica de Goiânia, 2006. 117p. (Mestrado em Ecologia e produção sustentável)

NEWTON, A.C., ALLNUTT, T.R., GILLIES, A.C.M., LOWE, A.J. & ENNOS, R.A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**. 1999. n. 14., p. 140-145.

PARRON, L. M.; AGUIAR, L. M. S.; DUBOC, E.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.; CAMARGO, A. J. A.; AQUINO, F. G. **Cerrado: desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008, cap. 5, 125-156.

PIRES, M. V. V.; FALEIRO, F. G.; ALMEIDA, B. C.; VILLELA, J. G. A.; SILVA, J. C. S.; SANO, S. M.; BELLON, G.; GUIMARÃES, T. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. Variabilidade genética de acessos de araticum da coleção de trabalho da Embrapa Cerrados com base em marcadores RAPD. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 21. **Anais...** Natal, RN. 2010a. Natal, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2010a.

PIRES, M. V. V.;FALEIRO, F. G.;SANO, S. M.; ALMEIDA, B. C.; VILLELA, J. G. A.;RAMOS, F. T. de; DALLASTA, R. A.; MELO, J. T. de; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G. Variabilidade genética de acessos de baru com base em marcadores RAPD e características morfológicas de frutos, sementes e folhas. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 21. **Anais...** Natal, RN. 2010b. Natal, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2010b.

PEREIRA, A. V.; PEREIRA, E. B. C.; JUNQUEIRA, N. T. V. Propagação e domesticação de plantas nativas do cerrado com potencial econômico. **Horticultura Brasileira**, 2001. v. 19, n. 2.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, DF: Embrapa CPAC, 1998, cap. 3, p. 87-166.

SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. de. **Baru: biologia e uso**. Planaltina, DF: EMBRAPA, 2004. 52p. (Documento 116).

SANO, S. M.; VIVALDI, L. J.; SPEHAR, C. R. Diversidade morfológica de frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 1999. v. 34, n. 4, p. 513-518.

SAWAZAKI, H. E.; BARBOSA, W.; COLOMBO, C. A. Caracterização e identificação de cultivares e seleções de pereiras através de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, 2002. v. 24, n. 2, p. 447-452.

SILVA, A. P. P.; MELO, B.; FERNANDES, N. **Fruteiras do cerrado**. Uberlândia: UFU, 2003. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/fruteiras%20do%20cerrado.html>> Acesso em: fev. 2011.

SILVA, D. B. da; SILVA, D. B.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. de. **Frutas do Cerrado**. Brasília: EMBRAPA - Informação Tecnológica, 2001. 178p.

SILVA, J. A. da; SILVA, D. B. da; JUNQUEIRA, W. T. V; ANDRADE, L. R. M. de. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília: EMBRAPA – CPAC, 1994. 166p.

SILVA, J. A. da; SILVA, D. B. da; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. de. **Coleta de sementes, produção de mudas e plantio de espécies frutíferas nativas dos cerrados**: informações exploratórias. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997. 23p. (Embrapa-CPAC. Documentos, 44).

SLOAN, A. E. Top trends to watch and work on for the millennium. **Food Technology**, Chicago, 1999. v. 53, n. 8.

VALLS, J. F. M. Recursos Genéticos no Brasil: a visão de melhoristas e de especialistas em recursos genéticos. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/UniPesquisa/Fruta/RecursosGeneticos/RecursosGeneticosTEXTTO.asp>>

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant population. **Molecular Ecology**, v.13, p.921-935, 2004.

VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C.; GASPAROTTO, C. R.; TOGAWA, R. C.; WERNECK, A. A. **Glossário de Recursos Genéticos Vegetais**. 1999. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/recgen/glossario>> Acessado em agosto 2010.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.** 1990. 18:6531-6535.

WONDRACEK, D.C.; FALEIRO, F. G.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Diversidade genética de acessos de maracujás-do-cerrado com base no perfil de carotenóides. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. (Org.) IX Simpósio Nacional sobre o Cerrado e II Simpósio Internacional sobre Savanas Tropicais, Brasília, Distrito Federal, 2008. **Anais...** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. Unidade CD. 2008. 6p.

WUNSCH A., HORMAZA J. I. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. **Sci. Hortic.** 2007. 173: 37-43.

CAPITULO I

ESTUDO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E VARIABILIDADE GENÉTICA DE COLEÇÃO DE BARU UTILIZANDO MARCADORES RAPD E MICROSSATÉLITES

ESTUDO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E VARIABILIDADE GENÉTICA DE COLEÇÃO DE BARU UTILIZANDO MARCADORES RAPD E MICROSSATÉLITES

RESUMO

O baru (*Dipteryx alata* Vog.) é uma fruteira amplamente disseminada no Cerrado. O fruto possui alto valor calórico e nutricional, sendo a polpa e a semente usadas principalmente como fonte de carboidrato, proteína e óleo. Objetivou-se, nesse trabalho, estudar a variabilidade genética de acessos de baru com base em características morfológicas e em análises de DNA por marcadores moleculares RAPD e Microssatélites. Folhas de 10 acessos da coleção de trabalho da Embrapa Cerrados foram coletadas e o DNA genômico extraído utilizando o método do CTAB, com modificações. Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas via PCR para obtenção de marcadores RAPD e Microssatélites. Foram avaliadas 15 características morfológicas quantitativas e 23 características morfológicas categóricas das matrizes de baru. As análises de DNA demonstraram grande diversidade genética entre os acessos. Tanto as características morfológicas quanto as moleculares permitiram uma diferenciação dos acessos. Os trabalhos de caracterização morfológica e molecular mostraram a importância dos diferentes grupos de características para avaliar a variabilidade genética dos acessos.

Palavras chaves: baru, marcadores moleculares, características morfológicas, correlação.

**STUDY OF MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND GENETIC
VARIABILITY OF BARU COLLECTION USING RAPD AND
MICROSATELLITES MOLECULAR MARKERS**

ABSTRACT

The baru (*Dipteryx alata* Vog.) is a native fruit widely disseminated in the Brazilian Savanna. The fruit has a high caloric and nutritional value with fruit pulp and seeds used as a carbohydrate, protein and oil sources. The objective of this work was to study the genetic variability of baru accessions based on morphological characteristics and DNA analysis using RAPD and microsatellites molecular markers. Young leaves of 10 baru accessions of the Embrapa Cerrados collection were collected and used for genomic DNA extraction using the CTAB method, with modifications. DNA samples from each genetic material were amplified by PCR for obtaining RAPD and microsatellites markers. Fifteen quantitative and 23 categorical morphological characteristics were used to analyze baru genetic variability. DNA analysis showed high genetic diversity among accessions. Both molecular and morphological characteristics allowed the accessions differentiation. The characterization using morphological and molecular markers showed the importance of different types of characteristics to evaluate the genetic variability of accessions.

Keywords: baru, molecular markers, morphological characteristics.

1. INTRODUÇÃO

O baru (*Dipteryx alata* Vog.), árvore leguminosa arbórea (Papilionoideae), é uma fruteira com ampla distribuição no Cerrado, geralmente ocorre em áreas férteis. Apresenta várias utilizações na alimentação humana e animal, na medicina, indústrias de cosméticos, bioenergia, artesanato, fonte de madeira e usos no reflorestamento e recuperação de áreas degradadas. O baru apresenta também, grande importância ecológica, sendo classificado como espécie-chave do Cerrado, devido ao amadurecimento de seu fruto na época seca, é muito utilizado por várias espécies da fauna dessa região, incluindo gado bovino (ALMEIDA et al., 1990). Seu uso sustentável pode contribuir para a conservação da biodiversidade desse bioma, podendo ser valorizado como produto que contribui para a conservação da natureza (SANO, et al. 2004).

O fruto possui alto valor calórico e nutricional, sendo a polpa e a semente usadas como fonte de carboidrato, proteína e óleo (VALLILO, et al. 1990). Possui alto teor de fibra (TOGASHI, 1993), é rica em açúcar, potássio, cobre e ferro (VALLILO et al., 1990). Além disso, sua madeira apresenta alta durabilidade e é utilizada para confecção de mourões, podendo ser usada também na construção naval, civil (LORENZI, 1992) e para a confecção de papéis para rápida impressão, papéis de embrulho e de embalagens (ANDRADE & CARVALHO, 1996). A polpa dos frutos é empregada para se fazer doces e geléias e a semente, crua ou torrada, para doces e paçoca (SILVA et al., 1994). Segundo Vera & Souza (2009), as amêndoas do baru possuem alto teor de proteína bruta (26,3%) e lipídios (33,3%), o óleo extraído é composto, em sua maioria (75,6%), por ácidos graxos insaturados. As sementes são utilizadas, ainda, como anti-reumáticas (BRANDÃO, 1993).

Estudos mais recentes ainda concluem que as sementes de *Dipteryx alata* Vog. constituem uma fonte significativa de fibras alimentares e minerais, sugerindo sua utilização na alimentação humana e animal, desde que comprovada a inexistência de compostos tóxicos ou alergênicos nas mesmas. As sementes estudadas são também boas fontes de macro e micronutrientes essenciais, como potássio, fósforo e manganês. O óleo da semente de baru apresenta teor de α -tocoferol e composição em ácidos graxos semelhantes aos do óleo de amendoim, destacando-se os ácidos oléico e linoléico, este considerado essencial (TAKEMOTO, et al. 2001).

Corrêa et al. (2000) realizaram um estudo em três regiões do estado de Goiás (intituladas por ele como: I – Mato Grosso Goiano; II – Norte/Nordeste, III – Estrada de

Ferro) e notou que o peso, o comprimento, a largura e a espessura do fruto se diferem. O peso médio, o comprimento médio, a largura e a espessura médias dos frutos coletados nas regiões I, II e III foram respectivamente 35,43 g, 0,056 m, 4,17 cm e 3,06 cm; 29,16 g, 0,051 m, 3,80 cm, 2,97 cm; e 35,13 g, 0,055 m, 4,22 cm, 3,99 cm. Estas diferenças estão associadas às condições de temperatura, índices de pluviosidade e outras variantes específicas de cada localidade o que acaba por ressaltar aspectos da composição genética do fruto, ou seja, o meio pode ser adequado para expressão de determinadas características que, em outro local, não se manifestam, o que indica um alto potencial de melhoramento genético das plantas (BOTEZELLI et al., 2000; CORREA et al., 2000).

Diante desse potencial, a caracterização genética de diferentes acessos de baru com base em diferentes características é de grande importância para programas de conservação e uso de recursos genéticos visando ao desenvolvimento, domesticação e melhoramento genético da cultura (FALEIRO, 2007).

Neste trabalho objetivou-se analisar a diversidade genética de coleção de trabalho de baru utilizando marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), bem como características morfológicas quantitativas e categóricas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Foram analisados dez acessos da coleção de trabalho de baru da Embrapa Cerrados com base em características morfológicas quantitativas e categóricas (Tabela 1.1). Os mesmos acessos, com exceção do CPAC BA-4 foram analisados com base em marcadores moleculares RAPD e microssatélites.

Tabela 1.1. Acessos de baru do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Cerrados analisados no presente trabalho.

Número	Código	Locais de coleta
1	CPAC BA-1	BAG CPAC
2	CPAC BA-2	BAG CPAC
3	CPAC BA-3	BAG CPAC
4	CPAC BA-4	BAG CPAC
5	CPAC BA-5	BAG CPAC
6	CPAC BA-6	BAG CPAC
7	CPAC BA-7	BAG CPAC
8	CPAC BA-8	BAG CPAC
9	CPAC BA-9	BAG CPAC
10	CPAC BA-10	BAG CPAC

Obtenção e análise de marcadores RAPD

Folhas de nove acessos da coleção de trabalho de baru da Embrapa Cerrados foram coletadas e o DNA genômico extraído utilizando o método do CTAB, com modificações (Faleiro et al., 2003). Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas via Reação em Cadeia da Polimerase para obtenção de marcadores moleculares RAPD. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 uL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 µM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de um “primer” decâmero (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Para obtenção dos marcadores RAPD, para análise do material genético foram utilizados 10 primers decâmeros: OPD-02, OPD-07, OPD-08, OPD-16, OPF-14, OPG-15, OPH-04, OPH-12, OPH-16 e OPH-19.

As ampliações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um 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 seis minutos a 72 °C, e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 ul de uma mistura de azul de

bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as dissimilaridades genéticas entre os diferentes acessos, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 2001).

Obtenção e análise de marcadores microssatélites

Na Tabela 1.2 são apresentados os primers utilizados para caracterização dos acessos de baru, com suas respectivas sequências e temperaturas de anelamento.

Tabela 1.2- Primers utilizados para obtenção de marcadores moleculares microssatélites de 9 acessos de baru.

Loci	Primers ¹		T _{anelamento}
	Sequência <i>Foward</i>	Sequência <i>Reverse</i>	
Do 05	AGGGAGGCCAAGAAGTAAGC	AAGGTTTGAAGTTGAAGCTTGG	56 °C
Do 06	AGCGGTGAAAAGACCATAGC	CCAACGATAAGATTCCTCCA	54 °C
Do 08	AGATCAGCGGACAAAGGTCT	GTAATGTTGTGCCACTCTTG	58°C
Do 17	GTTGCTGTTCGGTTCTCCATA	CCAAGGACGCTGTGCTCTAC	56°C
Do 20	GCCCATCTAAGCGCATTATT	AGTGGAAGGGTGGATTGATG	58°C
Do 24	AACGCAGGATCTAGCCAAA	CTTCTCGCTGTTGTGCACTC	58°C
Do 25	AAATGCAAAACGGAAGAGGA	CCCCTGAAGGAGACTTCGAT	55°C
Do 35	CAACCAAAGCAAACAAGCA	GCTGAGAAAGGGGAATGCAG	54°C

¹Primers desenvolvidos por Vinson CC, Dissertação de Mestrado, Univerdidade do Pará, Belém, 2004.

No caso dos microssatélites, as reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 µl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2,4 mM, 150 µM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 3 pM de cada um dos *primers*, uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador, de acordo com o seguinte programa: 4 minutos a 94 °C + 10 ciclos (30 segundos a 94 °C + 60 segundos a 60 °C –1 °C a cada ciclo + 90 segundos a 72 °C) + 30 ciclos (30 segundos a 94 °C + 60

segundos a 48 °C + 90 segundos a 72 °C) + 6 minutos a 72°C. Após amplificação a temperatura das amostras foi reduzida a 4°C.

Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 µl de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%), glicerol (60%) e água (39,75%). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio (0,2 µg/mL), para separação dos fragmentos microssatélites. O gel foi submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM) e a separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 100 volts. Ao término da corrida os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores gerados foram convertidos em matrizes numéricas codificadas, a partir das quais foram calculadas dissimilaridades genéticas entre os materiais genéticos e realizadas análises de agrupamento. A codificação foi realizada para cada loco, identificando os alelos presentes. Tal codificação é composta por dois números representando os alelos, sendo que dois números iguais significam que o loco está em homozigose (apresenta duas cópias do mesmo alelo) e dois números diferentes que o loco está em heterozigose (apresenta dois alelos diferentes).

As dissimilaridades genéticas obtidas a partir dos marcadores microssatélites foram calculadas com auxílio do Programa Genes (Cruz, 2001), baseando-se na seguinte fórmula:

$DG_{ij} = 1 - (NLC/NTL)$ sendo:

DG_{ij} = Dissimilaridade genética entre os acessos i e j ;

NLC_{ij} = Número de Locos Coincidentes entre os acessos i e j ;

NTL = Número Total de locos.

O NLC é o somatório das coincidências alélicas de cada loco analisado, sendo que cada coincidência pode assumir o valor 1 (dois alelos coincidentes); 0,5 (um alelo coincidente) e 0 (nenhum alelo coincidente).

Obtenção e análise de características morfológicas quantitativas

Foram avaliadas seis características morfológicas dos frutos (massa, largura, comprimento, espessura do fruto, espessura do endocarpo e espessura da polpa), quatro de sementes (massa, largura, comprimento e espessura) e cinco de folhas (número de folhas por ramo, comprimento, massa e largura da raque e massa dos folíolos) dos acessos analisados. As médias foram obtidas utilizando um total de 20 frutos, 20 sementes e no mínimo 15 folhas de cada acesso. Estatísticas descritivas foram

calculadas para cada característica e com base nas médias de cada característica avaliada em cada acesso foi calculada uma matriz de dissimilaridades genéticas, utilizando a Distância Euclidiana Média Padronizada (DEMP) com o auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2001).

Obtenção e análise de características morfológicas categóricas

Foram avaliadas 23 características dos acessos de baru, com relação ao fuste (crescimento, aspecto e cor), ritidoma (cor e tipo), copa (formato), folha (exsudação, disposição, filotaxia, forma, dimensão do pecíolo, raque), lâmina foliar (margem, ápice, base, pilosidade, relação comprimento/largura, estípula, coloração, nervação adaxial e abaxial e formato) e ramo (características). Os dados coletados de cada acesso foram categorizados em diferentes classes relacionadas na Tabela 1.3. Os valores de cada classe em cada característica de cada um dos 10 acessos de baru foram utilizados para o cálculo das distâncias ou dissimilaridades genéticas entre os acessos, com o auxílio do Programa Genes (Cruz, 2001), utilizando-se a seguinte expressão:

$DG_{ij} = 1 - [CV_{ij}/(CV_{ij} + DV_{ij})]$ onde:

DG_{ij} = Dissimilaridade genética entre os acessos i e j;

CV_{ij} = Número de coincidências de valores das classes das n características categóricas analisadas entre os acessos i e j;

DV_{ij} = Número de discordâncias de valores das classes das n características categóricas analisadas entre os acessos i e j;

Tabela 1.3 – Descritores morfológicos categóricos utilizados¹.

Fuste	Folha	
A. Crescimento 1. Monopodial 2. Simpodial	H. Composição 1. Pinada imparimpinada 2. Pinada parimpinada 3. Simples	R. Ápice 1. Mucronada 2. Acuminado 3. Retuso 4. Agudo 5. Obtuso 6. Arredondado 7. Truncado
B. Aspecto 1. Reto 2. Tortuoso 3. Aaulado 4. Protuberâncias 5. Base cilíndrica 6. Base achatada 7. Base acanalada	I. Exsudação 1. Ausente 2. Presente	S. Base 1. Arredondada 2. Cordada 3. Aguda 4. Lobada 5. Obtusa
C. Cor 1. Amarelo/cinza 2. Cinza/castanho 3. Amarelo/castanho/cinza	J. Relação c/l 1. 1,5 - 1,75 2. 1,76 - 2,00 3. 2 - 2,25 4. 2, 26 - 2,5	T. Estípula 1. Intrapeciolares 2. Interpeciolares
Ritidoma	L. Formato 1. Oblonga 2. Largo-oblonga 3. Largo-elíptica 4. Elíptica 5. Estreito-obovada 6. Ovada 7. Estreito-ovada	U. Coloração 1. Concolor 2. Discolor
D. Cor 1. Cinza claro/escuro 2. Castanho/cinza 3. Castanho	M. Filotaxia/disposição 1. Alternas dísticas 2. Alternas espiraladas 3. Opostas 4. Verticeladas	V. Nervura adaxial (1ª nerv./2ª nerv.) 1. Saliente/saliente 2. Saliente/impressa 3. Saliente imersa
E. Tipo 1. Com depressões 2. Liso 3. Áspero 4. Com placas lenhosas 5. Escamoso 6. Laminado 7. Reticulado 8. Estriado	N. Pilosidade 1. Glabras 2. Pulverulento 3. Pilosa	X. Nervura abaxial (1ª nerv./2ª nerv.) 1. Saliente/impressa 2. Saliente/saliente 3. Saliente/imersa
Copa	O. Pecíolo 1. 0,2 - 0,3 cm 2. 0,3 - 0,5 cm 3. 0,5 – 1 cm	Z. Formato (Campdodr.) 1. Bronquidódroma 2. Eucampdódroma 3. Reticulódroma 4. Cladódroma
F. Formato 1. Irregular 2. Umbelada 3. Leque 4. Cônica 5. Pendente	P.raque 1. Alada 2. Cilíndrica 3. Acanalada	
Ramos	Q. Margem 1. Inteira 2. Serreada 3. Ciliada 4. Dentada	
G. Característica 1. Lenticelados 2. Glabros 3. Rugosos 4. Pilosos		

¹Descritores selecionados com base no Guia do Observador de árvores do Cerrado, elaborado por Manoel Cláudio da Silva Júnior para curso de observadores de árvores do cerrado.

Análises de Correlação, Agrupamento e Dispersão com base nas matrizes de dissimilaridades genéticas

Para comparar as dissimilaridades genéticas entre os acessos de baru obtidas com base em marcadores moleculares RAPD, microssatélites, características morfológicas quantitativas e categóricas, foram calculados coeficientes de correlação de Pearson entre as dissimilaridades genéticas, com auxílio do Programa Genes.

As matrizes de dissimilaridades genéticas obtidas com base em cada tipo de marcadores moleculares e características morfológicas foram utilizadas para realizar a análise de agrupamento com o auxílio do Programa Statistica (STATSOFT INC., 1999), utilizando como critério de agrupamento o método do UPGMA. Ainda com base em cada uma das matrizes de dissimilaridades genéticas, foi realizada a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS e Statistica (STATSOFT INC., 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 96 marcadores RAPD com os 10 *primers* decâmeros, perfazendo uma média de 9,6 marcadores por *primer*. Os acessos CPAC BA-08 e CPAC BA-09 foram os mais divergentes dos demais (Figuras 1.1 e 1.2). Além da divergência desses dois acessos, as análises de agrupamento mostraram a formação de dois grupos de similaridade, um com os acessos CPAC BA-01, CPAC BA-02 e CPAC BA-03 e o outro com os acessos CPAC BA-05, CPAC BA-06, CPAC BA-07 e CPAC BA-10 (Figuras 1.1 e 1.2).

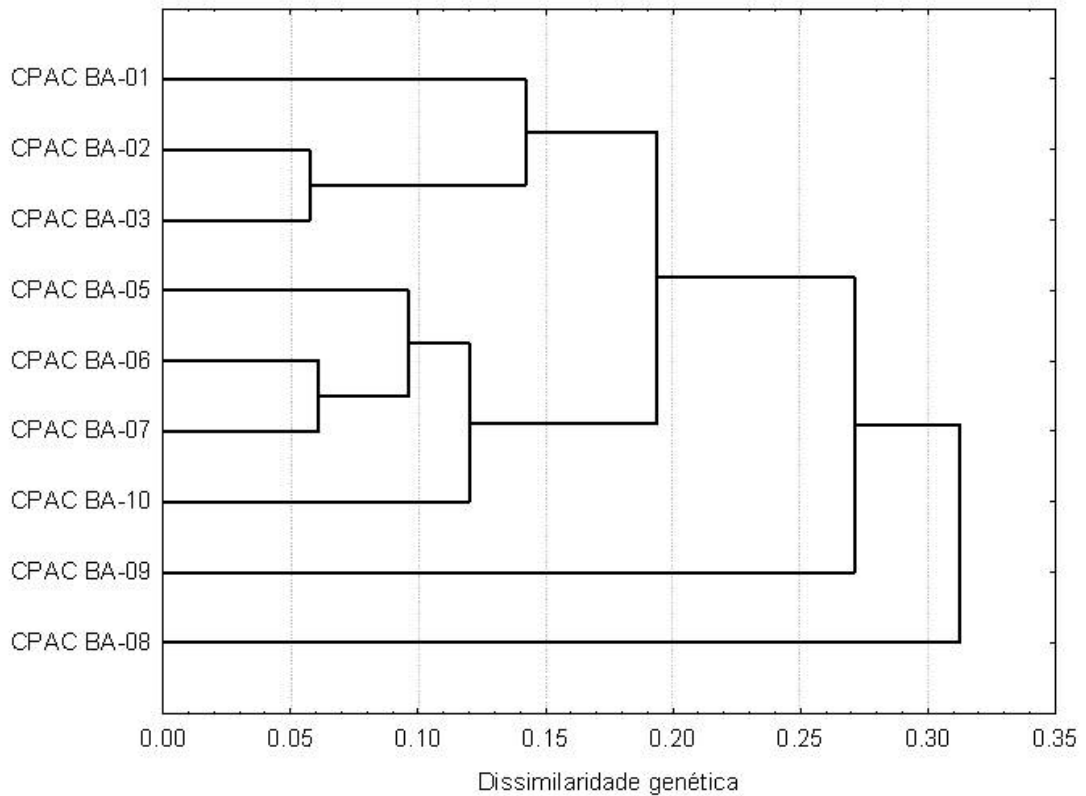


Figura 1.1 - Análises de agrupamento de nove acessos de baru, com base na matriz de dissimilaridades genéticas calculadas utilizando-se 96 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

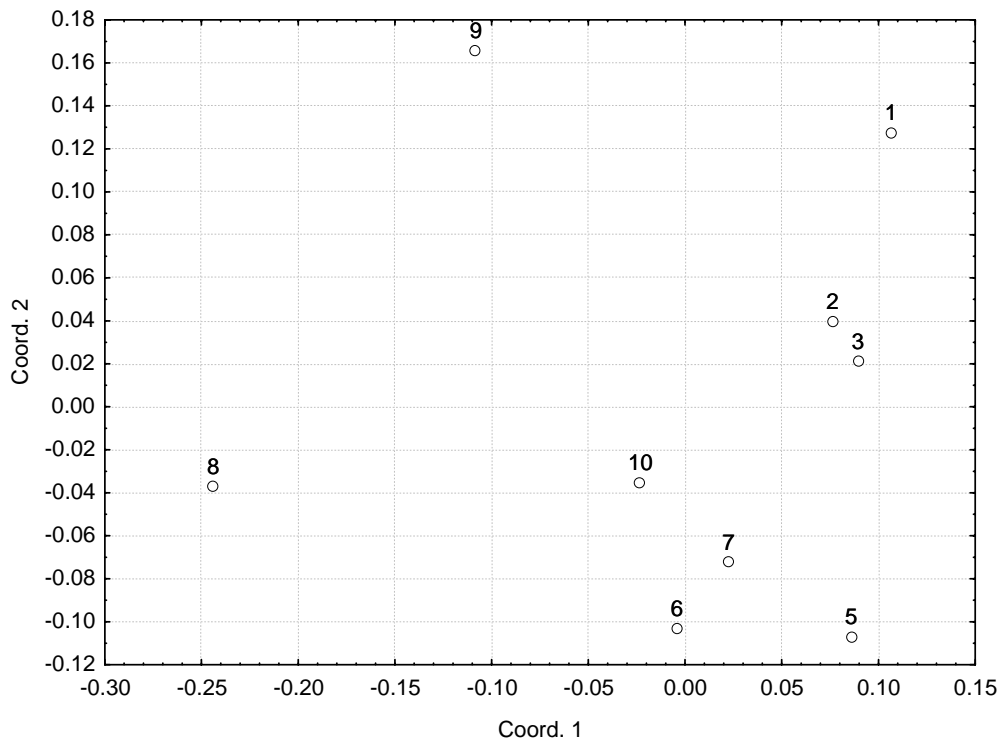


Figura 1.2 -Dispersão gráfica de nove acessos de baru com base na matriz de dissimilaridades genéticas calculadas utilizando-se 96 marcadores RAPD.

Com base nos marcadores microssatélites, a análise de oito locos gerou informações sobre 23 alelos. O número de alelos por loco variou de 1 a 4, com uma média de 2,875 alelos por loco. Análises de agrupamento com base na matriz de dissimilaridade genética entre os acessos, mostraram a formação de três grupos: um contendo apenas o acesso CPAC BA-01, outro contendo os acessos CPAC BA-02 e CPAC BA-3 e o último grupo contendo os demais acessos (Figuras 1.3 e 1.4)

Com relação aos dados morfológicos de frutos, sementes e folhas, observa-se diferenças fenotípicas entre os acessos (Tabela 1.4). As características que mais contribuíram para a diversidade genética foram o peso do fruto (41,3%), o seu comprimento (21,2%) e largura (11,1%). Com relação às características de sementes e folhas, as que mais contribuíram para a variabilidade genética foram o comprimento da semente (5,3%) e o comprimento da raque (8,4%). As análises de agrupamento evidenciam os acessos CPAC BA-01, CPAC BA-02, CPAC BA-08, CPAC BA-06, CPAC BA-05 como os mais divergentes. Dois grupos de similaridade podem ser observados, um formado pelos acessos CPAC BA-03, CPAC BA-04 e CPAC BA-09 e outro pelos acessos CPAC BA-07 e CPAC BA-10 (Figuras 1.5 e 1.6).

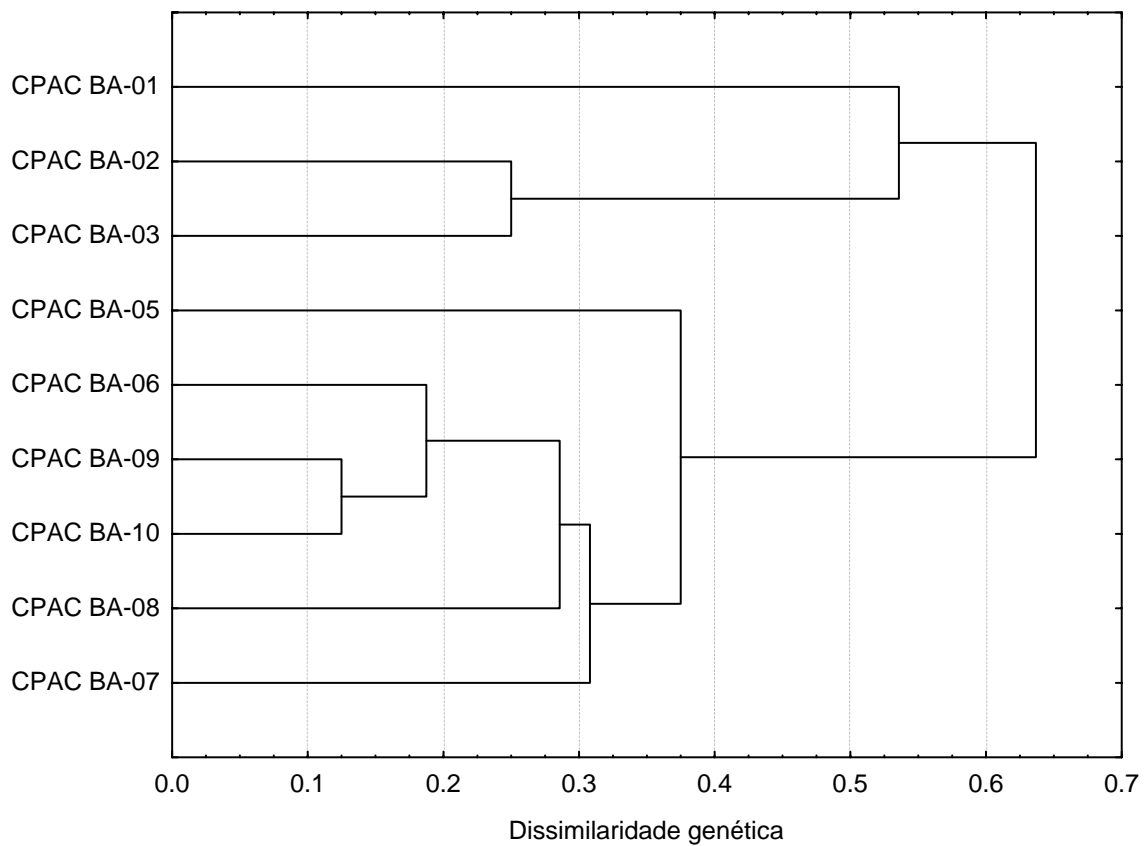


Figura 1.3 - Análises de agrupamento de nove acessos de baru, com base na matriz de dissimilaridades genéticas calculadas utilizando-se 8 locos de microssatélites. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

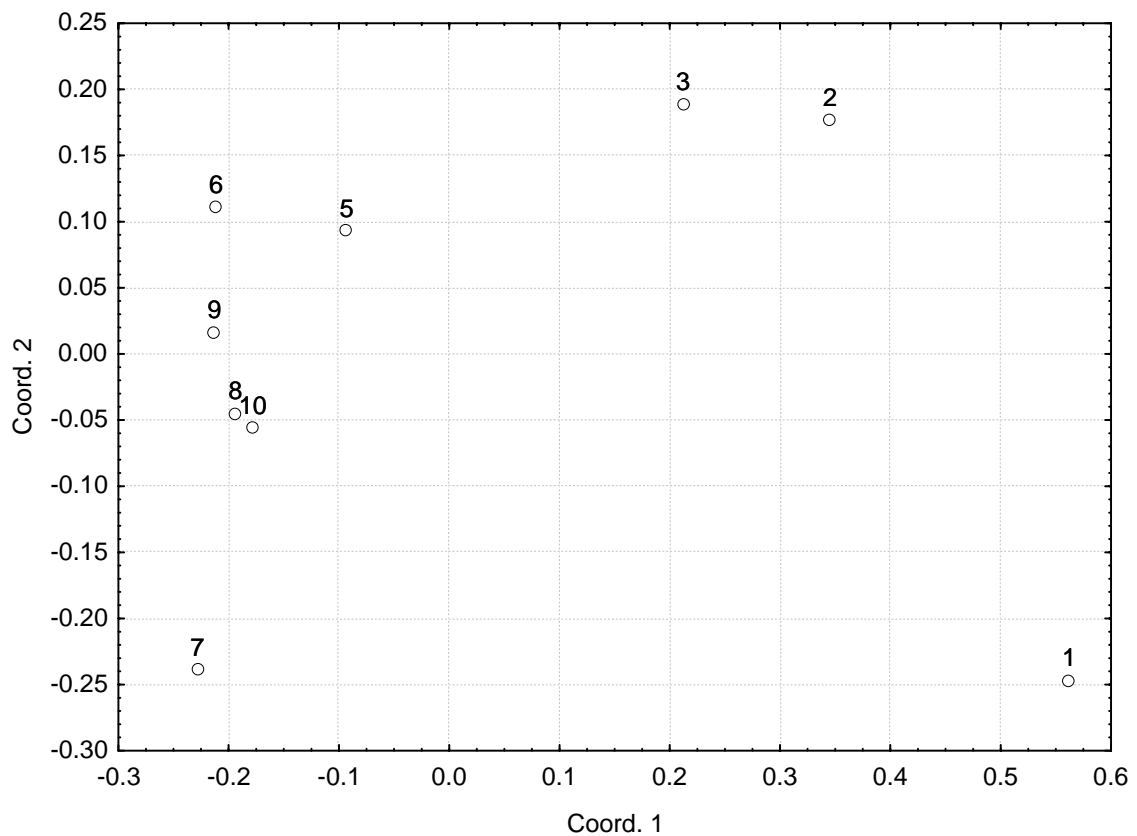


Figura 1.4 - Dispersão gráfica de nove acessos de baru com base na matriz de dissimilaridades genéticas calculadas utilizando-se 8 locos microssatélites.

Tabela 1.4 -Estatísticas descritivas de 15 características morfológicas de frutos, sementes e folhas de 10 acessos de baru e contribuição relativa de cada característica para a diversidade genética. Brasília, Embrapa Cerrados, 2010.

Orgão	Característica	Mínimo	Máximo	Média	DP	Variância	CR ¹ (%)
Fruto	Massa (g)	17,65	37,19	27,06	6,59	43,42	41,3
	Largura (mm)	30,56	40,27	36,17	3,41	11,65	11,1
	Comprimento (mm)	45,07	58,67	51,80	4,72	22,31	21,2
	Espessura (mm)	25,19	31,77	28,38	2,25	5,07	4,8
	Esp. endocarpo (mm)	3,71	8,85	5,86	2,05	4,20	4,0
	Esp. polpa (mm)	3,62	6,03	4,73	0,91	0,83	0,8
Semente	Massa (g)	0,79	1,57	1,17	0,25	0,06	0,06
	Largura (mm)	8,64	11,31	9,92	0,80	0,64	0,61
	Comprimento (mm)	20,16	26,19	23,59	2,37	5,62	5,3
	Espessura (mm)	7,45	10,09	8,55	0,84	0,71	0,7
Folha	Número por ramo	2,36	3,44	2,87	0,34	0,11	0,1
	Comp. raque (cm)	22,72	32,23	25,99	2,96	8,79	8,4
	Larg. raque (mm)	3,80	6,70	5,13	0,80	0,64	0,6
	Massa raque (g)	0,42	0,88	0,58	0,15	0,02	0,02
	Massa folíolo (g)	2,10	4,62	3,10	0,97	0,94	0,9

¹Contribuição Relativa para a Diversidade Genética, utilizando-se o método de Singh (1981).

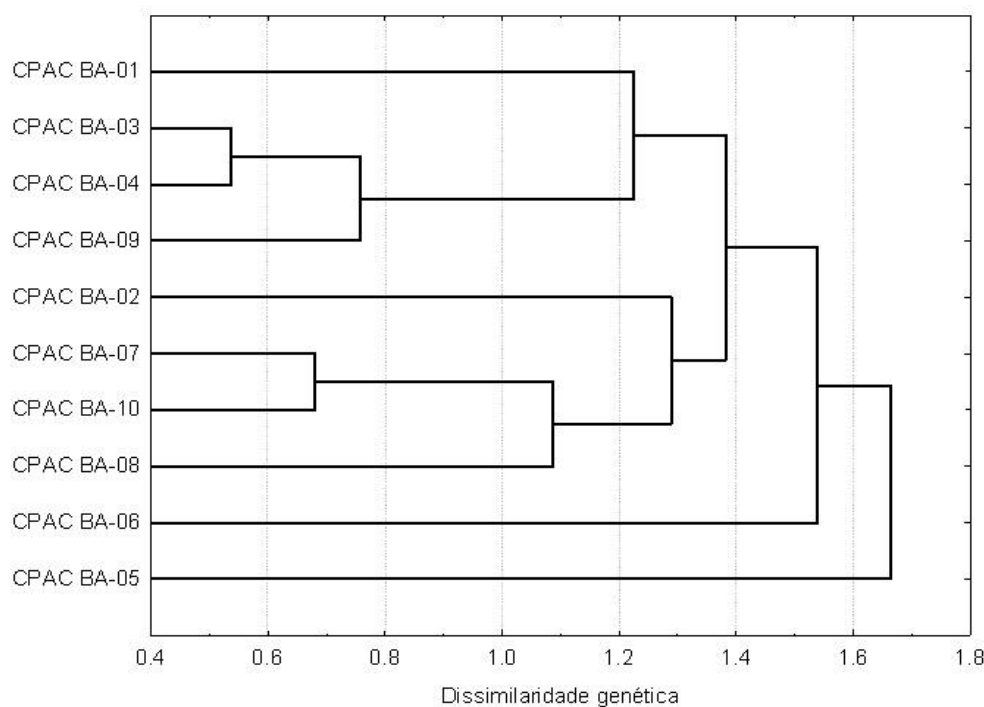


Figura 1.5- Análises de agrupamento de 10 acessos de baru com base na matriz de dissimilaridades genéticas calculadas utilizando-se 15 características morfológicas de frutos, sementes e folhas. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

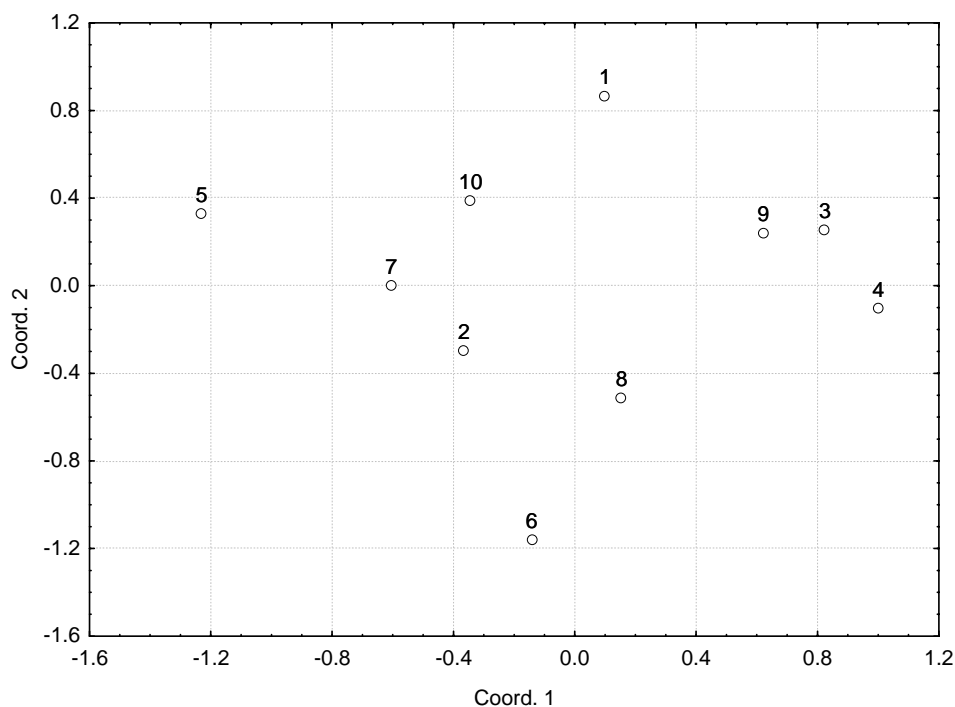


Figura 1.6 - Dispersão gráfica de 10 acessos de baru com base na matriz de dissimilaridade genética calculada utilizando-se 15 características morfológicas analisadas.

Com base nas características morfológicas categóricas, observou-se maior divergência entre os acessos quanto à cor do ritidoma, relação comprimento/largura e ápice da folha, com variação de três classes em cada característica. As demais características não apresentaram variações entre os acessos de baru, não contribuindo assim para a diferenciação entre os acessos analisados nesse trabalho (Tabela 1.5).

Análises de agrupamento com base na matriz de distâncias genéticas calculadas com base nas características categóricas dos acessos de baru apresentam notoriamente dois grupos divergentes, separando os acessos CPAC BA-01 e CPAC BA-05 do restante. Além disso, dentro do maior grupo, há três subgrupos, um formado pelos acessos CPAC BA-02 e CPAC BA-06, outro por CPAC BA-03, CPAC BA-09, CPAC BA-04, CPAC BA-07 e CPAC BA-08 e o terceiro apenas com o acesso CPAC BA-10 (Figuras 1.7 e 1.8).

É importante ressaltar que o terreno onde se encontram essas matrizes possui algumas áreas que foram aterradas há anos, na criação do centro de pesquisa onde se localiza a Embrapa Cerrados. Outras matrizes foram plantadas em latossolos. Isto pode ser considerado um fator relevante para este resultado. A formação do solo faz diferença

no desenvolvimento de características morfológicas, bem como a recepção de luz solar, podas, proximidade com vias pavimentadas etc.

Tabela 1.5. Caracterização de 10 acessos de baru com base em 23 características morfológicas categóricas.

CMC ¹	Acessos ²									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1
B	2	3	2	2	2	1	2	2	2	2
C	2	1	1	1	2	1	1	1	1	3
D	2	1	1	1	3	1	1	1	1	1
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F	2	3	1	2	3	1	1	1	1	1
G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
J	1	3	3	3	3	4	1	4	3	2
L	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
O	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Q	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R	1	2	2	2	2	3	1	1	3	2
S	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2
T	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
U	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V	1	1	2	2	1	1	2	1	2	2
X	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1
Z	2	1	1	1	2	1	1	2	1	1

¹Características Morfológicas Categóricas de acordo com descrição feita na Tabela 1.3

² Acessos [1- CPAC BA-01; 2- CPAC BA-02; 3- CPAC BA-03; 4- CPAC BA-04; 5- CPAC BA-05; 6- CPAC BA-06; 7- CPAC BA-07; 8- CPAC BA-08; 9- CPAC BA-09; 10- CPAC BA-10]

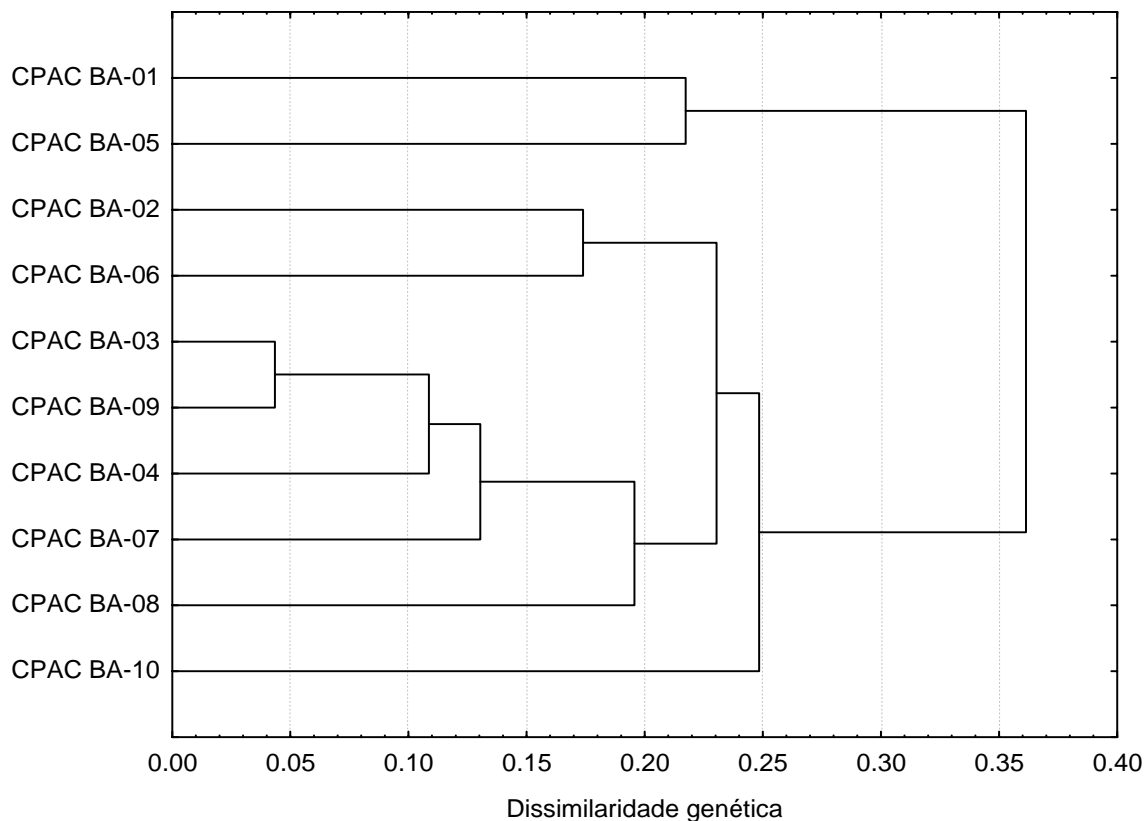


Figura 1.7 - Análise de agrupamento de 10 acessos de baru com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 23 características categóricas de fuste, ritidoma, folhas, lamina foliar, copa e ramo. O critério UPGMA foi utilizado para agrupamento.

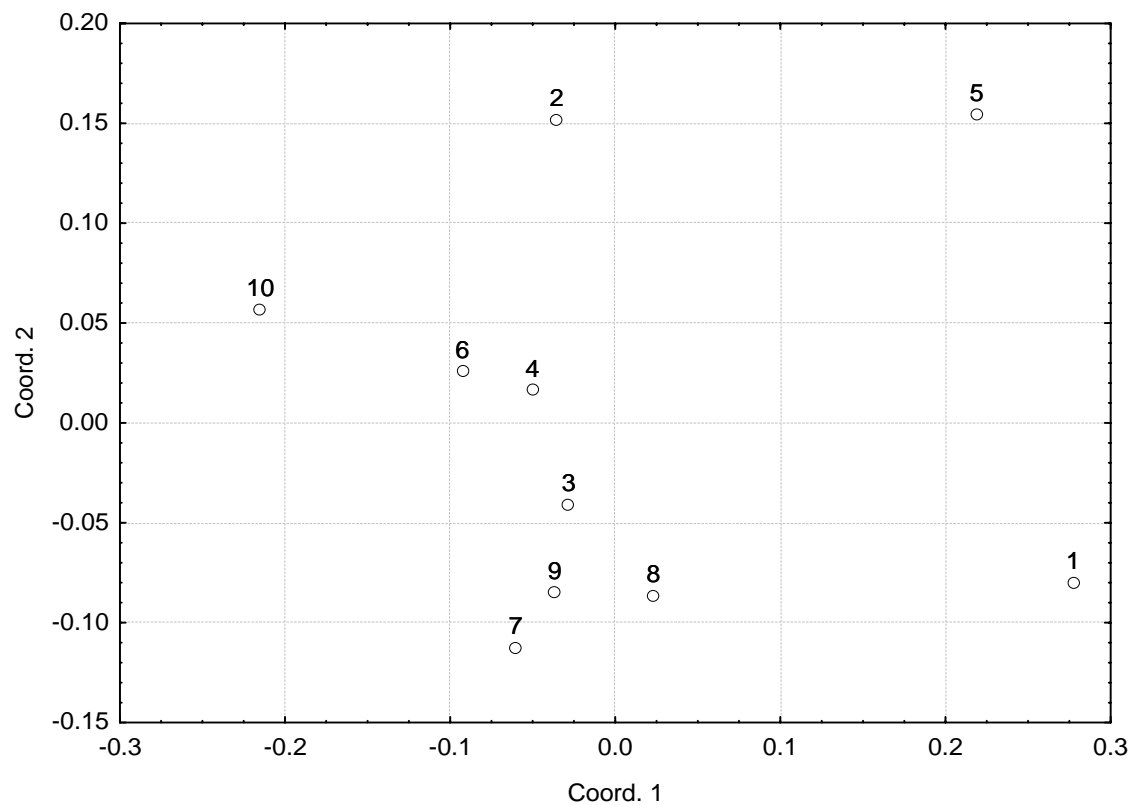


Figura 1.8 - Dispersão gráfica de 10 acessos de baru com base na matriz de distância genética calculada utilizando-se as 23 características categóricas analisadas.

Estatísticas descritivas das dissimilaridades genéticas obtidas com base nos diferentes tipos de características mostram a amplitude das distâncias e um maior coeficiente de variação para as dissimilaridades genéticas obtidas com base em marcadores SSR (43,6%), seguida das obtidas com base em marcadores RAPD (39,7%). (Tabela 1.6).

Em todas as análises de diversidade, observa-se que a planta CPAC BA-01 foi a mais distante das outras. Na avaliação das características morfológicas categóricas, por exemplo, foi possível perceber se tratar de uma planta diferenciada, com porte maior, copa mais desenvolvida, fuste com diâmetro maior, possivelmente por ser a mais antiga. A idade da planta poderia estar influenciando as características morfológicas, entretanto esta divergência desse acesso também foi verificada com base em marcadores moleculares do DNA, os quais não são influenciados pelo ambiente e idade da planta (FALEIRO, 2007).

Nas análises das características morfológicas quantitativas e categóricas, os acessos CPAC BA-03 e CPAC BA-09 estão mais próximos, sempre acompanhados do CPAC BA-04. Outro resultado coincidente entre as análises da diversidade com base nas características morfológicas quantitativas e categóricas foi a maior divergência do acesso CPAC BA-05.

Tabela 1.6 - Estatísticas descritivas relacionadas às dissimilaridades genéticas entre acessos de baru obtidas com base em marcadores moleculares RAPD, microssatélites (SSR), características morfológicas quantitativas (QUANT) e características morfológicas categóricas (CATEG).

Variável	NumObs	Média	Mínimo	Máximo	CV	Variância	DP
RAPD	36	0,2133	0,057	0,367	39.7	0,0072	0,0847
SSR	36	0,4792	0,125	0,857	43.6	0,0437	0,2091
QUANT	36	1.3658	0,62	1.91	21.7	0,088	0,2966
CATEG	36	0,2704	0,043	0,478	36.1	0,0095	0,0977

Tabela 1.7 – Análise de coeficiente de correlação de Pearson entre as medidas de dissimilaridade dos acessos de baru calculadas com base em características quantitativas (Quant), categóricas (Categ), marcadores moleculares RAPD (RAPD) e microssatélites (SSR).

Características	Car(X)	Car(Y)	Cov (X,Y)	Correlação	Alfa (%)
Quant x Categ	0,088	0,0095	0,0095	0,328	*4,84
Quant x RAPD	0,088	0,0072	-0,0021	-0,082	64,07
Quant x SSR	0,088	0,0437	0,0096	-0,154	62,85
Categ x RAPD	0,0095	0,0072	-0,0011	-0,1335	55,68
Categ x SSR	0,0095	0,0437	0,0048	0,2354	16,35
RAPD x SSR	0,0072	0,0437	0,0049	0,2763	9,91

A análise de coeficiente de correlação de Pearson entre as medidas de dissimilaridade calculadas com base em diferentes tipos de características (Tabela 1.7) demonstrou uma correlação positiva de 0,33 e significativa a 4,8% de probabilidade pelo teste t. entre as dissimilaridades calculadas com base em características morfológicas quantitativas e as características morfológicas categóricas. A correlação entre as dissimilaridades calculadas com base em marcadores moleculares RAPD e microssatélites também foi positiva de 0,28 e significativa a 9,9% de probabilidade pelo teste t. Faleiro et al. (2004) também obtiveram valor semelhante e igualmente positivo e significativo de 0,21 para a correlação entre as medidas de dissimilaridade calculadas com base em marcadores RAPD e microssatélites. As demais correlações entre as dissimilaridades calculadas com base em diferentes tipos de características não foram significativas ($p < 0,10$) pelo teste t. Estes resultados evidenciam de um lado, a relação entre as características morfológicas quantitativas e categóricas e por outro lado a relação entre as características obtidas com base em marcadores moleculares. Outro ponto importante é a complementaridade das características morfológicas e baseadas no DNA para estudos de diversidade genética.

A não relação entre as medidas de dissimilaridade calculadas com base em características morfológicas e marcadores moleculares pode indicar que os diferentes ambientes onde as plantas estão podem ter um efeito significativo na expressão fenotípica das características. Resultados de pesquisa têm mostrado que o baru pode também ocorrer em condições de baixa fertilidade, conforme os resultados encontrados

no Cerrado sobre murunduns (OLIVEIRA-FILHO & MARTINS, 1991) e no Cerrado sentido restrito (NASCIMENTO & SADDI, 1992). Nesse sentido, apesar do baru ter preferência por solos mais férteis, a abundância dessa espécie nem sempre pode ser considerada como indicadora de solos mesotróficos, conforme afirmado por RATTER et al. (1978). Assim, as condições edafoclimáticas dos locais onde os acessos estão devem ser consideradas nos resultados de diversidade.

Neste contexto, ressalva-se que as plantas introduzidas nas áreas da Embrapa Cerrados não estão no seu ambiente de origem e que este terreno é formado por áreas de latossolos e aterros feitos para a construção. Esta diferença ambiental pode interferir interfere na expressão fenotípica das características morfológicas. Percebe-se que plantas que se mostram mais próximas nas análises de DNA, como exemplo as plantas CPAC BA-06, CPAC BA-07e CPAC BA-05, que aparecem no mesmo grupo nessas análises, muitas vezes – supõe-se que estejam em ambientes com solos, luminosidade e declives diferentes – apresentam dissimilaridades maiores quando analisadas suas características morfológicas, agrupando-se de forma diferente. Este resultado ressalta que para os trabalhos de caracterização morfo-agronômica é essencial diminuir os efeitos ambientais nas características e para isso, a montagem de bancos ativos de germoplasma com repetições (progênies ou clones) dos diferentes acessos em diferentes locais assume importância estratégica.

4. CONCLUSÕES

Os resultados mostraram a diversidade genética dos acessos analisados, evidenciando a importância desses materiais. Tanto as características morfológicas quanto as moleculares permitiram uma diferenciação dos acessos. Análises de correlação mostraram certa relação entre as medidas de dissimilaridade calculadas com base em características morfológicas quantitativas e morfológicas categóricas, assim como uma relação entre as obtidas com base em marcadores moleculares RAPD e microssatélites. Estes resultados evidenciam a importância do uso complementar de diferentes grupos de características para a caracterização de recursos genéticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A.; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos Cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá.** 2 ed. Planaltina,DF: Embrapa-CPAC, 1990. 83p. (Embrapa-CPAC Documentos, 26).

ANDRADE, A. M. de & CARVALHO, C. J. de. **Produção de celulose e de papel Kraft da madeira de baru (*Dipteryx alata* Vog.).** Floresta e Ambiente, Rio de Janeiro, 1996. n. 3, p. 28-35.

BOTEZELLI, L.; DAVIDE, A.C.; MALAVASI, M. de. M. Características dos frutos e sementes de quatro procedências de *Dipteryx alata* VOGEL (BARU). **Cerne.** Lavras: Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2000. v. 6, n. 1, p. 009-018.

BRANDÃO, M. Plantas medicamentosas de uso popular dos cerrados mineiros. Belo Horizonte: Daphne, 1993. v.3, n. 4, p. 11-20.

CORREA, G. de. C.; NAVES, R. V.; ROCHA, M. R. da.; ZICA, L. F. Caracterização física de frutos de baru (*Dipteryx alata* Vog.) em três populações nos cerrados do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia: UFG, 2000. v. 30, n. 2, p. 05-11.

CRUZ, C. D. **Programa genes:** aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa : Universidade Federal de Viçosa – UFV, 2001. 648p.

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

FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R., KARIA, C. T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. (Comunicado Técnico N°92) 6p.

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; MONTEIRO, W. R.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; PIEDRA, A. G.; MOURA, A.D., ARÉVALO-GARDINI, E.; MARQUES, J. R. B.; GRAMACHO, K.P.; FALEIRO, A. S. G.; SANTOS, M. C. M. Variability in cação accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2004. 4:227-233.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. Washington, 1979. v. 76, n. 10, p. 5269-5273.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; MARTINS, F. R. A. **A comparative study of five cerrado areas in southern Mato Grosso, Brazil**. *Edinburg Journal of Botany*, 1991. v.48, n.3, p. 307-332.

RATTER, J.A., ASKEW, G.P., MONTGOMERY, R.F., GIFFORD, D.R. Observations on forests of some mesotrophic solis in Central Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, 1978. v.1, n.1, p. 47-58.

SANO, S. M.; VIVALDI, L. J.; SPEHAR, C. R. Diversidade morfológica de frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 1999. v. 34, n. 4, p. 513-518.

SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. Documento 116 - **Baru**: Biologia e Uso. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. ISSN 1517 – 5111.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT users guide**. Version 6. Ed. Cary, North Caroline, 1989. 846 p.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic diversity. **The Indian J. of Genetic and Plant Breeding**. 1981. v. 41, p. 237-245.

STATSOFT INC. **Statistica for Windows** [Computer program manual] Tulsa, OK: StatSoft Inc., 1999.

TAKEMOTO, E., OKADA, I. A.; GARBELOTTI, M. L.; TAVARES, M. AUED-PIMENTEL, S. Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 2001. 60(2):113-117,

TOGASHI, M. **Composição e caracterização química e nutricional do fruto do baru (*Dipteryx alata* Vog.)**. Campinas: UNICAMP, 1993. 108p. Tese de Mestrado.

VALLILO, M. I.; TAVARES, M.; AUED, S. Composição química da polpa e da semente do fruto do cumbaru (*Dipteryx alata* Vog.) – Caracterização do óleo e da semente. **Revista do Instituto Florestal**. São Paulo, 1990. v.2, n.2 p. 115-125.

VERA, R. & SOUZA, E. R. B. de. Baru **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2009. vol. 31 nº.1

WONDRACEK, D. C. **Caracterização e diversidade genética de acessos de maracujás do cerrado com base no perfil carotenóides**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília - UnB, 2009. 101p. Dissertação (Mestrado).

CAPÍTULO II

ESTUDO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E VARIABILIDADE GENÉTICA DE ARATICUM UTILIZANDO MARCADORES RAPD E MICROSSATÉLITES

ESTUDO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E VARIABILIDADE GENÉTICA DE ARATICUM UTILIZANDO MARCADORES RAPD E MICROSSATÉLITES

RESUMO

O araticum (*Annona crassiflora* Mart.) é uma espécie frutífera da família Annonaceae, nativa da região do Cerrado, com grande potencial de uso econômico. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a variabilidade genética da coleção de trabalho de acessos de araticum da Embrapa Cerrados e outros materiais próximos ao Distrito Federal, utilizando marcadores moleculares RAPD, Microssatélites e análise de características morfológicas. Folhas de 18 acessos de araticum foram coletadas e o DNA genômico extraído utilizando o método do CTAB, com modificações. Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas para obtenção de marcadores moleculares RAPD e Microssatélites. Na análise morfológica, foram avaliadas 23 características dos acessos de araticum. As dissimilaridades genéticas entre os 18 genótipos de araticum evidenciaram a variabilidade genética dos acessos e as análises de agrupamento levaram à formação de três grupos de similaridade. Verificou-se também coeficientes de dissimilaridades genéticas baixos entre os materiais oriundos da Embrapa Cerrados e altos entre os outros materiais. Esses acessos são importantes fontes de variabilidade para enriquecimento da atual coleção de trabalho da Embrapa Cerrados e para futuros estudos de caracterização morfológica e agronômica.

Palavras chave: araticum, marcadores moleculares, RAPD, SSR, categóricas, correlação.

**STUDY OF MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND GENETIC
VARIABILITY OF ARATICUM USING RAPD AND MICROSATELLITES
MOLECULAR MARKERS**

ABSTRACT

Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) is an Annonaceae fruit species, native to the Brazilian Savanna region with high economic potential. This study aimed to evaluate the genetic variability of the araticum collections from Embrapa Cerrados and others regions near to the Federal District, using RAPD and microsatellites markers as well as morphological analysis. Young leaves of 18 araticum accessions were collected and used for genomic DNA extracted using the CTAB method, with modifications. DNA samples from each genetic material were amplified for obtaining of RAPD and microsatellites markers. Morphological analysis were performed using 23 characteristics of each araticum accession. Genetic dissimilarities among the 18 araticum accessions showed high genetic variability among them and cluster analysis led to the formation of three similarity groups. It was observed low genetic dissimilarities among accessions from Embrapa Cerrados and high genetic dissimilarities among accessions from others regions. These accessions are important as genetic variability sources to enlarge the current Embrapa Cerrados collection and for future studies of morphological and agronomic germplasm characterization.

Keywords: araticum, molecular markers, RAPD, SSR, categorical characterization.

1. INTRODUÇÃO

O araticum (*Annona crassiflora* Mart.) é uma espécie frutífera da família Annonaceae, nativa da região do Cerrado, muito estudada atualmente em diversas áreas, desde a culinária, como fonte nutricional, até a medicinal, pelo grande potencial antioxidante (ROESLER et al., 2007).

Ocorre em maior densidade em cerrado típico, localizado nos latossolos não-concrecionários dos chapadões ocupando áreas mais altas, o que torna esta espécie mais vulnerável, pois, nestes locais, a pressão antrópica voltada, principalmente, para a realização de culturas anuais, reduz, sensivelmente, as áreas de vegetação nativa do cerrado. Convive em ambiente com baixo nível de oferta nutricional. A área basal total das plantas de araticum é influenciada positivamente pelos níveis de Ca, Mg e K no solo, e a densidade influenciada negativamente pelo nível de ferro no solo (MESQUITA et al., 2007).

Com isso, investe-se mais em seu estudo, como melhores substratos para desenvolvimento de mudas (FERREIRA et al., 2009), efeito alelopático sobre plantas daninhas (INOUE et al. 2010) e também com características antifúngicas e antibacterianas (ALMEIDA et al., 1998).

As buscas desenfreadas por novas fronteiras agrícolas aliadas ao extrativismo predatório, a que muitas espécies estão sendo submetidas, vêm provocando devastações e extinção de áreas do cerrado e para garantir a sobrevivência e a perpetuação de suas espécies nativas, uma alternativa é o estabelecimento de plantios comerciais. Porém as sementes de araticum apresentam germinação lenta e desuniforme, o que afeta negativamente sua propagação (BERNADES et al., 2007; BLANCO et al., 2007). Outro problema associado às plantas de araticum é o intenso ataque de insetos e fungos. Os insetos causam danos severos aos frutos e no período do florescimento, perfuram as pétalas e o aparelho reprodutor das flores, além do ataque às sementes (GOLIN, 2008; BRAGA FILHO et al., 2007; BRAGA FILHO et al., 2005).

De acordo com Pereira, et. al. (2008), o araticum é uma planta preferencialmente alógama, mas que exibe certo grau de auto-fecundação. Além disso, Cavalcante et al. (2009) afirmam que a formação de frutos é preferencialmente por meio da polinização cruzada, que não há formação de frutos sem o trabalho de polinizadores e ainda afasta a possibilidade de apomixia. Além de colocar a existência de plantas funcionais masculinas, femininas e hermafroditas, diz que *A. crassiflora* é autocompatível e cita Resende (2002), para dizer que a maioria das espécies perenes de araticum é alógama

ou com sistema reprodutivo misto, mas que há autofecundação em taxas inferiores a 50% e superiores a 5%, sendo raras as autógamas. Pereira et al. (2008) dizem também que existe um elevado nível de variabilidade genética em populações naturais de *A. crassiflora* do Estado de Goiás e a divergência genética entre as populações está fortemente estruturada no espaço.

Nesse contexto, estudos sobre a variabilidade genética destas espécies geram importantes informações para subsidiar diferentes práticas de manejo, estabelecimento e manejo de bancos de germoplasma e também etapas iniciais de seleção e melhoramento genético. Nesse sentido, a Embrapa Cerrados tem trabalhado na caracterização morfo-agronômica de uma coleção de trabalho de araticum.

Neste trabalho objetivou-se analisar a diversidade genética – por meio de marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), e utilizando características morfológicas categóricas de coleções de trabalho de araticum (*Annona crassiflora*), bem como analisar a importância dos diferentes grupos na caracterização dos recursos genéticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Os materiais genéticos analisados de araticum foram 18 acessos, sendo 7 da coleção de trabalho da Embrapa Cerrados e outros de localidades próximas ao Distrito Federal (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Acessos de araticum e sua respectiva origem

Número	Código	Locais de coleta
1	CPAC AR-9	Águas Emendadas
2	CPAC AR-11	Colégio Agrícola
3	CPAC AR-15	Cabeceiras – GO
4	CPAC AR-16	Cabeceiras - GO
5	CPAC AR-26	Reserva do Exército
6	CPAC AR-27	Reserva do Exército
7	CPAC AR-31	Reserva do Exército
8*	CPAC AR-7	Jardim ACN
9*	CPAC AR-8	Jardim transportes
10*	CPAC AR-1	Viveiro CPAC
11*	CPAC AR-1-1	Viveiro CPAC
12*	CPAC AR-1-2	Viveiro CPAC
13*	CPAC AR-1-3	Viveiro CPAC
14*	CPAC AR-1-4	Viveiro CPAC
15	CPAC AR-5	Consórcio
16	CPAC AR-6	Consórcio
17	Out group	Paraná
18	Out group	Terra Fria

* Acessos da coleção de trabalho da Embrapa Cerrados

Obtenção e análise de marcadores RAPD

Folhas dos acessos da coleção de trabalho de araticum da Embrapa Cerrados foram coletadas e o DNA genômico extraído utilizando o método do CTAB, com modificações (Faleiro et al., 2003). Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas via Reação em Cadeia da Polimerase para obtenção de marcadores moleculares RAPD. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 μ L, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 μ M de cada

um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 μ M de um “primer” (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 15 η g de DNA. Para obtenção dos marcadores RAPD, para o material genético de araticum foram utilizados 10 *primers* decâmeros : OPD-05, OPD-07, OPD-08, OPD-16, OPE-16, OPF-01, OPF-16, OPG-05, OPH-07 e OPH-08.

As ampliações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um 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 seis minutos a 72 °C, e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 μ l de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os produtos das reações de amplificação (marcadores RAPD) foram classificados em presença (1) e ausência (0) de bandas e convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as dissimilaridades genéticas entre os diferentes acessos, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 2001).

Obtenção e análise de marcadores microssatélites

Na Tabela 2.2 são apresentados os primers utilizados para caracterização dos acessos de araticum, com suas respectivas seqüências e temperaturas de anelamento, os quais foram desenvolvidos a partir de uma biblioteca genômica enriquecida, construída para *A. crassiflora*, citada por Ferreira et al. (2008).

Tabela 2.2- Primers utilizados para obtenção de marcadores moleculares microssatélites de acessos de araticum.

Loci	Primers		T _{anelamento}
	Sequência <i>Foward</i>	Sequência <i>Reverse</i>	
Acr 01	CGGCCTTCAAAAGGGAGATA	CATGATTCTTCTGCTTCTGTGG	60°C
Acr 10	TGACGAAAACGAGAAAAGCA	ATGTCCCCAACCCAATACAT	60°C
Acr 19	GAGAGCTGGGAGAAGAGCAA	AAAGCTGGGAGAGACGACAC	60°C
Acr 20	AGAGCCAGAGCCAGTGAGAC	TTGCCTCCATCTCTCAATCC	60°C
Acr 22	CTGACTCGCTGGCTCTCTCT	CTACAGCCCACATGTGCAAC	60°C
Acr 26	CACGACCAAGGAGAGAGGAG	GGCAACAATCCTGACTCACA	58°C
Acr 33	CAAACAGGCGATGAGACAGA	TGGTTGGCTTTTCTCTTTCAA	58°C
Acr 34	GGAACAGAAGCTGTGGCATT	CGCGCAATTCCACAATAAC	58°C
Acr 37	GGCAACTTCTCCCCTTTACC	CCGGTGCCTGCTGTATATG	60°C

A partir das amostras de DNA, as reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 µl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2,4 mM, 150 µM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 3 pM de cada um dos “primers que serão escolhidos de acordo com as espécies usadas no trabalho, uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 30 ηg de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador, de acordo com o seguinte programa: 94 °C por 5 min para desnaturação, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min à 55°C para anelamento e 1 min a 72°C e, ao final, uma extensão de 72° C por 10 min. Ao final da amplificação a temperatura das amostras foi reduzida a 4°C.

Após o procedimento, foram adicionados, a cada amostra, 3 µl de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%), glicerol (60%) e água (39,75%). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio (0,2 µg/mL), para separação dos fragmentos microssatélites. O gel foi submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1mM) e a separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 100 volts. Ao término da corrida os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores gerados foram convertidos em matrizes numéricas codificadas, a partir das quais foi possível calcular as dissimilaridades genéticas entre os materiais e realizar análises de agrupamento. A codificação foi realizada para cada loco, identificando os alelos presentes. Tal codificação é composta por dois números representando os alelos, sendo que dois números iguais significam que o loco está em

homozigose (apresenta duas cópias do mesmo alelo) e dois números diferentes que o loco está em heterozigose (apresenta dois alelos diferentes).

As dissimilaridades genéticas obtidas a partir dos marcadores microssatélites foram calculadas com auxílio do Programa Genes (Cruz, 2001), baseando-se na seguinte fórmula:

$DG_{ij} = 1 - (NLC/NTL)$ sendo:

DG_{ij} = Dissimilaridade genética entre os acessos i e j ;

NLC = Número de Locos Coincidentes entre os acessos i e j ;

NTL = Número Total de Locos.

O NLC é o somatório das coincidências alélicas de cada loco analisado, sendo que cada coincidência pode assumir o valor 1 (dois alelos coincidentes); 0,5 (um alelo coincidente) e 0 (nenhum alelo coincidente).

Obtenção e análise de características morfológicas categóricas

Foram avaliadas 23 características das árvores de araticum, com relação ao fuste (crescimento, aspecto e cor), ritidoma (cor e tipo), copa (formato), folha (exsudação, disposição, filotaxia, forma, dimensão do pecíolo), lâmina foliar (margem, ápice, base, pilosidade, relação comprimento/largura, textura, estípula, coloração, nervação adaxial e abaxial e formato), ramo (características). Os dados coletados de cada árvore foram categorizados em diferentes classes relacionadas na Tabela 2.3. Os valores das classes em cada característica de acessos individualizados de araticum foram utilizados para o cálculo das distâncias ou dissimilaridades genéticas entre os acessos, com o auxílio do Programa Genes (Cruz, 2001), utilizando-se a seguinte expressão:

$DG_{ij} = 1 - [CV_{ij}/(CV_{ij} + DV_{ij})]$ onde:

DG_{ij} = Dissimilaridade genética entre os acessos i e j ;

CV_{ij} = Número de coincidências de valores das classes das n características categóricas analisadas entre os acessos i e j ;

DV_{ij} = Número de discordâncias de valores das classes das n características categóricas analisadas entre os acessos i e j ;

Tabela 2.3- Descritores morfológicos categóricos utilizados¹ na caracterização do araticum

Fuste	Folha		
A. Crescimento 1. monopodial 2. simpodial	H. Composição 1. folha simples 2. composta	Q. Ápice 1. Arredondada 2. Mucronada 3. Obtuso 4. Agudo 5. Retuso 6. acuminado 7. Truncado	Z. Formato (Campdód.) 1. Bronquidódroma 2. Eucampdódroma 3. Reticulódroma 4. Cladódroma
B. Aspecto 1. Reto 2. Tortuoso 3. Abaulado 4. Protuberancias 5. Base cilíndrica 6. Base achatada 7. Base acanalada	I. Exsudação 1. ausente 2. Presente	R. Base 1. Arredondada 2. Aguda 3. cordada 4. lobada 5. obtusas	
	J. Relação C/L 1. 1,5 - 1,7 2. 1,7 - 1,99 3. 2 - 3 4. > 3		
C. cor 1. Cinza claro/escuro 2. cinza claro 3. castanho/cinza	L. Formato 1. Largo-elíptica 2. Elíptica 3. Estreito-oblonga 4. Estreito-ovada 5. largo-oblonga 6. estreito-oblonga 7. estreito-obovada 8. ovada 9. estreito-obvada 10. Lanceolada	S. Estípula 1. Intrapeciolares 2. ausente	
Ritidoma			
D. cor 1. Cinza claro 2. castanho/cinza	M. filotaxia/disposição 1. alternas dísticas 2. alternas espiraladas 3. opostas cruzadas 4. opostas dísticas 5. verticeladas	T. Textura 1. Coriácea 2. Cartácea 3. membranácea	
E. Tipo 1. Reticulado 2. Rugoso 3. Áspero 4. Liso 5. Escamoso 6. Com depressões 7. Laminado 8. Fissurado 9. Fendido 10. Estriado			
Copa	N. Pilosidade 1. Glabras 2. Pulverulento	U. Coloração 1. Concolor 2. Discolor	
F. Formato 1. Irregular 2. Cônica 3. Leque 4. Pendente 5. Colunar 6. Umbelada	O. Pecíolo 1. 0,3 - 0,49 cm 2. 0,5 - 0,69 cm 3. 0,7 - 0,99 cm 4. > 1 cm	V. Nervura Adaxial (1ªnerv./2ª nerv.) 1. Saliente/Imersa 2. Impressa/saliente 3. Impressa/Impressa 4. Impressa/Imersa 5. Imersa/Imersa 6. saliente/saliente 7. Imersa/saliente 8. Imersa/saliente 9. saliente/impressa	
Ramos	P. Margem 1. Inteira 2. ciliadas 3. dentadas 4. lobadas 5. palmadas 6. serrilhada 7. revoluta	X. Nervura Abaxial (1ªnerv./2ª nerv.) 1. saliente/saliente 2. saliente/impressa 3. saliente/imersa 4. Impressa/saliente 5. Impressa/Impressa 6. Impressa/Imersa 7. Imersa/Imersa 8. Imersa/saliente 9. Imersa/saliente	
G. Característica 1. Lenticelados 2. Glabros 3. Rugoso 4. Pilosos			

¹Descritores selecionados com base no Guia do Observador de árvores do Cerrado, elaborado por Manoel Cláudio da Silva Júnior para curso de observadores de árvores do cerrado.

Análises de Correlação, Agrupamento e Dispersão com base nas matrizes de dissimilaridades genéticas

Para comparar as dissimilaridades genéticas entre os acessos de araticum obtidas com base em marcadores moleculares RAPD, microssatélites e características morfológicas categóricas, foram calculados coeficientes de correlação de Pearson entre as dissimilaridades genéticas, com auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2001).

As matrizes de dissimilaridades genéticas obtidas com base em cada tipo de marcador molecular e características morfológicas foram utilizadas para realizar a análise de agrupamento com o auxílio do Programa Statistica (STATSOFT INC., 1999), utilizando como critério de agrupamento o método do UPGMA. Ainda com base em cada uma das matrizes de dissimilaridades genéticas, foi realizada a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS e Statistica (STATSOFT INC., 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 10 *primers* decâmeros geraram um total de 146 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 14,6 marcadores por *primer*. As dissimilaridades genéticas entre os 18 genótipos de araticum variaram entre 0,152 e 0,697 (dados não apresentados). A menor dissimilaridade foi observada entre o genótipo CPAC AR 1-3 e CPAC AR 1-4 (0,152), o que já esperado por terem origem da mesma matriz (CPAC AR 1), bem como a similaridade dos outros acessos localizados na Embrapa Cerrados, como mostra a dispersão gráfica na Figura 1. A maior dissimilaridade observada foi entre o genótipo do out group – de Terra Fria, e CPAC AR 9 – de Águas Emendadas, de 0,697 (Figura 2.1).

Do total de marcadores, 100% foram polimórficos. Verifica-se também coeficientes de dissimilaridades genéticas altos, evidenciando a ampla base genética do material total avaliado. Blanco (2007) coloca que é importante considerar também que, a alta proporção da variabilidade genética encontrada dentro das populações deve ser interpretada como resultante de elevadas taxas de fluxo gênico que devem ter operado no passado. A forte fragmentação do bioma Cerrado na atualidade, certamente, representa uma barreira sobre a qual dificilmente mudanças poderiam ocorrer nessa espécie, sobretudo entre populações separadas por centenas de quilômetros.

Analisando apenas o grupo de acessos já introduzidos há mais tempo no CPAC, as dissimilaridades diminuem, indicando maior similaridade entre os acessos, mostrando que a base genética da atual coleção de trabalho é mais estreita. Os acessos utilizados como *outgroup* foram os que mais diferiram dos outros, com maiores valores de dissimilaridade genética e maior dissimilaridade na análise do gráfico de dispersão (Figura 2.2).

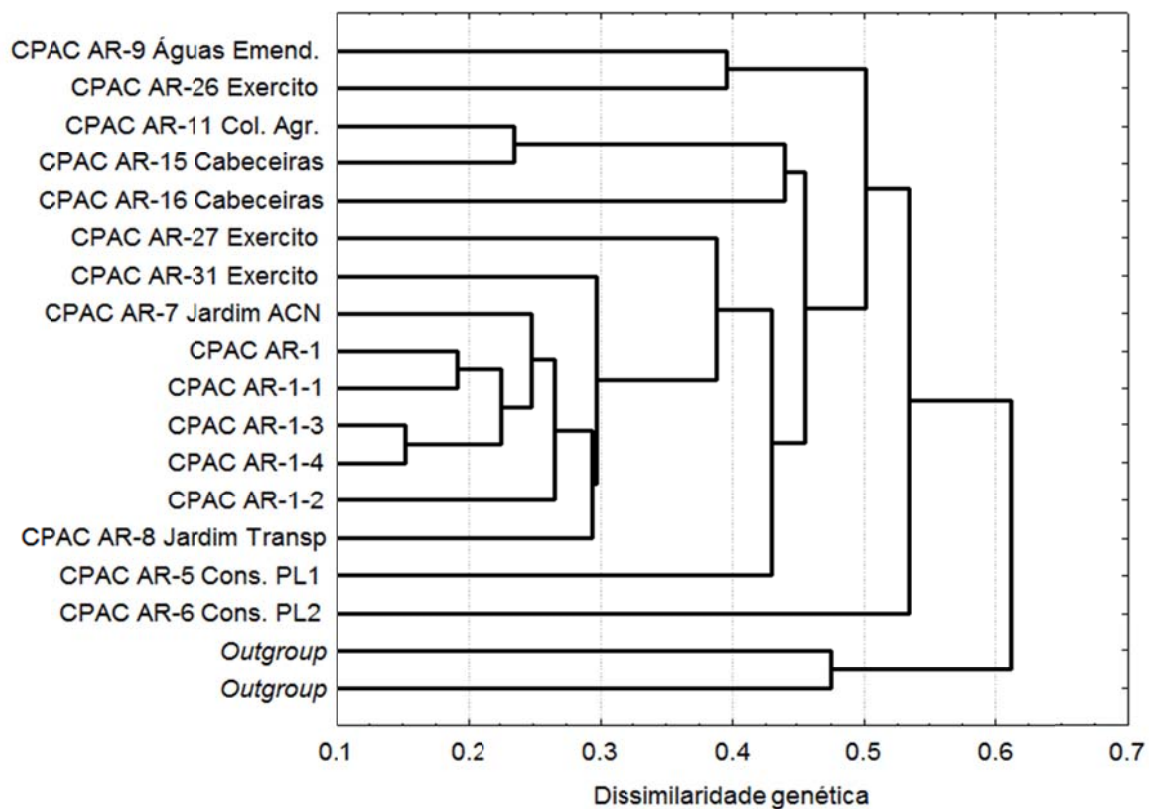


Figura 2.1- Análise de agrupamento de 18 acessos de araticum, com base na matriz de dissimilaridades genéticas calculadas utilizando-se 146 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

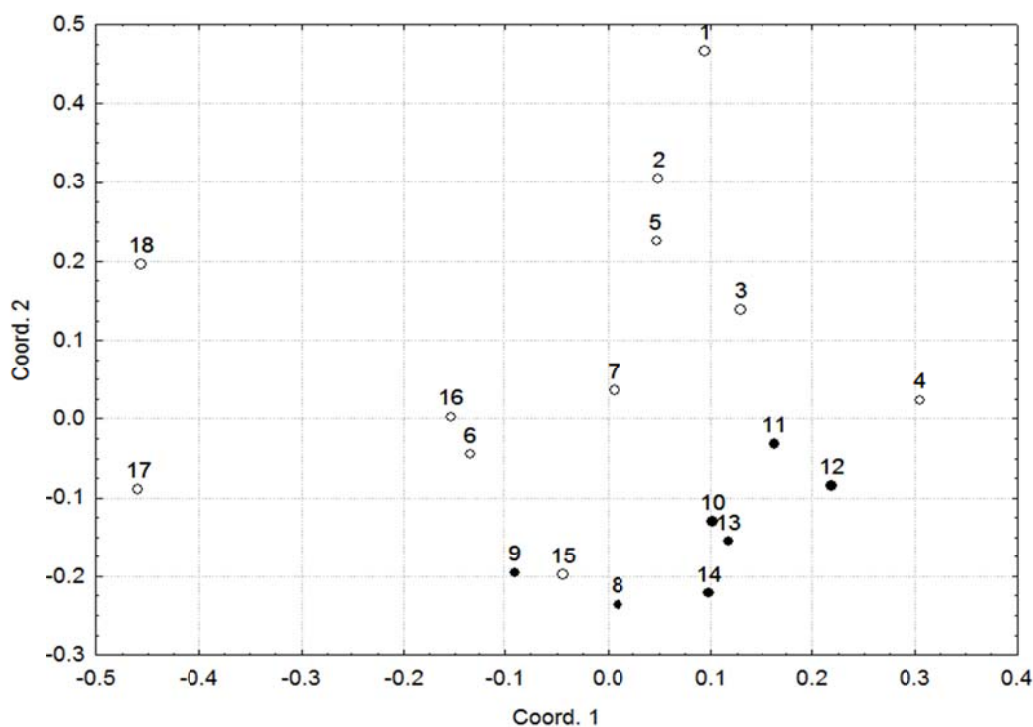


Figura 2.2- Dispersão gráfica de 18 acessos de araticum com base na matriz de dissimilaridades genéticas calculadas utilizando-se 146 marcadores RAPD.

Com base nos marcadores microssatélites, a análise de nove locos gerou informações sobre 33 alelos. O número de alelos por loco variou de 2 a 5, com uma média de 3,67 alelos por loco (Figura 2.3).

As análises de agrupamento com base na matriz de dissimilaridade mostraram a formação de três grupos, bem semelhantes aos obtidos com base na matriz de dissimilaridade genética calculada utilizando marcadores moleculares RAPD. O primeiro grupo é formado pelos acessos coletados em áreas de reservas, próximas ao Distrito Federal, com algumas exceções, o segundo pelos acessos do CPAC e o terceiro pelos acessos do *outgroup* (Figura 2.4).

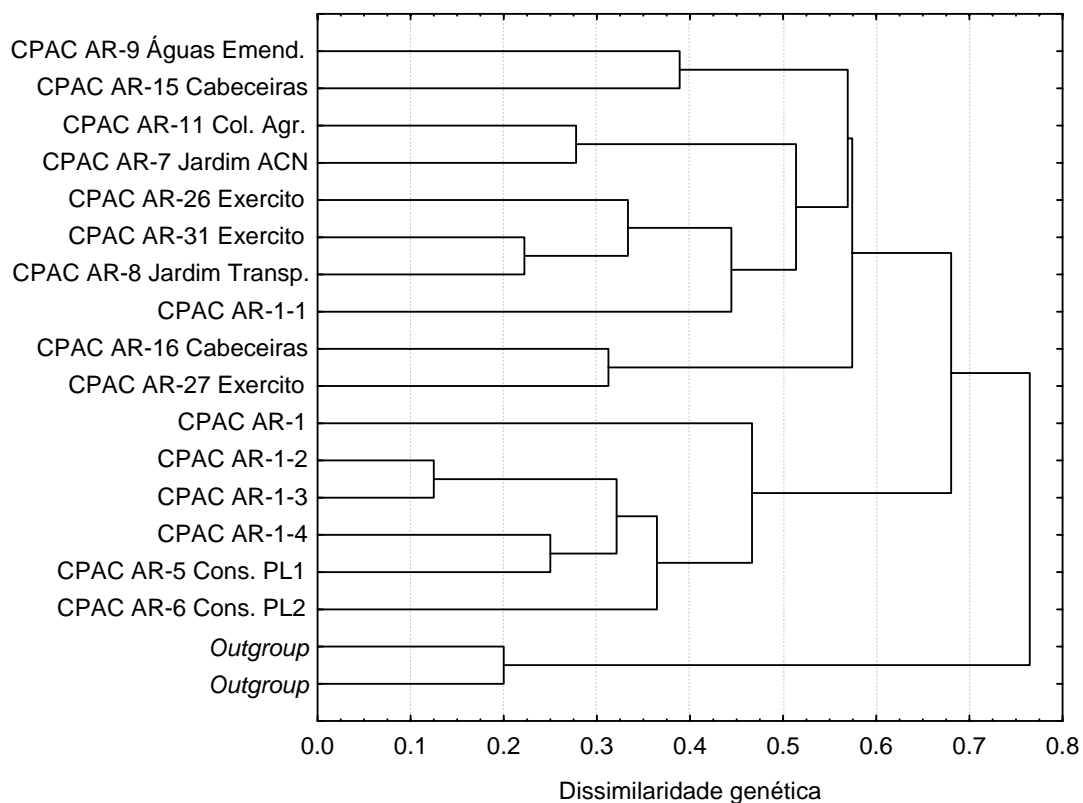


Figura 2.3- Análise de agrupamento de 18 acessos de araticum com base na matriz de dissimilaridades genéticas calculadas utilizando-se locos microssatélites. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

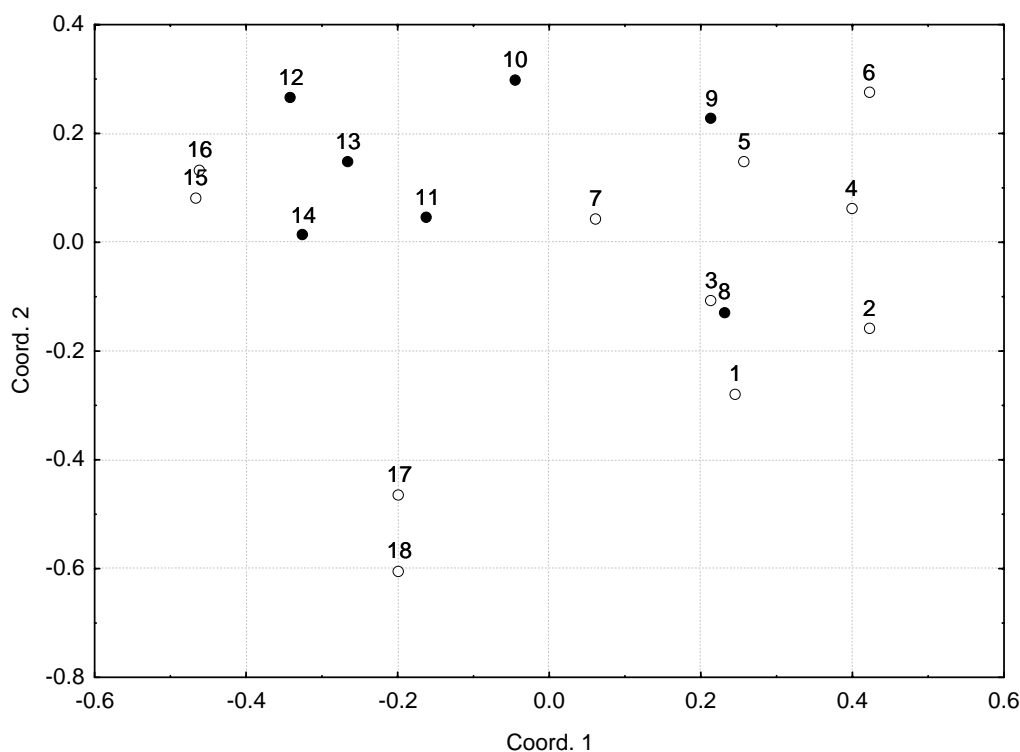


Figura 2.4- Dispersão gráfica de 18 acessos de araticum com base na matriz de dissimilaridades genéticas calculadas utilizando-se 9 locos microssatélites.

Os dois acessos utilizados como *outgroup* apresentaram uma distância genética elevada em relação aos demais acessos (Figura 2.2 e 2.4). Esses dois acessos que vieram do Vão Paranã e de Terra Fria. Segundo Pereira et. al. (2008), existe uma barreira geográfica que pode impedir o fluxo gênico entre algumas regiões do estado de Goiás localizadas no Vão do Paranã. Esta hipótese é sustentada pela elevada magnitude da dissimilaridade genética observada entre populações situadas em margens opostas, em contraposição à baixa distância geográfica entre elas, e ainda, pela reduzida magnitude das dissimilaridades genéticas entre populações situadas em uma mesma margem. Esses dados foram fundamentados em estudos genéticos com microssatélites. Os resultados desse trabalho corroboram com uma possível regionalização da variabilidade genética. Blanco (2007) enfatiza a elevada diversidade genética em termos de polimorfismos de DNA cloroplastidial, mesmo nas populações de *Annona crassiflora* isoladas geograficamente no estado de GO.

Na análise das características morfológicas categóricas os acessos do viveiro, identificados com os números CPAC AR-1-1, CPAC AR-1-2, CPAC AR-1-3 e CPAC AR-1-4 não foram utilizadas por serem ainda plantas muito jovens.

A análise morfológica categórica do araticum mostrou uma maior divergência dos acessos quanto ao ápice da folha, formato de folha e tamanho de pecíolo, com variação de 5 e 4 classes, respectivamente (Tabela 2.4). De acordo com Ribeiro et al. (2000), a julgar pela variabilidade morfológica encontrada nos frutos (peso, forma e volume) e na polpa (cor, consistência e sabor), pode-se inferir que há grande variabilidade genética no ambiente de ocorrência natural.

As matrizes ou acessos utilizados como *outgroup*, mais uma vez, ficaram isoladas do resto do grupo, mas houve aproximação com o acesso CPAC AR-6. Tanto os acessos do *outgroup* quanto o acesso CPAC AR-6 foram implantados no mesmo campo experimental da Embrapa Cerrados de cultivos consorciados. É provável que essa similaridade morfológica possa ser explicada por um possível efeito ambiental, considerando a proximidade das áreas onde que elas estão plantadas, com mesmo tipo de solo, vento, quantidade de água e tratos culturais. Pôde-se observar também que nas análises com base em marcadores moleculares RAPD e microssatélites, esse acesso apresentava certa divergência dos demais, mas não se aproximava do *outgroup*.

A matriz do Jardim ACN (CPAC AR-7) e a matriz do viveiro (CPAC AR-1) estão próximas nas duas análises. São plantas introduzidas no CPAC e possuem material genético próximo e recebem condições ambientais bem parecidas.

Tabela 2.4 - Caracterização de 14 acessos de araticum com base em 23 características morfológicas categóricas.

CMC ¹	Acessos ²													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	16	17	18
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
B	2	1	2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1
C	1	2	1	2	2	2	2	1	2	1	1	3	3	3
D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
E	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	3	2
F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G	1	3	1	3	1	3	3	1	1	2	1	2	1	1
H	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
J	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	3	3
L	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	3	3	4
M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
O	2	3	3	2	3	2	2	2	3	1	2	2	2	4
P	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Q	1	1	2	3	5	2	2	3	1	2	3	4	2	4
R	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
S	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1
T	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2
U	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
V	1	2	2	3	2	6	2	4	3	4	3	4	4	4
X	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Z	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1

¹Características Morfológicas Categóricas de acordo com descrição feita na Tabela 2.3

² Acessos [1- Águas Emend. CPAC AR 09; 2- CPAC AR 11 Col. Agric.; 3- CPAC AR 15 Cabeceiras; 4- CPAC AR 16 Cabeceiras; 5- CPAC AR 26 Exército; 6- CPAC AR 27 Exército; 7- CPAC AR 31 Exército; 8- CPAC AR 07 Jardim ACN; 9- CPAC AR 08 Jardim Transp.; 10- CPAC AR 01 Matriz viveiro; 11- CPAC AR 05 Consorcio PL 1; 12- CPAC AR 06 consorcio PL 2; 13- *outgroup* Paraná; 14- *outgroup* Terra Fria]

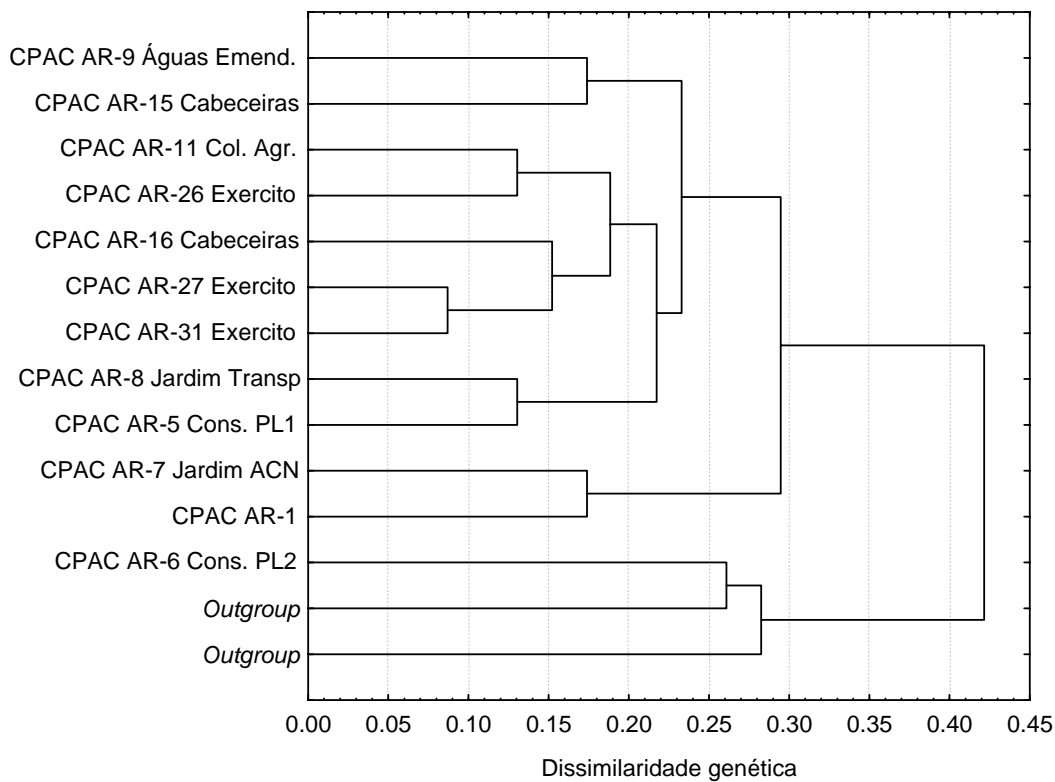


Figura 2.5- Análise de agrupamento de 14 acessos de araticum com base nas dissimilaridades genéticas calculadas utilizando 23 características morfológicas categóricas. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

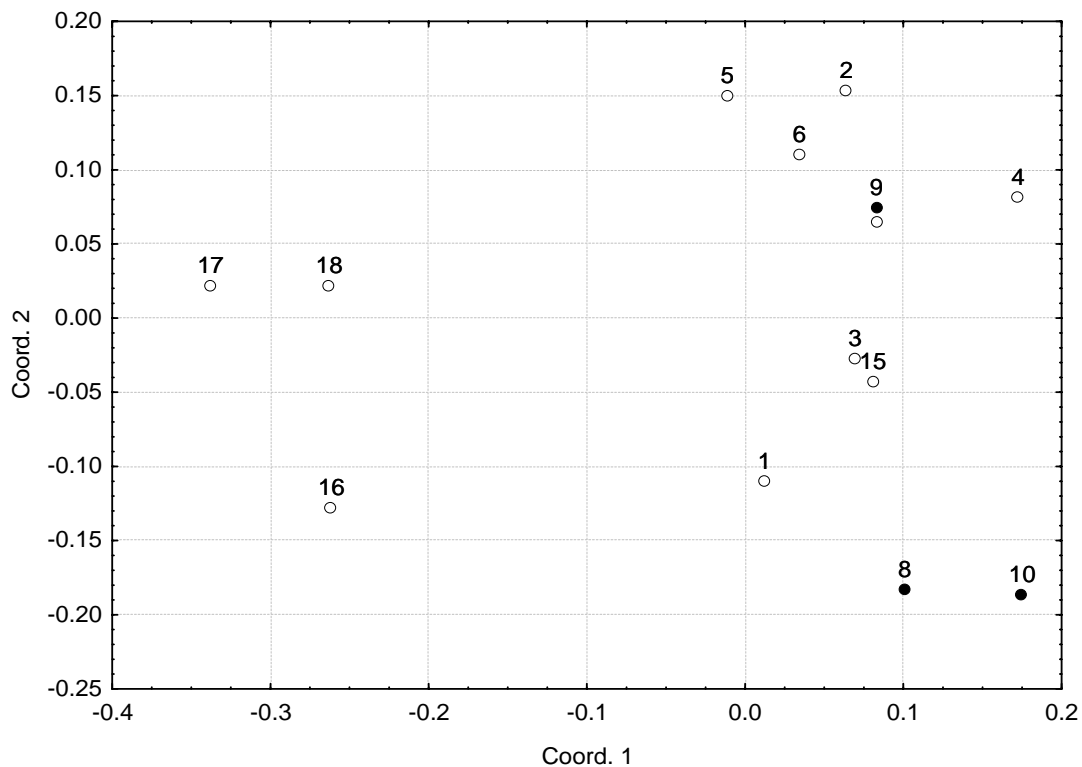


Figura 2.6- Dispersão gráfica de 14 acessos de araticum com base na matriz de dissimilaridades genéticas calculadas utilizando-se 23 características morfológicas categóricas.

Na Tabela 2.5 observa-se as estatísticas descritivas das dissimilaridades genéticas obtidas com base nos diferentes tipos de características mostram a amplitude das distâncias e um maior coeficiente de variação para as dissimilaridades genéticas obtidas com base em marcadores SSR (29,7%), seguida das obtidas com base em marcadores RAPD (22,3%; Tabela 2.5). A maior amplitude das dissimilaridades genéticas também foi obtida com base nos marcadores microsatélites.

Tabela 2.5 - Estatísticas descritivas relacionadas às dissimilaridades genéticas entre acessos de araticum obtidas com base em marcadores moleculares RAPD, microsatélites (SSR), características morfológicas categóricas (CATEG).

Variável	NumObs	Média	Mínimo	Máximo	CV	Variância	DP
RAPD	91	0,5022	0,22	0,697	22,3	0,0125	0,112
SSR	91	0,6422	0,2	1,0	29,7	0,0365	0,191
CATEG	91	0,697	0,478	0,913	15,51	0,0117	0,108

Tabela 2.6 – Análise de correlação de Pearson entre as medidas de dissimilaridade calculadas dos acessos de araticum com base em características categóricas (Categ), marcadores moleculares RAPD (RAPD) e microsatélites (SSR).

Características	Car(X)	Car(Y)	Cov (X,Y)	Correlação	Alfa (%)
Categ x RAPD	0,0117	0,0125	-0,006	-0,493	**0,0002
Categ x SSR	0,0117	0,0365	-0,0079	-0,381	**0,0262
RAPD x SSR	0,0125	0,0365	0,0101	0,472	**0,0006

A análise de coeficiente de correlação de Pearson entre as medidas de dissimilaridade calculadas com base em diferentes tipos de características demonstrou uma correlação positiva de 0,47 e significativa (Prob <0,01) pelo teste t. entre as dissimilaridades calculadas com base em marcadores moleculares RAPD e microsatélites (Tabela 2.6). Faleiro et al. (2004) também obtiveram valor positivo e significativo de 0,21 para a correlação entre as medidas de dissimilaridade calculadas com base em marcadores RAPD e microsatélites. As correlações entre as dissimilaridades calculadas com base em características morfológicas categóricas e as dissimilaridades calculadas com base em marcadores moleculares foram negativas.

Estas correlações evidenciam, de um lado, a relação entre as características obtidas com base em marcadores moleculares e de outro a não relação destas características com as características morfológicas categóricas. Nesse sentido, podemos dizer que existe uma complementaridade das características morfológicas e baseadas no DNA para estudos de diversidade genética. Entretanto, é importante salientar que alguns acessos foram analisados, em seu ambiente natural.

Possivelmente, o ambiente teve uma interferência significativa nas características morfológicas categóricas dos acessos. A utilização somente da análise *in situ* de um acesso é muito arriscada, principalmente quando estão sendo comparados diferentes acessos oriundos de diferentes ambientes. Neste caso, o ambiente pode ter uma forte influência no fenótipo, ou seja, nas expressões das características morfológicas das plantas. O uso de diferentes tipos de características de forma complementar é o melhor caminho para a caracterização de recursos genéticos e estudos de diversidade genética, sendo que o uso de marcadores moleculares do DNA é estratégico por não terem influência do ambiente e permitirem a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos obtidos diretamente do DNA (Faleiro et al., 2011a; 2011b).

4. CONCLUSÕES

Os acessos da coleção de trabalho da Embrapa Cerrados demonstraram proximidade genética. Houve alta variabilidade genética entre acessos das reservas de Águas Emendadas, do Exército, do Colégio Agrícola e de acessos implantados em áreas experimentais de cultivos consorciados. Houve interferência significativa do ambiente nas características morfológicas dos acessos de araticum avaliados. Este resultado ressalta que para os trabalhos de caracterização morfo-agronômica é essencial diminuir os efeitos ambientais nas características e para isso, a montagem de bancos ativos de germoplasma com repetições (progênies ou clones) dos diferentes acessos em diferentes locais assume importância estratégica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. P. de; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 1998. 464p.

BERNARDES, T. G.; ESTRÊLA, C. T.; NAVES, R. V.; REZENDE, C. F. A.; MESQUITA, M. A. M.; PIRES, L. L. Efeito do armazenamento e de fitohormônios na qualidade fisiológica de sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, 2007. v. 37, n. 3, p. 163-168.

BLANCO, A. J. V.; PEREIRA, M. de F.; COELHO, A. S. G.; CHAVES, L. J. Diversidade genética em populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) por meio da análise de seqüências de CpDNA. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, 2007. v. 37, n. 3, p. 169-175.

BRAGA FILHO, J. R.; VELOSO, V. da R. S.; NAVES, R. V.; NASCIMENTO, J. L. do. Danos de *Telemus chapadanus*(Casey 1922) sobre o florescimento do Araticum (*Annonacrassiflora* Mart.) no estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, 2005. v. 35, n. 1, p. 25-29.

BRAGA FILHO, J.R.; VELOSO, V.da.R.S.; NAVES, R.V.; NASCIMENTO, J.L.do.; CHAVES, L.J. Danos causados por insetos em frutos e sementes de araticum (*Annonacrassiflora* Mart., 1841) no cerrado de Goiás. **BioscienceJournal**, Uberlândia, v. 23, n. 4, p. 21-28, 2007.

CAVALCANTE, T. R. M.; NAVES, R. V.; FRANCESCHINELLI, E. V.; SILVA, R. P. Polinização e formação de frutos em araticum. **Bragantia**. Campinas: Bragantia, 2009. Vol. 68 n° 1.ISSN 0006-8705.

CRUZ, C.D. **Programa genes**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001. 648p.

FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R., KARIA, C.T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. (Comunicado Técnico N°92) 6p.

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; MONTEIRO, W. R.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; PIEDRA, A. G.; MOURA, A.D., ARÉVALO-GARDINI, E.; MARQUES, J. R. B.;

GRAMACHO, K.P.; FALEIRO, A. S. G.; SANTOS, M. C. M. Variability in cação accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2004. 4:227-233.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Recursos genéticos: conservação, caracterização e uso**. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JÚNIOR, F. B. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011a. p. 513-551.

FALEIRO, F. G. **Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal**. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JÚNIOR, F. B. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2011b. p. 55-118.

FERREIRA, M. de F.; BANDEIRA, L. F.; BLANCO, A. J. V.; COELHO, A. S. G.; CLAMPF, A. Y. Caracterização genética de populações naturais de *Annona crassiflora* Mart. utilizando marcadores microssatélites. In: Simpósio Nacional Cerrado: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade agronegócio e recursos naturais, 9, Brasília. **Anais...** Brasília, DF. 2008.

GOLIN, V. **Frugivoria e dispersão de sementes de araticum *Annona crassiflora* Mart. por animais em área de cerrado matogrossense**. Cáceres: Universidade do Estado de Mato Grosso, 2008. 62p. (Mestrado em Ciências Ambientais).

INOUE, M. H.; SANTANA, D.C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E.; PEREIRA, M. J. B.; PEREIRA, K. M. Potencial alelopático de *Annona crassiflora*: efeitos sobre plantas daninhas. **Planta daninha**, Viçosa, 2010. vol.28 nº 3, ISSN 0100-8358.

MESQUITA, M. A.M; NAVES, R.V; SOUZA, E. R. B. de; BERNARDES, T. G.; SILVA, L. B. e. Caracterização de ambientes com alta ocorrência natural de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, 2007. v. 29, n. 1, p. 15-19.

PEREIRA, M. F.; BANDEIRA, L. F.; BLANCO, A. J. V.; COELHO, A. S. G.; CIAMPI, A. Y. Caracterização Genética de Populações naturais de *Annona crassiflora* Mart. utilizando marcadores microssatélites. In: IX Simpósio Nacional Cerrado e II Simpósio Internacional Savanas Tropicais, Brasília, **Anais...** Brasília, DF, 2008.

PEREIRA, E. B. C.; PEREIRA, A. V.; MELO, J. T. de; SOUSA-SILVA, J. C.; FALEIRO, F. G. **Quebra de dormência de sementes de araticum**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. 15 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 137)

RESENDE, M. D.V. de. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 975p.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed.). Cerrado: ambiente e flora. Planaltina, DF. Embrapa CPAC, 1998, cap. 3, p. 87-166.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia Alimentos*. v.27 n.1 Campinas Jan./Mar. 2007

SAS INSTITUTE. SAS/STAT user's guide. Version 6, 4th. Ed. Cary, North Caroline, 1989. 846 p.

STATSOFT INC. Statistica for Windows [Computer program manual] Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999.