



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS**

**ROSA MARIA CORDOVIL BENEZAR**

**SISTEMA REPRODUTIVO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES  
NATURAIS DE MURICIZEIROS (*Byrsonima crassifolia* L.-Kunth) NAS SAVANAS DE  
RORAIMA**

**BOA VISTA**  
**2006**

**ROSA MARIA CORDOVIL BENEZAR**

**SISTEMA REPRODUTIVO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES  
NATURAIS DE MURICIZEIROS (*Byrsonima crassifolia* L.-Kunth) NAS SAVANAS DE  
RORAIMA**

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais-PRONAT da Universidade Federal de Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais, com área de concentração Bioprospecção.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Maílson Monteiro do Rêgo

**BOA VISTA**

**2006**

**ROSA MARIA CORDOVIL BENEZAR**

**SISTEMA REPRODUTIVO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES  
NATURAIS DE MURICIZEIROS (*Byrsonima crassifolia* L.-Kunth) NAS SAVANAS DE  
RORAIMA**

Dissertação apresentada como pré-requisito para a conclusão do Curso de Mestrado em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, defendida em 23 de agosto de 2006 e avaliada pela seguinte banca examinadora:

---

Dr. Ricardo Lopes  
EMBRAPA/AM

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elizanilda Ramalho do Rego  
UFRR

---

Prof<sup>º</sup> Dr.: Pablo Amenzaga  
UFRR.

---

Prof<sup>º</sup>.Dr.: Maílson Monteiro do Rêgo  
Orientador/UFRR

Ao Erizaldo, que é em todos os momentos, meu grande estímulo para chegar até aqui e aos meus filhos Zane, Júnior e Vitinho, que sempre contribuíram com muita paciência para a realização deste trabalho. Amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo ao meu **Deus** verdadeiro em tudo e sabedor de todas as coisas e que esteve e está comigo, revelando-me os detalhes de sua magnífica obra ao longo dessa caminhada.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Mailson Monteiro do Rêgo, pela orientação e revisão crítica do texto e confiança no meu trabalho.

A Prof<sup>a</sup> Dr. Elizanilda Ramalho do Rego pelo incentivo e críticas oportunas.

Ao Erizaldo, “João” por ser o maior incentivador dos meus estudos, por ser o paizão da Zane, do Júnior e do “xodó” da família, Vitinho, meu bom companheiro.

Ao Léo, amigão de todas as horas pela mui PACIÊNCIA, troca de idéias e que não mediu esforços em me acompanhar quando necessário, o qual é responsável por todos os registros fotográficos.

Ao Prof<sup>o</sup> Luiz Alberto Pessoni, que mesmo distante, ajudou esclarecer minhas dúvidas e me apoiou com as literaturas.

Aos meus pais adotivos “Benzinha e Moca” que moram no meu coração e que depositaram em mim a confiança de um filho biológico, com amor e dedicação solidificando em mim os valores éticos e morais de uma família.

A amiga especial Mércia Nereida com quem divido parte da minha vida nos momentos alegres e principalmente de os momentos conturbados.

As amigas Arlene e Aninha que me acompanharam nos momentos difíceis.

A Márcia Falcão e Raimundo companheiros de profissão e incentivo.

As amigas profissionais Ismênia Andrade e Mônica que confiaram em meu potencial.

Aos colegas de turma que torceram por mim nos momentos difíceis.

À CAPES, CNPq, a FINEP e ao PRONAT, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O presente trabalho analisou o sistema reprodutivo e a diversidade genética entre e dentro três populações naturais de muricizeiros (*Byrsonima crassifolia* L - Kunth) nas savanas de Roraima. Três populações naturais de murici foram avaliadas, Campo experimental da EMBRAPA, Campos Cauamé do Centro de Ciências Agrárias da UFRR e Bom Intento. Para caracterizar o sistema reprodutivo, foi montados experimentos com 05 tratamentos: auto-polinização espontânea, auto-polinização induzida, geitonogamia, polinização natural e xenogamia. A diversidade genética foi acessada por caracteres morfológicos e via marcador molecular RAPD. Os resultados mostram que o muricizeiro apresenta antese diurna com duração de até dez horas e o sistema reprodutivo mostraram diferenças significativas entre os tratamentos. O tratamento de polinização natural foi o que produziu maior quantidade de frutos (85%) diferenciando-se dos demais. A auto-polinização espontânea (5%) diferiu significativamente de geitonogamia (40%) e xenogamia (35%) embora os dois últimos tratamentos não difiram entre si. Não houve diferença significativa entre auto-polinização espontânea e auto polinização induzida, entretanto existiram diferenças significativas entre auto polinização espontânea e geitonogamia. Com relação à biometria dos frutos houve significancia entre os indivíduos avaliados para as duas características, indicando alta variabilidade genética nas populações avaliadas, formando cinco grupos distintos na população do Cauamé. Na análise da diversidade genética entre e dentro populações com base no marcador molecular, três primers foram eficientes em discriminar as três populações e demonstrar a grande diversidade genética que há tanto dentro como entre as populações. Dos oito primers utilizados o FUS-1 foi o mais polimorfico.

Palavras chaves: *Byrsonima*, diversidade, savana, incompatibilidade, RAPD.

## ABSTRACT

The present work analyzed the reproductive system and the genetic diversity inside and among three natural populations of murici (*Byrsonima crassifolia* L - Kunth) in the savannahs of Roraima. Three natural populations of murici were evaluated in experimental Field of the EMBRAPA, Cauamé Fields of the Scientific Center of Agrarian (CCA) of the UFRR and Bom Intento. To characterize the reproductive system, 05 experiments, were carried out: spontaneous self-pollination, induced self-pollination, geitonogamy, natural and xenogamy pollination. The genetic diversity was accessed by morphologic characters and by molecular marker RAPD. The results showed that the muricizeiro presents anthesis diurna which lasts up to ten hours and the reproductive system showed significant differences between the treatments. The treatment of natural pollination produced a higher amount of fruits (85%) distinguishing from the others. Spontaneous self-pollination (5%) differed significantly from geitonogamy (40%) and xenogamy (35%) although the two last treatments have no difference between themselves. There was no significant difference between spontaneous self-pollination and auto-induced pollination, however there were significant differences between auto-spontaneous and geitonogamy pollination. With reference to the biometry of the fruits there were significant differences between the types evaluated for the two characteristics, indicating high genetic variability in the evaluated populations and forming five distinct groups in the population of Cauamé. In the analysis of the genetic diversity among and inside populations based on molecular marker, three primers were efficient in discriminating the three populations and demonstrating the great genetic diversity inside and among the populations. The eight primers used FUS-1 was the most polymorphic.

Key words: *Byrsonima*, diversity, savannah, incompatibility, RAPD

## LISTA DE FIGURAS

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| FIGURA 1- | A: área experimental da Embrapa-água boa área I;<br>B: área do Centro de Ciências Agrícolas da UFRR área II.....   | 27 |
|           | C: área de propriedade particular do Sr. Paulo César<br>Barcelar área III.....   | 28 |
| FIGURA 2- | Protocolo utilizado na extração de DNA de muricizeiro.....   | 31 |
| FIGURA 3- | Gel de agarose para verificar a concentração de DNA nas populações<br>estudadas. A numeração corresponde a planta em campo.....  | 32 |
| FIGURA 4- | A: arbusto de <i>B. crassifolia</i> em ambiente de savana;<br>B: flor de <i>B. crassifolia</i> em corte: observar as anteras e<br>estiletos.....   | 37 |
| FIGURA 5- | Inflorescência do tipo racemo terminal.....  | 38 |
| FIGURA 6- | Frutos de <i>B. crassifolia</i> .....  | 41 |
| FIGURA 7- | Perfil eletroforético de DNA obtido com o primer FUS1 para 7<br>indivíduos. Da esquerda para a direita: M-DNA marcador de peso<br>molecular, e a numeração corresponde ao indivíduos de muricizeiro<br><i>Byrsonima crassifolia</i> .....                                  | 50 |
| FIGURA 8- | Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir das<br>distâncias genéticas expressas em complemento de Jaccard estimados<br>entre os oito genótipos de muricizeiro e baseado em 29 marcadores.....   | 51 |
| FIGURA 9- | Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir das<br>distâncias genéticas expressas em complemento de Jaccard estimados<br>entre os treze genótipos de muricizeiro e baseado em 43 marcadores<br>RAPD oriundos dos primers FUS 1, FUS 2 e A18, população Caumé..... | 52 |
| FIGURA10- | Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir das<br>distâncias genéticas expressas em complemento de Jaccard estimados<br>entre os oito genótipos de muricizeiro e baseado em 09 marcadores<br>RAPD oriundos do primer FUS 1 população do Bom Intento.....         | 54 |
| FIGURA11- | Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir das<br>distâncias genéticas expressas em complemento de Jaccard estimados<br>entre os vinte e nove genótipos de muricizeiro oriundos dos primers<br>FUS 1, FUS 2 e A18, das três populações .....                     | 55 |

## LISTA DE TABELAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| TABELA 1-  | Localização das áreas de pesquisas e atividades realizadas.....  | 25 |
| TABELA 2-  | Seqüência dos primers e enzima, utilizados no experimento.....   | 33 |
| TABELA 3-  | Características biométricas dos indivíduos de <i>B. crassifolia</i> .....  | 36 |
| TABELA 4-  | Resumo da análise de variância entre os genótipos e as variáveis, comprimento do fruto (CF) e diâmetro do fruto (DF) de <i>B. crassifolia</i> em mm.....   | 41 |
| TABELA 5-  | Comparação das médias entre 15 genótipos de <i>B. crassifolia</i> referente as variáveis comprimento e diâmetro do fruto nas populações do Cauamé e Bom Intento.....   | 42 |
| TABELA 6-  | Contribuição relativa das variáveis comprimento e diâmetro do fruto de muricizeiro <i>B. crassifolia</i> para divergência genética da população Cauamé -área II.....   | 42 |
| TABELA 7-  | Contribuição relativa das variáveis comprimento e diâmetro do fruto de muricizeiro <i>B. crassifolia</i> para divergência genética da população Bom Intento - área III.....  | 43 |
| TABELA 8-  | Agrupamento de 15 genótipos de muricizeiro <i>B. crassifolia</i> utilizando o método de agrupamento de otimizado de Tocher, com base na distância generalizada de Mahalanobis da população do Cauamé área II utilizando características comprimento e diâmetro do fruto.....       | 44 |
| TABELA 9-  | Agrupamento de 15 genótipos de muricizeiro <i>B. crassifolia</i> utilizando o método de agrupamento de otimizado de Tocher, com base na distância generalizada de Mahalanobis da população do Bom Intento-área III utilizando características comprimento e diâmetro do fruto..... | 44 |
| TABELA 10- | Frutificação e valores de qui-quadrado das classes de tratamentos em conjunto, para verificação do sistema reprodutivo de <i>B. crassifolia</i> .....  | 45 |
| TABELA 11- | Frutificação e valores de qui-quadrado para testes de comparação dos tratamentos de avaliação do sistema reprodutivo de <i>B. crassifolia</i> .....  | 45 |
| TABELA 12- | Resultado dos cruzamentos recíprocos dos 18 genótipos de <i>B. crasifolia</i> .....  | 48 |
| TABELA 13  | Matriz de distância genética expressa como complemento aritmético dos Coeficientes de Jaccard, obtidas para oito muricizeiros, baseados em 29 locos polimórficos de marcadores RAPD população Embrapa.....   | 51 |

|  |    |
|--|----|
| TABELA 14- Matriz de distância genéticas expressas como complemento aritmético dos coeficientes Jaccard, obtidas para oito muricizeiros, baseados em 09 locos polimórficos de marcadores RAPD, população Caumé.....          | 52 |
| TABELA 15- Matriz de distância genéticas expressas como complemento aritmético dos coeficientes Jaccard, obtidas para oito muricizeiros, baseados em 09 locos polimórficos de marcadores RAPD, população do Bom Intento..... | 53 |
| TABELA16- Matriz de distância genéticas expressas como complemento aritmético dos coeficientes Jaccard, obtidas para 29 muricizeiros das três populações.....  | 56 |

## SUMARIO

|       |  |    |
|-------|--|----|
|       | RESUMO   |    |
|       | ABSTRACT   |    |
|       | LISTA DE FIGURAS   |    |
|       | LISTA DE TABELAS   |    |
| 1     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 13 |
| 1.1   | Caracterização do Estado de Roraima.....   | 14 |
| 1.2   | Caracterização família Malpighiaceae.....  | 15 |
| 1.3.  | Gênero <i>Byrsonima</i> : importância ecológica e econômica.....                               | 15 |
| 1.4   | Sistema reprodutivo.....   | 18 |
| 1.5   | Auto-incompatibilidade.....  | 19 |
| 1.6   | Marcadores morfológicos.....   | 19 |
| 1.6.1 | Marcadores moleculares.....  | 20 |
| 1.6.2 | Técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase).....   | 21 |
| 1.6.3 | Marcador molecular do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....                        | 22 |
| 2     | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 24 |
| 2.1   | Objetivo geral.....  | 24 |
| 2.2   | Objetivos específicos.....   | 24 |
| 3     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 25 |
| 3.2   | Caracterização morfométrica da planta.....   | 26 |
| 3.3   | Sistema Reprodutivo.....   | 26 |
| 3.3.1 | Cruzamentos recíprocos.....  | 29 |
| 3.4   | Análise genética por meio de marcador RAPD.....  | 29 |
| 3.4.1 | Coleta de material vegetal.....  | 29 |
| 3.4.2 | Extração do DNA.....   | 30 |
| 3.4.3 | Determinação da concentração do DNA genômico.....  | 32 |
| 3.4.4 | Padronização do DNA para PCR.....  | 33 |
| 3.4.5 | Reação com o oligonucleotídeo iniciador arbitrário.....  | 33 |
| 3.4.6 | Visualização das bandas.....   | 33 |
| 3.5   | Análise dos dados moleculares.....   | 34 |
| 3.5.1 | Análise de agrupamento pelo método das ligações medias entre pares não ponderados (UPGMA)..... | 34 |
| 3.5.2 | Elaboração do dendrograma .....  | 34 |
| 4     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 36 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.1   | Caracterização morfométricas da planta .....  | 36 |
| 4.2   | Biometria do fruto <i>B.crassifolia</i> .....   | 40 |
| 4.3   | Sistema reprodutivo.....  | 44 |
| 4.3.1 | Cruzamentos recíprocos.....   | 47 |
| 4.4   | Análise diversidade genética entre e dentro de populações de muricizeiro<br>( <i>Byrsonima crassifolia</i> ) por meio de marcador RAPD..... | 49 |
| 4.4.1 | População da Embrapa (área I).....  | 49 |
| 4.4.2 | População do Cauame (Área II).....  | 51 |
| 4.4.3 | População do Bom Intento (área III).....  | 53 |
| 4.4.4 | Diversidade genética entre as populações do Embrapa (área I), Bom Intento (área II) e<br>Cauame (área III).....                             | 54 |
| 5     | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | 57 |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 58 |

## 1 Introdução

O equilíbrio do ecossistema depende de uma série de inter-relações principalmente planta-animal. Entretanto, atividades resultantes da ação humana são freqüentes ameaças para diversidade biológica que está deteriorando, quando se considera o aumento na taxa de extinção das espécies. Entre essas atividades está o uso do fogo, atividade agrícola, exploração madeireira, que invadem extensas áreas com riqueza de flora, levando ao desequilíbrio dos ecossistemas e conseqüente erosão genética (EHRlich 1997; PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A região Amazônica concentra ampla diversidade de espécies de grande importância econômica. A enorme variabilidade genética existente nas populações naturais de espécies frutíferas regionais é importante para programas de melhoramento vegetal visando resistência a doenças e pragas (SOUSA, 1996; PAIVA, 1998; ALMEIDA et al., 2004 FEITAS; OLIVEIRA, 2005).

O tipo de polinização, a distribuição geográfica e outras características são alguns dos requisitos para determinar a diversidade de espécies de um ambiente. A auto-incompatibilidade, que freqüentemente ocorre entre as espécies, é um mecanismo que evita a autofecundação e favorece o cruzamento e troca de genes entre as plantas da mesma espécie. Por outro lado, espécies que possuem sistema reprodutivo que favorece o cruzamento entre plantas podem apresentar certo grau de endogamia, se o cruzamento ocorrer entre plantas com um ancestral comum. Os polinizadores são importantes colaboradores de sistemas reprodutivos adaptados a ambientes freqüentemente perturbados, promovendo autopolinização e/ou polinização cruzada tendo em vista que muitas plantas sobreviveram à pressão seletiva, evoluindo concomitantemente com os polinizadores em um processo chamado de co-evolução (VOGEL, 1990; DAFNI, 1992; LÜTTGE, 1997; BARROS, 2002).

Observações de caracteres fenotípicos, utilizados como marcadores morfológicos são freqüentemente utilizados para agrupar e relacionar os indivíduos, baseando-se em caracteres semelhantes: altura da planta, forma da folha etc. Essas observações fazem parte dos métodos tradicionais, são interessantes devido fornecem idéias da relação genótipo x fenótipo. Entretanto, hoje estão disponíveis diversas técnicas de biologia molecular que detectam a variabilidade genética de forma mais rápida e com maior segurança, pois acessam diretamente o genoma (AZEVEDO et al., 2003; BENEZAR, 2004).

Essas técnicas permitem a obtenção de um número considerado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma dos indivíduos em estudo. Esses marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de genética como nos programas de melhoramento assistidos (SOUZA, 2001).

São técnicas eficientes baseadas em PCR (reação em cadeia de polimerase) e constantemente são aprimoradas acompanhadas de métodos estatísticos que permitem a manipulação de grandes quantidades de dados. Por meio desses dados é possível estreitar os laços de parentesco entre indivíduos de populações distantes e ainda fornecer parâmetros que auxiliam o pesquisador a buscar informações de genes de interesse agrônômico (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1995; SOUZA, 2001; AZEVEDO et al., 2003).

### **1.1 Caracterização do Estado de Roraima**

O Estado de Roraima está situado no extremo setentrional do Brasil entre as coordenadas aproximadas de 5° 16' N e 1° 25' S e 58° 55' W e 64 48' W, possui uma área física de 225.1161 km<sup>2</sup> (IBGE *apud* BARBOSA et al., 2005). Barbosa et al., (2005) comentam que parte do seu território, 44.000 Km<sup>2</sup> está coberto pela maior área contínua de savana do Bioma Amazônia, as florestas cobrem cerca de 170.000 Km<sup>2</sup> e o restante possuem florestas de transição (SILVA; REBOUÇAS, 1998). O clima predominante na região é o tropical sazonal - Aw, na classificação de Köppen, com nítida estação seca e precipitação média anual é de 1.614mm/ano, sendo que a maior concentração das chuvas (58%) ocorre entre os meses de maio e julho e a menor (9%), entre os meses de dezembro e março (BARBOSA, 1997). As médias anuais de temperatura e umidade relativa são, respectivamente, 27,4°C e 76%, (EMBRAPA *apud* BARBOSA, 1997). O solo é de constituição arenosa e argilo-arenosos (VALE JÚNIOR, 1999).

As savanas de Roraima encontram-se isoladas das grandes formações abertas do Brasil Central. Possui savanas variando de gramíneas até estépica arborizada (BARBOSA et al., 2005).

Brasil (1975) considera o termo savana como sinônimo ecológico de cerrado comparando as savanas de Roraima com os demais sistemas de vegetação abertas brasileiros.

Segundo Schmidt et al., (2005) esse ambiente apresenta um mosaico de formações vegetais que variam quanto a composição florística, a densidade e a altura da cobertura vegetal. Diversos fatores atuam como determinantes da estrutura e composição florística do

cerrado entre eles o estresse hídrico a profundidade do solo e o fogo (BARBOSA; FEARNSSIDE, 2004).

## **1.2 Caracterização família Malpighiaceae**

A família Malpighiaceae é representada por 63 gêneros e 1.100 espécies, distribuídas largamente nas regiões tropicais. Constitui-se de árvores, arbustos e lianas (ANDERSON, 1990; MABBERLEY, 1993). Apresentam folhas inteiras opostas, geralmente pilosas e com estípulas, flores vistosas de coloração em geral amarela ou rosada, cíclicas, hermafroditas, reunidas em inflorescências paniculadas nas axilas superiores ou terminais. O cálice apresenta como característica dez glândulas grandes (elaióforos) localizadas na base externa das sépalas, duas em cada sépala (BARROSO, 1991; SIGRIST; SAZIMA, 2004).

Segundo Ramalho; Silva (2002) as malpighiáceas são a principal família produtora de óleos florais e atribui a Vogel, a descoberta da relação entre as flores das malpighiáceas e as abelhas. Esse modo de polinização é bem distribuído nos trópicos resultando no sucesso das malpighiáceas.

## **1.3 Gênero *Byrsonima*: importância ecológica e econômica**

O gênero *Byrsonima* conta com cerca de 150 espécies (MABBERLEY, 1993) e está distribuído nos campos cerrados e suas espécies são frequentemente conhecidas entre outros como: murici, murici-vermelho, murici-cascudo e são de ampla distribuição em todas as savanas neotropicais (MIRANDA; ABSY, 1997; SANNOMIYA et al., 2004).

A maioria dos muricizeiros ou grande parte deles ocorrem espontaneamente em praticamente toda a Amazônia e apresentam portes variados: arbustivo, arbóreo e lianas. Cavalcante (1991); Ledo (1996) sugerem que esse bioma Amazônico seja o centro de origem e dispersão das espécies do gênero.

Gusmão et al., (2006) analisaram os frutos de *B. verbascifolia* que são fonte de renda para as famílias de comunidade rural do norte de Minas Gerais, verificaram que os mesmos apresentam correlação positiva entre a massa de matéria fresca e o tamanho do fruto sendo que os frutos maiores são os mais ricos em polpa indicando alto potencial genético para conservação de germoplasmas. Estudos sobre biologia floral e sistemas reprodutivos das espécies do gênero, foram realizados por Albuquerque; Rêgo (1989); Silva (1990); Barros (1992); Bergamin (1998); Teixeira; Machado (2000); Oliveira; Gibbs (2000). O estudo da

biologia floral e sistema reprodutivo são de extrema importância no entendimento da cadeia de eventos fenológicos e seus respectivos sinalizadores (ALMEIDA, 1998; SCHIMIDT et al., 2005).

A morfologia floral e o tipo de reprodução do ponto de vista evolutivo oferecem relevantes vantagens para a espécie, já que através dos atributos utilizados o indivíduo de determinada espécie poderá “combinar” o seu genótipo com o de outros indivíduos. Essa variabilidade dá à população o potencial de se adaptar ao meio, permitindo assim, sua sobrevivência (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; BARROS, 2002).

Souza (1996), comenta que o estudo da biologia reprodutiva contribui muito para o manejo e conservação do germoplasma de determinadas espécies. O tipo de inflorescência, o número de estames por flores e folhas são partes constituintes de um todo, que influenciam no esquema de seleção, pois estão relacionados também com a produtividade da planta (BRANDÃO, 1991; PINHEIRO et al., 1993).

Teixeira; Machado (2000) estudaram indivíduos *Byrsonima sericea* com e sem elaióforos e verificaram que as mesmas são visitadas frequentemente pelos mesmos polinizadores mesmo que por engano. Associação das flores oleíferas com o grupo das abelhas Centridini foram estudadas por Ramalho; Silva (2002) em uma região de restinga na Bahia. Segundo esses autores as *Centridini* são adaptadas para a coleta do óleo produzido por *B. sericea*. A partir de método estatístico utilizando a média do número de flores/inflorescências, os autores concluíram que, 65 indivíduos são suficientes para produzir cerca de 5,5 a 7,5 litros de óleo por hectare.

Vinson et al., (1997), fizeram análise química do óleo produzido por *Byrsonima crassifolia* (L.) – Kunth, em uma reserva biológica da Costa Rica, verificaram que as *Centris* coletam óleo de coloração amarelo claro das glândulas. Do óleo contido nas células das abelhas 98% são misturas de ácidos graxos. O estudo desses autores mostra a importância da produção das flores de *B. crassifolia*, para o desenvolvimento nutricional das larvas de *Centris*, pois elas são dependentes tanto do carboidrato produzido pelo pólen quanto do óleo vegetal (sendo este mais energético), evidenciando a estreita relação entre os mesmos.

*Byrsonima crassifolia* (L.) – Kunth, também foi estudada aqui no Brasil no estado do Maranhão por Albuquerque; Rêgo (1989) e ainda Pereira; Freitas (2002), no estado do Ceará. No Maranhão os autores observaram que as flores amarelas dessas plantas, são utilizadas como fonte de alimento durante todo ano por seus respectivos polinizadores predominantemente abelhas do gênero *Centris*, que coletam e utilizam o óleo como fonte de

alimentação e no Ceará os autores acompanharam o desenvolvimento da biologia floral (OLIVEIRA; PIE, 1998).

Segundo Albuquerque; Rêgo (1989) as flores apresentam sinais de senescência no segundo dia com a mudança progressiva na coloração: de amarelo para alaranjado e finalmente vermelho. Todo esse processo estende-se por cinco dias com a queda das pétalas ressecamento das anteras e elaióforos (Pereira; Freitas, 2002). As flores de *B. crassifolia*, segundo Albuquerque; Rêgo (1989) são frequentemente visitadas por *Centridini*, e *Trigoni*, entre outras espécies de abelhas. Essas abelhas pousam sobre as flores e com o auxílio das mandíbulas se prendem no estandarte encostando o abdômen nos estames e estigmas da flor. Com os dois pares de pernas promovem a fricção das glândulas de óleos que são rompidas e imediatamente coletadas e reservadas em escopas das pernas posteriores.

As abelhas da família *Anthophoridae* principalmente as espécies do gênero *Centridini*, segundo Vogel, (1990) são adaptadas para a coleta de óleo. As visitas podem ocorrer para coletar óleo e/ou pólen. Teixeira; Machado (2000); Benezar; Pessoni, (2006) verificaram comportamento semelhante dessas abelhas nas visitas realizadas em *B. coccolobifolia* e *B. sericea* indicando que essas abelhas exercem papel importante na polinização das espécies desse gênero. Segundo Ramalho; Silva (2002), essas abelhas tem tamanho corporal ideal para a morfologia das flores de *Byrsonima*, chegando a visitar até seis flores por inflorescência em *B. cericea* (OLIVEIRA; BRANDÃO, 1991; OLIVEIRA, 1998).

Nas regiões do Brasil, onde *Byrsonima crassifolia* é encontrada, devido às variações de tamanho e a coloração dos frutos, diferentes denominações são atribuídas à espécie: murici-amarelo, murici-branco, murici-da-mata ou murici-do-campo.

Em análise feita por espectrofotometria de massa dos componentes dos frutos de *B. crassifolia*, oriundos do Ceará, foram encontrados 46 componentes, que somados dão o cheiro característico do fruto (VAZQUES et al., 1999; ALVES; FRANCO, 2003).

A importância econômica dessa espécie deve-se à madeira, utilizada como lenha e na construção civil; os frutos, são ricos em vitamina C e a polpa, pode ser consumida *in natura*, na forma de sorvetes, geléias, ou como medicinal, principalmente para as doenças respiratórias, no combate a febre, bronquites e como laxantes (ALBUQUERQUE; RÊGO, 1989; ALMEIDA, 1998; MIRANDA, 1998; SANNOMIYA, 2004).

*B. crassifolia* é uma planta de cerrado e está sujeita às constantes ameaças, principalmente aquelas resultantes das atividades antrópicas como: construção de estradas, aração, drenagem e outras que levam a perda da biodiversidade local, pois fragmentam ou mesmo destroem os habitats de espécies da região. Essas ações além de descaracterizar o

ambiente, ainda abrem espaços para a introdução de espécies exóticas (EHRlich 1997; PRIMACK; PEREIRA, 2001). Segundo Benezar (2004), atividades como essas são freqüentes nas savanas do estado de Roraima ameaçando *B. crassifolia* que apresenta alta variabilidade genética. O autor sugere a criação de Unidades de Conservação como modo de prevenção desta e de outras espécies desse rico bioma.

#### **1.4 Sistema reprodutivo**

Segundo Dafni (1992), os vários sistemas sexuais implicam diferentemente na emissão de flores, interferem no mecanismo de polinização e comportamento do polinizador. Ainda segundo este autor o sistema reprodutivo de um táxon pode ser refletido na estrutura floral implicando diretamente na atratividade de polinizadores (atributo e recompensa). (ZAPATA; ARROYO, 1978; SOUSA, 1996; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; BARROS, 2002)

Existem alguns meios de reprodução sexuada, por exemplo, a autopolinização (transporte do grão de pólen das anteras ao estigma da própria flor ou mesmo de flores diferentes do mesmo indivíduo – geitonogamia) , são meios de formar novos indivíduos, que até certo ponto trazem vantagens para a espécie, como uma boa representação em ambientes perturbados pelo homem. A xenogamia (polinização cruzada ou alogamia), do ponto de vista evolutivo oferece relevantes vantagens para a espécie, já que através desse meio de reprodução a espécie terá a oportunidade de recombinar o seu genótipo com de outros indivíduos. Essa variabilidade na população proporciona meios de adaptação (SCARIOT et al., 1991; DAFNI, 1992; VALOIS, 1996; ART, 1998).

As pesquisas em relação ao sistema reprodutivo indicam que o gênero *Byrsonima* apresenta os três tipos de sistema: autogâmico, alogâmico e misto (BARROS, 1992; BENEZAR; PESSONI, 2006). Segundo Scariot et al., (1991), plantas que apresentam sistema misto, garantem um alto nível de adaptabilidade da população às condições vigentes do ambiente, proporcionado pela autofecundação, associado à manutenção de elevado potencial evolutivo através da recombinação de alelos, capacitando a espécie para a colonização de novas e extensas áreas.

### 1.5 Auto incompatibilidade

A auto-incompatibilidade de plantas ocorre quando esta, não aceita ser fertilizada com o próprio pólen ou pólen de outra planta com alelos idênticos, favorecendo a alogamia. O fato da planta não aceitar o próprio pólen se deve a condições fisiológicas com base genética e tornou-se motivo de atenção por pesquisadores da área de melhoramento. Identificar e entender os processos moleculares e celulares que levam o reconhecimento e a rejeição do pólen auto incompatível, inclusive a identificação, localização e seqüenciamento das proteínas e genes envolvidos tornou-se motivo de freqüentes pesquisas (WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002).

Segundo Nettancourt (1977), a auto-incompatibilidade genética é controlada por um único *locus* multialélico o *locus-S*. A auto-incompatibilidade com base na morfologia floral classifica-se em: homomórfico e o heteromórfico. Nas plantas homomórficas não há diferença de morfologia floral, porém a auto-incompatibilidade pode ocorrer por um mecanismo que impede o crescimento do tubo polínico antes de fertilizar o óvulo o que pode ser atribuído a único *locus*. As espécies com auto-incompatibilidade heteromórfica produzem flores com diferente morfologia floral relacionadas a estilete e antera. (*locus-S*). (DAFNI 1992; RÊGO 1997a; WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002).

Segundo Rêgo (1997a) a auto-incompatibilidade quando homomórfica subdividi-se em: gametofítica e esporofítica. Na gametofítica a incompatibilidade reside no alelo S do genoma haplóide do grão de pólen e na esporofítica a especificidade é gerada pela constituição do esporófito do qual o pólen foi originado, ou seja, no genótipo da planta mãe. A auto-incompatibilidade surgiu antes da divergência evolutiva e apresenta ampla distribuição entre as angiospermas e a auto incompatibilidade gametofítica parece ser a mais freqüente (WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002).

### 1.6 Marcadores morfológicos

Os marcadores morfológicos são caracterizados pelo fenótipo que expressam. Esses marcadores são baseados em caracteres geralmente fácil de serem visualizados como o nanismo, cor da pétala, do fruto entre outros. (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; RÊGO, 1997a; REGO, 1997b). Segundo Almeida (1997); Carvalho et al., (2003), o conhecimento desses caracteres nos permite acessar a diversidade genética entre grupos de genitores

importantes no melhoramento, principalmente na identificação de combinações híbridas de maior efeito heterótico.

As pesquisas têm constatado ampla diversidade de várias espécies de plantas quanto a: eficiência nutricional, resistência a pragas. Essa diversidade é decorrente de uma série de mecanismos fisiológicos, morfológicos e bioquímicos desenvolvidos pelas plantas quando submetidas a condições adversas (MOURA et al., 1999; CARVALHO et al., 2003). CROXFORD, et al., 2006) comentam que os melhoristas de plantas têm tradicionalmente selecionado variabilidade com base no fenótipo. Os marcadores fenotípicos apresentam limitações no pouco número de *locus* ligados a genes de importância econômica. Selecionar essas características apresentam certos inconvenientes, tendo em vista que o seu embasamento muda de acordo com o ambiente. Uma forma de evitar esse problema é selecionar indivíduos superiores com base no genótipo, pois este é independente do ambiente e não muda durante o ciclo de vida do indivíduo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; MILACH, 1998).

### **1.6.1 Marcadores moleculares**

Com o desenvolvimento de técnicas modernas da biologia molecular, hoje é possível acessar diretamente o DNA dos indivíduos utilizando-se de marcadores moleculares. Esses marcadores apresentam relevantes vantagens em relação aos marcadores morfológicos como, por exemplo, o alto nível de polimorfismo, são neutros em relação ao fenótipo e contêm um maior número de informação genética por loco. Marcadores moleculares são definidos como sendo qualquer fenótipo molecular que diferenciam dois ou mais indivíduos e tem-se transformado em ferramentas importantes no estudo e avaliação genética de populações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; ABREU, 1998).

Hilsdorf; Krienger, (1998); comentam que, entre outros estudos, os marcadores moleculares podem ser usados na identificação de espécies e híbridos, determinação da estrutura populacional de uma espécie e variação genética em populações selvagens e cultivadas.

Os marcadores moleculares são freqüentemente utilizados por melhoristas de plantas do mundo inteiro, e está se tornando de fundamental importância no desenvolvimento da agricultura (MORAIS; RANGEL, 1997; MILACH, 1998; DORNELAS, 2000). O aumento na eficiência da seleção, o melhor conhecimento e caracterização do germoplasma e a maximização dos ganhos genéticos tem sido objetivos dos cientistas agrícolas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; GRIFFITHS, 2001). Para chegar a estes objetivos os melhoristas

têm buscado incessantemente novas metodologias para acessar essas informações genômicas como marcadores de DNA.

Marcadores moleculares em nível de DNA, disponíveis hoje no mercado, se diferenciam pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade genética, e, assim, variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre os indivíduos. Custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade são requisitos que devem ser levados em consideração quando se opta por um dos tipos de marcadores. Os marcadores podem ser classificados em dois grupos, dependendo da metodologia utilizada para identificá-los: hibridação ou amplificação de DNA como, por exemplo, o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (MAGALHÃES; SUGANUMA; CIAMPI, 2003; AZEVEDO et al., 2003).

### **1.6.2 Técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)**

A PCR é uma técnica que foi desenvolvida por Kaly Mullis na década de 80 (MULLIS; FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1985 *apud* FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995), e causou grande revolução na biologia, pois proporcionou o entendimento dos processos biológicos fundamentais envolvendo diagnósticos e o melhoramento de plantas e animais domésticos.

É uma técnica que oferece rapidez, versatilidade e alta sensibilidade tornando-se importantíssima nos estudos genéticos moleculares envolvendo grande número de indivíduos. Devido sua extrema sensibilidade a partir desta técnica um único fragmento de DNA pode ser amplificado de forma exponencial (AZEVEDO et al., 2003).

Segundo Ferreira; Grattapaglia, (1995); Azevedo et al., (2003), o princípio da PCR envolve três etapas básicas para que ocorra a reação de síntese de qualquer DNA. Essas etapas são desenvolvidas repetidas vezes em ciclos que incluem:

- 1-desnaturação térmica do DNA molde;
- 2-anelamento de olinonucleotídeos sintéticos;
- 3-polimerização de novas fitas de DNA.

A desnaturação ocorre a partir da elevação da temperatura (92 a 95°C). Uma vez reduzida essa temperatura (35 a 60°C) ocorre o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores chamados de “primers” permitindo a hibridização. Eleva-se novamente a temperatura (72°C) para que a enzima Taq DNA polimerase realize a extensão a partir de cada primers iniciador utilizando cada um dos quatro dNTP como substrato e o DNA a ser aplicado como molde.

Embora hoje seja muito eficiente, a PCR no princípio ficou muito limitada, pois fazia uso de enzima que não suportava altas temperaturas, com o isolamento de enzimas termoestáveis, oriundas de bactérias de fontes termais como o uso de Taq DNA polimerase, esse problema foi solucionado. Um outro fator limitante para o uso da PCR, foi o conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse, obrigando o pesquisador a clonar e seqüenciar. Esse problema técnico foi solucionado na década de 1990, quando se teve a idéia de usar primers mais curtos e de seqüência arbitrária descartando a necessidade de conhecimento prévio da seqüência do DNA (THOMPSON, 1993; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; AZEVEDO et al., 2003).

### **1.6.3 Marcador molecular do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**

Como já comentado no texto a PCR, limitava-se devido requerer o prévio conhecimento da seqüência de DNA em estudo. Com o desenvolvimento de técnicas que faziam uso de seqüências arbitrárias de primers iniciadores, superou-se essa dificuldade (AZEVEDO et al., 2003).

Atualmente existe uma série de técnicas de biologia molecular para detectar a variabilidade genética ao nível de DNA (ERING; SCHUCH, 2003). Uma delas foi desenvolvida por dois grupos de pesquisadores nos Estados Unidos de forma independente na década de 1990, atribuindo à mesma nomes diferentes. Um desses grupos foi o de Williams et al.; que patentearam com o nome de RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), que utiliza seqüência de primers arbitrários um outro grupo, foi o de Wechsh; Mccleand et al.; que atribuíram a mesma técnica o nome de AP-PCR (Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reation), justificando que a seqüência dos primers iniciadores são arbitrárias, porém a reação de amplificação é de segmento específico do genoma do um terceiro grupo também de forma independente desenvolveu o mesmo método com o nome de DAF (Amplification Fingerpring) para detectar diferenças genéticas entre os indivíduos (CAETANO-ANÓLLES, BASSAM; GRESSHOFF et al., 1991).

Os variados nomes atribuídos a essa técnica de primers com seqüência arbitrária não é o ponto mais importante nesse avanço tecnológico, o que importa verdadeiramente foi a facilidade e o impulso proporcionado pela mesma, nos estudos relacionados a indivíduos e populações, pois permitiu abranger espécies antes nunca estudada. Neste trabalho optou-se por utilizar a sigla RAPD. O RAPD permite realizar a análise da estrutura e diversidade genética

de populações naturais, a construção de mapas genéticos e o uso de um único primer com seqüência arbitrária não sendo necessário o conhecimento prévio do genoma em estudo.

O marcador RAPD possui as vantagens de ser rápido, simples e eficiente, gerando grande quantidade de polimorfismo. Utiliza pouca quantidade de DNA para a análise genotípica e o custo da técnica são baixos em relação a outros tipos de marcadores. Suas desvantagens é ser um marcador dominante, não permitindo distinguir se o indivíduo é homozigoto ou heterozigoto e o baixo teor de informação por loco (BARBOSA-NETO e BERED,1998 *apud* MILACH, 1998; CARLINI-GARCIA et al., 2001; AZEVEDO et al., 2003).

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Com base no que foi exposto verifica-se a importância do conhecimento das plantas no seu habitat natural e ainda a necessidade de se avaliar a diversidade genética contribuindo para a conservação desses importantes recursos fitogenéticos. Portanto esse trabalho se propõe a estudar o sistema reprodutivo e a diversidade genética de diferentes populações de muricizeiros nativos do Estado de Roraima.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Estudar a biologia floral e fazer análises biometricas dos frutos de plantas nativas;
- Determinar o sistema reprodutivo da espécie;
- Verificar se há auto-incompatibilidade na espécie;
- Quantificar a variabilidade genética existente entre e dentro de populações por meio de marcador RAPD.

### 3 Material e métodos

#### 3.1 Caracterização das áreas de estudo

As observações de campo e coleta de material vegetal foram realizadas em três áreas distintas I, II, III (tabela 1 e figuras 1A; 1B; 1C) A área I, pertence a Embrapa, região da água boa, a área II Centro de Ciências Agrárias pertencente à Universidade Federal de Roraima-UFRR, e a área III é de propriedade do senhor Paulo César Barcelar que gentilmente cedeu sua propriedade para esta pesquisa. Todas as áreas são utilizadas como pasto natural para atividades de pecuária extensiva e são cobertas por savana arbórea aberta (campo sujo), descrita por Miranda (1998) como o tipo predominante de savana em Roraima. No Estado, este tipo de formação se caracteriza pela presença de árvores baixas (5 a 7m), espaçadas e de aspecto xeromórfico, associadas com um tapete graminoso contínuo dominado por espécies de *Andropogon* e *Trachypogon* (VELOSO et al., 1975). As espécies lenhosas mais freqüentes do local são *Byrsonima crassifolia* L., *Byrsonima coccolobifolia* Kunth, *Curatella americana* L. e *Bowdichia virgilioides* Kunth (BARBOSA; FEARNSTIDE, 2004).

TABELA 1 - Localização das áreas de pesquisas e atividades realizadas

| Área  | Localização   | Atividades realizadas  |
|---|---|--|
| I – Campo Experimental Água Boa, da Embrapa-Roraima | Km 35 da BR - 174, sentido Boa Vista (RR) – Mucajai (RR)<br>N 2° 39' 30''<br>O 60° 49' 58,6''             | *Biometria de 30 genótipos;<br>*Sistema reprodutivo;<br>*Cruzamentos recíprocos<br>*Extração de DNA. |
| II – Campus Cauamé – UFRR                           | Km 12 da BR - 174, Monte Cristo, sentido Boa Vista (RR) – Venezuela.<br>N 2° 52' 32''<br>O 60° 42' 26,5'' | Biometria de frutos de 15 genótipos;<br>*Extração de DNA.  |
| III – Bom Intento                                   | Km 31 da BR – 174, na região do Bom Intento<br>N 2° 55' 48,9''<br>O 60° 34' 11,2                          | Biometria de frutos de 15 genótipos;<br>*Extração de DNA.  |

### **3.2 Caracterização morfométrica da planta**

Dos indivíduos estudados na área I, foram medidas a altura e maior e menor extensão da copa. Foi verificado o comprimento de 32 inflorescências e o número de botões florais das mesmas em quatro plantas realizando a média aritmética. Foram marcados 32 inflorescência distribuídos em duas plantas para observar a média de variação dos dias da abertura da primeira flor até a última. Foram marcadas ainda 16 flores distribuídas em 3 plantas para verificar a tempo de abertura (antese) e os tamanhos das anteras e estiletos foram medidos com régua milimétrica. Os frutos foram medidos de 15 plantas da área II e 15 plantas da área III com três repetições e aplicado o teste Tukey 1%. A contribuição relativa do comprimento e diâmetro dos frutos para a divergência genética nas áreas de estudo realizou-se o cálculo com base nas médias não padronizadas (SINGH, 1981) e para obter melhores informações relacionadas ao comportamento dessas populações nas áreas II e III com base nessas características, fez-se um agrupamento dos 15 genótipos de cada área de estudo, utilizando o método de agrupamento de otimização de Tocher, com base na matriz distância generalizada de Mahalobis.

Para a altura e comprimento das plantas foram utilizados fita métrica para os frutos utilizou-se paquímetro STARFFR 150\*0,02mm de ajuste manual.

### **3.3 Sistema Reprodutivo**

Para a determinação do sistema reprodutivo foram selecionadas algumas plantas da área I que estavam em estágio de florescimento. Destas foram sorteadas seis plantas em que se pudessem fazer os tratamentos abaixo descritos. Em cada planta foram marcados racemos a com vinte botões florais eliminando-se o restante.



FIGURA 1A - área experimental da Embrapa água boa área I.



FIGURA1B- Centro de Ciências Agrárias-campus CCA. Área II.



FIGURA 1C - propriedade particular do Sr. Paulo César Barcelar área III.

Foram utilizados pinça de ponta fina que freqüentemente foi flambada e hastes com extremidades de algodão. Os racemos que apresentavam botões em pré-antese foram isolados com saquinhos de papel e submetidos ao seguintes tratamentos conforme a metodologia proposta por DAFNI, (1992) com modificações descritas a seguir;

**a) autopolinização espontânea (AE)**

As inflorescências foram apenas isoladas, desde a pré-antese até abertura de todos os botões e a visualização do desenvolvimento dos frutos e/ou murchamento das flores.

**b) auto polinização induzida (AI)**

Após a abertura da flor retirava-se pólen das anteras e esfregava-se sobre a região estigmática da própria flor.

**c) geitonogamia (GT)**

O botão em pré antese foi aberto e emasculado para ser polinizado com pólen de flores doadoras do mesmo indivíduo.

**d) polinização natural (PN)**

As inflorescências foram apenas marcadas com barbante, permanecendo expostas aos visitantes florais.

**e) xenogamia (XG)**

As peças florais do botão receptor e em pré-antese foram abertas com pinça de ponta fina e emasculadas, logo após esfregava-se sobre o estigma receptor o pólen da flor recém-aberta da planta doadora.

**3.3.1 Cruzamentos recíprocos**

Para verificar o comportamento da auto-incompatibilidade foi realizado cruzamentos recíprocos entre 18 indivíduos previamente marcadas. Foram marcados 15 botões para cada tratamento. Esse procedimento foi realizado por meio de cruzamentos recíprocos em cadeia. Esse método descrito por Wallace (1979), e também utilizada por Rêgo (1997a) consiste em cruzar reciprocamente a primeira planta com a segunda e esta com a seguinte e assim sucessivamente até a última planta ser cruzada com a primeira, formando assim uma cadeia.

**3.4 Análise genética por meio de marcador RAPD****3.4.1 Coleta de material vegetal**

Amostras foliares das três populações naturais *B. crassifolia* foram coletadas (37 amostras área I; 30 amostras área II e 30 amostras área III). Cada amostra foi identificada em papel vegetal, envolvida em papel alumínio, reservada em caixa térmica com gelo e transportada para o Laboratório de Biologia Molecular da Biofábrica da UFRR onde foram armazenados em freezer a - 20°C.

### 3.4.2 Extração do DNA

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se a metodologia proposta por Ferreira e Grattapaglia (1995), com modificações (figura 2). Cerca de 200mg de cada amostra foi macerada no cadinho utilizando pistilo (previamente congelados) até formar um pó que foi depositado em tubos de Eppendorf de 1,5  $\mu$ L, os quais receberam identificação individual. Foi adicionado em cada tubo 600  $\mu$ L do tampão de extração. Este material foi levado ao banho-maria a 65°C por 30 minutos, e foram agitados manualmente a cada 5 minutos. Em seguida, o material foi retirado do banho-maria, permanecendo em temperatura ambiente, para que ocorresse o resfriamento do mesmo.

Após o resfriamento, foi adicionado em cada tubo 600  $\mu$ L de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 (v:v), foram agitados manualmente por 5 minutos invertendo-os aproximadamente 20 vezes. Os tubos foram centrifugados a 7.000 rpm durante 5 minutos. Com cuidado os tubos foram retirados da centrífuga e pipetado o sobrenadante que foi colocado em um novo tubo de mesma capacidade; foi adicionado 600  $\mu$ L de isopropanol gelado em cada tubo misturado por inversão dos tubos. Em seguida foi centrifugado a 7.000 rpm durante 15 minutos para a formação do pellet no fundo do tubo. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 300 $\mu$ L de álcool a 70%, para limpeza do pellet, e levou-se novamente o material para ser centrifugado a 7.000rpm por 15 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi descartado. Essa etapa foi repetida com álcool na concentração de 95% e centrifugado por 5 minutos. Descartou-se novamente o sobrenadante e os tubos foram levados à câmara de fluxo laminar por 20 minutos para secagem completa do pellet. Finalizando a etapa de extração do DNA, foi adicionado 100  $\mu$ L de água DDA em cada tubo que foram colocados no freezer a -20°C até o uso.

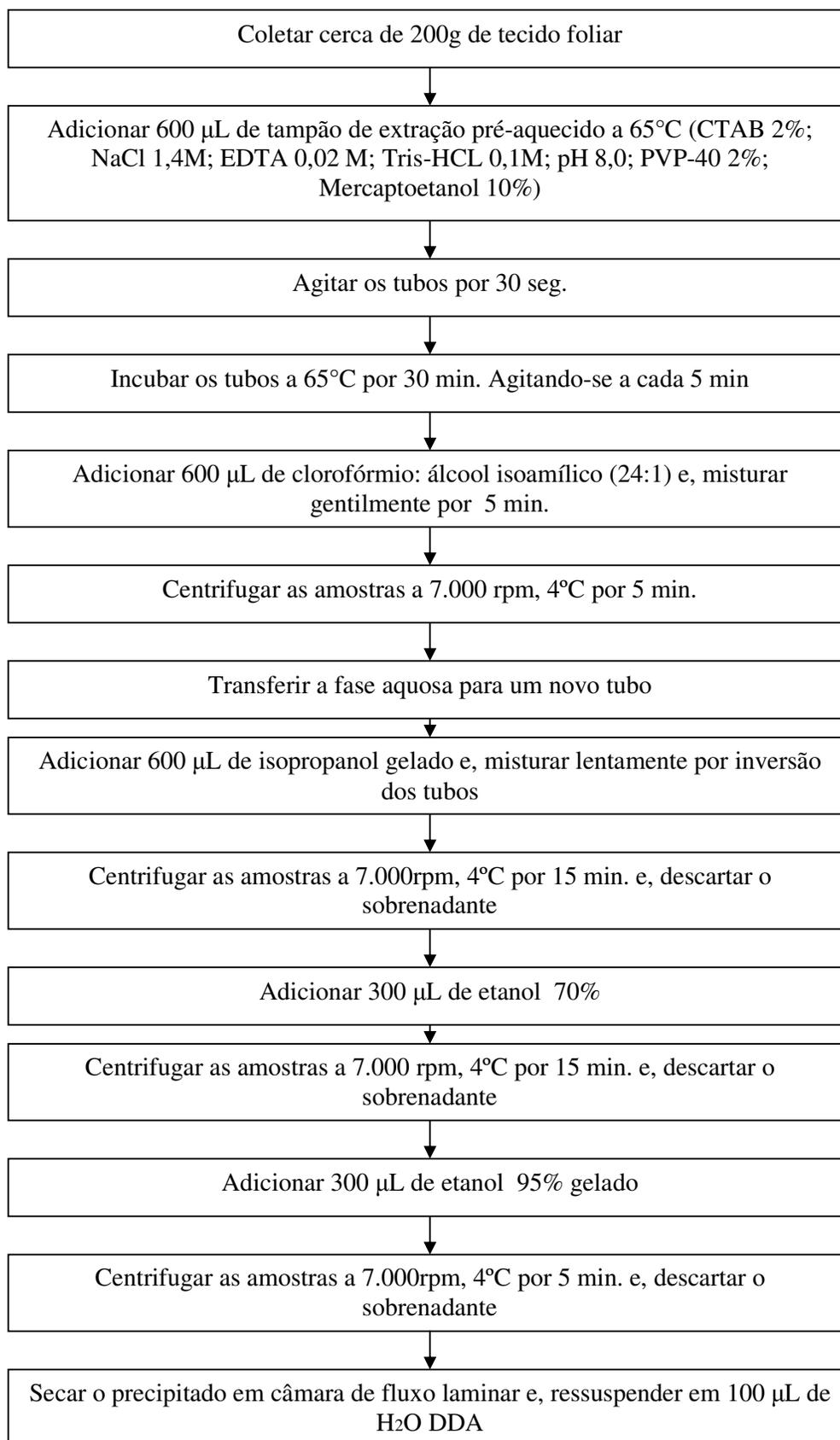


FIGURA 2 - Protocolo utilizado na extração de DNA de muricizeiro.

### 3.4.3 Determinação da concentração do DNA genômico

Para determinação da concentração do DNA genômico, uma alíquota de 2  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 0,8%, utilizando como padrão uma concentração de DNA de 50  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ . Na figura 3 verifica-se o padrão de concentração.

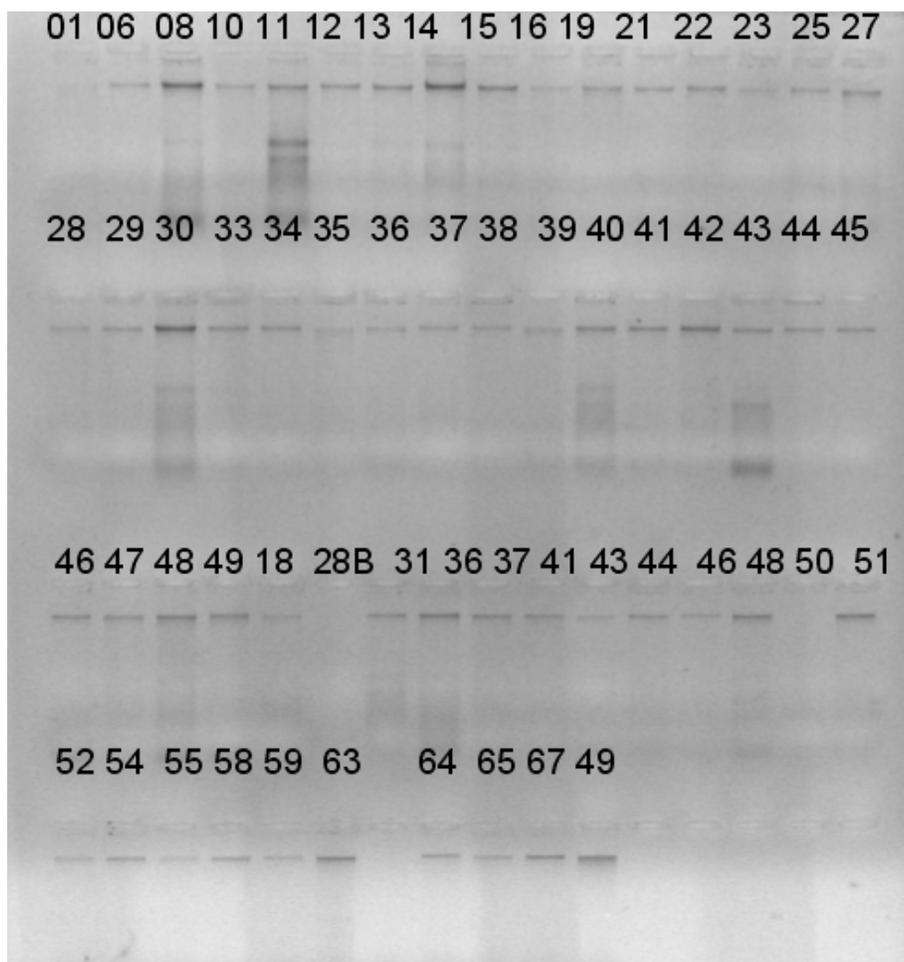


FIGURA 3 - Gel de agarose para verificar a concentração de DNA nas populações estudadas. A numeração corresponde a planta em campo.

### 3.4.4 Padronização do DNA para PCR

Após a determinação da concentração do DNA de cada amostra, foi realizada uma padronização para uma concentração final de  $10 \text{ ng. } \mu\text{L}^{-1}$ , por meio de diluições.

### 3.4.5 Reação com o oligonucleotídeo iniciador arbitrário

Inicialmente, foi preparado o coquetel de reação de PCR de  $30 \mu\text{L}$  com a seguinte composição para cada amostra:  $10,6 \mu\text{L}$  de água (DDA),  $3 \mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  ( $2,5 \text{ mM}$ ),  $3,0 \mu\text{L}$  de tampão  $10\text{X}$ ,  $3 \mu\text{L}$  de dNTP'S ( $25 \text{ mM}$ ),  $5 \mu\text{L}$  de primers ( $25 \text{ pmol}$ ) e  $0,4 \mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase I ( $5 \text{ u.}\mu\text{l.}^{-1}$ ). Em seguida, de cada tubo, foi retirado  $2 \mu\text{L}$  do DNA total e colocado em tubo de PCR. Posteriormente os tubos foram levados ao Termociclador, programado para os seguintes ciclos: dois ciclos ( $94^\circ \text{ C}$  por  $1 \text{ min}$ ;  $36^\circ \text{ C}$  por  $1 \text{ min}$ ;  $72^\circ \text{ C}$  por  $2 \text{ min}$ ) e 33 ciclos ( $94^\circ \text{ C}$  por  $10 \text{ seg}$ ;  $40^\circ \text{ C}$  por  $20 \text{ seg}$ ;  $72^\circ \text{ C}$  por  $2 \text{ min}$ ) e finalmente a  $72^\circ \text{ C}$  por  $5 \text{ min}$ , para polimerização final. Os oito primers (Invitrogen do Brasil), utilizados encontram-se na tabela 2.

TABELA 2 - Seqüência dos primers e enzima, utilizados no experimento

|        |                                       |
|--------|---------------------------------------|
| FUS1   | 5' AGTCAGCCAC 3'                      |
| FUS2   | 5' CGCTGTCCTT 3'                      |
| FUS3   | 5' CTCCGCCA 3'                        |
| FUS4   | 5' GTGCGTATGG 3'                      |
| A17    | 5' GACCGCTTGT3'                       |
| A18    | 5' AGGTGACCGT3'                       |
| D10    | 5' GGTCTACACC3'                       |
| B18    | 5' CCACAGCAGT3'                       |
| Enzima | Taq DNA polimerase-Taq.GEN-Biosystems |

### 3.4.6 Visualização das bandas

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose a  $1,2\%$  em tampão TBE  $1\text{X}$  e corados com brometo de etídio na concentração de  $0,15 \mu\text{L.mL}^{-1}$  em cuba de eletroforese. O gel foi visualizado em transiluminador UV e a imagem foi capturada em sistema de foto documentação com câmera CANON POWERSHOT S70. Neste trabalho os

primer foram considerados polimórficos quando apresentavam 95% de bandas iguais e 5% de bandas diferentes.

### **3.5 Análise dos dados moleculares**

#### **3.5.1 Análise de agrupamento pelo método das ligações medias entre pares não ponderados (UPGMA)**

Adotou-se o software genes para os cálculos (CRUZ, 2001). Como método de análise multivariada utilizou-se a distância de Jacard ( $D = a/(a + b + c$ , onde  $a$  = presença em 1;  $b$  = presença em 2 e  $c$  = presença em 1 e 2) e agrupados através do método hierárquico não ponderado de agrupamento aos pares pela média aritmética (UPGMA). Esse método requer como similaridade entre dois grupos aquela dada pelos dois membros mais parecidos. Assim na matriz de distancia genética  $D = (dik)$  é identificado o par mais próximo (U e V) de acessos que iriam formar o primeiro grupo UV. As distâncias entre UV e qualquer outro grupo W são determinados por:

$$d(UV, W) = (\sum \sum dik) / N_{(UV)} N_w$$

em que:

$dik$ , é a distancia entre o acesso  $i$  no grupo UV e o acesso  $k$  no grupo W;  $N_{(UV)}$  e  $N_w$  são os números de acessos nos grupos UV e W, respectivamente.

Após calcular e identificar a distância entre os pares de acessos mais próximos, formando o primeiro grupo, adota-se o procedimento UPGMA para inclusão de novos acessos no grupo, comparando-se o acréscimo no valor médio da distância dentro do grupo e o nível máximo permitido ( $\alpha$ ) para a distância média intra-grupo seja inferior a qualquer distância inter-grupos.

#### **3.5.2 Elaboração do dendrograma**

O método UPGMA é aglomerativo e hierárquico que parte dos  $n$  acessos separados e os agrupam em conjuntos sucessivos até que na ultima etapa estejam agrupados em um só conjunto, cujo gráfico é o dendrograma. A técnica adota a distância entre dois grupos como a média das distancias entre todos os pares de acessos, sendo que os pares são formados por um acesso de cada grupo. Os acessos são agrupados pela similaridade que é resultante da divergência genética, dada pelo inverso da expressão:

$$DG = (1,0 - S)100$$

Em que: S, é a similaridade entre os pares.

## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Caracterização morfométricas da planta

Na tabela 3 são apresentados os dados biométricos de algumas características dos indivíduos de *B. crassifolia* (figura. 4A) estudados na área I. As plantas apresentam média de altura de 2,56m (n=30) e extensão de copa de 3,23m x 2,68m.

As alturas médias dessas plantas condizem com os relatos feitos por Miranda (1998) quando trabalhou com espécies lenhosas de savana inclusive *B. crassifolia*. Segundo a autora essa espécie, neste ambiente dificilmente, atinge altura superior a três metros.

TABELA 3 - Características biométricas dos indivíduos de *B. crassifolia*.

|                         | <b>Planta<br/>(m)</b>   | <b>Racemo<br/>(cm)</b> | <b>Anteras<br/>(mm)</b> | <b>Estiletos<br/>(mm)</b> |
|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|
| <b>Altura</b>           | 2,56 ± 0,3              | -                      | -                       | -                         |
| <b>Extensão da copa</b> | 3,23 ± 0,9 x 2,68 ± 1,6 | -                      | -                       | -                         |
| <b>Comprimento</b>      | -                       | 14,4 ± 3,6             | 2,5 ± 0,5               | 2,6 ± 0,5                 |
| <b>Nº de botões</b>     |                         | 30,1 ± 9,8             |                         |                           |

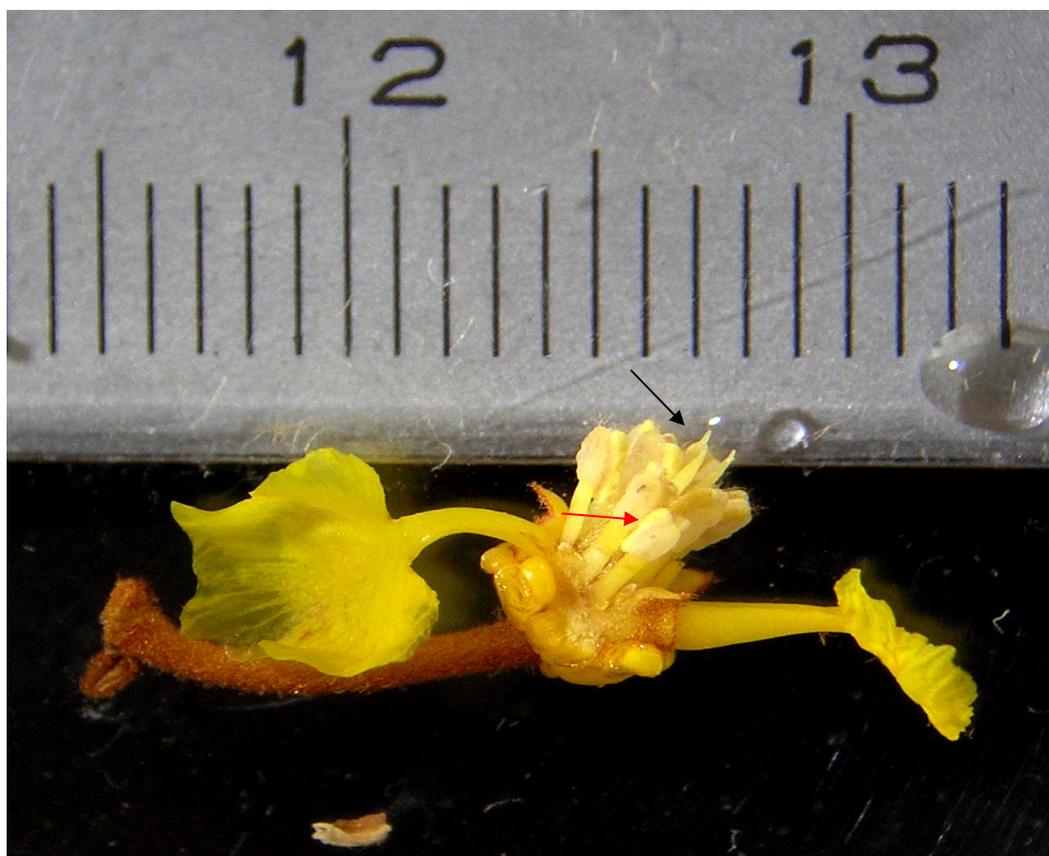


FIGURA 4 -A: arbusto de *B. crassifolia* em ambiente de savana; B: flor de *B. crassifolia* em corte. Observar as anteras  e estilietes 

Albuquerque; Rêgo (1989) quando estudaram *B. crassifolia* no Estado do Maranhão, classificaram-na como sendo de porte arbustivo a sublenhoso com alturas aproximadas de 1 a 3m, apresentando caules ramificados e aparentemente frágeis, características similares aos observados neste estudo. Em ambientes de floresta do nordeste do Brasil, as espécies de *Byrsonima* podem atingir até 20m de altura como *B. sericea* (TEIXERA; MACHADO, 2000).

As inflorescências de *B. crassifolia* são do tipo racemos terminais (figura 5) apresentam comprimentos médios de 14,4cm e em média 30 botões distribuídos ao longo do eixo. O comprimento do racemo de *B. crassifolia* são maiores que os estudados por Pereira; Freitas (2002) que medem cerca de 7-11cm com 32 flores abertas por dia.

Embora sejam maiores, os racemos *B. crassifolia* estudadas nas savanas, apresentam menor número de botões florais, ao contrário de outras espécies como *B. sericea* que são menores, porém com um elevado número de botões (45-55) (TEIXERA; MACHADO, 2000). Essa elevada concentração de botões para *B. sericea* talvez seja reflexo do sistema reprodutivo dessa espécie que se mostra auto-incompatível. *B. crassifolia* também, talvez esteja expressando no número de botões florais a forma como se reproduz nas savanas, pois verificou-se que a mesma se apresenta auto-compatível.



FIGURA 5 - Inflorescência de *B. crassifolia* do tipo racemo terminal.

A abertura de todas as flores de um racemo pode se estender de 15 até 18 dias em média (n=32). Albuquerque; Rêgo (1989) verificaram que esse processo se estende por um período maior, entre 15 e 35 dias, o que talvez se justifique pelo número de botões florais comentados por Pereira; Freitas (2002).

O florescimento das espécies de savanas é provável que esteja associado às questões fisiológicas em resposta às condições do meio, como por exemplo o uso do fogo, que segundo a literatura seja ele de ação natural ou antrópica pode interferir em diversas etapas das plantas inclusive, o florescimento, acelerando esse processo (RIBEIRO; WALTER, 1998; CARDOSO et al., 2000; HERINGER; JACQUES, 2001; SCHMIDT; SAMPAIO; BORGHETTR, 2005). Nas savanas de Roraima é freqüente o uso do fogo para renovação de pastagem (BARBOSA et al., 1997) induzindo a brotações novas e florescimento em espécie *B. coccolobifolia* (WALTER 1998; BENEZAR; PESSONI, 2006).

A média de 15 a 18 dias para total abertura de todos os botões florais de um racemo permite com que os primeiros botões abertos e fecundados já estejam em pleno desenvolvimento e/ou maduros. Neste trabalho foi observada a freqüência dos insetos desde inflorescência até o posterior desenvolvimento dos frutos. Fernandes et al., (2005) estudando *B. crassifolia* verificou que as inflorescências dessa espécie são acompanhadas por até 44 espécies de insetos.

Quanto às flores marcadas (n=16) para verificar o tempo total de abertura, verificou-se que as mesmas gastam um tempo aproximado de até dez horas nesse processo de antese, abrindo diuturnamente e não apresentam odores perceptíveis aos órgãos sensoriais. No trabalho realizado por Pereira; Freitas (2002), a antese de *B. crassifolia* é diurna com picos nas primeiras horas da manhã entre 7:00 e 8:00h, fato que não foi comprovado no presente trabalho.

Benezar; Pessoni, (2006), quando avaliaram *B. coccolobifolia*, nas savanas de Roraima verificaram que esta espécie também desenvolve o processo de antese diuturnamente e com extensão por até doze horas. Teixeira; Machado, (2000), verificaram que *B. sericea* inicia a antese no período diurno principalmente para as flores que recebem os primeiros raios solares.

As flores amarelas de *B. crassifolia* são pentâmeras. Quatro pétalas são côncavas afastam-se totalmente do centro floral enquanto que uma delas apesar de distender-se totalmente não se afasta do centro flor ficando ereta e é chamada de estandarte. As flores são hermafroditas de simetria zigomorfa com dez estames e três estiletos (figura 4B). As anteras em média apresentam 2,6mm de comprimento (n=40) são desce longitudinalmente, e os

estiletos com 2,6mm de comprimento (n=15) ultrapassam levemente o limite das anteras quando a flor esta totalmente aberta.

Portanto as flores de *B. crassifolia* apresentam atributos típicos de síndrome de melitofilia (FAEGRI; VAN DER PIJL, 1979); ALBUQUERQUE; RÊGO 1989; WALTER 1998; BENEZAR; PESSONI, 2006), como zigomorfia, antese diurna e recompensas florais como pólen e óleo. Entretanto, o índice de frutos resultantes de auto-polinização conforme será discutido no decorrer deste trabalho, devem ocorrer com frequência e que as visitas de seus polinizadores podem estar sendo ineficaz ocasionando a geitonogamia.

#### **4.2 Biometria do fruto *B.crassifolia***

Os frutos de *B.crassifolia* são drupáceos (figura 6) e o endocarpo apresenta-se muito rígido. Quando maduros apresentam coloração amarela com superfície aparentando ser um tanto oleaginosa, de consistência macia e succulenta. O resumo da análise de variância dos dados referentes a biometria dos frutos de 30 indivíduos das populações estudadas são apresentados na tabela 4. As características comprimento e diâmetro do fruto, mostraram-se significativas. Com base nas análises das médias foi aplicado o teste Tukey a 1% representadas na tabela 5. Verifica-se que exceto os indivíduos 4, 5, 6, 10 e 14 todos os outros da população do Cauamé (áreaII), mostraram-se altamente diversificado para a variável comprimento do fruto enquanto que o diâmetro do fruto é melhor representado no acesso 1, 2, 5, 6, 8, 9, 10, 11 e 15. Na população do Bom Intento (área III), a diversidade genética para o comprimento do fruto é evidenciada em todos os indivíduos exceto 4, 5, 6, e 14. Gusmão (2006) realizando trabalho semelhante com *B. verbascifolia*, também verificou alta diversidade genética em relação as variáveis estudadas neste trabalho e correlacionou positivamente o tamanho do fruto com a quantidade de polpa características essas que não puderam ser avaliadas devido à baixa frutificação no período de estudo.



FIGURA 6 - Racemo com frutos drupáceos de *B. crassifolia*, Cauamé área II.

TABELA 4- Resumo da análise de variância entre os genótipos e as variáveis, comprimento do fruto (CF) e diâmetro do fruto (DF) de *B. crassifolia* em mm.

|                              |    | Pop. Cauamé<br>Área II |          | Pop.do Bom Intento<br>Área III |          |
|------------------------------|----|------------------------|----------|--------------------------------|----------|
| Quadrado médio das variáveis |    |                        |          |                                |          |
| FV                           | GL | CF                     | DF       | CF                             | DF       |
| Genótipos                    | 14 | 1.0046**               | 1.0623** | 1,0046**                       | 1,0623** |
| Resíduo                      | 30 | 0.1444                 | 0.2035   | 0,1444                         | 0,2035   |
| Total                        | 44 |                        |          |                                |          |
| Média                        |    | 7.3222                 | 8.2955   | 7,3222                         | 8,2955   |
| CV%                          |    | 5.1905                 | 5.4387   | 5,1905                         | 5,4387   |

\*\*significativo a 1%

TABELA 5 – Comparação das médias entre 15 genótipos de *B. crassifolia* referente as variáveis comprimento e diâmetro do fruto nas populações do Cauamé e Bom Intento.

| Genótipos | População Área II - Cauamé |                   | Genótipos | População Área III – Bom Intento |                   |
|-----------|----------------------------|-------------------|-----------|----------------------------------|-------------------|
|           | Comprimento do Fruto (mm)  | Diâmetro do Fruto |           | Comprimento do Fruto (mm)        | Diâmetro do Fruto |
| 1         | 8.3a                       | 9.56a             | 1         | 8.3a                             | 9.56a             |
| 2         | 7.76ab                     | 8.86abc           | 2         | 7.76ab                           | 8.86abc           |
| 3         | 8.46a                      | 7.93bc            | 3         | 8.46a                            | 7.93bc            |
| 4         | 6.8bc                      | 7.63c             | 4         | 6.8bc                            | 7.63c             |
| 5         | 6.8bc                      | 8.43abc           | 5         | 6.8bc                            | 8.43abc           |
| 6         | 6.83bc                     | 8.23abc           | 6         | 6.83bc                           | 8.23abc           |
| 7         | 7.23abc                    | 7.8bc             | 7         | 7.23abc                          | 7.8bc             |
| 8         | 7.16abc                    | 9.3ab             | 8         | 7.16abc                          | 9.3ab             |
| 9         | 7.66abc                    | 8.73abc           | 9         | 7.66abc                          | 8.73abc           |
| 10        | 6.9bc                      | 8.16abc           | 10        | 6.9bc                            | 8.16abc           |
| 11        | 7.23abc                    | 8.33abc           | 11        | 7.23abc                          | 8.33abc           |
| 12        | 7.46abc                    | 7.9bc             | 12        | 7.46abc                          | 7.9bc             |
| 13        | 7.63abc                    | 7.93bc            | 13        | 7.63abc                          | 7.93bc            |
| 14        | 6.33c                      | 7.5c              | 14        | 6.33c                            | 7.5c              |
| 15        | 7.23abc                    | 8.1abc            | 15        | 7.23abc                          | 8.1abc            |

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a 1%

A divergência genética foi avaliada com base nas médias não padronizadas, resultando nas tabela 6 e 7. Analisando a tabela 6, observa-se que o comprimento dos frutos da população do Cauamé (área II), contribui com 48,60% enquanto que o diâmetro com 51,39%, da diversidade. Na população do Bom Intento (área III tabela 7), as contribuições dos caracteres para a diversidade, representam cerca de 60 e 39% respectivamente. Segundo Gusmão (2006), *B. verbascifolia* é uma espécie altamente diversificada em relação ao tamanho dos frutos sugerindo que esses caracteres sejam considerados em programas de melhoramento. Comparando com *B. crassifolia* verifica-se também, essa diversidade. Benezar (2004) trabalhando com *B. crassifolia* nas savanas de Roraima verificou grande diversidade genética para altura e diâmetro de copa entre outras características.

TABELA 6 - Contribuição relativa das variáveis comprimento e diâmetro do fruto de muricizeiro *B. crassifolia* para divergência genética da população Cauamé -área II.

| Variável    | S <sub>j</sub> | VALOR EM % |
|-------------|----------------|------------|
| Comprimento | 70.322223      | 48.60      |
| Diâmetro    | 74.362222      | 51.39      |

Cálculo feito com médias não padronizadas – SINGH (1981)

TABELA 7 – Contribuição relativa das variáveis comprimento e diâmetro do fruto de muricizeiro *B. crassifolia* para divergência genética da população Bom Intento - área III.

| Variável    | S.j        | VALOR EM % |
|-------------|------------|------------|
| Comprimento | 734.699402 | 60.36      |
| Diâmetro    | 482.442037 | 39.63      |

Cálculo feito com médias não padronizadas – SINGH (1981)

Com o método de otimização de Tocher verifica-se na tabela 8, que na população do Cauamé (área II), formaram-se cinco grupos sendo o grupo 1 menos diverso, reunindo nove genótipos seguido pelo segundo grupo que reuniu três genótipos. Os grupos 3, 4 e 5, foram mais diversos, apresentando apenas um genótipo. A média de distância nos indivíduos do grupo I é menor, por isso os genótipos foram reunidos nesse grupo repetindo-se o mesmo comportamento no grupo dois. Nessa população observa-se que os indivíduos mais divergentes estão isolados em grupo único mostrando maior diversidade nos grupos 3, 4 e 5.

Araújo (2000) ao trabalhar com cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) comenta que a formação de vários grupos está relacionado a diversidade que há dentro da população o que parece ser o caso *B. crassifolia* nessa área de pesquisa.

Na tabela 9 observa-se que na população do Bom Intento (área III), formou-se quatro grupos. O grupo 1 reuniu doze genótipos apresentando indivíduos mais semelhantes geneticamente, refletido pela média requerida pelo teste estatístico utilizado. Os grupos 2, 3 e 4, apresentaram apenas um indivíduo, indicando maior diversidade (CRUZ; REGAZZI, 1997).

Comparando as duas populações verifica-se que a população do Bom Intento é menos diversa para os caracteres considerados. Esse fato pode estar relacionado as variações ambientais, e mais ainda, relacionados ao comportamento reprodutivo da espécie (OLIVEIRA; GIBBS, 2000; GUSMÃO, 2006) que mostrou-se preferencialmente alogâmico.

Segundo Araújo (2000), o conhecimento dos pares de genitores de maior divergência orienta o processo de hibridação. Assim, os pares mais divergentes devem ser utilizados em cruzamento para geração de híbridos mais heteróticos.

Os resultados deste trabalho foram semelhantes aos resultados encontrados por Paiva (1998), quando avaliou frutíferas da Amazônia, onde também encontrou grande variabilidade

genética nas populações naturais. Segundo esse autor, a variabilidade é uma das principais riquezas que dispõem os melhoristas para ampliar as potencialidades de cultivos. Com base nesses resultados verifica-se que as populações das áreas de pesquisa apresentam indivíduos com diversidade genética e podem ser utilizados em programas de melhoramento para as características comprimento e diâmetro do fruto.

TABELA 8- Agrupamento de 15 genótipos de muricizeiro *B. crassifolia* utilizando o método de agrupamento de otimizado de Tocher, com base na distância generalizada de Mahalanobis da população do Cauamé área II utilizando características comprimento e diâmetro do fruto.

| <b>Grupo</b> | <b>Genótipo</b>        |
|--------------|------------------------|
| 1            | 6 10 5 11 15 7 12 13 4 |
| 2            | 2 9 8                  |
| 3            | 1                      |
| 4            | 3                      |
| 5            | 14                     |

TABELA 9- Agrupamento de 15 genótipos de muricizeiro *B. crassifolia* utilizando o método de agrupamento de otimizado de Tocher, com base na distância generalizada de Mahalanobis da população do Bom Intento-área III utilizando características comprimento e diâmetro do fruto.

| <b>Grupo</b> | <b>Genótipo</b>               |
|--------------|-------------------------------|
| 1            | 2 9 11 15 10 6 4 7 12 13 5 14 |
| 2            | 1                             |
| 3            | 8                             |
| 4            | 3                             |

### 4.3 Sistema reprodutivo

Os resultados dos experimentos de polinização controlada e o percentual de frutos formados em condições naturais respectivamente, encontram-se na tabela 10 e 11. Os resultados exibidos na tabela 10 mostram que houve diferença significativa entre os tratamentos. E ao comparar os tratamentos (tabela 11) verifica-se que a polinização natural é o tratamento que se diferencia de todos os demais, produzindo maior quantidade de frutos (85%). A auto polinização espontânea (5%) difere significativamente de geitonogamia (40%) e xenogamia (35%) embora os dois últimos tratamentos não difiram entre si.

TABELA 10- Frutificação e valores de qui-quadrado das classes de tratamentos em conjunto, para verificação do sistema reprodutivo de *B. crassifolia*.

| Classes de cruzamentos | Número de cruzamentos | Número observado de pegamento de frutos (O) | Número esperado de pegamento de frutos (E) | (O - E) | (O - E) <sup>2</sup> /E |
|------------------------|-----------------------|---|--|---------|-------------------------|
| AE                     | 20                    | 1.0   | 7.4  | -6.4    | 5.5351                  |
| AI                     | 20                    | 4.0   | 7.4  | -3.4    | 1.5621                  |
| GT                     | 20                    | 8.0   | 7.4  | 0.6     | 0.0486                  |
| PN                     | 20                    | 17.0  | 7.4  | 9.6     | 12.4540                 |
| XG                     | 20                    | 7.0   | 7.4  | -0.4    | 0.0212                  |
| Total                  | 100                   | 37.0  | 37.0                                       | 0       | 19.6216                 |

Qui-quadrado: 19.6216.

Graus de Liberdade: 4; 5%

AE=auto polinização espontânea; AI=auto polinização induzida; GT=geitonogamia; PN=polinização natural; XG=xenogamia.

Não houve diferença significativa entre auto-polinização espontânea e auto polinização induzida, entretanto, as diferenças existentes entre auto polinização espontânea e geitonogamia sugere maior eficiência no segundo tratamento.

TABELA 11- Frutificação e valores de qui-quadrado para testes de comparação dos tratamentos de avaliação do sistema reprodutivo de *B. crassifolia*.

| Tratamento | Sucesso (%) (N° de Frutos/N° de Flores) | AE        | AI        | GT        | XG        |
|------------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| AE         | 5,00 (1/20)                             | -         | (2,06) ns | (7,02)*   | (5,69) *  |
| AI         | 20,00 (4/20)                            | -         | -         | (1,88) ns | (1,12) ns |
| GT         | 40,00 (8/20)                            | -         | -         | -         | (0,1)ns   |
| PN         | 85 (17/20)                              | (25,86) * | (6,86) *  | (8,64) *  | (10,4)*   |
| XG         | 35 (7/20)                               | -         | -         | -         | -         |

\* Diferença significativa a 5% de probabilidade de probabilidade pelo teste de  $\chi^2$

<sup>ns</sup> Diferença não significativa

Os dados apresentados diferem de outros relatados para espécie. Segundo Rego; Albuquerque (1989), *B. crassifolia*, é uma espécie com auto-incompatibilidade, manifestada tanto pelo abortamento da maioria das flores autofecundadas, pelo grande número de queda dos frutos que iniciaram o desenvolvimento. Por outro lado, Pereira; Freitas (2002), estudando *B. crassifolia* no estado Ceará verificaram vigeamento de frutos resultantes de autopolinização, que persistiram até a maturação quando foram coletados, o que corrobora com os dados encontrados no presente estudo. Auto-incompatibilidade completa foi observada por Teixeira; Machado (2000) que ao avaliarem o sistema reprodutivo de *B. sericea* e confirmada por Ramalho; Silva (2002). Teixeira; Machado (2000) realizaram pesquisa em área de floresta secundária e verificaram 12% de frutificação para polinização natural. Segundo Guedes (1998), essa área apresenta baixa densidade de indivíduos de *B. sericea* associados a uma fauna mais abundante de espécies generalistas, supondo a escassez de *Centridini* que são as polinizadoras efetivas. Ramalho; Silva (2002) quando estudaram esta mesma espécie, verificaram uma taxa de frutificação de 25% em área de restinga. A extrapolação dessa taxa de frutificação de *B. sericea*, para toda a copa, com base no número de flores resultam em mais de 17.000 frutos, portadores de sementes resultantes da polinização cruzada pelas *Centridini*. Porém, Silva (1990) obteve sucesso em autopolinizações manuais desta espécie.

Barros (1992) estudou a biologia reprodutiva de sete espécies simpátricas do gênero *Byrsonima* e considerou que elas apresentavam “certo grau de autocompatibilidade”, com percentuais de frutificação por autopolinização variando entre 5,2% a 16,3%.

Benezar; Pessoni (2006) verificaram que nas savanas de Roraima *B. coccolobifolia* é uma espécie autocompatível com percentual de 44% das frutificações resultantes de autopolinizações. Pesquisas realizadas por Sigrist; Sazima (2004), com 12 espécies de Malpighiaceae dos gêneros *Banisteriopsis*, *Dicella*, *Mascagnia*, *Stigmaphyllon* e *Tetrapteryx*, evidenciaram a existência de diferentes comportamentos reprodutivos, com algumas espécies sendo auto-incompatíveis, outras autocompatíveis e uma agamospérmica ou apomítica. O nível de autogamia espontânea das espécies autocompatíveis, entretanto, foi considerado desprezível pelas autoras.

Barbosa et al., (2003) ao estudarem a fenologia das espécies do gênero, nas savanas de Roraima, verificaram que *B. crassifolia* costuma ter pico de floração de dezembro a fevereiro com amplitude de novembro a maio, ou seja, no meio da estação seca como pode ser observado pelos dados históricos de distribuição das chuvas no Estado. Segundo esses autores, *B. crassifolia* é muito visitada por abelhas de hábito solitário como as *Centris* ssp., *Epicharis* ssp. e *Xylocopa frontalis*.

Segundo Barros (2002) essas abelhas são assíduas visitantes das espécies de *Kielmeyera*, percorrendo várias flores no mesmo indivíduo. Neste caso, ao visitarem várias flores estas espécies de abelhas poderão estar promovendo a deposição de pólen sobre as papilas estigmáticas e com isso impedirem a efetiva polinização cruzada, tendo em vista que esta espécie é alto incompatível. Em cortes histológicos para a verificação do crescimento do tubo polínico o autor verificou um bloqueio no crescimento na parte intermediária do estilete, caracterizando uma auto-incompatibilidade tardia. Este mesmo comportamento foi observado por Benezar; Pessoni, (2006), ao estudar a biologia reprodutiva de *B. coccolobifolia* nas savanas. Os autores verificaram as abelhas *Xylocopa* ssp e *Bombus* ssp, que esse comportamento favoreceu extremamente a geitonogamia, responsável por elevado índice de frutificação.

Observa-se que as espécies de *Byrsonima* apresentam auto-incompatibilidade total ou parcial e são polinizadas preferencialmente por *Centridini* que são importantes no processo de reprodução das espécies e parecem manter estreita relação com as Byrsonimas. Segundo Oliveira; Gibbs, (2000), as espécies de malpigiaceas são bem representadas nos cerrados e oferecem riqueza de óleo e pólen para *Centridini*, o que talvez justifique a presença elevada de espécies do gênero explorando seus respectivos nectários florais.

Com base nos resultados dos experimentos de autopolinizações, *B. crassifolia* aceita ser fertilizada pelo próprio pólen, aparentando não ter alelos-S iguais. Sendo esta autocompatível. Portanto *Byrsonima crassifolia* apresenta um sistema reprodutivo misto com preferência para a alogamia. Tal sistema, segundo Scariot et al., (1991), combina as vantagens da auto-fecundação e polinização cruzada, garantindo um alto nível de adaptabilidade da população às condições vigentes do ambiente associado à manutenção de elevado potencial evolutivo através da recombinação, o que capacita a espécie para a colonização de novas e extensas áreas.

#### **4.3.1 Cruzamentos recíprocos**

Os resultados dos 540 cruzamentos realizados em dialelo circulante entre os 18 genótipos de *Byrsonima crassifolia* são mostrados na tabela 8. Destes, 268 (49,6%) resultaram em frutificações. Embora tenha havido algumas diferenças entre os cruzamentos recíprocos, entre as plantas 2 x 3 e 33 x 34 (Tabela 8), não é possível afirmar que a espécie seja auto-incompatível, visto que a taxa de auto-fecundação induzida chega a 20% no estágio de antese. Por outro lado, Barros (1992), afirma que sete espécies do gênero *Byrsonima* apresentam

“certo grau de autocompatibilidade”, com percentuais de frutificação por autopolinização variando entre 5,2% a 16,3%, fenômeno este confirmado por este trabalho.

Akamine; Girolami (1959); Rêgo (1997a) relataram diferenças entre cruzamentos recíprocos trabalhando com genótipos de *Passiflora edulis*. É interessante ressaltar que os genótipos aqui estudados são oriundos de populações naturais de savanas. Lewis (1954) comenta que a diferença entre cruzamentos recíprocos é uma das principais características do sistema esporofítico. Chang (1974) atribui a condições ambientais, tais como pluviosidade, temperatura e fotoperíodo na época da hibridação, a diferença nas médias de vingamento e pegamento, dos frutos entre as plantas de maracujá. Bruckner et al., (1995) também atribuíram ao acaso a variabilidade observada na média da frutificação, em cruzamentos recíprocos entre plantas de maracujazeiro pertencentes a dois grupos auto-incompatíveis.

A diferença entre as hibridações nos genótipo 1 x 2 não puderam ser avaliadas, devido o racemo ter quebrado e com isso perdido os tratamentos, entretanto é possível verificar que do cruzamento entre 2x1 ou seja quando 2 é fêmea e 1 é macho, ocorre a formação de 3 frutos (20%), indicando a aceitabilidade dos alelos do acesso 2. Verifica-se que há uma incompatibilidade unilateral nos cruzamentos entre os acessos 3 x 2 e 33 x 34, permitindo a produção de frutos somente quando as plantas 3 e 33 são utilizadas como genitores femininos e as plantas 2 e 34 com genitores masculinos, respectivamente.

TABELA 12- Resultado dos cruzamentos recíprocos dos 18 genótipos de *B. crasifolia*.

| ♀ \ ♂ | 1   | 2  | 3  | 5   | 10 | 14 | 26 | 33  | 34 | 35  | 36  | 39  | 42  | 43  | 46 | 47 | 49  | 50 |     |
|-------|-----|----|----|-----|----|----|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|----|-----|
| 1     |     | 3+ |    |     |    |    |    |     |    |     |     |     |     |     |    |    |     | 7+ |     |
| 2     | *   |    | -  |     |    |    |    |     |    |     |     |     |     |     |    |    |     |    |     |
| 3     |     | 3+ |    | 2+  |    |    |    |     |    |     |     |     |     |     |    |    |     |    |     |
| 5     |     |    | 8+ |     | 9+ |    |    |     |    |     |     |     |     |     |    |    |     |    |     |
| 10    |     |    |    | 13+ |    | 5+ |    |     |    |     |     |     |     |     |    |    |     |    |     |
| 14    |     |    |    |     | 7+ |    | 7+ |     |    |     |     |     |     |     |    |    |     |    |     |
| 26    |     |    |    |     |    |    | 7+ | 15+ |    |     |     |     |     |     |    |    |     |    |     |
| 33    |     |    |    |     |    |    |    | 3+  |    |     |     |     |     |     |    |    |     |    |     |
| 34    |     |    |    |     |    |    |    |     | 4+ | 10+ |     |     |     |     |    |    |     |    |     |
| 35    |     |    |    |     |    |    |    |     |    | 9+  | 6+  |     |     |     |    |    |     |    |     |
| 36    |     |    |    |     |    |    |    |     |    |     | 13+ | 15+ |     |     |    |    |     |    |     |
| 39    |     |    |    |     |    |    |    |     |    |     |     | 12+ | 15+ |     |    |    |     |    |     |
| 42    |     |    |    |     |    |    |    |     |    |     |     |     | 12+ | 10+ |    |    |     |    |     |
| 43    |     |    |    |     |    |    |    |     |    |     |     |     |     | 11+ | 8+ |    |     |    |     |
| 46    |     |    |    |     |    |    |    |     |    |     |     |     |     |     | 9+ | 3+ |     |    |     |
| 47    |     |    |    |     |    |    |    |     |    |     |     |     |     |     |    | 9+ | 11+ |    |     |
| 49    |     |    |    |     |    |    |    |     |    |     |     |     |     |     |    |    | 2+  | 2+ |     |
| 50    | 14+ |    |    |     |    |    |    |     |    |     |     |     |     |     |    |    |     | 7+ | 11+ |
|       |     |    |    |     |    |    |    |     |    |     |     |     |     |     |    |    |     |    | 8+  |

Número seguido do sinal (+) significa o número de pegamento de frutos conseguidos entre cruzamentos recíprocos, (-) corresponde a aborto.

\*os racemos quebraram

#### **4.4 Análise diversidade genética entre e dentro de populações de muricizeiro (*Byrsonima crassifolia*) por meio de marcador RAPD**

##### **4.4.1 População da Embrapa (área I)**

Foi extraído DNA total de 37 indivíduos de uma população natural, após a extração, foi realizada a padronização dos mesmos para uma concentração de  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de DNA, o qual foi submetido à reação de PCR. Apenas oito indivíduos foram amplificados. Dos 08 primers utilizados neste trabalho para amplificação dos 37 indivíduos de muricizeiro, apenas dois FUS1 e A18 produziram bandas polimórficas. Os perfis eletroforéticos obtidos para murici com a técnica de marcadores RAPD, apresentaram bandas polimórficas como apresentado na figura 7, obtido com o primer FUS1. Os primers utilizados geraram 29 locos polimórficos, perfazendo uma média de 14,5 bandas por primer. A presença e ausência de produtos de amplificação foi utilizada para calcular a distância genética entre os oito muricizeiros (tabela 13). O menor e maior valores obtidos entre pares de indivíduos foram, respectivamente, 0,1578 e 1,0, entre as plantas 45 e 46, e, entre o indivíduo 13 e todos os demais.

Quanto a não amplificação do DNA de 29 indivíduos ocorrido neste trabalho, Williams et al., (1990), comentam que a mudança única em um nucleotídeo pode impedir toda a amplificação. Dados semelhantes foram encontrados por Silva (1999) trabalhando com acessos de arroz. Segundo Lindhout et al., (1994) várias hipóteses podem explicar o fato de que alguns locos estejam presentes em um indivíduo e ausentes em outro, sendo que as explicações mais simples são segregação, mutações e epistasia.

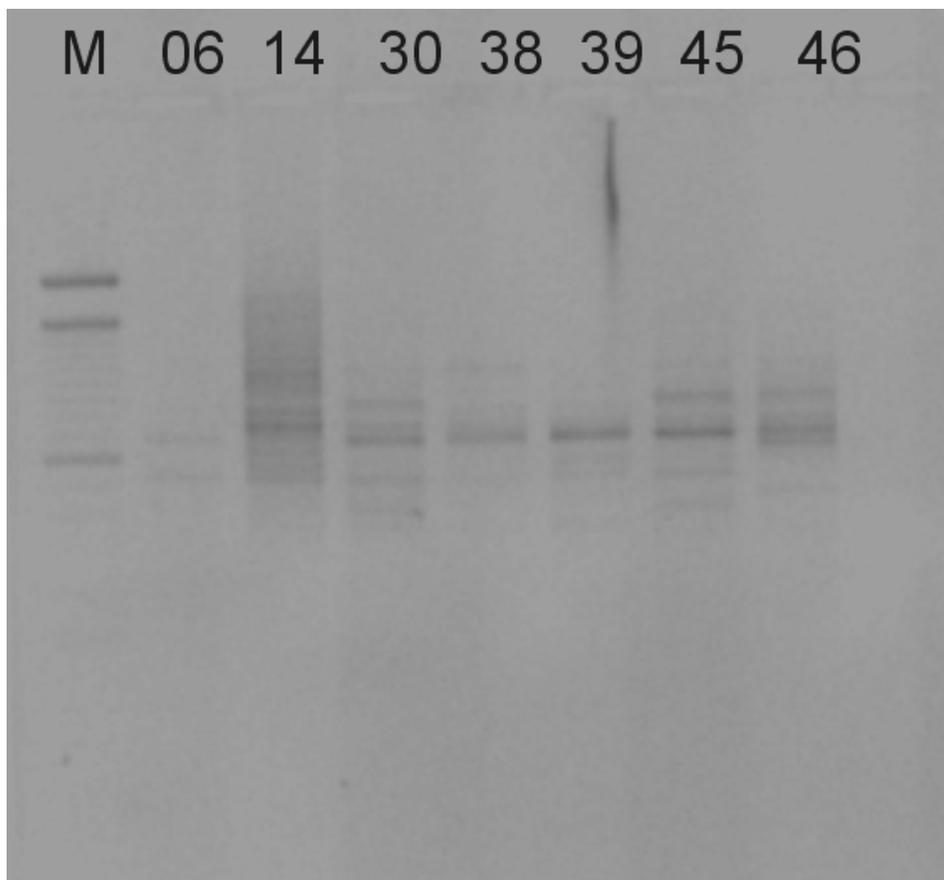


FIGURA 7- Perfil eletroforético de DNA obtido com o primer FUS1 para 7 indivíduos. Da esquerda para a direita: M-DNA marcador de peso molecular, e a numeração correspondem aos indivíduos de muricizeiro (*Byrsonima crassifolia*).

Houve considerável variabilidade nessa população, sendo que os indivíduos 45 e 46 foram os mais próximos e o indivíduo 13 o mais distante de todos os outros.

A informação obtida neste estudo deve ser de uso prático para mapeamento do genoma de muricizeiro, bem como para futuros programas de melhoramento. Na escolha dos pais para mapeamento de populações necessita de avaliação do nível de polimorfismo entre os potenciais parentais. Da perspectiva do melhoramento, a distancia genética é importante parâmetro na escolha dos pais para cruzamento (PARAN et al., 1998).

TABELA 13- Matriz de distância genética expressa como complemento aritmético dos coeficientes Jaccard, obtidas para oito muricizeiros, baseados em 29 locos polimórficos de marcadores RAPD população Embrapa.

| Indivíduos | 6  | 14  | 30    | 38    | 39    | 45    | 46    | 13  |
|------------|----|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| 6          | .0 | 1.0 | 0.778 | 0.714 | 0.714 | 1.0   | 1.0   | 1.0 |
| 14         |    | .0  | 0.789 | 0.764 | 0.882 | 0.545 | 0.578 | 1.0 |
| 30         |    |     | .0    | 0.428 | 0.428 | 0.368 | 0.25  | 1.0 |
| 38         |    |     |       | .0    | 0.5   | 0.647 | 0.714 | 1.0 |
| 39         |    |     |       |       | .0    | 0.529 | 0.571 | 1.0 |
| 45         |    |     |       |       |       | .0    | 0.157 | 1.0 |
| 46         |    |     |       |       |       |       | .0    | 1.0 |
| 13         |    |     |       |       |       |       |       | .0  |

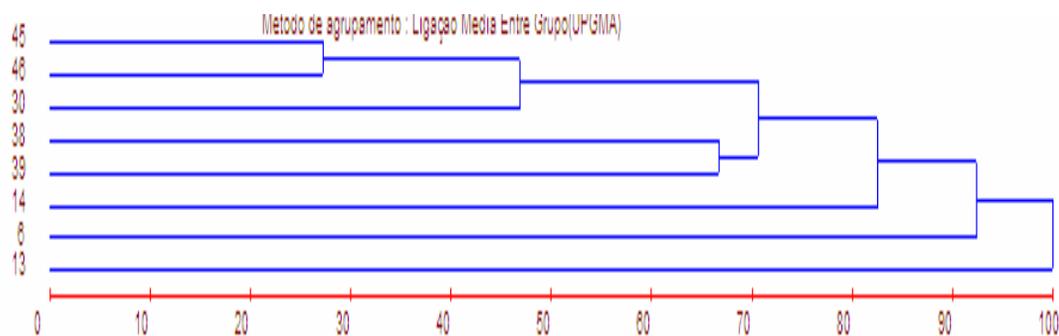


FIGURA 8- Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir das distâncias genéticas expressas em complemento de Jaccard estimados entre os oito genótipos de muricizeiro e baseado em 29 marcadores RAPD oriundos de dois primers, população Embrapa.

#### 4.4.2 População do Cauame (Área II)

Foi extraído DNA total de 30 indivíduos de uma população natural, após a extração, foi realizado a padronização dos mesmos para uma concentração de  $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de DNA, o qual foi submetido à reação de PCR. Apenas 13 indivíduos foram amplificados. Dos 8 *primers* utilizados neste trabalho para amplificação dos 30 indivíduos de muricizeiro, apenas três, FUS1, FUS 2 e A18, produziram bandas polimórficas. Os primers utilizados geraram 43 locos polimórficos. A presença e ausência de produtos de amplificação foi utilizada para calcular a





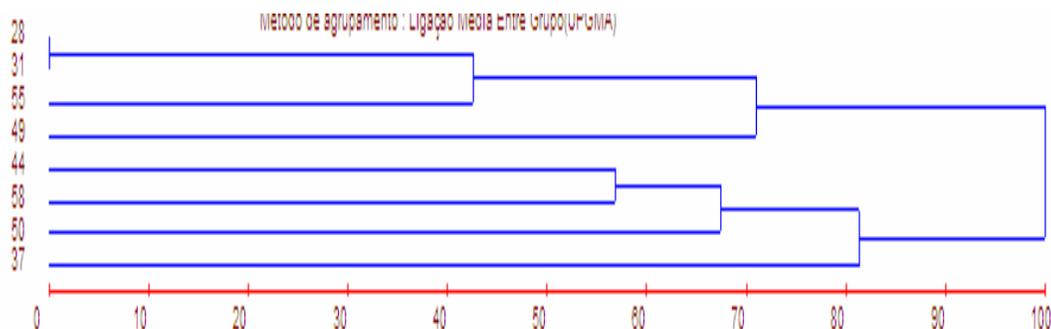


FIGURA 10- Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir das distâncias genéticas expressas em complemento de Jaccard estimados entre os oito genótipos de muricizeiro e baseado em 09 marcadores RAPD oriundos do primer FUS 1 população do Bom Intento.

#### 4.4.4 Diversidade genética entre as populações do Embrapa (área I), Bom Intento (área II) e Cauame (área III)

Com base nos perfis eletroforeticos obtidos nas três populações constituído de 29 indivíduos foi montada uma matriz de distancia genética (tabela 16) e construído o dendrograma apresentado na (figura 12). A menor distância foi obtida entre os indivíduos 28 e 31 pertencentes à população do Bom Intento. Benezar, (2004) ao avaliar esta população para caracteres morfológicos verificou que estes dois genótipos (28, 31) reuniram-se em grupos diferenciados quando analisados pelo método de Tocher. Ao analisar o dendrograma observa-se grande variabilidade genética entre e dentro das populações e que os marcadores foram eficientes em separar as populações, exceto os indivíduos 16 Cauamé , 37 Bom Intento, 6 e 13 Embrapa, os que foram agrupados com indivíduos pertencentes a outras populações. Quando analisados por Benezar, (2004) esses indivíduos foram reunidos em grupos distintos. Existem indivíduos mais semelhantes a indivíduos de outras populações do que de sua população de origem. E importante observar que dos 08 primers utilizados apenas três foram eficientes na produção dos produtos eletroforeticos (FUS 1, FUS 2 e A-18). Segundo Landergott et al., (2001) o número de fragmentos polimórficos utilizados na avaliação da variabilidade genética em plantas é bastante variável, independente da domesticação da espécie. Para espécies como a samambaia (*Dryopteris cristata*) ainda não domesticada, este

autor encontrou 27 fragmentos. Zimback et al.; (2004) analisando a diversidade genética em *Trichilia pallida*, uma Meliaceae encontraram 72 fragmentos polimorficos. Portanto devido o polimorfismo ter sido acessado com um número relativamente pequeno de primers supõe-se que esse material seja um potencial para futuros estudos de melhoramento tendo em vista as poucas informações moleculares em relação a esta espécie.

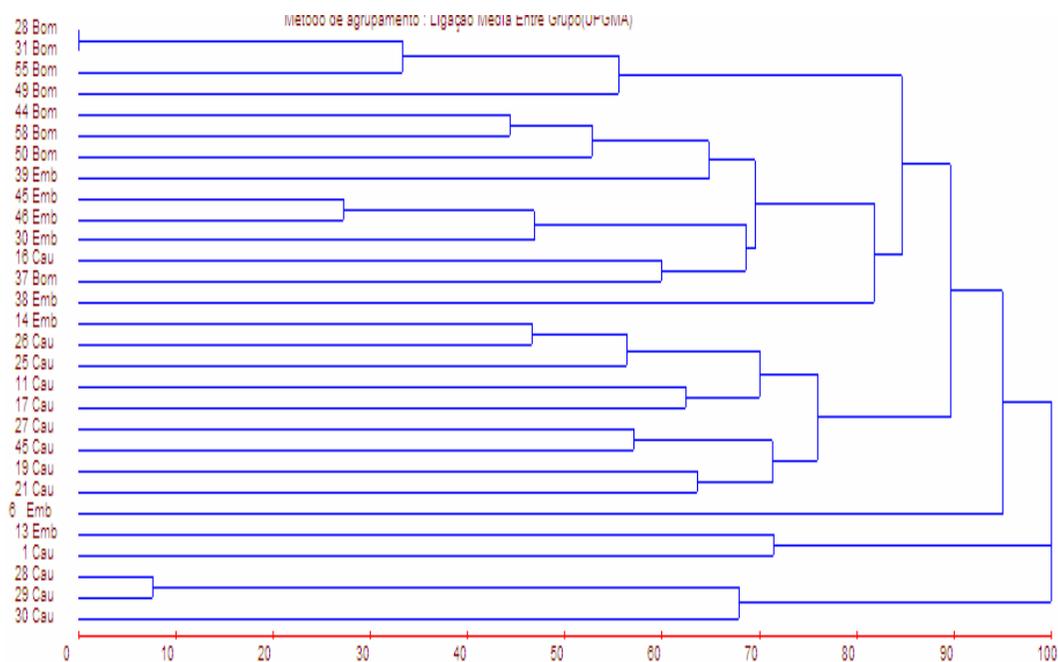


FIGURA 11- Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir das distâncias genéticas expressas em complemento de Jaccard estimados entre os vinte e nove genótipos de muricizeiro oriundos dos primers FUS 1, FUS 2 e A18, das três populações



## 5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitem concluir que:

A antese das flores de *B. crassifolia* ocorre em horários variados podendo estender-se por até dez horas;

*B. crassifolia* apresenta problemas de compatibilidade tendo preferência por alogamia;

Apresenta diversidade genética para caracteres morfológicos e moleculares tanto dentro quanto entre populações;

Os marcadores RAPD mostraram-se eficientes revelando polimorfismo no genoma desta espécie proporcionando informações que podem ser consideradas em futuros programas de melhoramento;

Sugere-se que seja utilizado maior número de primer para melhor detectar o polimorfismo nessa espécie e a criação de Unidades de Conservação, tendo em vista a existência de indivíduos geneticamente únicos em cada área de estudo.

## REFERÊNCIAS

ABREU, U.G.P.; MARIANTE, A. S.; SANTOS, S.A. Conservação genética de raças do pantanal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília-DF, ano I, nº 5, p.19-21, mar/abr. 1998.

AKAMINE, E. K.; GIROLAMI, G. Pollination and fruit set in the yellow passion fruit. **Hawaii farm science**, v.5 n.4, p. 3-5 1959.

ALBUQUERQUE, P.M.C.; RÊGO, M.M.C. Fenologia das abelhas visitantes de murici (*Byrsonima crassifolia* Malpighiaceae). **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi**, série zool..5 , Belém, n. 2, p.163-178, 1989.

ALMEIDA, S.P.; *Byrsonima verbascifolia*. In: ALMEIDA, S.P.; PROENÇA,.; SANO, M. S.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina : EMBRAPA, 1998. p.84-89.

ALMEIDA, L. A.; KKIHL, R. A. S de. ABDELNOOR, R. V. Melhoramento da soja. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS., 1997, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA,1997. p.11-55.

ALMEIDA, O. S.; SILVA, A. H B; SILVA, A. B.; SILVA, A. B.; AMARAL, C. L. F. Estudo da biologia floral e mecanismos reprodutivos do alfavacão (*Ocimum officinalis* L.) visando melhoramento genético. **Acta scientiarum, biological sciences**, v.26,n.3, p.343-348, 2004.

ALVES, G. L.; FRANCO, M. R. B. Headspace gas chromatography-mass spectrometry of volatíle compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich). In: **Jounal of Chromatography**, A 289, 2003, p. 297-301.

ANDERSON, W.R. The oringin of the malpighiaceae the evidence from morphology. **Botanical Garden**, v. 64 p. 219-224, 1990.

ARAÚJO, D. G. **Caracterização de germoplasma de cupuaçuzeiro** (*Theobroma crandiflorum* Willd ex Spreng Schum) **utilizando descritores de frutos**. Lavras, 2000. 88f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Minas Gerais.

ART, H. W. **Dicionário de ecologia e ciência ambiental**. São Paulo: Melhoramentos, 1998. 583p.

AZEVEDO, M. de O.; FELIPE, M. S.S.; BRÍGIDO, M. de M.; MARANHÃO, A. Q.; SOUZA, de M. T. **Técnicas básicas em Biologia Molecular**. Brasília: UNB, 2003. 212p

BARBOSA, R.I. Distribuição das chuvas em Roraima. In: BARBOSA, R. I. (org.) **Homem, ambiente e ecologia no Estado de Roraima**. Amazonas: INPA, 1997. p. 325-335.

BARBOSA, R. I.; CASADIO, G. M. L.; SILVA, S.J. R. Fenologia e visitantes florais de *Curatella americana* L., *Byrsonima crassifolia* L., Kunth in H.B.K. em área de savana aberta de Roraima, Norte da Amazônia Brasileira, Belém. 2003, **Anais...** Disponível em:<<http://agroeco.inpa.gov.br/reinaldo/RIBarbosaProdCientUsuVisitantes/2003FenologiaSavana54CNB.pdf>>. Acesso maio 2006.

BARBOSA, R. I. FEARNSIDE, P. M. Wood density of trees in open savanas of the Brazilian Amazon. **Forest Ecology and management** . v.199, p. 115-123, 2004.

BARBOSA, R. I.; XAUD, H. A. M. COSTA e SOUZA, J. M. Referencial geográfico e histórico. **Savanas de Roraima**. Boa Vista: FEMACT, 2005. p. 11-20.

BARROS, M. A. G. de, Floração sincrônica e sistemas reprodutivos em quatro espécies de *Kielmeyera* Mart. (Guttiferae). **Acta bot. bras.** v.16, n.1, jan. p.113-122. 2002.

BARROS, M.A.G. Fenologia da floração, estratégias reprodutivas e polinização de espécies simpátricas do gênero *Byrsonima* Rich (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Biologia**. v. 2, n. 52, p. 343-353. 1992

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universitária, 1991.v.2, p.325-329.

BENEZAR, R. M. C. **Diversidade genética dentro e entre populações de muricizeiros (*Byrsonima crassifolia* L-Kunth)**. Boa Vista, RR/2004.36f. Monografia (Especialização em Recursos Naturais). Programa de Pesquisa e Pós-Graduação em Recursos Naturais - PRONAT, Universidade Federal de Roraima.

BENEZAR, R. M. C.; PESSONI, L. A. Biologia floral e sistema reprodutivo de *Byrsonima coccolobifolia* (Kunth.) em uma savana Amazônica. **Acta Amazônica**, v. 36, n.2, p.159-168, 2006.

BERGAMIN, M. **Aspectos reprodutivos e distribuição de duas espécies de Byrsonima (Malpighiaceae) em área de cerradão na reserva biológica de Mogi-Guaçu – SP**, 1998. 88f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Faculdade de Rio Claro, Universidade do Estado de São Paulo.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional da Produção Mineral. Projeto RADAMBRASIL-Levantamento de Recursos Naturais. v.8.MME.Rio de Janeiro, 1975,428p.

CAETANNO-ANNÓLES, G.; BASSAM, B. J.; GRESSHOFF, P.M. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. **Plant Mol. Biol. Rep.** n.4, p.294-307, 1991.

CARDOSO, E. L.; CRISPIM, S. M. A.; RODRIGUES, C. A. G.; BARIONI-JÚNIOR, W. Composição e dinâmica da biomassa aérea após a queima em savana gramíneo-lenhosa no pantanal. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.35, n.11 nov. p.2309-2316, 2000.

CARLINI-GARCIA, L. A.; VENCOSKY, COELHO, A.S.G. Método Bootstra, aplicada em níveis da reamostragem na estimação de parâmetros genéticos populacionais. **Scientia Agrícola**, v. 58, n: 4, p. 775-793, 2001.

CARVALHO, L. P. de., LANZA, M. A.; FALLIERI, J.; SANTOS J. W. Análise da diversidade genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de algodão. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.38,n.10 out., p.1149-1155, 2003.

CAVALCANTE, P. B. Murici. **Frutas Comestíveis da Amazônia**. 5.ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeld, 1991. p.174-179.

CHAN, C. C. Studies on unfruitfulness of the yellow passion fruits growing in Taiwan. **Taiwan Agriculture Quarterly (Tai-Wan nung-yeh)**, v. 10, n. 2, p. 78-89, 1974.

CROXFORD, A. E.; ROBSON, M.; WILKINSON, M. J. Characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite loci in csthew (*Anacardium occidentale* L.) and their cross-species utilization. **Molecular Ecology Notes** – Manchester: Press, v.6, p. 249-251, 2006

CRUZ, C.D. Aplicativo computacional em genética e estatística. GENES, Viçosa, 2001. CD-ROM 1.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento -genético**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1997. 390p.

DAFNI, A. **Pollination Ecology** - New York: Press, 1992. 250p.

DORNELAS, M.C. Construindo flores. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília-DF, ano II, n. 12, p 28-32, jan./fev. 2000.

EHRlich, P. R. A perda da diversidade – causas e conseqüências. In: WILSON, E. O. **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 27-35.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **The principles of pollination ecology**. 2. ed. Oxford: Pergamon Press, 1979. 291p.

FERNADES, G. W.; FAGUNDES, M.; GRECO, M. K. B.; BARBEITOS, M. S.; SNATOS, J.C. Ants and their effects on insect herbivore community associated with the inflorescences of *Byrsonima crassifolia*, (Linnaeus) H.B.K. (Malpighiaceae). **Revista brasileira de entomologia**. v.2, n. 49 jul. p.264-269, 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA, 1995. p. 38-53.

FIGUEIREDO, M. E.; MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M.; SILVA, M.A.; SANTOS, L. C.; ALMEIDA, L.F.R.; BRITO, A. R. M. S.; SALGADO, H. R. N.; VILEGAS, W. Avaliação química e atividade anti-diarreica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Brazilian journal of Pharmaceutical Sciences, v.41, n.1, jan/mar.p. 79-83, 2005.

FONTES, J.; CINTRA, R.; SANAIOTTI, T. Efeito da variação na composição da comunidade de arvores na riqueza e abundancia de aves em um cerrado mato-grossense – Os desafios do Novo Milênio. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL. 3, 2000, Corumbá. **Anais...** Disponível em:<<http://www.cpap.embrapa.br/agencia/congresso/Bioticos/FONTES076.pdf>>. Acesso em 20 de maio 2006.

FREITAS, C.V.; OLIVEIRA, P.E. Biologia Reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**. v. 3, n.25, p. 311-321. 2005.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. **Genética Moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 589p.

GUEDES, L. S. A vegetação fanerogâmica da reserva ecológica de dois irmãos. In: MACHADO, I. C.; LOPES, A.V.; PORTO, K. C. **Reserva ecológica de dois irmãos**: estudo de um remanescente de Mata Atlântica em área urbana. Recife-PE: Universitária, 1998. p.157-172.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F. A.; FONSECA-JÚNIOR, E. M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima vrebascifolia* Rich. Ex. A. Juss.) **CERNES**, Lavras, v.12,n.1 jan/mar. p. 84-91, 2006.

HERINGER, I. JACQUES, A.V. Adaptação das plantas ao fogo: enfoque na transição floresta-campo. **Ciência Rural**, Santa Maria - MS, v.31 n.6, p. 1085-1090, 2001.

HISDORF, A.; KRIEGER, Biologia molecular na conservação de peixes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília –DF, ano I, nº 5, p.10-15, mar/abr. 1998

LANDERGOTT, U.; HOLDEREGGER, R.; KOZLOSWSKI; SELLER, J. J. Historical bottlenecks decrease genetic diversity in natural populations of *Dryopteris cristata*. **Heredity**, Oxford, v.87, n.3, p. 344-355, 2001.

LEWIS, D. Comparative incompatibility in angiosperms and fungi. **Advances in genetics**, v.6, p. 235-285, 1954.

LEDO, A. S. **Potencialidade da fruticultura no estado do Acre**, Rio Branco, EMBRAPA:1996. 16p.

LINDHOUT, T.; HRUSDEN, S.V.; PET, G. et al. Perspectives of molecular marker assistant breeding for earliness in tomato. **Euphytica**, Wageningen, v. 79, n. 14, p. 279-286, 1994.

LÜTTGUE, U. **Physiological ecology of tropical plants**. Berlin: Spriger-verlag, 1997.

MABBERLEY, D. J. **A portable dictionary of the higher plants**. 4. ed. New York: Press, 1993

MAGALHÃES, M. T. Q.; SUGANUMA, E.; CIAMPI, A. Y. Análise da variabilidade genética em espécies arbóreas tropicais nativas com o uso de marcador molecular RAPD. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2003, Porto Seguro-BA. **Anais...** 2003. p. 30-35.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Brasília - DF. ano I, nº 5, mar/abr p. 25-28, 1998.

MIRANDA, I. S. **Flora, Fisionomia e Estrutura das Savanas de Roraima, Brasil**. Manaus, 1998. 97f. Tese (Doutorado em Botânica) – Faculdade de Biologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

MIRANDA, I. S.; ABSY, L. M. In: Homem, Ambiente e Ecologia no Estado de Roraima. **Flora fanerogâmica das savanas de Roraima**. Manaus: INPA, 1997. p. 445-455.

MORAIS, O. P.; RANGEL, P.H.N. Melhoramento de arroz no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS. 1997, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1997. p.35.

MOURA, W.; M.; CASALI, V. W. D.; CRUZ, C. D.; LIMA, P. C. Divergência genética em linhagens de pimentão em relação a eficiência nutricional de fósforo. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.34, n.2 fev., p.217-224, 1999.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymol**, San Diego, v.55, p. 335-350, 1987.

NETTANCOURT, D. **Incompatibility in angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 230p 1977.

OLIVEIRA, P. E.; GIBBS, P. E. Reproductive biology of wood plants in cerrado community of Central Brazil. **Flora**, v.195, n.4, p. 311-329, 2000.

OLIVEIRA, P. E. Fenologia e biologia reprodutiva das espécies do Cerrado. In: **Cerrado**: ALMEIDA, S.P.; PROENÇA,.; SANO, M. S.; RIBEIRO, J. F. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p.169-192.

OLIVEIRA, P. S.; BRANDÃO, C. R. F. The ant community associated with extrafloral nectarines in the Brazilian cerrados. In: Cutler, D. F.; Huxley, C. R. (eds.) **Ant plant interactions**. Oxford University Press, 1991. p. 438-459.

OLIVEIRA, P. S.; PIE, M. R. Interactions between ants and plants bearing extrafloral nectarines in cerrado vegetation. In: CONGRESSO de ENTOMOLOGIA do BRASIL, 17, 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** 1998. p.161-176. 200p.

PARAN, I.; AFTERGOOT, E.; SHIFRISS, C. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. **Euphytica**, v. 99, p.167-174, 1998.

PAIVA, J. R. de. **Melhoramento genético de espécies agroindustriais na Amazônia**. Estratégias e novas abordagens. Brasília: EMBRAPA, 1998, 135p.

PEREIRA, J. O. P.; FREITAS, B. M. Estudo da biologia floral e requerimentos de polinização do muricizeiro (*Byrsonima crassifolia* L.). **Revista ciência agrônômica**. Fortaleza - CE, v.33, n.2, p. 5-12. 2002.

PINHEIRO, F.F.M.; CRISÓSTOMO, J. R.; PARENTE, J.I.G.; MELO, F.I.O.; ALMEIDA, J.I.L. de, **Desenvolvimento de caracteres da panícula e frutificação de duas populações de cajueiros comum e anão-precoce (*A. occidentale*)**. Fortaleza: EMBRAPA. 1993. v.8, 24p.

PRIMACK, R.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Midiograf, 2001.

RAMALHO, M.; SILVA, M. Flora oleífera e sua guilda de abelhas em uma comunidade de restinga tropical. **SITIENTIBUS** série ciências biológicas, Salvador, v.2 n.1/2, p. 34-43, 2002.

RAVEN, P. H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RÊGO, M. M. **Genética, interação pólen-pistilo e expressão de proteínas na auto-incompatibilidade do maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims)**. Viçosa, 1997a. 61f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Minas Gerais.

REGO, E. R. **Herança da cor e caracterização de frutos de tomate mutante amarelo, normal, F1 e F2**. Viçosa, 1997b. 66f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Minas Gerais.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma do Cerrado. In: ALMEIDA, S.P.; PROENÇA,.; SANO, M. S.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA: 1998. p.90-166.

SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C.M.; COELHO, R. G.; SANTOS, L. C.; HIRUMALIMA, C. A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography fo the separation o flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* - Niedenzu (IK). **Journal of Chromatography**, Holanda, A,1035 p. 47-51, 2004.

RAMALHO, M.; SILVA, M. Flora oleífera e sua guilda de abelhas em uma comunidade de restinga tropical. **SITIENIBUS** série ciências biológicas, Salvador, v.2 n.1/2, p. 34-43, 2002.

SIGRIST, M. R.; SAZIMA, M. Pollination and reproductive biology of twelve species of neotropical malpighiaceae: stigma morphology and its implications for the breeding system. **Annals of Botany**, v. 94 n.1, p. 33-41, 2004.

SILVA, A. T. **Estudo da divergência genética em acessos de arroz através de marcadores morfológicos e moleculares (RAPD)**. Lavras, 1999. 95f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Lavras Minas Gerais.

SILVA, S.I. **Floração e frutificação de duas variedades de *Byrsonima sericea* DC**. Recife, 1990. 75f.. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Faculdade de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SILVA, S. J. R.; REBOUÇAS, M. A. P. Plantas Melíferas de Roraima-Parte- II. **Boletim do Museu Integrado de Roraima**. Boa Vista, v.4, p.32-33, 1998.

SINGH, A.; SINGH, H.N. Note on heritability genetic advance and minimum number of genes in chili. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.47, n..5, p.260-262, 1977.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos genético e melhoramento-plantas: biologia molecular aplicada ao melhoramento**. Ronfonópolis: Fundação MT, 2001. 939-966p.

SOUSA, M. A. D. de, **Biologia reprodutiva de onze espécies de Myrtacea em floresta de terra firme na Amazônia Central**. Manaus, 1996. 78f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Faculdade de Biologia, Universidade do Estado do Amazonas, 1996.

SCARIOT, A. O.; LLERAS, E.; HAY, J. D. Reproductive Biology of the Palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. **Biotropica**. v.23, n.1,p. 12-22, 1991.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; AGNOL DALL' M. Auto-incompatibilidade em plantas. **Ciência Rural** v.32 n.6 nov./dez.2002.

SCHMIDT, I. B.; SAMPAIO, A. B.; BORGHETTI, F. Efeitos da época de queima sobre a reprodução sexuada e estrutura populacional de *Heteropterys pteropetala* (Adr. Juss.) Malpighiaceae, em áreas de Cerrado *sensu stricto* submetidas a queima bienais. **Acta bot. bras.** v.19, n.4, p. 927-934, 2005.

TEIXEIRA, L.A.G.; MACHADO I.C. Sistema de polinização e reprodução de *Birsonima sericea* DC (Malpighiaceae). **Acta bot. bras.** v. 14, n.3, p.347-357, 2000.

VALE JÚNIOR, J. F. **Pedogênese e alterações dos solos sob manejo itinerante, em áreas de rochas vulcânicas ácidas e básicas, no nordeste de Roraima**. Viçosa, 1999. 61f. Tese (Doutorado em Pedologia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Minas Gerais.

VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Planaltina: SP. EMBRAPA,1996. 62p.

VÁZQUES, M. M.; GONZALEZ-ESQUINCA, A.R.; CAZARES LUNA, L.; M. N.; GUTIERREZ, M.N.M.; GARCIA-ARÁEZ, A. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. **Journal of ethnopharmacology**, v.66, p.79-82, 1999.

VELOSO, H.P.; GÓES FILHO, L.; LEITE, P.F.; SILVA S.B.; FERREIRA, H.C.; LOUREIRO, R.L.TEREZO, E.F.M. 1975. IV Vegetação: As regiões fitoecológicas, sua natureza e seus recursos econômicos - estudo fitogeográfico. In: BRASIL. Ministério das Minas e Energia, Departamento Nacional de Produção Mineral. *Projeto RADAMBRASIL. Folha, NA. 20 Boa Vista e parte das Folhas NA. 21 Tumucumaque, NB. 20 Roraima e NB. 21*. Rio de Janeiro, DNPM, Projeto RADAMBRASIL.

VINSON, S. B.; WHILIAMS, H. J.; FRANKIE, G. W.; SHRUM, G. Floral lipid chemistry of *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae) and e use of floral lipids by Centris Bees (Hymenoptera: Apidae). **Biotropica** v.29, n. 1, p. 76-83, 1997.

VOGEL, S. History of the malpighiaceae in the light of pollination ecology. **Memoirs of the New York Botanical Garden**. v.55, n.130-142, 1990.

WALTER, P. E. Fenologia e biologia reprodutiva das espécies do Cerrado In: ALMEIDA, S.P.; PROENÇA,; SANO, M. S.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p.169-192.

WALLACE, D. H. Interactions of S alleles in sporophytically controlled self-incompatibility of Brassica. **Theor. Appl Genet.**, v.54 p.193-201, 1979.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELICK, A. E.; LIVAK, K. J.; et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531-6535, 1990.

WITTMANN, M. T. S.; DALL'AGNOL, M. Auto-incompatibilidade em plantas *Ciência Rural*. v. 32 n.6 nov./dez. 2002

ZAPATA, T.R.; ARROYO, M.T.K. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. **Biotropica** v.10, n.3, p. 221-230, 1978.

ZIMBACK, L.; MORI, E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; VEIGA, R. F. A.; MELLO JÚNIOR, J.R.S. Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* SWARTZ (Meliaceae) por marcadores RAPD. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n.65, p. 114-19, 2004.