

Diversidade genética de clones de aceroleira avaliada por meio de marcadores moleculares ISSR

Eveline Nogueira Lima^{1*}, Maria Emília Bezerra de Araujo¹,
Candida Hermínia Campos de Magalhães Bertini¹,
Carlos Farley Herbster Moura², Maraisa Crestani Hawerth³

¹Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, DF, Brasil.

³Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Caçador, SC, Brasil.

*Autor correspondente: e-mail: evelinenlima@gmail.com

Resumo

A aceroleira (*Malpighia emarginata*) é uma frutífera tropical nativa da América Central e do Norte da América do Sul. Nos pomares brasileiros, observa-se alta variabilidade entre os genótipos cultivados. Essa alta variabilidade na cultura permite a identificação de genótipos que venham ao encontro de interesse agrônômicos. Neste sentido, objetivou-se avaliar a variabilidade genética entre 56 genótipos de aceroleira por meio de iniciadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Amostras de folhas foram coletadas em Pacajus-CE e levadas para o laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza-CE. Foram utilizados 20 iniciadores ISSR, que promoveram a formação de 148 bandas polimórficas (79,57%), as quais possibilitaram diferenciações entre os genótipos. Portanto, estas informações devem ser utilizadas em futuros trabalhos de melhoramento genético visando obter as melhores combinações entre os acessos estudados.

Palavras-chave: *Malpighia emarginata*, melhoramento genético, variabilidade genética, biologia molecular.

Genetic diversity of clones of acerola assessed by ISSR molecular markers

Abstract

The Indian cherry (*Malpighia emarginata*) is a tropical fruit originated from American continent. In Brazilian orchards, there was high variability among cultivated genotypes. On the other hand, high variability allows the identification of superior genotypes for cropping industry. This study aimed to evaluate the genetic variability among 56 genotypes using ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) primers. Leaf samples were collected in Pacajus-CE and taken to the laboratory of Molecular Biology postharvest, in Fortaleza. Altogether, 20 primers were used which yielded 148 polymorphic bands (79.57%), enabling the differentiation within the population study. As a result, this information may be used in future studies on breeding programs, such as choosing best combinations for parental crossings.

Keywords: *Malpighia emarginata*, genetic improvement, genetic variability, molecular biology.

Introdução

A aceroleira (*Malpighia emarginata*) é originária de regiões da América Central, Noroeste da América do Sul e Antilhas (Maciel et al., 2010). É uma importante frutífera tropical, que se caracteriza por um crescimento rápido e desordenado dos pomares, com mudas obtidas por via sexuada, originando alta segregação no porte e na produção da planta, no tamanho, forma, cor e teor de vitamina C dos frutos (Maciel et al., 2008).

Nos pomares brasileiros observa-se alta variabilidade entre os materiais cultivados no que se refere a importantes características como produtividade, hábito de crescimento e porte da planta, arquitetura da copa, cor, sabor, consistência e tamanho do fruto, além do rendimento de polpa, entre outras, resultado da propagação seminal. Esta alta variabilidade dos materiais genéticos acarreta sérios problemas ao sistema de produção, pois dificulta a execução racional de todas as práticas culturais, desorganizando, principalmente, o sistema de comercialização do produtor, com prejuízos (Oliveira et al., 2009).

Entretanto, a criação de programas de melhoramento genético para essa cultura proporcionou o desenvolvimento de clones, os quais minimizam os problemas da grande variabilidade observada nos pomares. Mas, por outro lado, a utilização de poucos clones por muitos anos pode resultar em uma maior vulnerabilidade genética desses materiais às pragas e doenças. Em razão disso, a preservação da variabilidade genética da acerola, mediante a constituição de bancos de germoplasma, tem grande importância tanto do ponto de vista da conservação biológica como da aplicação no melhoramento genético (Salla et al., 2002). Assim, o conhecimento da variabilidade genética e da relação entre diferentes acessos de aceroleira é importante para maximizar o uso de recursos genéticos para futuros programas de melhoramento (Oliveira et al., 2009).

Os marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o estabelecimento dos princípios teóricos do mapeamento genético e das análises de ligação gênica (Lanza et al., 2000; Eloi, 2010).

Entretanto, a caracterização de genótipos, bem como o estudo da variabilidade com base nestes caracteres, apresenta uma série de limitações, tais como: a demora na avaliação; o fato de não poder ser realizada em qualquer período do ano; em plantas frutíferas muitas avaliações somente são possíveis de serem realizadas quando estas entram em produção, requerendo, assim, um custo elevado e tempo prolongado para análise; acesso de pequena porção do genoma da planta; os marcadores morfológicos são dependentes e influenciados pelo ambiente (Yamagishi et al., 2005; Franzon et al., 2010). Além disso, essas avaliações são realizadas de forma subjetiva, e o resultado pode variar de acordo com a percepção dos avaliadores (Franzon et al., 2010). Com o advento da biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do DNA, que culminou no surgimento dos vários tipos de marcadores moleculares (Souza et al., 2008). Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), um marcador molecular é definido como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondendo a regiões expressas ou não do genoma). Diversas técnicas moleculares estão disponíveis para a avaliação da diversidade genética em nível de sequência de DNA, ou seja, para a determinação do polimorfismo genético, permitindo a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo.

Dentre as diversas técnicas moleculares, os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), tem sido utilizado com bastante sucesso para relevar o polimorfismo molecular em diversas espécies vegetais (Almeida Júnior et al., 2008), sendo considerado como um dos marcadores amplamente variáveis devido grande ocorrência e distribuição no genoma (Ellegren, 2004). Além disso, é um marcador que possui a vantagem de não requerer informações prévias do genoma revelando padrões altamente polimórficos (Zietkiewicz et al., 1994), mostrando-se úteis em estudo genéticos, especialmente no estudo da diversidade genética e das relações de indivíduos proximalmente relacionados (Salimath et al., 1995).

O objetivo do presente estudo foi estimar a variabilidade genética de clones de aceroleira da coleção de germoplasma da Embrapa Agroindústria Tropical utilizando-se marcadores ISSR.

Material e Métodos

Para a realização desse trabalho foram utilizados 56 clones de aceroleira, sendo 38 clones provenientes do jardim de sementes e 18 clones do jardim clonal. Todos os clones encontram-se no Campo Experimental de Pacajus da Embrapa Agroindústria Tropical, que está localizado no município de Pacajus-CE e constituem a coleção de germoplasma de acerola da Embrapa – CNPAT.

Para a realização da extração de DNA, foram coletadas folhas jovens de cada clone. As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas resfriadas durante o transporte, em caixa de isopor com gelo, até o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical, onde foram mantidas congeladas à temperatura de -20 °C até o início das extrações de DNA.

As extrações de DNA foram efetuadas usando o protocolo de Doyle & Doyle (1987), adaptado a partir do método utilizando-se o detergente CTAB (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide). Após as extrações, a qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1% e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop 2000. Adotou-se como parâmetro de definição da pureza das amostras de DNA extraído o desempenho constatado para a relação A_{260}/A_{280} , considerado ideal quando dentro do intervalo de 1,8 a 2,0. Depois da quantificação da concentração de ácidos nucléicos extraídos, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 10 ng μL^{-1} e armazenadas em freezer a -20 °C.

Foram realizados testes preliminares de amplificação com 56 iniciadores ISSR da marca IDT (Integrated DNA Technologies), utilizando quatro genótipos selecionados ao acaso, onde foram feitas reações de PCR com os quatro genótipos e os 56 iniciadores, foram observados os iniciadores cuja apresentava as bandas padrões (presença e ausência). Desses, 25 iniciadores

apresentaram os melhores resultados quanto à amplificação em termos de quantidade, nitidez de bandas e polimorfismo gerado pelas bandas. A partir dos resultados iniciais obtidos, esses iniciadores foram selecionados para realizar a caracterização dos 56 genótipos de aceroleira.

Os padrões de fragmentos que cada iniciador produziu, em cada combinação de fatores, foram avaliados visualmente, tendo-se observado a reprodutibilidade e a intensidade dos fragmentos e a presença de polimorfismo. Finalmente, foram escolhidos 20 iniciadores dentre os 25 testados.

As reações de ISSR foram realizadas em um volume final de 25 μL , compostas por: 2,5 μL de tampão de reação 10x, 1,0 μL de MgCl_2 50 mM, 0,2 μL de dNTPs (10 mM por nucleotídeo), 2,0 μL de DNA (10 ng μL^{-1}), 2 μL de cada iniciador (10 μM), 0,2 μL de Taq DNA polymerase (1,0 U) e água ultra pura para completar o volume da reação. Todos os reagentes usados foram da marca Invitrogen.

As condições de PCR utilizadas foram: 5 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguindo-se de 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 minuto), anelamento (47-55 °C, dependendo do iniciador, por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto) seguindo-se de uma etapa de extensão final (72 °C por 5 minutos). Todas as reações de PCR foram realizadas no termociclador TECHNE, modelo TC 512. As reações foram preparadas isoladamente. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose (1,8%) corados com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) e submetidos à eletroforese a 90 volts por 3 horas. Posteriormente, os géis foram visualizados sob luz UV e fotografados em fotodocumentador digital Canon PowerShot A620. Para a análise dos resultados, foram utilizados os recursos computacionais do programa Genes (Cruz, 2008). A análise estatística foi feita com base na matriz de dados binários formada por meio da análise dos géis de ISSR, onde, para a presença de banda, foi atribuído o valor 1, enquanto à ausência desta foi atribuído o valor zero. A distância genética foi calculada aos pares entre os genótipos, pelo complemento aritmético do índice de Jacard (Cruz & Carneiro, 2003). Com base na matriz de dissimilaridade, utilizou-se dos

métodos de agrupamento de otimização de Tocher.

Resultados e Discussão

Na análise de pureza do DNA extraído, verificadas pelas relações A260/ A280, constatou-se que foram obtidas amostras de boa qualidade variando de 1,70 a 2,00. A integridade do DNA é fundamental para a nitidez e reprodutibilidade dos produtos de amplificação via PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1995). As quantidades extraídas foram suficientes para realização de todas as reações.

A análise dos dados com os 20

iniciadores selecionados revelou variação no número de fragmentos amplificados, totalizando 186 fragmentos de DNA. Foi possível identificar 148 (79,57%) fragmentos polimórficos (Tabela 1), com uma média de 9,3 marcadores por iniciador ISSR. O número de bandas polimórficas por iniciador variou de três (I 822 e I 812) a doze (I 808), e o polimorfismo variou de 42,85% (I 812) a 100% (I 827). Salla et al., (2002) ao avaliarem a diversidade genética de 24 genótipos de *Malpighia emarginata* utilizando 37 iniciadores RAPD, obtiveram 164 fragmentos de DNA, onde 149 foram polimórficas (90,8%).

Tabela 1. Sequência do iniciador, bandas geradas e bandas polimórficas obtidas a partir da adoção dos 20 iniciadores ISSR utilizadas na caracterização dos genótipos de aceroleira

Iniciador	Seqüência (5' → 3')	BG	BP	Polimorfismo (%)	Temp. anelamento (°C)
808	5' AGA GAG AGA GAG AGA GC	14	12	85,71	50
822	5' TCT CTC TCT CTC TCT CA	4	3	75	46
826	5' ACA CAC ACA CAC ACA CC	9	6	66,66	51,8
816	5' CAC ACA CAC ACA CAC AT	8	7	87,5	47
811	5' GAG AGA GAG AGA GAG AC	9	7	77,77	51
846	5' CAC ACA CAC ACA CAC ART	15	11	73,33	51,8
817	5' CAC ACA CAC ACA CAC AA	9	8	88,88	49,3
827	5' ACA CAC ACA CAC ACA CG	10	10	100	52,8
812	5' GAG AGA GAG AGA GAG AA	7	3	42,85	50,4
857	5' ACA CAC ACA CAC ACA CYG	12	10	83,33	54,3
828	5' TGT GTG TGT GTG TGT GA	8	7	87,5	50,0
829	5' TGT GTG TGT GTG TGT GC	7	5	73,43	53,4
834	5' AGA GAG AGA GAG AGA GYT	10	6	60	49,2
818	5' CAC ACA CAC ACA CAC AG	9	8	88,88	50
830	5' TGT GTG TGT GTG TGT GG	8	7	87,5	52,7
848	5' CAC ACA CAC ACA CAC ARG	11	9	81,81	52,7
821	5' GTG TGT GTG TGT GTG TT	8	6	75	50,3
841	5' GAG AGA GAG AGA GAG AYC	11	8	72,72	51
823	5' TCTCTCTCTCTCTCG	8	7	87,5	47,1
844	5' CTC TCT CTC TCT CTC TRC	9	8	88,88	48,6
TOTAL		186	148		

BG= Bandas Geradas; BP= Bandas Polimórficas.

Salla et al., (2002), citam que a variabilidade detectada com marcadores de DNA concorda igualmente com as informações existentes sobre a origem dos genótipos de acerola cultivados no Brasil. No entanto, apesar de ter uma base genética estreita, uma elevada

segregação genética pode ainda ser observada em pomares onde sementes são intensamente utilizadas na produção de mudas (Carvalho, 1998). Na Figura 1 encontra-se o padrão obtido a partir do iniciador de código I 841.

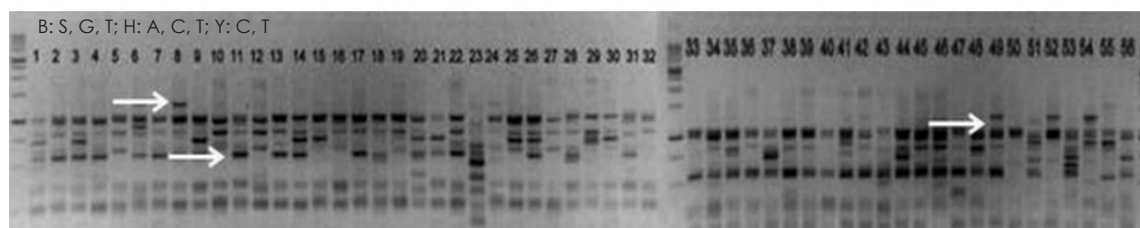


Figura 1. Padrão de amplificação de 56 genótipos de aceroleira utilizando o iniciador I 841. Linhas laterais correspondem ao marcador de 1kb e colunas de 1 a 56 correspondem aos clones de aceroleira. As setas indicam bandas polimórficas

A partir do polimorfismo identificado foi possível determinar a matriz de distâncias entre os acessos. As distâncias genéticas entre os 56 clones variaram entre 0,358 e 0,766. A menor distância genética (0,358) foi obtida entre os genótipos 8 (26/6/5) e 9 (26/8/7). A maior distância genética (0,766) foi observada entre os genótipos 32 (68/1/15) e 36 (12/7/15).

A utilização do método de otimização de Tocher, fundamentado na dissimilaridade, possibilitou a distribuição dos genótipos estudados em 28 grupos distintos (Tabela

2). Verifica-se uma grande distribuição dos genótipos em grupos diferentes, indicando uma ampla diversidade entre os genótipos avaliados. Oliveira et al., (2009), estudando a divergência genética utilizando marcadores moleculares RAPD entre 48 acessos de aceroleiras pelo método de Otimização de Tocher, agrupou os mesmos em 13 grupos distintos. Por outro lado, Filho et al., (2010), avaliando a diversidade genética de 25 acessos de goiabeiras, pelo método de Tocher foi possível separar em 12 grupos distintos.

Tabela 2. Agrupamento dos 56 clones de aceroleiras, pelo método de Tocher, com base na dissimilaridade expressa pelo Complemento Aritmético do Índice de Jaccard.

Grupos	Clones
I	1 (8/4/1), 2 (8/4/8) e 4 (20/4/5)
II	3 (12/7/3) e 5 (20/6/1)
III	6 (23/7/90) e 8 (26/6/5)
IV	7 (26/6/3) e 9 (26/8/7)
V	10 (38/6/1) e 12 (91/7/9)
VI	11 (38/7/1) e 13 (47/5/2)
VII	14 (51/3/4) e 16 (56/6/5)
VIII	15 (56/3/4) e 17 (56/7/7)
IX	18 (72/3/3) e 20 (71/7/4).
X	19 (72/3/8) e 21 (72/7/4)
XI	22 (79/10/9) e 24 (23/7/16)
XII	23 (79/10/9) e 25 (26/2/12)
XIII	26 (26/2/16) e 28 (87/11/15)
XVI	27 (51/7/16) e 29 (66/7/14)
XV	30 (66/7/15) e 32 (68/1/15)
XVI	31 (68/1/14) e 33 (26/5/13)
XVII	34 (51/3/17) e 36 (12/7/15)
XVIII	35 (26/8/14) e 37 (20/4/17)
XIX	38 (56/7/10) e 40 (BRS 152)
XX	39 (C71) e 41 (BRS 235)
XXI	42 (BRS 236) e 44 (BRS 238)
XXII	43 (BRS 237) e 45 (F. Branca)
XXIII	46 (Okinawa) e 48 (Mineira)
XXIV	47 (Barbados) e 49 (II 47/1)
XXV	50 (Camta 40-2) e 52 (BV 7)
XXVI	51 (BV1) e 53 (Monami)
XXVII	54 (FP 19) e 56 (C69)
XXVIII	55 (f.t)

No primeiro grupo observa-se a presença de três clones (5, 36%) (Tabela 02). Este grupo foi o que concentrou mais indivíduos. Geralmente, os grupos maiores, formados por mais acessos, agrupam os pares que apresentam menores distâncias, uma vez que o tamanho do grupo é delimitado por uma distância média entre os pares de indivíduos (Oliveira et al., 2009).

Os grupos (I, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII,

XXIII, XXIV, XXV, XXVI, XXVII) apresentaram dois acessos cada. Por outro lado, o grupo XXVIII foi formado por apenas um clone 55 (FLÓRIDA T). Segundo Vieira et al., (2008) grupos formados por apenas um indivíduo apontam na direção de que tais indivíduos sejam mais divergentes em relação aos demais, como pôde ser observado neste trabalho. Caixeta et al. (2003), estudando variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. por meio de marcadores

RAPD, observaram a formação de dois grupos isolados, sendo os mesmos considerados os mais divergentes entre os 44 genótipos estudados.

De acordo com Fonseca et al., (2006), alta variabilidade genética possibilita a identificação de genótipos divergentes e, por conseguinte, possíveis combinações híbridas de maior efeito heterótico, e assim, permitindo em suas gerações segregantes o desenvolvimento de genótipos superiores. Devendo-se, portanto, na seleção de genitores para cruzamentos, procurar sempre aliar o bom desempenho fenotípico dos genótipos com a divergência genética.

Lopes et al., (2002), estudando o polimorfismo isoenzimático de aceroleira, sugerem que o alto grau de polimorfismo observado nesta cultura seja um indicativo de considerável taxa de cruzamento, confirmando a predominância de alogamia da aceroleira. Segundo Oliveira et al., (2007), estudos de diversidade sugerem que há uma tendência em germoplasma de plantas arbóreas e arbustivas, alógamas ou autógamas com alta taxa de alogamia, especialmente naquelas pouco melhoradas, apresentarem alto polimorfismo. Portanto, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho constata-se a possibilidade de se obter ganhos genéticos significativos com o emprego dos clones considerados nesta avaliação a partir do seu emprego em futuros programas de melhoramento genético.

Conclusão

Há significativa variabilidade genética entre os clones estudados. O clone 55 (FLÓRIDA T) foi o mais divergente, podendo ser indicado para cruzamentos em programa de melhoramento da cultura da aceroleira. Entretanto, o mesmo necessita de análises morfológicas para que seja verificado os seus atributos de qualidade.

Referências

Almeida Junior, E.B. de. 2010. Diversidade de *Manilkara Adans.* (Sapotaceae) para o Nordeste do Brasil. 158f. (Tese de Doutorado)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

Caixeta, R.P., Carvalho, D., Rosado, S.C.S., Trugilho, P.F. 2003. Variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. detectada por

meio de marcadores moleculares. *Revista Árvore* 27: 357-363.

Carvalho, R.I.N. 1998. Variabilidade em plantas jovens de aceroleira propagadas por semente. *Agropecuária Catarinense* 11: 16-18.

Cruz, C.D. 2008. Programa GENES: Diversidade Genética. Viçosa MG, UFV. 278p.

Cruz, C.D.; Carneiro, P.C.C. 2003. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV.

Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1987. A RAPD isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 1: 11-15.

Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews* 5: 435-445.

Eloi, I.B. de B. 2010. Marcadores microssatélites para a análise da variabilidade genética e da estrutura de populações de milho pipoca (*Zea Mays* L.). 76f. (Dissertação de Mestrado)- Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa-CENARGEM, 220p.

Filho, A.G., Oliveira, J.G. de., Viana, P. A., Siqueira, A.P. de O., Oliveira, M.G., Pereira, M.G. 2010. Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.). *Acta Scientiarum. Agronomy* 32: 627-633.

Franzon, R.C., Castro, C.M., Raseira, M.do.C.B. 2010. Variabilidade genética em populações de pitangueira oriundas de autopolinização e polinização livre, acessada por AFLP. *Revista Brasileira Fruticultura* 32: 240-250.

Fonseca, A.F.A., Sedyama, T., Cruz, C.D., Sakayama, N.S., Ferrão, M.A.G., Bragança, S.M. 2006. Divergência genética em café conilon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 599-605.

Lanza, M.A., Guimarães, C.T., Schuster, I. 2000. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. *Informe Agropecuário*, 21: 97-108.

Lopes, R., Bruckner, C.H., Finger, F.L., Lopes, M.T.G. 2002. Polimorfismo isoenzimático e potencial de utilização das isozimas como marcadores genéticos em aceroleira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37:151-158.

Maciel, M.I.S., Mélo, E., Lima, V., Souza, K.A., Silva, W. 2010. Caracterização físico-química de frutos de genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.). *Ciência e Tecnologia de*

Alimentos 30: 865-869.

Maciel, M. I. S., Silva, W.S. da, Souza, K.A. de, Melo, E. de. A., Lima, V. L. A. G. de, Pedrosa, E.M. R. 2008. Modificações pós-colheita em frutos de 16 genótipos de aceroleira armazenados sob refrigeração. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 3:157-163.

Oliveira, M.G., Oliveira, J.G., Filho, A.G., Pereira, M.G., Viana, A.P., Filho, G.A.S., Lopes, G.E.M. 2009. Diversidade genética de aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.), utilizando marcadores moleculares RAPD e características morfoagronômicas. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31: 162-170.

Oliveira, M.S.P., Amorim, E.P., Santos, J.B., Ferreira, D.F. 2007. Diversidade genética entre acessos de açazeiro baseada em marcadores RAPD. *Ciências Agrotécnicas* 31: 1645-1653.

Salimath, S.S., Oliveira, A.C. de, Godwin, I.D., Bennetzen, J.L. 1995. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. *Genome* 38: 757-763.

Salla, M.F.S., Ruas, P.M.M., Pípolo, V.C. 2002. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 24:015-022.

Souza, C.M.P.de., Viana, A.P., Ferreira, C.F., Silva, S.de.O. e., Carvalho, A.J.C.de., Berbert, P.A., Sousa, E.F.de. 2008. Avaliação da dissimilaridade genética em genótipos de bananeira (*Musa* spp.) via marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura* 30: 419-424.

Vieira, E.A. Fialho, J.F. Silva, M.S. Fukuda, W.M.G. Faleiro, F.G. 2008. Variabilidade genética do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Cerrados acessada por meio de descritores morfológicos. *Científica* 36: 56-67.

Yamagishi, M., Shigehito, M., Nakatsuka, A., Itamura, H. 2005. Identification of persimmon (*Diospyros kaki*) cultivars and phenetic relationships between *Dyospyros* species by more effective RAPD analysis. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam 105: 283-290.