

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BUTIAZEIRO POR MARCADORES RAPD<sup>1</sup>

ADRISE MEDEIROS NUNES<sup>2</sup>, VALMOR JOÃO BIANCHI<sup>3</sup>, JOSÉ CARLOS FACHINELLO<sup>4</sup>,  
ALEXANDRE ZANARDO DE CARVALHO<sup>5</sup>, GUILHERME CARDOSO<sup>6</sup>

**RESUMO-** O grupo botânico *Arecaceae* é de extremo interesse por compreender plantas em extinção e por apresentar um grande potencial de exploração econômica. O butiazeiro (*Butia capitata* (Mart.) Becc.) ocorre naturalmente no Sul do Brasil. Sua caracterização molecular é de extremo interesse para futuros trabalhos de melhoramento genético. Assim sendo, verificou-se a variabilidade genética existente entre vinte e dois genótipos de butiazeiro da espécie (*Butia capitata*), pertencentes ao BAG (Banco Ativo de Germoplasma) de frutíferas nativas do Centro Agropecuário da Palma – UFPel. Esses genótipos foram analisados usando marcadores do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Um total de 136 fragmentos foram obtidos, sendo 77 polimórficos. O *primer* OPA11 apresentou maior polimorfismo, produzindo 9 perfis diferentes. A análise de agrupamento, realizada pelo método UPGMA, produziu um dendrograma que permitiu a clara separação dos genótipos em dois grupos principais. Verificou-se que, com a técnica de marcadores de RAPD, foi possível obter um perfil molecular único e uma estimativa da variabilidade existente entre os genótipos de butiazeiro avaliados.

**Termos de indexação:** *Butia capitata* Mart., marcadores moleculares, variabilidade genética, *fingerprinting*.

### MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PINDO PALM BY RAPD MARKERS

**ABSTRACT-** The study of the botanical group *Arecaceae* is of extreme interest for evolving several endangered species of plants and for presenting a great potential of economical exploration. The Pindo palm (or wine palm, jelly palm) (*Butia capitata* (Mart.) Becc.) is natural from the south of Brazil. Its molecular characterization is of extreme interest for future researches of genetic improvement. Since little is known about the variability of the species, the existent genetic variability was verified among twenty-two genotypes of Pindo palm (or wine palm, jelly palm), from BAG (Germoplasm Assets Bank) of fruit trees native from the Agricultural Center of the Palma - UFPEL, which were analyzed using markers RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) with Operon Technologies' decamers *primers*. With 21 *primers*, 136 bands were obtained, from which 77 were polymorphic, being the marker OPA11 the most polymorphic, producing 9 different marks. The grouping analysis was accomplished by the separation method of the accesses in two groups. Although a small *primers* number was used, great genetic variability was verified among the genotypes, and they have all been originated from seeds collected in a single geographical area. Markers RAPD are useful in the estimate of the genetic variability among the Pindo palm (or wine palm, jelly palm) genotypes.

**Index Terms:** *Butia capitata* Mart., molecular markers, genetic variability, *fingerprinting*

### INTRODUÇÃO

O grupo botânico *Arecaceae* é de extremo interesse em virtude de ser constituído por plantas em extinção e por apresentar um grande potencial de exploração econômica. Dentro deste grupo está o butiazeiro que possui distribuição pantropical, com apenas algumas espécies adaptadas aos climas mais frios. O gênero *Butia* possui oito espécies descritas na América do Sul, sendo que duas delas são bem distribuídas nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul: *Butia capitata* Mart. e *Butia eriospatha* (Meg.) Bec. (Rossato, 2007).

O avanço da agricultura e a falta de interesse pelas frutas nativas, até pouco tempo atrás, foram os principais motivos da diminuição do número de plantas de butiazeiro em seu habitat. O estímulo para o uso de espécies nativas como alimento e fonte de vitaminas é uma alternativa viável para reduzir o processo de

extinção, promovendo a manutenção e o replantio de espécies, como no caso do butiazeiro.

O conhecimento sobre a genética das populações de butiazeiro, existentes na zona sul do Rio Grande do Sul, é a base para a ampliação do conhecimento dessa espécie, visto que a maioria dos palmares se encontra ameaçado de extinção. Dessa forma, a caracterização molecular é de interesse para futuros trabalhos de melhoramento genético, bem como para outros trabalhos que visem a reduzir a ameaça de extinção dessa espécie.

A caracterização de genótipos, até pouco tempo, era realizada com base nas características morfológicas e agronômicas. Porém, esse tipo de análise não pode ser realizado em qualquer período do ano, e normalmente não é possível ser completado até a produção das frutas, requerendo um custo elevado e tempo prolongado de análise. Além disso, as características são avaliadas de forma subjetiva, podendo sofrer

<sup>1</sup>(Trabalho 232-07). Recebido em: 27-09-2007. Aceito para publicação em: 20-06-2008.

<sup>2</sup>Bióloga, M. Sc./Fruticultura de Clima Temperado, Bolsista do CNPq, Doutoranda do Departamento de Fitossanidade, FAEM-UFPel, (53) 32757388, C.P. 354, 96010-900, Pelotas-RS- E-mail: adrisenunes@gmail.com

<sup>3</sup>Eng. Agr., Dr., Prof. Adjunto Depto. Botânica, Instituto de Biologia-UFPel, Câmpus Universitário, Pelotas-RS, 96010-900. E-mail: valmorjb@yahoo.com

<sup>4</sup>Eng. Agr., Dr., Prof. Titular Depto. Fitotecnia, FAEM-UFPel, (53) 32757124, C.P. 354, 96010-900, Pelotas-RS-Brasil.

<sup>5</sup>Biólogo, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola – UFPel.

<sup>6</sup>Acadêmico do curso de Ciências Biológicas - Instituto de Biologia-UFPel, Bolsista PIBIC/CNPq.

influências ambientais, principalmente quando se estudam cultivares com características muito similares (Bianchi et al., 2002).

Atualmente, o uso de marcadores moleculares é uma ferramenta complementar para a caracterização de germoplasma e, conseqüentemente, para a identificação de populações e raças primitivas (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

A técnica que envolve a detecção de Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) tem sido eficiente na caracterização de genótipos em várias espécies, antes que as características fenotípicas sejam expressas. Essa técnica é considerada um método rápido em relação ao RFLP e produz maior número de marcadores em relação às isoenzimas (Zimback et al., 2003).

Embora algumas técnicas mais recentes, como AFLP e SSR, sejam preferidas por serem mais informativas, muitas vezes os RAPDs, devido à sua simplicidade, baixo custo e menor infraestrutura requerida, ainda são os escolhidos, principalmente por laboratórios que não possuem equipamentos para técnicas mais elaboradas (Upadhyay et al., 2004).

Em palmeiras, Shah et al. (1994) utilizaram RAPDs e comprovaram a eficiência desses marcadores para estudos de diversidade genética de dendê (*Elaeis guineensis*).

Sawazaki et al. (1998) realizaram estudos em palmeiras dos gêneros *Euterpe*, *Bactris*, *Elaeis* e *Syagrus*, a partir de folhas de mudas dessas palmeiras, analisadas por marcadores RAPD. Foi verificada grande variabilidade genética interespecífica, com reconhecimento de híbridos. Os resultados dos marcadores RAPD comprovaram aqueles obtidos com análise de isoenzimas, porém com maior eficácia, pois possibilitaram facilmente a análise de grande número de marcadores genéticos.

Marcadores RAPDs foram utilizados por Souza et al. (2001) para avaliar a hipótese da existência de três raças de pupunha (*Bactris gasipaes*). Pela análise com oito *primers*, obtiveram 80 marcadores, cuja similaridade média estimada pelo coeficiente de Jaccard foi de 0,53. O dendrograma construído pelo método UPGMA revelou dois grandes grupos: um (grupo Pará) sendo formado por 26 plantas da raça Pará, 5 plantas da raça Putumayo e uma planta da raça Solimões; e o outro grupo (grupo Rio Solimões) sendo formado por 29 plantas da raça Solimões, 19 plantas da raça Putumayo e uma planta da raça Pará. A estrutura do segundo grupo sugeriu a existência de apenas uma raça ao longo do Rio Solimões, pois as plantas amostradas ficaram distribuídas em subgrupos sem ordem aparente. A análise genética não apoiou a hipótese de três raças, levando a sugerir que a raça Putumayo estende-se ao longo do Rio Solimões até a Amazônia central.

O potencial da técnica de RAPD na revelação de polimorfismos também foi verificado em acerola (*Malpighia emarginata*), onde foi observada alta variabilidade genética entre os acessos estudados, apesar da estreita base genética da espécie (Salla et al., 2002).

Em pessegueiro e nectarineira, a técnica de RAPD também se mostrou eficiente. Apesar da baixa variabilidade genética existente nessas espécies, esses marcadores foram eficientes para a caracterização molecular (Lima et al., 2003).

Em trabalho realizado com dezessete cultivares de

ameixeira, o alto grau de polimorfismo detectado pelos marcadores RAPD confirmaram o potencial da técnica na análise de *fingerprinting* e sua utilidade na estimativa da variabilidade genética. Através do uso desses marcadores, houve a clara separação das cultivares em três grupos, correspondentes às suas respectivas espécies: *Prunus salicina*, *Prunus domestica* e *Prunus cerasifera* (Bianchi et al., 2003).

No presente trabalho, objetivou-se caracterizar molecularmente, pela técnica RAPD, vinte e dois genótipos de butiazeiro da espécie *Butia capitata* pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da UFPel, localizado no Centro Agropecuário da Palma, para verificar a variabilidade genética existente entre os genótipos desta população.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Caracterização Molecular de Plantas Lenhosas, pertencente ao setor de Fruticultura da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), e no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica, IB/UFPel, no período de março a agosto de 2006.

O material vegetal para análise constituiu-se de folhas jovens, oriundas de 22 genótipos de butiazeiros provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da UFPel. Esse banco de germoplasma possui uma coleção com 121 genótipos de butiazeiro. As sementes utilizadas para a formação desse banco foram coletadas no município de Santa Vitória do Palmar-RS.

Para a extração do DNA, as amostras foram coletadas em tubo tipo eppendorf de 2,0mL e armazenadas a -80°C. O DNA genômico foi extraído conforme protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987), com algumas adaptações.

As amostras foram maceradas com nitrogênio líquido e logo após foram adicionados, em cada tubo, 950µL de tampão de extração (2% CTAB; 1,4M NaCl; 20mM EDTA; 100mM Tris HCl pH 8,0; 1% PVP e 1% β-Mercaptoetanol). Logo após, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°, por 60 min. Depois, em temperatura ambiente, foi adicionado igual volume de clorofórmio/álcool-isoamílico (24:1), agitando por 10 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, por 10 min, aproximadamente 550µL do sobrenadante foram transferido para um novo tubo. Em seguida, foi adicionado igual volume de etanol (-20°C), mantendo as amostras a -20°C, por uma hora, para a precipitação do DNA. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 10 min, seguindo-se a eliminação do álcool sobrenadante. Cada precipitado de DNA foi lavado com etanol 70%, secado e dissolvido em 100 a 200µL de TE pH 8,0, contendo 10µg mL<sup>-1</sup> de RNase e incubado a 37°C, por uma hora.

O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8%. A estimativa da concentração de DNA foi realizada com base na comparação da intensidade das bandas com padrão de DNA Lambda digerido com a enzima *Hind III* e diluído a uma concentração de 15ng L<sup>-1</sup> para utilização em reação em cadeia da polimerase (PCR).

### Análise de RAPD

Para as reações de amplificação, foram utilizados 24 oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* de RAPD da Operon Technologies (OPA1, OPA2, OPA3, OPA4, OPA5, OPA8, OPA9, OPA10, OPA11, OPB1, OPB2, OPB3, OPB4, OPB5, OPB6, OPB7, OPB8, OPB9, OPB10, OPB11, OPB12, OPB13, OPB14 e OPB16). As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador MJ Research PTC-100, por 2 ciclos de 94°C/30s, 36°C/30s, 72°C/120s; 20 ciclos de 94°C/20s, 36°C/15s, 45°C/15s, 72°C/90s; 19 ciclos de 94°C/20s (aumentado 1s /ciclo), 36°C/15s, 45°C/15s, 72°C/120s (aumentado 3s /ciclo), seguido por 10 min de 72°C, conforme descrito por Koller et al. (1993).

O mix de reação teve um volume total de 25µL, contendo: 2,5µL tampão 10x (10mM Tris-HCl pH9,0; 50mM KCl); MgCl<sub>2</sub> (1,5mM); *primer* (0,2µM); dNTPs (0,2 mM cada); Taq DNA polimerase - Invitrogen (1 unidade) e 30 ng de DNA.

Os produtos de amplificação foram separados em cuba de eletroforese horizontal (5 V cm<sup>-1</sup> por 90 minutos) em géis de agarose 1,5%, posteriormente corados com banho em solução de brometo de etídeo por 30 min, e as bandas reveladas sob luz ultravioleta.

As reações de amplificação foram feitas em duplicata, sendo que, para a análise, somente foram considerados os dados dos *primers* que produziram bandas repetidas nas duas amplificações. Os perfis eletroforéticos obtidos foram utilizados para a diferenciação dos genótipos e para construir a matriz de similaridade genética, a qual foi elaborada com os dados produzidos por cada *primer*, registrando-se a presença (1) e ausência (0) de bandas no perfil eletroforético para cada um dos genótipos. A similaridade genética foi calculada usando o coeficiente DICE GS (i j) = 2 a / 2 a + b + c, onde: a = número de bandas polimórficas co-presentes; b = número de bandas em i, e c = número de bandas em j) com "software" NTSYS.pc versão 1.8 (Rohlf, 1993). Realizou-se análise de agrupamento para construir um dendrograma com os dados de similaridade, empregando o método UPGMA (*Unweighted pair group mean average*).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 24 *primers* de RAPD testados, apenas 21 foram selecionados, devido à qualidade, intensidade e repetibilidade dos fragmentos amplificados. De acordo com essas características, os *primers* selecionados foram: OPA1, OPA2, OPA3, OPA4, OPA5, OPA8, OPA9, OPA10, OPA11, OPB1, OPB2, OPB3, OPB4, OPB5, OPB6, OPB7, OPB8, OPB9, OPB10, OPB12 e OPB14. Foi produzido um total de 136 fragmentos, sendo 77 polimórficos (Tabela 1). Os *primers* utilizados amplificaram de 3 até 13 bandas, sendo evidente o polimorfismo entre os genótipos, como demonstrado pelo padrão de bandas de RAPD obtido com o *primer* OPA11 (Figura 1). Através da amplificação com esse *primer* verificou-se a existência de uma grande variabilidade entre os genótipos analisados. Em palmeiras do gênero *Euterpe* (juçara, açai e híbridos), *Bactris* (pupunhas com e sem espinhos) e de dois outros gêneros, *Syagrus* (gariroba) e *Elaeis* (dendê), também foi verificado um elevado grau de polimorfismo quando o *primer*

OPA11 foi empregado (Sawazaki et al., 1998).

Dentre os *primers* de RAPD utilizados no presente estudo, aqueles que possuem maior potencial para utilização, em análise de variabilidade genética em butiazeiro, são: OPA1, OPA11, OPB4, OPB7, OPB9 e OPB10, pois produziram, pelo menos, cinco ou mais bandas polimórficas. A média de fragmentos (bandas) amplificados, por *primer*, foi igual a 6,5, sendo que o *primer* OPA4 não produziu nenhuma banda característica (Tabela 1).

Com base na similaridade genética média, calculada para os 22 genótipos de butiazeiro analisados, verifica-se no dendrograma (Figura 2) a presença de cinco grupos, sendo três deles formados por genótipos únicos (8; 9 e 10) e outros dois grandes grupos. O primeiro grupo associa dez genótipos com similaridade que varia de 80% a 95%, e o segundo grupo associa nove genótipos com similaridade que varia de 65% a 85%.

O maior grau de similaridade genética foi observado entre os genótipos 4 e 6 (95%), enquanto a menor similaridade genética se encontra entre os genótipos 8; 9 e 10.

Na Figura 1, são apresentados alguns padrões de amplificação obtidos para os 22 genótipos analisados. Conforme pode ser observado no perfil eletroforético dos fragmentos obtidos com os *primers* OPB4, houve um padrão de amplificação característico entre os genótipos de 8 a 13 e de 16 a 20; entretanto, como pode ser observado no dendrograma (Figura 2), apenas alguns desses genótipos se agruparam relativamente próximos, a exemplo de 16; 17 e 20; 11 e 13; 18 e 19, supondo que se trata de indivíduos irmãos ou parentes muito próximos. Por outro lado, os genótipos 8; 9 e 10 ficaram muito distantes na árvore, em relação aos demais.

O baixo grau de similaridade observado nos genótipos 8; 9 e 10 pode ser resultado da segregação genética promovida por polinização cruzada realizada por insetos que introduziram pólen de locais relativamente distantes em relação ao local de coleta das sementes, uma vez que todos os genótipos foram obtidos de sementes procedentes de uma mesma localidade, em Santa Vitória do Palmar. Outra possibilidade é que essas plantas sejam derivadas de sementes provenientes de outras localidades, resultando em mistura varietal, fato importante para obter variabilidade genética. No dendrograma, verifica-se que os genótipos pertencentes ao subgrupo dois apresentam menor similaridade genética entre si, ficando evidente a variabilidade genética existente neste material. Porém, a maior similaridade foi observada no subgrupo um, formado pelos genótipos 1; 3; 4; 5; 6; 7; 14; 15; 21 e 22. Possivelmente, esse resultado se deve ao fato de que estes genótipos, talvez, sejam provenientes de uma única planta-matriz.

Estudos com outros tipos de marcadores são extremamente importantes, pois, dependendo da técnica utilizada, diferentes níveis de polimorfismo na população de butiazeiro poderão ser detectados. Os marcadores microssatélites são os marcadores de DNA que possuem altos níveis de polimorfismo, sendo necessários para evitar uma super ou subestimativa da variabilidade genética existente (Cavalli & Winge, 2003).

Os mesmos genótipos analisados por marcadores RAPD também foram, neste trabalho, submetidos a testes com marcadores de microssatélites isolados de *Euterpe edulis*, porém

não se obtiveram bons resultados de amplificação, sendo um indicativo de que existe baixa transferibilidade dos marcadores empregados entre as espécies de palmeiras *Euterpe edulis* e *Butia capitata* (dados não divulgados). Entretanto, novas análises devem ser conduzidas, alterando-se as condições de PCR e do perfil térmico de amplificação com a finalidade de verificar a viabilidade de transferência de informação genética entre essas espécies de palmáceas, a aplicação de outros marcadores de microssatélites oriundos de espécies correlatas, ou, ainda, a utilização de outras técnicas para melhor avaliar a variabilidade genética entre os genótipos de butiazeiro.

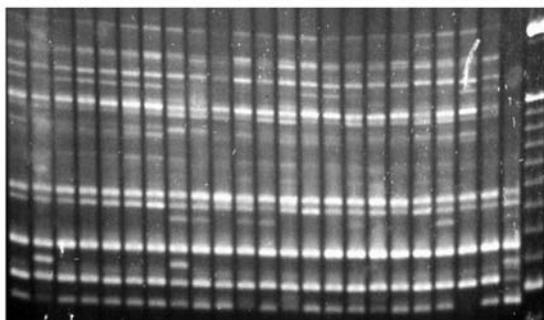
A existência de variabilidade genética é uma condição fundamental para que haja evolução, uma vez que se constitui na mudança das frequências gênicas. O conhecimento da frequência dos genes de uma população é importante para traçar estratégias de conservação e ampliação da variabilidade genética, principalmente de espécies em risco de extinção, evitando, assim, que novas espécies entrem na lista de extintas.

Apesar de a técnica de RAPD ser considerada por muitos pesquisadores como sendo de baixa repetibilidade de

resultados, comparada às outras técnicas moleculares, quando otimizadas as condições da PCR, ela mostra-se eficiente no estudo da variabilidade genética. Verificou-se, neste trabalho, que a técnica de RAPD se mostrou de grande utilidade para estudo de variabilidade genética em *Butia capitata*, considerando a não-existência de dados moleculares sobre essa espécie. Além disso, segundo Upadhyay et al. (2004), essa técnica é mais rápida, mais simples, requer menor quantidade de DNA e tem baixos custos quando comparada a outras técnicas moleculares, conforme já mencionado.

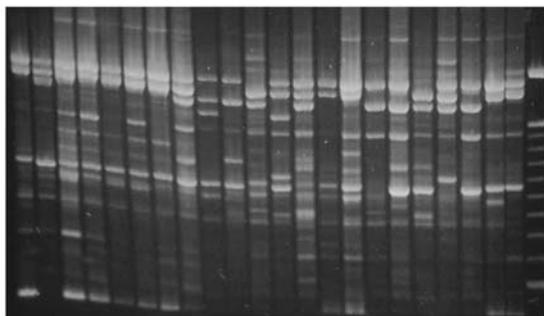
Estudos mais completos, incluindo a utilização de marcadores moleculares, tanto RAPD como de outras técnicas mais avançadas, entre as quais, marcadores AFLP e de microssatélites, devem ser conduzidos com o objetivo de enriquecer os conhecimentos já adquiridos e proporcionar a associação dos marcadores moleculares a características de interesse, contribuindo, dessa forma, ao estabelecimento de estratégias que possibilitem o desenvolvimento de cultivares que possuam um ou vários caracteres desejáveis.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 M



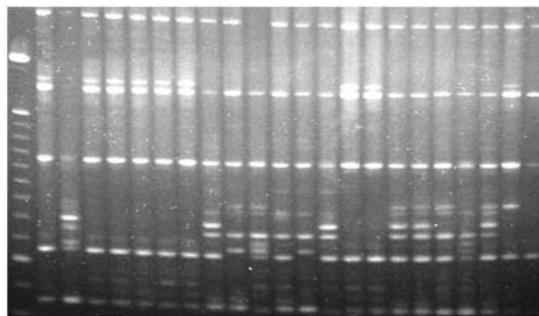
Perfil eletroforético do *primer* OPA1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 M



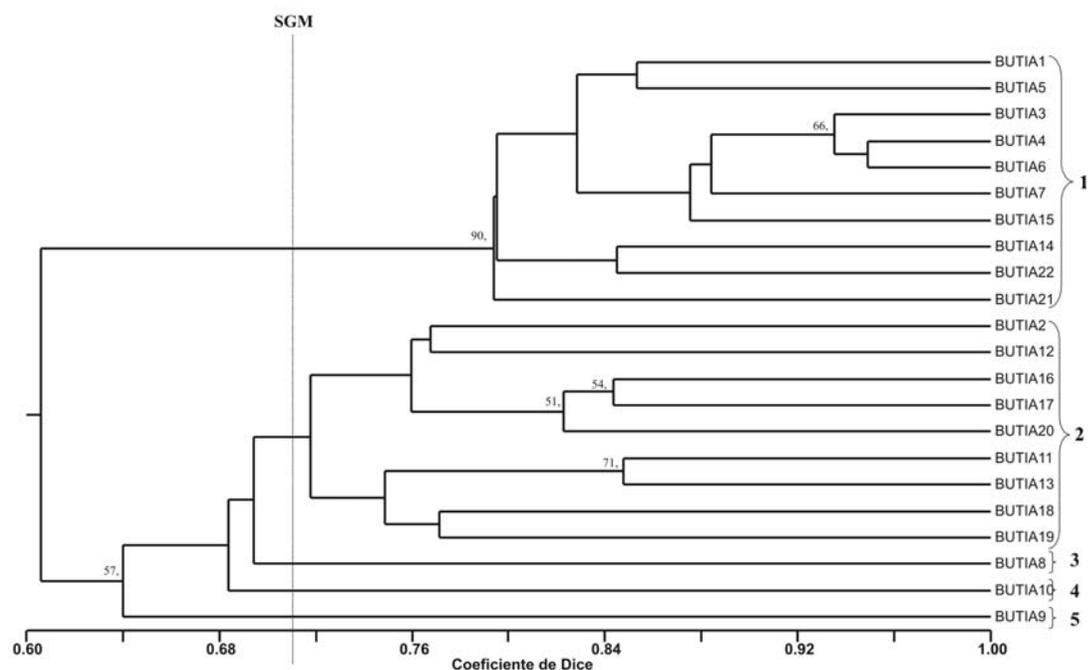
Perfil eletroforético do *primer* OPA11

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22



Perfil eletroforético do *primer* OPB4

**FIGURA 1** - Padrão eletroforético obtido pela amplificação do DNA de 22 genótipos de butiazeiro, utilizando os *primers* de RAPD OPA01, OPA08, OPA11 e OPB04. M=Padrão DNA Ladder 100pb. UFPel, Pelotas-RS, 2007.



**FIGURA 2** – Dendrograma de similaridade de 22 genótipos de butiazeiro, construído a partir dos produtos de amplificação obtidos com os primers de RAPD, usando o método de agrupamento UPGMA. Separado em subgrupos distintos, conforme numeração de 1; 2; 3; 4 e 5. Similaridade genética média (SGM).

**TABELA 1** - Lista dos *primers* utilizados, número total de fragmentos obtidos (FO) e número de fragmentos polimórficos amplificados (FP) FAEM/UFPEL, 2007.

Primer	FO	FP	Primer	FO	FP
OPA1	13	5	OPB3	3	1
OPA2	6	4	OPB4	8	6
OPA3	4	1	OPB5	5	2
OPA4	4	0	OPB6	8	4
OPA5	4	2	OPB7	8	5
OPA8	6	4	OPB8	3	1
OPA9	6	4	OPB9	11	7
OPA10	3	1	OPB10	11	7
OPA11	10	9	OPB12	6	4
OPB1	6	3	OPB14	7	4
OPB2	4	3	<b>Total</b>	<b>136</b>	<b>77</b>

## CONCLUSÕES

A técnica RAPD mostrou-se eficiente na caracterização dos genótipos de butiazeiros, permitindo identificar uma grande variabilidade genética, disponibilizando dados para seleção e conservação de material genético, para futuros trabalhos de melhoramento.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro ao projeto.

## REFERÊNCIAS

- BIANCHI, V.J.; VENTURI, S.; FACHINELLO, J.C.; TARTARINI, S.; SANSAVINI, S. I marcatori AFLP e SSR, rivolutivi nella identificazione genetica delle varietà di susino. **Rivista di Frutticoltura**, Bologna, n.4, p.83-87, 2002.
- BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C.; SCHUCH, M.W. RAPDs na caracterização genético molecular e no estudo da variabilidade genética de cultivares de ameixeira. **Revista Brasileira de Frutticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p.272-274, 2003.
- CASSAS, A.M.; IGARTUA, E.; BALAGUER, G.; MORENO, M.A. Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analyzed by RAPD markers. **Euphytica**, Netherlands, v. 110, n. 1, p. 139-149. 1999. (não consta no texto)
- CAVALLI, S. S.; WINGE, H. Variabilidade genética em populações naturais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UERGS, 2003. 165-176.

- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1996. 220p.
- KOLLER, B.; LEHMANN, J.; McDERMOTT, J.M.; GESSLER, C. Identification of apple cultivars using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.85, p.901-904, 1993.
- LIMA, M.R.; AUGUSTIN, E.; CHOER E, RASEIRA MCB. Caracterização de cultivares de pessegueiro e nectarineira por marcadores moleculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 349-355, 2003.
- ROHLF, F.J. **NTSYS.PC**. Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 1.8. New York: Exeter Publications, 1993.
- ROSSATO, M. Recursos genéticos de palmeiras do gênero *Butia* do Rio Grande do Sul. Pelotas: FAEM/UFPEL, 2007. 135 p. Programa de Pós-Graduação em Agronomia.
- SALLA, M.F.S.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; Carpentieri-Pípulo, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 015-022, 2002.
- SAWAZAKI, H. E.; BOVI, M. L. A.; SODEK, L. Genetic relationships of palms based on enzymatic and RAPD polymorphism. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v.58, n.4, p.681-691, 1998.
- SHAH, F. H.; RASHID, O.; SIMONS, A. J.; DUNSDON, A. The utility of RAPD markers for the determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis*). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.89, p. 713-718, 1994.
- SOUZA, N.R.; RODRIGUES, D.P.; CLEMENT, C.R.; NAGAO, E.O.; ASTOLFI-FILHO, S. 2001. Discriminação de raças primitivas de pupunha (*Bactris gasipaes*) na Amazônia brasileira por meio de marcadores moleculares (RAPDS). **Acta Amazonica**, Manaus, v.31, n.4, p.539-545, 2001.
- UPADHYAY, A.; JAYADEV, K.; MANIMEKALAI, R.; PARTHASARATHY, V.A. Genetic relationship and diversity in Indian coconut accessions based on RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p. 353-362, 2004.
- ZIMBACK, L.; BARBOSA, W.; MORI, E.S.; VEIGA, R.F. de A. Caracterização e identificação de das cultivares de pessegueiro tropical e douradão através de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 352-354. 2003.